

論 文 審 査 の 要 旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

品川 文乃

主論文の題目

題 目 幼若ラットにおけるキノロン系抗菌薬シプロフロキサシンによる関節障害の分子メカニズム

および

掲載誌 聖マリアンナ医科大学雑誌 45 巻 3 号（印刷中）

掲載誌・審査委員

主査 鈴木 真奈絵

副査 遊道 和雄

副査 川畑 仁人

[論文の要旨・価値] キノロン系抗菌薬は幼若動物で関節障害を惹起するため、小児への使用は制限されている。当該関節障害の発症機序は主に軟骨細胞のアポトーシスによると考えられているが、TNF/TNFR1 や活性酸素種によるものなど複数の経路が報告されており、さらに未解明の発症機序も考えられる。本研究はシプロフロキサシン(CFX)による新たな関節障害の発症機序の解明を目的とした。

3 週齢の雄 SD ラットを 6 匹ずつ 3 群に分け、各々 1200mg/kg CFX、600mg/kg CFX、0.5%メチルセルロース(対照)を 1 日 1 回 10 日間経口投与した(承認番号 1602031)。投与終了翌日に採取した膝関節の HE 染色では、軟骨の表層の厚さには差を認めなかったが(1200mg/kg CFX 群 $90.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$, 600mg/kg CFX 群 $85.0 \pm 3.5 \mu\text{m}$, 対照群 $90.3 \pm 4.7 \mu\text{m}$; $p \geq 0.05$)、中間層と深部層では 1200mg/kg CFX 群で対照群に比較し菲薄化を認めた(中間層 $52.7 \pm 2.7 \mu\text{m}$ Vs $73.3 \pm 5.5 \mu\text{m}$, $p < 0.05$; 深部層 $80.8 \pm 10.8 \mu\text{m}$ Vs $140.0 \pm 15.5 \mu\text{m}$, $p < 0.05$)。サフラニン O 染色で、CFX の投与量依存性に軟骨細胞間基質の強度の低下を認めた(1200mg/kg CFX 群 $35.5 \pm 5.6 \text{ AU}$, 600mg/kg CFX 群 $66.7 \pm 3.2 \text{ AU}$, 対照群 $89.9 \pm 2.1 \text{ AU}$; 600mg/kg CFX 群 Vs 対照群, $p < 0.05$; 1200mg/kg CFX 群 Vs 対照群, 1200mg/kg CFX 群 Vs 600mg/kg CFX 群, $p < 0.01$)。電子顕微鏡による観察では、CFX 群でクロマチン濃縮等のアポトーシス特異的な所見を認め、これは 1200mg/kg CFX 群で顕著であった。また 1200mg/kg CFX 群で、小胞体の変性所見を認めた。

1200mg/kg CFX 群および対照群各 3 匹の膝関節軟骨より蛋白質を調整し、液体クロマトグラフィー質量分析にて蛋白質の発現を比較したところ、1200mg/kg CFX 群のみで同定された蛋白質の中に、小胞体ストレスに關与する 78kD glucose-regulated protein (GRP78)を見出した。GRP78 および小胞体ストレス誘導性アポトーシスに關わる転写因子 C/EBP homologous protein (CHOP)について、上記 3 群の膝関節軟骨における発現をウェスタンブロット法により確認したところ、GRP78 の発現には差を認めなかった($p \geq 0.05$)。これに対し、CHOP は 1200mg/kg CFX 群で、対照群に比較し 2.2 ± 0.32 倍($p < 0.01$)、600mg/kg CFX 群に比較し 2.1 ± 0.25 倍($p < 0.05$)と、発現が増加していた。幼若ラット関節軟骨で、CFX により小胞体ストレス誘導性アポトーシスが惹起され、関節障害が生じる可能性が示された。本研究は、CFX による若年性の関節障害において、軟骨のアポトーシスを惹起する経路の 1 つとして小胞体ストレスが關与することを示唆した、価値ある研究であると考えられた。

[審査概要] 主査・副査と陪席者の下で行われ、約 20 分の発表に続き約 30 分の質疑応答がされた。発表は CFX による関節障害及び本研究の内容について、背景や周辺知識も含め分かりやすくまとめられていた。質疑応答では、1. 軟骨以外の関節の障害部位、2. CFX 投与量の妥当性、3. 電子顕微鏡の観察所見における軟骨細胞の形態学的変化の再現性、4. TUNEL 等アポトーシス検出の為の染色法施行の有無、5. 質量分析とウェスタンブロット法の結果の整合性など、多岐に亘る質問がされたが、申請者はほぼ全ての質問に的確に回答した。

最 終 試 験 結 果 の 要 旨

[研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価] 申請者は、本研究内容及び周辺知識を十分に理解しており、研究への意欲が高く専門的学識を有していると判断された。態度・人柄は礼儀正しく誠実であり、発表および全ての質問に真摯に対応していた。英文読解力は、参考論文の一部の和訳により評価し、優れた結果であった。以上より、学位授与に値すると判断された。