

氏 名 (本籍)	工 藤 玄 (青森県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 2 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 1 4 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	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	ピリメタミンと葉酸の同時経口投与による血漿 中 5 メチル四水素葉酸濃度低下のメカニズムに 関する研究
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一 副査 岐阜大学 教授 武 脇 義 副査 岩手大学 教授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教授 小 川 益 男 副査 帯広畜産大学 教授 西 村 昌 数

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

学位論文申請者はその修士課程時代に、葉酸拮抗薬ピリメタミン (PYR) のラットにおける催奇形性について研究し、①PYRを妊娠ラットに投与すると奇形が発現する、②その奇形発現はビタミンである酸化型葉酸 (FA) を同時投与すると増強される、という奇異な現象を発見した。毒性の増強である。その後の研究でこの毒性強化は、PYRとFAを同時投与した時の葉酸代謝の増悪と連動していることが実験証明された。しかしPYRとFAを同時投与するとなぜ葉酸代謝が増悪するかの機序については、依然不明のままであった。申請者はこの機序について研究し、学位論文にまとめた。

PYRとFAの同時投与による葉酸代謝増悪の機序については、第1章と第2章に記載した。第1章では、ラットの葉酸恒常性維持に重要な働きをしている体内葉酸 (還元型) の腸肝循環に対する、経口投与したFAの影響についてまとめた。麻酔下でラットを開腹し、腸管ループを作りループ内にアイソトープラベルした種々葉酸を注入し、葉酸吸収経路での競合を調べた。その結果、①経口投与したFAは腸管での還元型葉酸の吸収を阻害し、代わりに自身が体内循環に入ること、②代わりに体内に入ったFAは体内にある葉酸拮抗剤PYRのために還元葉酸になれな

いことを、胆汁中の還元型葉酸の濃度変化の推移から発見した。③体内葉酸はF Aのため体外に排泄されてしまう。従ってP Y R存在下ではF Aと投与すると体内葉酸量は減少するという機序である。葉酸は還元型でなければ活性を持たず、ビタミン葉酸（F A）は体内で還元されて、初めて活性を持つ。この実験証明は、葉酸代謝の増悪の有力な機序として学会でも広く支持されたが、この機序だけでは、奇形増強反応を起こすに十分な葉酸代謝の増悪は起こらないのではないかと、という学会での指摘も受けた。そこで申請者はさらに、体内葉酸の腎排泄に及ぼすF Aの影響を検討し、第2章にまとめた。代謝ケージ内で飼育したラットにP Y RとF Aを同時投与し体内葉酸の尿中排泄と血漿中葉酸濃度の変化から、体内葉酸の動態を解明した。その結果P Y R単独投与時に比べて、体内葉酸の排泄が圧倒的に多くなる事実を発見した。つまりF Aは腎尿管でも体内葉酸の再吸収を阻害し体内葉酸を尿中に排泄させることが判明した。第1章と2章の内容については、葉酸関連の国際学会でトピックスとして扱われ、学会を賑わせた。

申請者はさらにこの葉酸拮抗薬の毒性を葉酸が増強する事実が、ラット以外の動物種でも起こるのかについて興味を持ち、マウスを使って催奇形性試験を行った。この内容は第3章にまとめたP Y Rのマウスにおける催奇形用量を測定し、これにF Aを同時投与したときの奇形発生率と、マウスの葉酸代謝を調べた。その結果ラットの場合と同様に、マウスでもF AはP Y Rの奇形発生率を増加させ、またマウスの葉酸代謝を増悪させることが証明できた。

申請者がテーマとしたP Y Rは、葉酸代謝拮抗薬というカテゴリーの薬物である。このカテゴリーの薬物は他にも多い。申請者はP Y R以外の葉酸代謝拮抗薬でも同様な事象が起こるのかについて興味を持ち、制ガン薬として人体に使われているメトトレキサートについて研究した。その結果P Y Rで見られた現象がメトトレキサートでも見られることが確認された。この結果は第4章にまとめた。

以上工藤玄の学位論文内容を要約すると、1) F Aは腸管内と腎尿管内で体内葉酸の体内循環を遮断し、体内葉酸を体外に排泄させる、2) 代わりに入ったF Aが体内で還元されれば葉酸代謝は健全に保たれるが、葉酸代謝拮抗薬の存在下では還元が行われなため葉酸欠乏の状態になる、3) これはラットだけでなく、他の多くの動物種にも起こる事象であることが推察される。葉酸拮抗薬とビタミン葉酸（F A）の配合は人体でも使われており、本論文はその危険性について警告した薬理・毒性学上重要な内容のものとする。

## 審 査 結 果 の 要 旨

学位論文申請者はその修士課程時代に、葉酸拮抗薬ピリメタミン（P Y R）のラットにおける催奇形性について研究し、①P Y Rを妊娠ラットに投与すると奇形が発現する、

②その奇形発現はビタミンである酸化型葉酸（FA）を同時投与すると増強される、という不思議な現象を発見した。この現象についてはその後、東京農工大学家畜薬理学教室で研究が進展し、PYRとFAを同時投与すると葉酸代謝が増悪することが原因であることが実験証明された。しかし同時投与するとなぜ葉酸代謝が増悪するかの機序については、不明のままであった。申請者は修士課程終了後製薬企業の研究所に勤務したが、上記の葉酸代謝の増悪機序を解明したいという意欲のため、本研究科に社会人学生として入学し、4年間の努力により本学位請求論文を提出した。

申請者が当初目標とした、PYRとFAの同時投与による葉酸代謝増悪の機序については、論文の第1章と第2章にまとめてある。第1章では、ラットの葉酸恒常性維持に重要な働きをしている体内葉酸（還元型）の腸肝循環に対する、FA投与の影響を検討したものである。ラットで腸管ループを作り、ループ内にアイソトープラベルした種々葉酸を注入して葉酸吸収経路での競合を調べた。その結果、FAは腸管での還元型葉酸の吸収を阻害し、体内葉酸は体外に排泄されてしまうこと、FAは阻害するだけでなく代わりに自身が体内に入ること、さらに胆汁中の還元型葉酸の濃度変化の推移から、代わりに入ったFAは、葉酸拮抗剤PYRのために体内で還元葉酸になれないことを確認した。

この実験証明は、葉酸代謝の増悪の有力な機序として学会でも広く支持されたが、同時にこの機序だけでは、奇形増強反応を起こすに十分な葉酸代謝の増悪は起こらないのではないかという学会での指摘もあり、申請者はさらに、体内葉酸の腎排泄に及ぼすFAの影響を検討した。代謝ケージ内で飼育したラットにPYRとFAを同時投与したところ、PYR単独投与時に比べて体内葉酸の排泄が圧倒的に多くなる事実を発見した。つまりFAは腎尿細管でも、体内葉酸の再吸収を阻害し体内葉酸を尿中に排泄させることが判明した。この研究内容は第2章にまとめた。1章と2章の内容については、葉酸関連の国際学会でトピックスとして扱われ、学会を賑わせた。

申請者はさらにこの葉酸拮抗薬の毒性を葉酸が増強する事実を、ラットだけでなくマウスでも証明し、第3章にまとめた。当初はウサギまたは犬での試験を計画していたが、時間的な問題、技術的な問題などでマウスを使っての研究に代替えた。この経緯は、最終試験の席上で申請者が述べた通りである。

また葉酸拮抗薬についても、PYRだけでなくメトトレキサートについても検討し、第4章にまとめた。この現象がPYRに限られたものではなく、人体用医薬としても広

く使われている葉酸代謝拮抗薬とビタミンの葉酸（FA）の併用は危険であることを警告した。

以上が当学位論文申請者の研究内容についてであるが、12月の代議委員会で正式に審査委員会が発足して以来、種々の通信手段により各審査委員と申請者の間で論文についての質疑応答があり、本日に至った。本日の最終審査では当人からの論文についての説明があり、審査委員との間で論文内容とそれに関連する科学的識見についての応答があり、相互の理解が得られた。

以上のような慎重な審査の結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。