

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 孫 敬

題 目：葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット妊娠期曝露が胎盤および胎児脳へ及ぼす影響

葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate (MTX)は、葉酸代謝過程におけるジヒドロ葉酸還元酵素を拮抗阻害することにより DNA 合成阻害ならびに細胞死・細胞増殖抑制を惹起する。MTX は当該機序を介し抗腫瘍作用・免疫抑制作用・妊娠中絶作用を示すため、医療において広く用いられている。MTX の妊娠期曝露が人・実験動物において流産、胎児・新生児の発達障害を惹起することは知られているが、MTX により誘発された胎盤や胎児脳の病変の病理組織学的所見に関する報告は少なく、詳細な病理発生機序は明らかにされていない。本研究では MTX の妊娠期曝露が胎盤および胎児脳に及ぼす影響およびその病理発生機序を明らかにすることを目的とし、MTX によって誘発された胎盤および胎児脳の病変の経時的変化に関する詳細な病理組織学的解析を実施した。

## (1) Methotrexate が胎盤の発達へ及ぼす影響

MTX 0.2mg/kg の妊娠 11-12 日または 13-14 日のラットへの曝露実験を実施し、以下の知見を得た。

- ・妊娠 11-12 日における MTX 曝露は、①胎児致死率の増加、②胎児重量の減少、③胎盤の矮小化を惹起したことに對し、妊娠 13-14 日曝露群では著変は認められなかった。
- ・妊娠 11-12 日における MTX 曝露は胎盤基底層および迷路層の菲薄化を誘発したが、基底層における変化がより重度であった。一方、妊娠 13-14 日曝露群では両層の菲薄化の程度は妊娠 11-12 日曝露群に比較し明らかに軽微であった。妊娠 11-12 日曝露群における胎盤基底層では細胞死の増加や細胞増殖活性の抑制が認められた。

当該結果より、妊娠 11-12 日における MTX 曝露は、細胞死の誘発や細胞増殖活性の抑制を介して基底層の菲薄化を惹起することが明らかとなった。また、MTX は①妊娠 13-14 日よりも妊娠 11-12 日においてより強く作用すること、②迷路層よりも基底層の構成細胞に対しより強く作用することが示された。過去になされた Cisplatin や 6-Mercaptopurine の曝露実験ではいずれも迷路層に強く菲薄化が誘発されており(Exp Toxicol Pathol 65, 211-217, 2013/ J Vet Med Sci 70, 551-556, 2008)、今回誘発されたような基底層に菲薄化が強く発現するタイプの胎盤病変誘発の報告はなされておらず、本研究が初の報告に相当する。今後、MTX による基底層菲薄化と胎児致死率増加の関連を明らかにする必要がある。

## (2) Methotrexate が胎児脳の神経上皮細胞へ及ぼす影響

MTX 30mg/kg の妊娠 13 日目におけるラットへの曝露実験を実施し、以下の知見を得た。

・妊娠 13 日目における MTX 曝露により、終脳・間脳・中脳・後脳の脳室帯において、神経上皮細胞の apoptosis の誘発および細胞増殖活性の抑制が認められた。終脳脳室帯における apoptotic cell および mitotic cell の存在率の経時的推移状況は Ethylnitrosourea や Busulfan といった他の DNA 損傷性化学物質によるものと一致しなかった (J Toxicol Sci 36, 695-712, 2011)。本相違には体内薬物動態や apoptosis 誘発および細胞増殖活性抑制に至る機序の相違が関与しているのかもしれない。また、後脳において MTX によって誘発された pyknotic cell の存在率は他の脳部位に比較し明らかに低値であることが示された。これに対し、5-Fluorouracil および Busulfan による後脳の pyknosis は他の脳部位に比較し同程度に生じると報告されており、MTX の作用は 5-Fluorouracil および Busulfan に比較し、脳の部位による感受性差が高いことが示唆された。

・MTX によって誘発された apoptosis は全実験期間を通して終脳脳室帯の全層に分布した。胎児脳の脳室帯における神経上皮細胞の核の位置は当該細胞の細胞周期と関係があることが知られている。一方、葉酸欠乏による apoptosis の発生機序には S 期停止、G2 期停止が大きく関与することが報告されている (J Nutr 129, 25-31, 1999)。本研究において、MTX 誘発 apoptosis は脳室帯全層に分布していたことから S 期停止、G2 期停止のみが関与しているのではなく、細胞周期における様々な時期において生じている可能性あるいは細胞周期停止とは無関係に生じている可能性が示唆された。また、本研究において MTX によって誘発された apoptosis の分布状況は、既報の DNA 損傷性化学物質によるものとも一致せず (J Toxicol Sci 36, 695-712, 2011)、既報の化学物質とは異なる機序によって apoptosis を誘発する可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	孫敬
審査委員	主査： 鳥取大学 准教授 杉山晶彦
	副査： 鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査： 山口大学 教授 奥田 優
	副査： 鳥取大学 教授 日笠喜朗
	副査： 鳥取大学 教授 森田剛仁
題目	Effects of prenatal exposure to folate metabolism antagonist, Methotrexate on placenta and fetal brain in rats 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット妊娠期曝露が胎盤および胎児脳へ及ぼす影響
審査結果の要旨： 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate (MTX) は、葉酸代謝過程におけるジヒドロ葉酸還元酵素を拮抗阻害することにより DNA 合成阻害ならびに細胞死・細胞増殖抑制を惹起する。MTX は当該機序を介し抗腫瘍作用・免疫抑制作用・妊娠中絶作用を示すことから医療において広く用いられている。Methotrexate の妊娠期曝露が流死産、胎児・新生児の発達障害を惹起することは知られているが、MTX により誘発された胎盤や胎児脳の病変の病理組織学的所見に関する報告は少なく、詳細な病理発生機序は明らかにされていない。本研究では MTX の妊娠期曝露が胎盤および胎児脳に及ぼす影響およびその病理発生機序を明らかにすることを目的とし、MTX によって誘発された胎盤および胎児脳の病変に関する病理組織学的解析を実施した。本研究により得られた結果の概要は下記の通りである。  第 1 章では、MTX を妊娠 11-12 日または 13-14 日のラットへの曝露実験を実施し、MTX が胎盤の発達へ及ぼす影響を検討した。その結果、以下の知見が得られた。 ・妊娠 11-12 日における MTX 曝露は、①胎児致死率の増加、②胎児重量の減少、③胎盤の矮小化を惹起したことに對し、妊娠 13-14 日曝露群では著変は認められなかった。 ・妊娠 11-12 日における MTX 曝露は胎盤基底層および迷路層の菲薄化を誘発したが、基底層における変化がより重度であった。一方、妊娠 13-14 日曝露群では両層の菲薄化の程度は妊娠 11-12 日曝露群に比較し明らかに軽微であった。妊娠 11-12 日曝露群における胎盤基底層では細胞死の	

増加や細胞増殖活性の抑制が認められた。

当該結果より、妊娠 11-12 日における MTX 曝露は、細胞死の誘発や細胞増殖活性の抑制を介して基底層における重篤な菲薄化を惹起することが明らかとなった。また、MTX は①妊娠 13-14 日より妊娠 11-12 日においてより強く作用すること、②迷路層よりも基底層の構成細胞に対しより強く作用することが示された。過去になされた Cisplatin や 6-Mercaptopurine の曝露実験ではいずれも迷路層に強く菲薄化が誘発されており、今回誘発されたような基底層に菲薄化が強く発現するタイプの胎盤病変誘発の報告はなされておらず、本研究が初の報告に相当する。

第 2 章では、MTX 30mg/kg の妊娠 13 日目におけるラットへの曝露実験を実施し、Methotrexate が胎児脳の神経上皮細胞へ及ぼす影響を検討した。その結果、下記の知見が得られた。

・妊娠 13 日目における MTX 曝露により、終脳・間脳・中脳・後脳の脳室帯において、神経上皮細胞の apoptosis の誘発および細胞増殖活性の抑制が認められた。終脳脳室帯における apoptotic cell および mitotic cell の存在率の経時的推移状況は Ethylnitrosourea や Busulfan といった他の DNA 損傷性化学物質によるものと一致しなかった。本相違には体内薬物動態や apoptosis 誘発および細胞増殖活性抑制に至る機序の相違が関与しているのかもしれない。また、後脳において MTX によって誘発された pyknotic cell の存在率は他の脳部位に比較し明らかに低値であることが示された。これに対し、5-Fluorouracil および Busulfan による後脳の pyknosis は他の脳部位に比較し同程度に生じると報告されており、MTX の作用は 5-Fluorouracil および Busulfan に比較し、脳の部位による感受性差が高いことが示唆された。

・MTX によって誘発された apoptosis は全実験期間を通して終脳脳室帯の全層に分布した。胎児脳の脳室帯における神経上皮細胞の核の位置は当該細胞の細胞周期と関係があることが知られている。一方、葉酸欠乏による apoptosis の発生機序には S 期停止、G2 期停止が大きく関与することが報告されている。本研究において、MTX 誘発 apoptosis は脳室帯全層に分布していたことから S 期停止、G2 期停止のみが関与しているのではなく、細胞周期における様々な時期において生じている可能性あるいは細胞周期停止とは無関係に生じている可能性が示唆された。また、本研究において MTX によって誘発された apoptosis の分布状況は、既報の DNA 損傷性化学物質によるものとも一致せず、既報の化学物質とは異なる機序によって apoptosis を誘発する可能性が示唆された。

本研究は、葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate の妊娠期曝露が胎盤および胎児脳に誘発する病態の病理発生機序を解明する上で極めて重要な知見を提示しており、獣医学研究のさらなる発展に資すると判断できる。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位授与に値するものであると認める。