

氏名（国籍）	申 豪 澈（大韓民国）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第14号
学位授与年月日	平成7年3月14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	Enterohepatic Circulation Kinetics of Bile Non-methylated Active Folate Derivatives in Folate Homeostasis in Rats
審査委員	主査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一 副査 帯広畜産大学 教授 齊 藤 篤 志 副査 岩手大学 教授 小 林 晴 男 副査 岐阜大学 教授 武 脇 義 副査 東京農工大学 教授 笹 本 修 司

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、ラットの胆汁中に分泌する非メチル化葉酸の、葉酸代謝の恒常性維持における働きについて述べたものである。I章で葉酸代謝の総論を背景にして本学位論文の研究目的を述べ、II章で胆汁中に分泌する非メチル化葉酸の同定、III章で高速液体クロマトグラフ法による非メチル化葉酸の同時定量法の開発、IV章で胆汁中非メチル化葉酸の腸肝循環と非メチル化葉酸の由来、V章で胆汁中の非メチル化葉酸の動物種差について記載し、VI章で総合討論する構成になっている。

本論文での最も重要な記載は、II章～IV章の前半までにある。ラットの胆汁中には5メチルテトラヒドロ葉酸（5MF）だけでなく他に3種類の非メチル化葉酸が分泌し、それらも5MFと同様に葉酸代謝の恒常性維持機構に役割を果たしているという学説である。従来は5MFだけが腸肝循環し、体内の葉酸代謝の恒常性維持に役割を果たしていると言われてきた。本研究で新たに発見されたラットの胆汁中の非メチル化葉酸とは、テトラヒドロ葉酸、10ホルミルテトラヒドロ葉酸、5-10メチレンテトラヒドロ葉酸の3種類で、学位論文申請者は高速液体クロマトグラフ、電気化学検出器、ボルタモグラム、フォトダイオードアレイ検出器を駆使し、それを同定した。さらに高速液体グラフに電気化学検出器を組み合わせて、4種類の胆汁中葉酸誘導体の同時定量法に成功し、3種の非メチル葉

酸の胆汁中への分泌量が、それぞれほぼ5 MFと同量あることを証明した。高速液体クロマトグラフを使った胆汁中の非メチル化葉酸の分別定量は世界で初めての成功で、専門誌に投稿し既に出版されている。葉酸の定量法として一般的なのはバイオアッセイであるが、バイオアッセイではこのような分別定量は困難である。

論文は次にこのようにして発見された胆汁中の非メチル化葉酸が、ただ分泌しているだけなのか、5 MFと同様に葉酸代謝の恒常性維持機構に役割を果たしているのかというテーマに展開する。ラットを使った麻酔下の実験で、胆汁を体外に排出させた場合は血漿中葉酸(5 MF)は減少し続けるが、この時非メチル化葉酸を腸管に注入すれば、この減少が抑制できることから、胆汁中の非メチル化葉酸はただ分泌しているだけではなく、葉酸代謝の恒常性維持機構に役割を果たしているという結論を導いた。この業績は葉酸代謝についての新たな見解を述べたもので、国内・国際学会で大きな評価を得、2つの学会誌に投稿し、1つは出版され他の1つは現在最終審査中である。

IV章の後半では胆汁中に分泌される3種の非メチル化葉酸の由来について、V章では胆汁中に分泌される葉酸誘導体の種差について記載している。これらの部分はいずれも未完成な部分があるが、魅力あるテーマを将来に残している。IV章の後半では、胆汁中に分泌される3種の非メチル化葉酸の由来についての検討から、葉酸代謝のサルベージ機構について記載している。ラットに5 MFを静注すると胆汁中には5 MFが多量に分泌されるが、非メチル葉酸は余り分泌されない。しかし5 MFの代わりに酸化型葉酸(ビタミン葉酸)を静注すると胆汁中には非メチル葉酸が多く分泌し、5 MFは余り分泌されない。血漿中には5 MFしかないから、胆汁中に分泌される他の非メチル化葉酸は、体内で老化・死滅した細胞中の活性葉酸が生体で酸化されたものではないか、と推論している。つまり生体内で死滅した細胞中に含まれる活性葉酸が酸化され(活性葉酸は酸化され易い)、循環血によって肝臓に運搬され還元され非メチル化葉酸となり胆汁とともに腸管内に排出し、それが腸粘膜でメチル化されて血漿中5 MFになり体内を移動するという、葉酸代謝のサルベージ機構についての仮説が生まれる。この論旨の中での不十分な点は、非メチル化葉酸の基質がまだ生体位で同定出来ていないことである。本論文では代替えとしてビタミン葉酸を基質としているが、例えば死滅した細胞中の活性葉酸が生体で酸化された物を生体に投与して、ビタミン葉酸の場合と同じ様な胆汁中非メチル化葉酸の分泌を起すことを証明できれば、葉酸代謝のサルベージ機構について新たな学説が生まれると考える。

V章の動物種差については豚、モルモット、マウス、兎の胆汁中の活性葉酸について測定し、ラットと比較している。その結果それぞれの動物種で、胆汁中に排出される葉酸誘導体が種類も量も著しく異なることを発見した。従来から葉酸代謝の研究にはラットが多く使われており、ラットについての知見がヒトも含めた哺乳動物の葉酸代謝とされてきた。しかし葉酸代謝の中心にある胆汁中の葉酸分泌にこの様な種差があることは、葉酸代謝は動物種毎に大きな違いあることを示唆する。ここで不十分な点は、高速液体クロマトグラフ測定モードにある。この結果はラットの胆汁中の葉酸誘導体を測定するのモードで得たものであり、それぞれの動物種のモードで測定すれば違った結果になるかも知れない。今後の検討を加え論文公表する予定である。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の中心となる記載は、ラットの胆汁中には5メチルテトラヒドロ葉酸(5MF)だけでなく、他に3種類の活性非メチル化葉酸が分泌しており、それらも5MFと同様に葉酸代謝の恒常性維持機構に役割を果たしているという部分である。従来は5MFだけが体内で葉酸代謝の恒常性維持に役割を果たしているとされてきた。これは論文のⅡ章～Ⅳ章の前半までにある。

論文審査期間中に審査委員から指摘された、内容に関わる主な意見は以下の2点であった。

①Ⅳ章の後半での胆汁中に分泌される4種の非メチル化葉酸の由来についての記載：

胆汁中に分泌される葉酸誘導体の由来で、ラットに5MFを静注すると胆汁中には5MFが分泌されるが、5MFの代わりに酸化型葉酸(ビタミン葉酸)を静注すると、胆汁中には他の葉酸誘導体(非メチル葉酸)が多く分泌する。ラット血漿中には活性葉酸は5MFしか無いから、胆汁中の非メチル化葉酸の由来は酸化型葉酸であろう。しかし生体内にはビタミン葉酸は存在しないので、酸化型葉酸に体内で老化・死滅した細胞中の活性葉酸が生体で酸化されたものではないか。そして肝臓は酸化された葉酸を還元する場所で、腸粘膜が還元型非メチル化葉酸をメチル化する場所という、葉酸代謝のサルベージ機構についての作業区分ができるという、論旨で仮説を立てている。

これに対して、体内で酸化された葉酸をビタミン葉酸で代替えている点、非メチル葉酸の基礎分泌量とサルベージされるという生体内酸化型葉酸量のマスバランスの証明が無い点に問題がある、という指摘があった。

②Ⅴ章での、胆汁中に分泌される非メチル化葉酸の種差について記載：豚、モルモット、マウス、兎の胆汁中の葉酸誘導体の分泌を調べたところ、著しい種差が見つかった。従来から葉酸代謝の研究にはラットが多く使われており、ラットについての知識がヒトも含めた哺乳動物の葉酸代謝とされてきたが、葉酸の体内動態の中心的な位置を占める胆汁中葉酸誘導体の分泌が動物種毎に異なる。以上から申請者は、今後ヒトも含めてそれぞれの動物種について、葉酸代謝を研究し直さなければならないとしている。

この記載について、その主張の意味は分かるが、この結果はラットの胆汁中の葉酸誘導体を測定するのモードでの結果であり、それぞれの動物種の場合に合った測定モードの検討すれば、また別の結果が生まれるかも知れない、という意見が出された。

平成7年1月26日の審査会では、①と②についての審査員の指摘はもっともなものであ

ることが確認された。しかし、Ⅱ章～Ⅳ章の前半までの中心となる記載には十分な科学的な根拠があり合意できること、また①と②の指摘部分についても、将来に意義のあるテーマを残していることから、この論文内容は、申請者の大学院での学習成果を示すもので、学位論文としてふさわしい内容であるという結論となった。

なおこれらの内容は、本学位論文の基礎となる学術論文として4つの学術論文に発表し、3つが印刷され1つが現在最終的な審査中である。