白血球アラキドン酸代謝を介する eicosapentaenoic acid の抗炎症作用

寺 野 隆*

Anti-inflammatory effect of eicosapentaenoic acid through the modulation of arachidonic acid metabolites in leukocytes Products derived from arachidonic acid (AA) via both the cyclooxygenase (particularly PGE_2) and lipoxygenase (particularly LTB_4) play a role in inflammation. To clarify the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on inflammation, EPA ethyl ester (80% pure, 240 mg/kg/day) was administered for 4 weeks to the rats. The supplementation of a standard rat diet with EPA caused a significant increase in the formation of LTB_5 , which is biologically for less active (at least 30 times) than LTB_4 , and a decrease in the synthesis of LTB_4 by A 23187 stimulated leukocytes. The EPA rich diet significantly increase the EPA content of leukocytes phospholipids without altering the content of AA, DHA and linoleic acid.

Then, antiinflammatory effect of EPA was assessed using two models of acute inflammation. In the first model EPA fed rat (240 mg/kg/day for 4 weeks) produced significantly lower concentration of PGE_2 and TXB_2 in inflammatory exudate derived from implantation of carrageenin impregnated sponges. Triene prostaglandin were not detected in the exudate however certain level of LTB_5 were present. In the second model, edema induced by injection of carrageenin into rat paws were significantly reduced in animals fed an EPA rich diet. Supplementation of the diet with EPA could, by reducing the synthesis of PGE_2 and LTB_4 and increasing LTB_5 (less active biologically), offer a novel and nontoxic approach to the modulation of an inflammatory response.

Further *in vitro* experiment disclosed that EPA was better substrate for 5-lipoxygenase than AA but was less favoured substrate for LTA hydrolase. EPA or its oxygenated metabolites, such as LTA_5 or LTB_5 , inhibits LTB_4 formation particularly at the level of LTA hydrolase.

Takashi Terano*

* 2nd Department of Internal Medicine Chiba University School of Medicine

key words : eicosapentaenoic acid, anti-inflammation, LTB_4 , LTB_5 , PGE_2

海獣類, サカナを主食とするエスキモー人に心筋梗塞の発症が少ないという疫学調査¹⁾により脚光を浴びたエイコサペンタエン酸 (EPA) は, 魚油に含まれ, 二重結合を5個有する炭素数20個の多価不飽和脂肪酸で, 経口摂取により体内で増加する。このEPAが, 血小板, 血管壁でのプロスタグランジン(PG)産生調節を介して抗血栓作用を発揮することは周知の事実である²⁾。その抗血栓作用の機序は, 血小板シクロオキシゲナーゼ(CO)抑制³⁾, アラキドン酸(AA)の膜よりの遊離抑制³⁾などを介する prothrombotic な TXA_2 産生の抑制, 血管壁での antithrombotic な PGI_2 や PGI_3 産生増加^{4,5)} 赤血球変形能, 全血粘度の改善⁶⁾など多岐にわたる。

EPA は, CO の基質とはなりにくいが²⁾, もう一つのAA代謝酵素であるリポキシゲナーゼ(LO)のよい基質⁷⁾となり, EPA由来のLO代謝産物(LTB_5 , LTC_5 ,

LTD_5)が近年報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

PGとりわけ PGE_2 が炎症のメディエーターであることは周知の事実であるが, 5-LOを経てAAより産生されるロイコトリエン B_4 (LTB_4)も強力な白血球遊走作用を有し, 炎症惹起に重要な役割を果たす¹¹⁾。

EPAを多食するエスキモー人には, 心筋梗塞をはじめとする血栓性疾患のみならず, 慢性関節リウマチ, 潰瘍性大腸炎, 乾癬などの慢性炎症性疾患も少ない¹²⁾。さらに, 魚油をsystemic lupus erythematosus(SLE)のmodel miceに投与すると, その自己免疫性腎症の発症が抑制され生存期間の延長が認められた¹³⁾。

最近, 筆者は, EPAが5-LOのよい基質となることを確認し, さらに, EPA由来の5-LO代謝産物である LTB_5 の生物活性を, 白血球凝集, 白血球走化, リゾチーム酵素の放出などでみると, その活性が, AA由来の LTB_4 の1/30以下であることを報告した¹⁴⁾。そこで筆者は, PG代謝産物の産生を調節して, 抗血栓作用を発

* 千葉大学医学部第二内科学教室

揮する EPA が, PG, LTB_4 と関連のふかい炎症の場合においても PG, LT の産生を調節することにより, 抗炎症作用を発揮しうるかを, 以下のごとく検討した。

まず, ラットに EPA を投与し, 投与前後の白血球での脂肪酸構成の変化と, 白血球での LTB_4 と, 生物活性の低い LTB_5 の産生の変化を観察した。つぎに, 2種の炎症モデルを用い, EPA 投与がモデル動物で抗炎症作用を示しうるか, また, その際, 炎症の場合での PG, LT の産生はどのように変化するかを検討し, 最後に *in vitro* の系を用い, EPA がどのような機序で 5-LO 代謝産物産生を調節しているかを明らかにした。

方法と材料

(1) EPA 経口投与後のラット白血球 LTB_4 , LTB_5 の産生

① EPA 投与プロトコール

雄性ウィスターラット (150 g) 20匹に通常ラット食を与え, それに EPA ethyl ester (80%純度, 日本水産) を oil in water emulsion の形で EPA 換算 240 mg/kg/day 4週間胃管を用いて連日投与した。対照群には, EPA 投与時の vehicle である水 1 ml を同様に胃管を用い連日投与した。餌・水の摂取は自由とし, 毎週体重測定を行った。

② ラット白血球での LTB_4 と LTB_5 の産生

ラット白血球は既法に準じて調整した¹⁴⁾。すなわち, ラットの腹腔内に 20 ml の 0.2% oyster glycogen (type II, Sigma) 加生食を注射し, 17時間後に窒息死させ, 20 ml HEPES buffered Hanks balanced salt solution pH 7.4 (HHBS, 日本製薬) で腹腔内を洗浄しつつ浸出液を集め, 5×10^7 cells/ml の白血球浮遊液を準備した。白血球の80%は好中球で, 残りは単核球であった。おのおののラットの白血球浮遊液 1 ml を 37°C で10分予熱後終濃度 $10 \mu\text{M}$ Ca ionophore A 23187 (Calbiochem) を加え, 10分間 37°C で刺激し, 2 ml のエタノールで反応を停止した。

抽出は, 内部標準物質の PGB_3 500 ng¹⁵⁾ を加えた後, 反応液を水で希釈し, 15%エタノール溶液をつくり, さらに, 2M クエン酸でその pH を 3.5 に調整後, メタノール, 水 各 20 ml で予洗した ODS silica mini-column (C_{18} -Sep-Pak) にアプライし, カラムを水 20 ml で洗浄後 1 ml の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用酢酸エチルで溶出して行った。これを N_2 ガス下で乾固後, HPLC の溶剤 (メタノール/水/酢酸 = 70/30/0.01, pH 5.7) にとき, 逆相 (RP-)HPLC にアプライし, 産生された LTB_4 , LTB_5 を, PGB_3 を内標とし 270 nm での紫外吸収測定により定量した。ポンプは, Waters 6000 A を用い, $5 \mu\text{m}$ ODS (Laboratory data control 社, 250×4.5 mm) カラムを使用し, flow 1 ml/

表 1 formation of LTB_4 and LTB_5 by A23187-stimulated leukocytes from control rats and EPA fed rats

treatment	LTB synthesis (ng/5 $\times 10^6$ cells)		ratio
	LTB_4	LTB_5	$\text{LTB}_5/\text{LTB}_4$
control group (n=13)	44.0 $\pm$ 4.74	2.56 $\pm$ 0.51	0.055 $\pm$ 0.007
EPA fed group (n=13)	37.3 $\pm$ 6.91	9.22 $\pm$ 1.78*	0.259 $\pm$ 0.015**

The amounts of LTB_4 and LTB_5 were assayed separately by RP-HPLC using PGB_3 as internal standard.

Results are presented as mean $\pm$ SE

*P < 0.01

**P < 0.001

図 2 effect of oral administration of EPA on fatty acid composition of rat leukocyte phospholipids

fatty acid	fatty acid composition (mole %)	
	control group (n=8)	EPA fed group (n=16)
16:0	22.85 $\pm$ 0.31	21.93 $\pm$ 0.62
18:0	22.02 $\pm$ 0.52	21.29 $\pm$ 0.41
18:1 (ω 9)	13.74 $\pm$ 0.19	13.86 $\pm$ 0.25
18:2 (ω 6)	12.38 $\pm$ 0.37	12.50 $\pm$ 0.28
20:3 (ω 6)	1.43 $\pm$ 0.11	1.40 $\pm$ 0.10
20:4 (ω 6)	17.13 $\pm$ 0.56	17.47 $\pm$ 1.16
20:5 (ω 3)	0.55 $\pm$ 0.06	1.71 $\pm$ 0.14*
22:5 (ω 3)	1.18 $\pm$ 0.15	1.88 $\pm$ 0.09*
22:6 (ω 3)	1.46 $\pm$ 0.18	1.15 $\pm$ 0.07
EPA/AA ratio	0.032 $\pm$ 0.005	0.108 $\pm$ 0.031*

values are the mean $\pm$ SE

*P < 0.001

min で上述の溶剤を用いて分析を行った。

③ 白血球の脂肪酸構成

既報^{3,6)} に準じて行った。すなわち白血球の脂質を, folch 液 (クロロフォルム/メタノール = 2/1, v/v) を用い, 室温60分間抽出し, その脂質を薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した。プレートは, Silica-gel 60F₂₅₄ glass plates (Merck, 0.5 mm thick) を使用, 石油エーテル/エチルエーテル/酢酸 = 82/18/1, v/v/v を展開溶媒に用いた。BF₃ メタノールを用い TLC で分離したリン脂質画分脂肪酸のメチルエステルを調整した。

ついで, diethyleneglycolsuccinate (DEGS) でコーティングしたガラスキャピラリーカラム (40 m $\times$ 0.3 mm ϕ) を装着した日立 063 型ガスクロマトグラフを用い, 脂肪酸を分離, 定量した。内部標準物質としては C23:0 を用いた。

(2) EPA 投与後の炎症反応の変化

① 炎症浸出液中のエイコサノイドの測定

Simmons らの方法¹⁶⁾ に準じ無菌のポリエステルスボ

図1 correlation between the ratio of EPA/AA present in leukocytes and LTB_5/LTB_4 formation in the leukocytes. data from control group (○) and rats fed EPA (●)

ンジ (3.5×1×0.5 cm) を 1% κ -カラゲニン (Sigma) に浸し、そのスポンジを EPA 投与ラット (EPA 240 mg/kg/day を 4 週間)、および対照ラットの腹部皮下に移植し、6 時間後にスポンジを取りだし、スポンジ内浸出液中の白血球数、 PGE_2 、 TXB_2 および LTB_4 の濃度をそれぞれ coulter counter (白血球カウンター) と RIA (Amersham, UK)¹⁷⁻¹⁹⁾ で測定した。さらに、各群より 5 匹相当分の浸出液をブールし、2 容のエタノールにて除蛋白、脂質抽出後、これを前述した ODS-silica mini-column にのせ、エイコサノイドを 1 ml の酢酸エチルで抽出した。

LTB に関しては、前述した溶剤を用いて、RP-HPLC にて LTB_4 と LTB_5 を分離し、15~30 秒おきに HPLC fraction を集め、その溶出液中の LTB の濃度を LTB_4 RIA¹⁹⁾ を用いて定量した。 LTB_5 は、この LTB_4 RIA の抗体に 17.8% の cross reactivity を示した¹⁴⁾。 LTB_5 の濃度は、cross reactivity で補正して表現した。

EPA 由来の PG (3 シリーズ PG) の測定に関しては、上述の酢酸エチル抽出液を乾固後、5% 硝酸銀処理 TLC (Whatman, LK5D, UK) 上で酢酸エチル/イソオクタン/酢酸/水=180/50/20/100 の有機層を用いて、 PGE_2 、 PGE_3 、 TXB_2 、 TXB_3 を分離し、TLC plate のシリカを 0.5 cm きざみにすべて掻き取り、シリカ中の PG、TX を 1 ml 50 mM Tris buffer pH 7.4 で溶出後、溶出液中

図2 eicosanoid concentrations and leukocyte number of inflammatory exudate obtained 6h after implanting sponges impregnated with 1% carrageenin.

control (▨) and EPA-fed rat (▤). values given are mean $\pm$ SE (n=20)

* P < 0.05. *** P < 0.01

の PGE_2 、 PGE_3 、 TXB_2 、 TXB_3 を PGE_2 、 TXB_2 の RIA をそれぞれ用いて測定した^{17,18)}。 PGE_2 、 PGE_3 、 TXB_2 、 TXB_3 の位置はスタンダードと Rf が一致することを確認した。 TXB_3 、 PGE_3 、 TXB_2 ならびに PGE_2 の Rf は、0.18、0.22、0.30、0.36 であった。 PGE_3 の PGE_2 に対する cross reactivity、 TXB_3 の TXB_2 に対する cross reactivity は、このシステムではいずれも 10~20% 程度と予測された。 $[^3H]PGE_2$ 、 $[^3H]TXB_2$ を用いて算出したスタンダードの、この硝酸銀 TLC よりの回収率は 79% であった。

② ラット足蹠浮腫

EPA 投与ラット (EPA 240 mg/kg/day 4 週間) および対照ラットの後足蹠に、2% κ -カラゲニン (Sigma) 0.1 ml を皮下注射した。注射 1 時間より 4 時間後まで後足の容積の変化を reverse dial calipers (Carobranze) を用いて測定した^{20,21)}。

(3) ヒト白血球における EPA とアラキドン酸 (AA) 代謝

ヒト多形核白血球は、Palmer の方法²²⁾に従って準備

図3 TLC separation of PGE and TXB produced in inflammatory exudate induced by implantation of carrageenin soaked sponges. Metabolites were separated by silver nitrate TLC and measured by specific RIA.

図4 HPLC separation of LTB_4 and LTB_5 in inflammatory exudate induced by implantation of carrageenin soaked sponges. Metabolites were separated by RP-HPLC and measured by specific RIA for LTB_4 . Peak 1 is LTB_5 (dotted line: corrected for the lower cross-reaction in the RIA). Peak 2 is 6-trans- LTB_4 isomer. Peak 3 is LTB_4 A; control rat. B; EPA fed rat

した。すなわち、ヘパリン採血した血液を20% volの6%高分子デキストラン(半井化学)とまぜ、 37°C 45分間放置し、得られた白血球層をFicoll-Paque(ファーマシア)に重層し、好中球を分離後、混入する赤血球を塩化アンモニウムで破壊して除去、HHBSで洗浄後HHBSに浮遊し 2×10^7 cells/mlとした。

図5 comparison between control (—●—) and EPA-fed rats(---○---) in paw edema response induced by sub-plantar injection of carrageenin. Each point is the mean $\pm$ SE (n=15). * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$

使用した白血球の98%以上が多形核白血球であった。白血球浮遊液 1 ml (2×10^7 cells/ml) を $2 \mu\text{M}$ A 23187 で、AA (純度99%以上, Nu-check Prep, USA), またはEPA (純度99%以上, 日本水産) の存在下 ($0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$) に 37°C 5分間刺激した。2 ml の冷エタノールで反応停止後、5-LO 代謝産物を前述の ODS-silica minicolumn で抽出し、RP-HPLC を用いて分離、定量した。

図6 RP-HPLC trace showing the metabolism of AA and EPA in the presence of 30 μ M AA (upper panel), 30 μ M EPA (middle panel) or 30 μ M AA + 30 μ M EPA (lower panel) by A 23187 (2 μ M) stimulated human PMN (2×10^7 /ml)

Analytical method was described in method³⁾. UV absorption profile at 270 nm was monitored from 0 to 20 min and at 235 nm from 20 min to 38 min.

内標としては、LTB₄測定にPGB₃(合成PGE₃(Upjohn, Kalamazoo)を水解して産生¹⁵⁾), HETE (hydroxy eicosatetraenoic acid) または HEPE (hydroxy eicosapentaenoic acid) 測定に13-HODD (13-hydroxy octadecadienoic acid: C₁₈:2, ω 6 の photolysis により産生)を用いた。ポンプは TRI-ROTAR V (JASCO)を用いて、flow は 1 ml/min とし、column 温度は JASCO TU-300 にて 30°C に保ち、JASCO solvent programmer GP-A 40 を用いて、16 分までアセトニトリル/メタノール/酢酸/水=32.5/32.5/40/0.01 (Solvent A) で溶出、その後 Solvent A/メタノール=6/4 に変更し 40 分まで分析した。カラムは Develosil ODS 5 μ m (150 $\times$ 4.2 mm 野村化学)を使用、カラム溶出液の UV 吸収は、multi-320 multi wavelength spectrophotometric UV detector (JASCO, JAPAN)を用いて、195~350 nm の間を 5 nm おきに連続的に測定した。各ピークの同定は、① スタンダードと RT が同じであること、② multi UV detector により得られた各ピークの UV 吸収プロファイルが LTB (conjugated triene), hydroxy fatty acid (conjugated diene) に特有なプロファイルと一致すること、③ 一部のサンプルでは、フラクションの LTB₄ RIA による測定により行った。

結 果

① 240 mg/kg/day の EPA を 4 週間投与後、体重、グリコーゲン刺激により腹腔内に出現した白血球数とも対照群と有意差はなかった。両群とも白血球の80%は好中球で残りは単核球であった。

EPA および対照群での A 23187 刺激白血球での LTB₄ の産生量は、表 1 に示すように、EPA 投与群で LTB₄ 産生が減少、LTB₅ 産生量がいちじるしく増加した。よって LTB₅/LTB₄ は、EPA 投与後約 5 倍と増加した。その際の白血球の脂肪酸構成を表 2 に示すが、EPA 群で EPA (C₂₀:5, ω 3) と docosapentaenoic acid (DPA, C₂₂:5, ω 3) の有意な増加が認められたが、EPA と同様魚油に含まれることの知られる docosahexaenoic acid (DHA) の増加はなく、また、PG 前駆物質の AA の変動も認められなかった。さらに、白血球での LTB₅ と LTB₄ の産生量の比と、白血球 EPA と AA 比の間には、図 1 に示すように有意な正相関 ($r=0.795$, $P<0.001$) が認められた。

② i. カラゲニンによるスポンジ内炎症浸出液中、両群とも細胞の95%以上が好中球であった。図 2 に示すように、浸出液中の PGE₂ は 13.9 ± 1.9 ng/ml から 5.9 ± 1.9 ng/ml, mean $\pm$ SE, $P<0.01$ に TXB₂ は $9.8 \pm$

表 3 concentrations of eicosanoids formed($\text{ng}/2 \times 10^7$ PMN)

	6 trans isomers of LTB ₅	LTB ₅	5S-12S-diHEPE	6 trans isomers of LTB ₄	LTB ₄	5S-12S-diHETE	15HEPE	5HEPE	15HETE	12HETE	5 HETE
AA (-)	20	20	—	126	243	—	—	105	—	—	350
EPA (-)	—	—	—	1162	393	63	—	33	241	76	3322
AA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	959	160	96	39	25	—	126	3781	—	—	90
EPA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	556	131	60	801	224	35	334	4196	150	49	2830

The formation of 5-LO metabolites from exogenous AA and EPA in A23187 ($2 \mu\text{M}$) stimulated human PMN ($2 \times 10^7/\text{ml}$) metabolites were separated by RP-HPLC and quantitated by UV absorbance. Values are means of duplicate determination.

図 7 effect of increasing concentration of exogenous EPA on the generation of 5-LO metabolites in A 23187 ($2 \mu\text{M}$) stimulated human PMN ($2 \times 10^7/\text{ml}$)

Left panel shows the 5-LO pathway metabolites from exogenous EPA and right panel shows the 5-LO metabolites from endogenous AA. The results are the mean of 3 separate experiments.

2.4 ng/ml から、 2.3 ± 0.28 ng/ml, $P < 0.05$ にと EPA 投与群で有意に減少したが、白血球数と LTB₄ は、EPA 群で減少する傾向にあるも有意差はなかった ($0.05 < P < 0.1$)。また、EPA 群浸出液で、PGE₃、TXB₃ は検出されなかったが(図 3)、LTB₅ は、LTB₄ の約 1/10 量産生されていた(図 4)。

ii. ラット足蹠浮腫は図 5 に示すごとく、注射 2, 3, 4 時間後とも、EPA 群で対象群に比し、有意な足腫脹の減少を観察した(20%減少, $n=15$, $P < 0.01$)

③ 図 6 にヒト好中球を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 30 μM)の AA, EPA または AA+EPA の存在下に 2 μM A 23187 で刺激した際の 5-LO 代謝産物の代表的な RP-HPLC プロファイルを示す。UV 吸収測定は multi UV detector を用いて行った。0~16 分までは 270 nm での UV 吸収パターンを、20~38 分までは 235 nm での吸収パターンを示す。

AA および EPA 由来のすべての 5-LO 代謝産物の同時測定が可能であった。表 3 に示すごとく、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

の AA, EPA より代謝産物を比較すると、5HEPE 産生量 $\geq$ 5HETE, 6 trans LTB₅ $\leq$ 6 trans LTB₄, LTB₅ $\ll$ LTB₄ であった。EPA と AA を同量(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)同時に加えると、5HEPE, 5HETE の産生量は単独に加えた際と著変はなかったが、6 trans LTB は減少、さらに LTB₄ の著減が認められた。

図 7 左に示すように、外因性に加える AA または EPA の量を増やすと、LTB₅, 6 trans LTB₅ と 5HETE または 5HEPE (data not shown)は、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで用量依存的に増加するが、それ以上の脂肪酸を加えると、むしろ抑制を受けた。図 7 の右に示すように、外因性 EPA を増やすと、内因性 AA より 5-LO 代謝産物は濃度依存的に抑制された。EPA による内因性 AA からの LTB₄ 産生の抑制率は、5HETE および 6 trans LTB₄ の抑制率よりも高かった。

考 察

EPA は、cyclooxygenase の基質とはなりにくいが、

よい lipoygenase の基質であり, *in vivo*, *in vitro* で 5 シリーズの EPA 由来ロイコトリエンの産生が報告されている。今回、筆者らの炎症浸出液の実験でも、白血球 EPA/AA 比に応じて、浸出液中に LTB_5 が存在していたこと (LTB_4 の約 1/10) は、EPA が効果的に膜より放出され、さらに 5-LO により代謝されることを裏づけている。

今回は、ブレラベル法を用いたデータは示さなかったが、EPA は AA と同程度に phospholipase により白血球膜リン脂質より放出される²³⁾。そこで EPA の抗炎症作用を探る第一ステップとして、炎症を惹起する LTB_4 に相応し EPA よりつくられる、 LTB_5 の生物活性を調べたところ、 LTB_5 は LTB_4 に比しはるかに生物活性が弱かった¹⁴⁾。痛風、リウマチ様関節炎の関節液中、乾癬の皮膚では正常に比し LTB_4 の濃度が高いことが報告されている^{24,25)}。よって、EPA 投与により生物活性の低い LTB_5 が LTB_4 のかわりに産生されれば、炎症反応は抑制される可能性がある。

よって、つぎにラットに高度に精製した EPA を 240 mg/kg/day 4 週投与し、 LTB_4 、 LTB_5 の産生の変化をみたところ、EPA 群で A 23187 刺激白血球での LTB_5 産生は著増し、 LTB_4 の産生は減少した。総 LTB ($LTB_4 + LTB_5$) の量は両群とも変化なかった。このデータからも、EPA が 5-LO のよい基質となっていることが確認された。

Murphy ら²⁾は、fish oil 投与後 mice の mastocytoma cell での LTB_5 、 LTC_5 の産生が増加し、 LTB_4 産生が著減することを報告している (対照群の 2.5%)。

筆者らの実験では、 LTB_4 の減少は少ないが、筆者らの実験が正常食+精製 EPA であるのに対し、彼らは fat free diet+fish oil を用いており、ほとんどの AA が EPA におきかえられ、このような LTB_4 の著減がみられたと考えられる。筆者らの実験では、白血球脂肪酸構成で変化したのは、EPA と DPA の増加のみで、AA や DHA の content には変化がなかった。白血球で産生された LTB_5/LTB_4 と、白血球 EPA/AA が正相関したことよりも、膜 EPA 濃度依存的に LTB_5 が産生されたことが明らかとなった。EPA とともに増加した DPA は、EPA の elongation metabolites と考えられる²⁶⁾。また、AA は総リン脂質画分で減っていないが、PC・PE など各サブフラクションでは減少している可能性は否定できない。EPA 投与群浸出液中では、対照群に比し PGE_2 、 TXB_2 が有意に減少していた。

PGE_2 が炎症の mediator として重要であることは周知の事実であるが²⁷⁾、炎症におけるトロンボキサンの働きに関しては、いまだ一定の見解が得られていない。よって、EPA による TXB_2 産生抑制が、炎症抑制にどのような役割を果たすかは明らかでない。炎症浸出液中

図 8 metabolic pathway of AA and EPA in leukocytes.

で、 PGE_3 、 TXB_3 などの 3 シリーズの PG が認められなかったことより、炎症においても 3 シリーズの PG の役割は少なく、EPA は、CO を抑制することにより PGE_2 、 TXB_2 の産生を減らし、抗炎症作用を発揮していると考えられた。浸出液中の LTB_4 は EPA 群で減る傾向にあり、さらに LTB_4 は bradykinin、 PGE_2 などの vasodilator といっしょになり、はじめて血管透過性亢進を示すので、わずかではあるがこの LTB_4 の減少も炎症抑制の一因をなすと考えられる。

また、浸出液中の LTB_4 は、RIA で測定しているの、EPA 群では、cross react する LTB_5 も同時に計り込んでいる。EPA 群での LTB_4 の値は計り込んだ LTB_5 の値を差し引くと、さらに減少すると考えられる。足蹠浮腫モデルでの EPA の浮腫抑制作用は、上述した EPA により減少した PGE_2 が大きく関与していると思われる。

足蹠浮腫モデルでは、注射 1 時間後まではセロトニン、ヒスタミンなどの vasoactive amines の関与が強いが、2～4 時間後は PG phase とよばれ、特に PGE_2 の関与が強いと考えられている。筆者らのデータは、EPA 投与が浮腫形成の PG phase に働き、PG を抑制して浮腫抑制したと考えられる。これは第一のスポンジモデルで EPA 投与浸出液中で PGE_2 が抑制された事実によっても裏づけられる。さらに、 LTB_4 産生抑制も、この浮腫抑制に関与していると考えられる。また、膜リン脂質での EPA の増加が、膜の流動性を変化させ、それにより白血球機能が変化し、炎症反応に影響が及んだ可能性もある。かように普通の食事に高純度の EPA を補って投与した際、EPA は PGE_2 、 TXB_2 、 LTB_4 などの産生を抑制することにより、モデル動物で抗炎症作用を呈するものと考えられた。

さて、いままでの実験で、EPA の抗炎症作用への可能性を議論してきたが、つぎに今回みられた EPA による LTB_4 産生抑制のメカニズムをヒト刺激白血球を用いて検討した。

まず、今回 JASCO の HPLC system を用いて、AA と EPA 由来のすべての 5-LO 代謝産物を 1 回の run

で同時に分離できる solvent system を考案し、また、定量のため LTB₄ (LTB₄ と LTB₅)、6 trans LTB₄、5S・12S・diHETE、20・OH・LTB₄ に対して PGB₃ を内標に使用した。LTB₄ 定量に内標として、普通 PGB₂ がよく用いられるが、LTB₅ と PGB₂ の RT がほぼ同じで、PGB₁ は、LTB₄ と重なるため、PGE₃ より水解により PGB₃ を作製 HPLC で精製後、UV spectrophotometry (ϵ_{275}^{MeOH} 28500²⁸⁾)にて濃度を決定使用した。

HETE および HEPE 測定の内標として、種々の hydroxy 脂肪酸をチェックしたところ、保持時間 (RT) より、C₁₈:2, ω :6 の photolysis によりつくった 13-HODD がもっとも適することが判明した。

抽出、HPLC などすべてのステップを通しての回収率は LTB₄ が約85%、5 HETE および 5 HEPE が約75%であった。また、各ピーク同定のため、スタンダードと同じ RT を持つことのみでなく、各ピークの UV 吸収の profile を multi UV detector を用いて表出、その peak を確認した。さらに一部には確認のため、フラクションの LTB₄ RIA による測定も行った。

図8に AA と EPA の 5-LO 代謝産物のマップを示す。外因性 EPA は、6 trans LTB₄ および 5 HEPE には、AA が 6 trans LTB₄ や 5 HETE になるのと同程度には代謝されるので、EPA は 5-LO に対し AA と同等のよい基質である。しかし、LTB₅ の産生は、同量の AA よりの LTB₄ 産生に比し、はるかに少ない。

すなわち、LTA₅ は LTA₄ に比し、LTA hydrolase の基質とは、はるかになりにくい。LTB₄ 産生の rate limiting step は LTA hydrolase であり²⁹⁾、今回の実験でも AA や EPA を加えると、6 trans LTB₄ や 5 HETE、5 HEPE の産生は用量依存的に増加 (basal の約10倍) するが、LTB₄、LTB₅ の産生はすぐにプラトーとなってしまう。

外因性に加えた EPA は、内因性 AA よりの 5-LO 代謝産物を用量依存的に抑制したが、LTB₄ の抑制率がかつても高かった。同量の EPA と AA を同時に加えると、LTB₄ の産生量は AA 単独のときに比べ43%減少した。

これらの事実より、LTB₄産生の rate limiting step である LTA hydrolase の段階で、EPA または accumulation した LTA₅ が、これを抑制して、LTB₄ の産生を落とすと考えられた。

Prickett らが、SLE の model mice に fish oil を投与すると、蛋白尿の出現が抑制され生存期間が延長すると報告している¹³⁾。近年、RA の joint pain に対し、fish oil が有効であることを示唆するデータも報告された³⁰⁾。

今回の実験より得られたデータをも総合して考えると、EPA 投与は PGE₂、TXA₂、LTB₄ などの産生を抑

制することにより抗炎症作用を示す可能性が示唆された。その作用は、非ステロイド抗炎症剤に比し弱い、作用機序も違い、また副作用もなく長期連用が可能なので、慢性炎症抑制の base therapy としての使用が期待される。免疫系への関与も含め、今後さらに多くの clinical study が必要であると考えられる。

稿を終えるに当たり、ご指導いただきました吉田尚主任教授、田村泰講師、平井愛山博士に深謝致します。

文 献

- 1) Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S., Vane, J.R.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* 2: 117, 1978.
- 2) Needleman, P., Raz, A., Minkes, M., Ferrendelli, J.A., Sprecher, H.: Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 944, 1979.
- 3) Hirai, A., Terano, T., Hamazaki, T., Sajiki, J., Kondo, S., Ozawa, T., Fujita, T., Miyamoto, T., Tamura, Y., Kumagai, A.: The effect of oral administration of fish oil concentrate on the release and metabolism of ¹⁴C-arachidonic acid and ¹⁴C-eicosapentaenoic acid by human platelets. *Thrombosis Research* 28: 285, 1982.
- 4) Hamazaki, T., Hirai, A., Terano, T., Sajiki, T., Kondo, S., Fujita, T., Tamura, Y., Kumagai, A.: Effect of orally administered ethyl ester of eicosapentaenoic acid on PGI₂-like substance production by rat aorta. *Prostaglandins* 23: 557, 1982.
- 5) Fischer, S., Weber, P.C.: Prostaglandin I₃ is formed *in vivo* in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature* 307: 165, 1984.
- 6) Terano, T., Hirai, A., Hamazaki, T., Kobayashi, S., Fujita, T., Tamura, Y., Kumagai, A.: Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis* 46: 321, 1983.
- 7) Jakschik, B.A., Sams, A.R., Sprecher, H., Needleman, P.: Fatty acid structural requirement for leukotriene biosynthesis. *Prostaglandins* 20: 401, 1980.
- 8) Murphy, R.C., Pickett, W.C., Culp, B.R., Lands, W.E.M.: Tetraene and pentaene leukotrienes: selective production from murine mastocytoma cells after dietary manipulation. *Prostaglandins* 22: 613, 1981.
- 9) Leitch, A.G., Lee, T.H., Ringel, E.W., Prickett, J.D., Robinson, D.R., Pyne, S.G., Corey, E.J., Drazen, J.M., Austen, K.F., Lewis, R.A.: Immunologically induced generation of tetraene and pentaene leukotrienes in the peritoneal cavities of menhaden-fed rats. *J. Immunol.* 132: 2559, 1984.

- 10) Hammarström, S.: Leukotriene C₆: a slow reacting substance derived from eicosapentaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 255: 7093, 1980.
- 11) Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A.: Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 517, 1980.
- 12) Sinclair, H.M.: Advantages and disadvantages of an Eskimo diet. In drugs effect lipid metabolism (eds. Fumagali, R., Kritchevsky, D. and Paoletti, R.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1980, p 363.
- 13) Prickett, J.D., Robinson, D.R., Steinberg, A.D.: Dietary enrichment with the polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid prevents proteinuria and prolongs survival in NZB×NZWF₁ mice. *J. Clin. Invest.* 68: 556, 1981.
- 14) Terano, T., Salmon, J.A., Moncada, S.: Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₅. *Prostaglandins* 27: 217, 1984.
- 15) Terano, T., Salmon, J.A., Moncada, S.: Effect of orally administered eicosapentaenoic acid (EPA) on the formation of leukotriene B₄ and leukotriene B₅ by rat leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3071, 1984.
- 16) Simmons, P.M., Salmon, J.A., Moncada, S.: The release of leukotriene B₄ during experimental inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1353, 1983.
- 17) Salmon, J.A.: A radioimmunoassay for 6-keto prostaglandin F_{1α}. *Prostaglandins* 15: 383, 1978.
- 18) Higgs, G.A. Salmon, J.A.: Cyclo-oxygenase products in carrageenin-induced inflammation. *Prostaglandins* 17: 737, 1979.
- 19) Salmon, J.A.: Simmons, P.M., Palmer, R.M.J.: A radioimmunoassay for leukotriene B₄. *Prostaglandins* 24: 225, 1982.
- 20) Winter, C.A., Risely, E.A., Nuss, G.W.: Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544, 1962.
- 21) Liew, F.Y.: Lymphocyte subsets involved in delayed-type hypersensitivity. *Advances in inflammation research*, (eds. Otterness, I., Capetola, R. and Wong, S.). Raven Press, New York, 1984, Vol 7, p 135.
- 22) Palmer, R.M.J., Stepney, R.J., Higgs, G.A., Eakins, K.E.: Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxygenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins* 20: 411, 1980.
- 23) Terano, T., Hirai, A., Tamura, Y., Yoshida, N., Salmon, J.A., Moncada, S.: Effect of eicosapentaenoic acid on eicosanoid formation by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Progress in lipid Res.* 1986 (in press).
- 24) Rae, S.A., Davidson, E.M., Smith, M.J.M.: Leukotriene B₄ an inflammatory mediator in gout. *Lancet* 2: 1122, 1982.
- 25) Klickstein, L.B., Shapleigh, C., Goetzl, E.J.: Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J. Clin. Invest.* 66: 1166, 1980.
- 26) Spector, A.A., Kaduce, T.L., Figard, P.H., Norton, K.C., Hoak, J.C., Czervionke, R.L.: Eicosapentaenoic acid and prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *J. Lipid. Res.* 24: 1595, 1983.
- 27) Moncada, S., Vane J.R.: Mode of action of aspirin-like drugs. *Adv. Int. Med.*, 24: 1, 1979.
- 28) Andersen, N.H.: *J. Lipid Res.* 10: 320, 1969.
- 29) Jakschik R.A., Kuo C.G.: Characterization of leukotriene A₄ and B₄ biosynthesis. *Prostaglandins* 25: 767, 1983.
- 30) Kremer, J.M., Bigauette, J., Michalek, A.V., Timchalk, M.A., Lininger, L., Rynes, R., Huyck, C., Zieminski, J., Bartholomew, L.E.: Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1: 184, 1985.