

〈原 著〉

実験的粥状動脈硬化発生過程の微小循環系諸事象変化に及ぼす エイコサペンタエン酸 (EPA) の影響

大久保 千代次, 山 田 重 行

(国立公衆衛生院生理衛生学部)

浅 野 牧 茂

(日本女子大学食物学科)

Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on microcirculatory events during development of dietary-induced hyperlipidemia in the rabbit

Chiyoji OHKUBO, Shigeyuki YAMADA

(Department of Physiological Hygiene, The Institute of Public Health)

Makishige ASANO

(Department of Food and Nutrition, Japan Women's University)

C. OHKUBO, S. YAMADA, M. ASANO *Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on microcirculatory events during development of dietary-induced hyperlipidemia in the rabbit*, **44**(4), 499-510, 1995.

Rabbits whose ear lobes had a rabbit ear chamber (REC) for intravital microscopic study were fed a regular rabbit chow (CONT group: n=6) or that supplemented with 1.0% cholesterol (CH group: n=7) for 3 weeks. Another groups of CH fed animals was treated with daily oral administration of eicosapentaenoic acid (EPA) at a dose of 600mg/kg (CH+EPA group: n=8) for 3 weeks.

Results were as follows: Although plasma CH levels in CH+EPA group were almost the same or higher than those in CH group, incidence of fatty streak of thoracic aorta in CH group (6/7) was much higher than that of CH+EPA group (1/8). Total area (mean \pm SE) of the fatty streak in CH and CH+EPA groups was $24.1 \pm 3.1 \text{mm}^2$ and $5.4 \pm 5.4 \text{mm}^2$, respectively. Both adhesion indices of white blood cells in vivo and in vitro systems showed that activated adhesiveness due to CH feeding was remarkably suppressed by EPA administration. Within REC, many lipid-laden macrophages became visible in the connective tissue space and then intra- and extracellular irregular-sized lipid droplets appeared as anisotropic cross images with polarized microscopy in both groups. Mean count (\pm SE) of the cross images in CH+EPA group (27.5 ± 11.0) was lower than that of CH group (48.0 ± 14.1).

Beside the difference between CH and CH+EPA groups, significantly different mean count ($p < 0.05$) was noticed between two groups of CH-fed animals classified according to the incidence of fatty streak (59.5 ± 13.8) and another group without it (16.0 ± 2.7). Moreover, the mean count of cross images in REC was clearly related with the incidence

[キーワード] EPA, 粥状動脈硬化, 高脂血症, 微小循環, 耳介透明窓法, マクロファージ, 泡沫細胞, 脂肪斑

[平成7年11月6日受理]

of fatty streak of aorta, i.e., a significantly positive correlation coefficient ($r=0.62$; $p<0.05$) was also noticed between the mean count of cross images and the total area of fatty streak.

Except for anemic change, there were no noticeable changes in any parameters in CONT group throughout the experimental period, mentioned above.

Key Words EPA, atherosclerosis, hyperlipidemia, microcirculation, rabbit ear chamber, macrophage, foam cell, fatty streak

(Accepted for publication, November 9, 1995)

1. はじめに

高脂血症は粥状動脈硬化の3大危険因子の1つにあげられている。Dyerbergら¹⁻²⁾がグリーンランドエスキモー人の海産物消費量、特に海産物に含まれるn-3系多価不飽和脂肪酸消費量の多いことが虚血性心疾患の罹患率と死亡率を低くしているとの仮説を提案して以来、エイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid, EPA) 摂取と虚血性心疾患あるいは高脂血症との関連性が検討されてきた³⁻⁵⁾。

我々は、生体顕微鏡的に微小循環動態が観察可能な食餌性高脂血症ウサギを対象として粥状動脈硬化発生過程に及ぼすEPAの影響を実験的に検討した結果、いくつかの知見を得たので報告する。

2. 研究材料と方法

1) 動物

実験開始当時に体重2.5~3.7kgで、あらかじめ皮下組織微小循環諸事象の生体顕微鏡観察用の耳介透明窓(rabbit ear chamber, REC)⁶⁾を装着した日本白色雄性ウサギ(クリーンウサギ, 日本医科学資材研究所)を用いた。実験期間を通じて、気温 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 及び湿度 $50\pm 5\%$ で飼育した。実験群には、①標準固形飼料摂取+生理的食塩水経口投与群(CONT群, n=6) ②コレステロール(CH)添加固形飼料摂取+生理的食塩水経口投与群(CH群, n=7) ③コレステロール添加固形飼料摂取+EPA経口投与群(CH+EPA群, n=8)の3群を設けた。CONT群には魚粉・動物性たんぱくぬき標準固形飼料(RM4-魚粉FREE, 船橋農場)を、CH群, CH+EPA群にはこの標準飼料にCHを1%(W/W)となるように添加したものをいずれも浄水と共に随意に3週間に亘って摂取させた。なお、血中EPAレベルを低下させるため、3群とも実験開始前1

週間は魚粉・動物性たんぱくぬき標準固形飼料を摂取させた。

2) 薬物

CH+EPA群にはEPAとしてEPAエチルエステル(Lot.30415-TO524, 持田製薬)を1日1回宛600mg/0.7ml/kg宛経口投与した。CONT群およびCH群には0.7ml/kgの生理的食塩水(以下生食)を同様に連日経口投与した。薬物は日曜日を除く週6日、延べ3週間に亘って午前中に経口投与した。

3) 測定項目

広域循環系血液性状の検査は実験開始前(以下PREと略す)、開始後1週, 2週および3週(以下1W, 2W, 3Wと略す)のそれぞれ週末時点で、耳介中心動脈からEDTA-2Kあるいはヘパリン添加真空採血管(VT-573DK, VT-032H, テルモ)で採取した血液について実施し、微小循環系諸事象の生体顕微鏡観察はREC内に再生している血管網について無麻酔下で血液性状検査と同時期に適時に実施した。

a. 体重

実験期間中、一週間ごとに体重を測定した。

b. 広域循環系指標

①血漿脂質濃度

総コレステロール(CH)濃度と中性脂肪(TG)濃度は酵素法、脂肪酸分画はTLC-FID法により測定した。

②In vitroでの白血球粘着能

筆者らの方法⁷⁾を改良した。概略を以下に示す。耳介中心動脈よりヘパリン加採血した血液1ml中に0.1%アクリジンオレンジ(Sigma)10 μl を加えヘマトクリット用ガラス毛細管(VC-H075, テルモ)に分取し、直ちに湿度100%, 37 $^\circ\text{C}$, 水平位で30分間インキュベートした後、ガラス毛細管を自動注入器に接続し、0.48ml/minの流速にて1分間生理的食塩水でガラス毛細

管内の血液を洗い流し、流れに抗してガラス内壁面に付着残存した白血球数を一定倍率 (TV Relay Lens 1×20) で蛍光顕微鏡 (Nikon OPTIPHOT) を用いて計数した。

③好中球 NBT 還元能

Park 法⁹⁾に準じた。概略を以下に示す。ヘパリン添加血液0.1mlと Nitroblue tetrazolium : NBT 溶液 (0.15M のリン酸緩衝液 (pH7.2) と生食の等量混液に 0.2%溶解)0.1ml を試験管中で注意深く混和し蓋をして37℃, 15分間インキュベートした後, 室温で15分間静置した。この試料を再度注意深く混和し, その一部をとって塗抹標本を作製し, ライト染色の後, 100倍の対物レンズを使用し, TV モニター上で鏡検し観察された好中球100個中の内, 細胞質が青黒くびまん性に着色する NBT 陽性数を計数した。

④血液像

白血球 (WBC) 数, 赤血球 (RBC) 数, 血色素 (Hb) 量, ヘマトクリット (Ht) 値, 赤芽球 (EBL) 数を常法により計測した。

⑤胸部大動脈脂質沈着面積

実験終了後, ウサギをベントバルビタールナトリウム (Nembutal, Abbott) 静注により死に至らしめ, 胸部大動脈の弓部中樞端から横隔膜部位までの全長を摘出した。付着している脂肪を取り除いた後長軸に沿って切開し, 内膜面を伸展し, 複写機で複写し, 脂肪沈着面積を算出した。

c. 微小循環系指標

REC を外科的に装着し, 直径6.4mm 深さ50μm の円形創腔内に再生した同一脈管網を対象に生体顕微鏡的に観察した。REC は, アクリル樹脂製の透明な円形テーブルのチャンパーで, REC 装着手術には特殊なパンチャーを用い, 円形テーブルとチャンパー支持用柱を通す孔を表面麻酔した耳介に同時にあけて装着する。REC の生体顕微鏡的观察は無麻酔下で通常の光学顕微鏡あるいは落射型蛍光顕微鏡, 光学カメラ, TV カメラ, VTR システムを用いて行った。微小循環系諸事象は, TV モニター画像で観察すると共に, カラー写真撮影をした。また, PRE と3W における同一事象を後刻反復再現して, 多角的に解析することができるようにした (図1)⁹⁾。

①血管内 WBC 粘着能

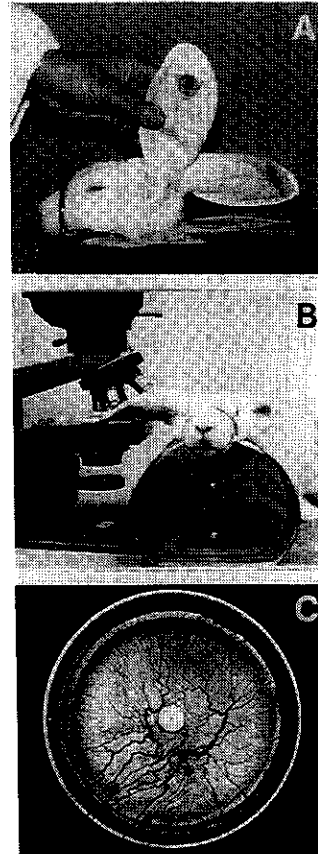


図1 微小循環動態を観察する REC 法
A : 両側の耳介に装着した円形透明窓 (rabbit ear chamber : REC), B : ウサギを金属製のドラムで固定し, REC を顕微鏡で観察, C : 弱拡大の顕微鏡で観察されたウサギ皮膚微小循環脈管網

WBC 粘着性は, 観察される REC 内の同一細静脈 4 本について単位時間当たりの偏流現象に伴って一定部位の管壁を rolling する WBC 数で表した。VTR を介して30秒毎に流れる WBC 数を 5 回計測してその平均値を求めた。

②血管外組織内大型細胞の挙動

CH 負荷に伴って, 経時的に血管外壁に沿って現れる大型細胞 (マクロファージ) を観察した時に白色に輝く大小の異方十字像として観察される胞体内 CH エステルの計測を行った。異方十字像出現の定量化のため, 2.5(接眼)×40(対物)の倍率で写真撮影を行って印画紙上の異方十字像の個数およびその直径 (一画面上で大きなものから順に 5 つ) を印画紙上で計測した。

③REC 間質組織内 CH 結晶

剖検後、切除した REC は 10% PBS ホルマリン液で固定した後に出現する CH 針状結晶が観察されたので、上段②と同様にその数を計測した。

d. 統計処理

実験結果は原則として実測値で平均値の差の検定 (Student's t-test) を行い推計学的有意差 ($p < 0.05$ 以上を以下有意差とする) を求めた。なお、実測値で実験開始前値 (PRE) において有意な群間変動が認められる場合、PRE を基準としてその後の変化を変動率 (%) で表示した。変動幅は標準誤差 (Standard error, SE) で示した。

3. 実験結果

1) 体重

体重は、CONT 群、CH 群及び CH+EPA 群は、全期間を通して、PRE に比較して有意差は認められなかった (図 2)。

2) 血液成分

a. 各血漿脂質濃度

①血漿 CH 濃度

CONT 群はグラフ上では殆んど変化が見られないものの 3W で極く軽度だが有意 ($p < 0.05$) な低下が認められた。CH 群と CH+EPA 群は著増し、いずれも

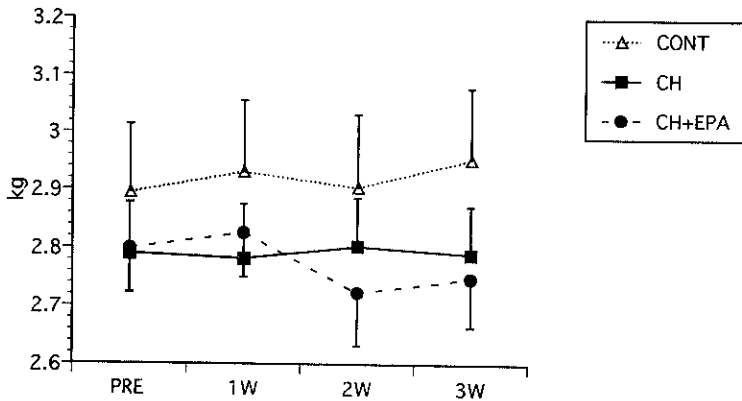


図 2 実験期間中の平均体重変化

実験開始前 (PRE)、開始 1、2、3 週後 (1W、2W、3W) のコレステロール摂取群 (CH) 群、コレステロール摂取とエイコサペンタエン酸投与 (CH+EPA) 群、標準飼料摂取 (CONT) 群の推移を示す。変動幅は標準誤差 (各時点の縦軸) で示した。以下図表中の表示は同様である。

表 1 血液中各系指標の実測値平均 (±標準誤差) と有意差検定

表中の * は、各実験群において実験開始前値 (表中 PRE) との間に推計学的有意差 (**; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$) があることを示す。

		RBC ($\times 10^4/mm^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	EBL (%)	WBC (/mm ³)	TG (mg/dl)
CONT	PRE	862 ± 9.7	14.3 ± 0.2	46 ± 0.45	2.5 ± 1.73	6388 ± 251	127 ± 18.6
	1W	612 ± 9.1 **	13.3 ± 0.17 **	44.3 ± 0.43 **	0.8 ± 0.79	5438 ± 358	137 ± 27.9
	2W	614 ± 14.2 **	13.7 ± 0.27 *	44.4 ± 1.01	3.9 ± 1.7	5500 ± 237 *	163 ± 36.5
	3W	612 ± 11.1 **	13.4 ± 0.23 **	44.1 ± 0.51 **	0.8 ± 0.83	5575 ± 403	111 ± 22
CH	PRE	683 ± 12.5	14.8 ± 0.22	46.7 ± 0.79	2.9 ± 1.6	6613 ± 780	75 ± 44.5
	1W	633 ± 11.9 **	13.7 ± 0.21 **	44.1 ± 0.95 **	12.7 ± 3 *	8825 ± 741	39 ± 71.4 *
	2W	587 ± 13.8 **	13.0 ± 0.31 **	42.1 ± 1.15 **	37 ± 14.51*	9488 ± 971 **	36 ± 33.8 **
	3W	594 ± 12.6 **	13.2 ± 0.28 **	43.6 ± 0.91 **	20.2 ± 6.96 *	10200 ± 1598 *	44 ± 16.4
CH+EPA	PRE	645 ± 15.4	14.5 ± 0.28	46.7 ± 0.78	0 ± 0	6588 ± 440	128 ± 32.6
	1W	626 ± 13.4 *	13.8 ± 0.27 **	44.1 ± 0.73 **	14.1 ± 3.14 *	9863 ± 1163	46 ± 17.3 **
	2W	595 ± 13.4	13.2 ± 0.34 *	43.1 ± 1.21 *	10.9 ± 7.63	9075 ± 949	48 ± 11.7 *
	3W	571 ± 15.6 **	12.9 ± 0.33 **	41.7 ± 0.84 **	12.2 ± 7.62	11750 ± 2503	40 ± 8.3 *

表2 血中の各測定指標平均値の群間比較

表中の*は、各実験群間において両者の間に推計学的な有意差 (** ; p<0.01, * ; p<0.05) があることを示す。n.s.は有意差を認めないことを示す。

	CONT-vs-CH			CONT-vs-CH+EPA			CH-vs-CH+EPA		
	1Week	2Week	3Week	1Week	2Week	3Week	1Week	2Week	3Week
体重	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NBT還元能	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
末梢血中WBC数	**	*	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
末梢血中RBC数	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
末梢血Hb濃度	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
末梢血Ht	*	*	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
末梢血中赤芽球数	**	*	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
血漿CH濃度	**	**	**	**	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
血漿TG濃度	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.
血漿EPA濃度	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**	**	**	**

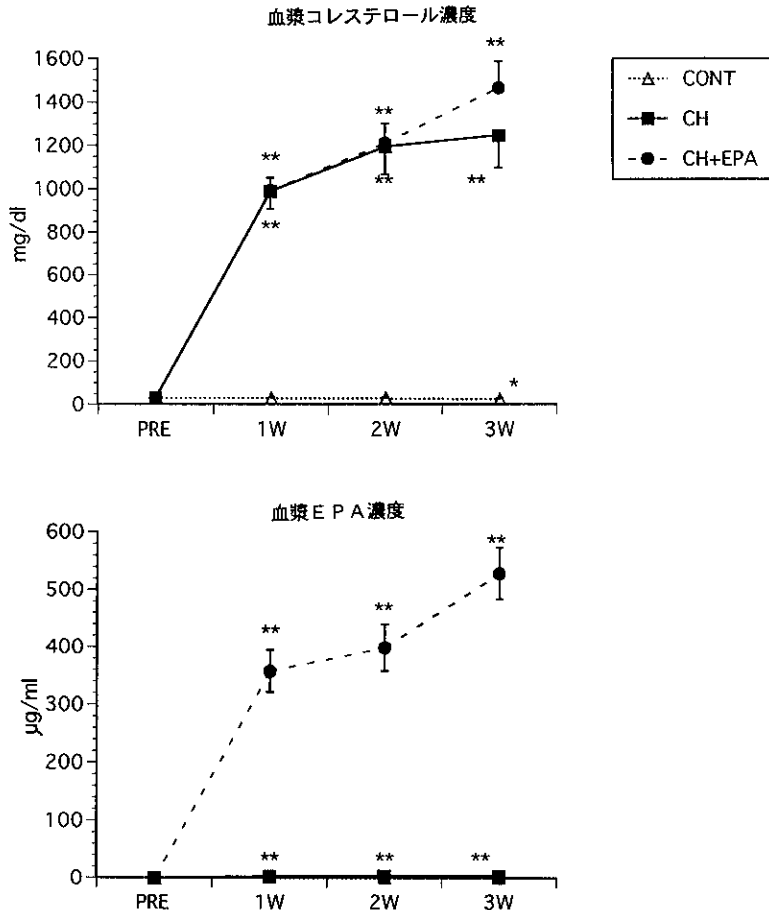


図3 血漿コレステロールおよびEPA濃度変化
各測定時点における血漿コレステロール濃度(上段)およびEPA濃度(下段)の変化を示す。図中の*は、各実験群において実験開始前値(図中PRE)との間に推計学的な有意差 (** ; p<0.01, * ; p<0.05) があることを示す。

高度に有意 ($p < 0.01$) な差が PRE との間に認められた (図 3, 表 1). 群間比較では, 実験開始後はいずれの計測点でも CONT 群と比較して CH 群, CH+EPA 群が有意な ($p < 0.01$) 高値を示した (表 2).

②血漿 TG 濃度

CH 群及び CH+EPA 群では, 減少傾向を示し, CH+EPA 群では全ての計測点で PRE と比較して有意差 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) が認められた (表 1). 群間比較では, CONT 群と比較して全ての計測点で CH+EPA 群が有意 ($p < 0.01$) に減少した (表 2).

③血漿 EPA 濃度

CONT 群は, 全期間を通して有意な差は認められな

かった. CH 群はグラフ上では殆んど変化が認められないものの, 有意 ($p < 0.01$) なわずかな増加を示した. 一方, EPA を投与した CH+EPA 群では著増が認められた (図 3, 表 1). 群間比較では, CONT 群及び CH 群と比較して CH+EPA 群は実験開始後の全計測点で有意 ($p < 0.01$) な上昇を示した (表 2).

b. 白血球粘着能 (in vitro)

3W 時に, 採取した末梢血を対象にして比較を行ったところ CONT 群に比べて CH 群では高値を示したものの有意な差とはならなかった. 一方, CH+EPA 群は CONT 群, CH 群の両群に対して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な低値を示した (図 4, 表 1).

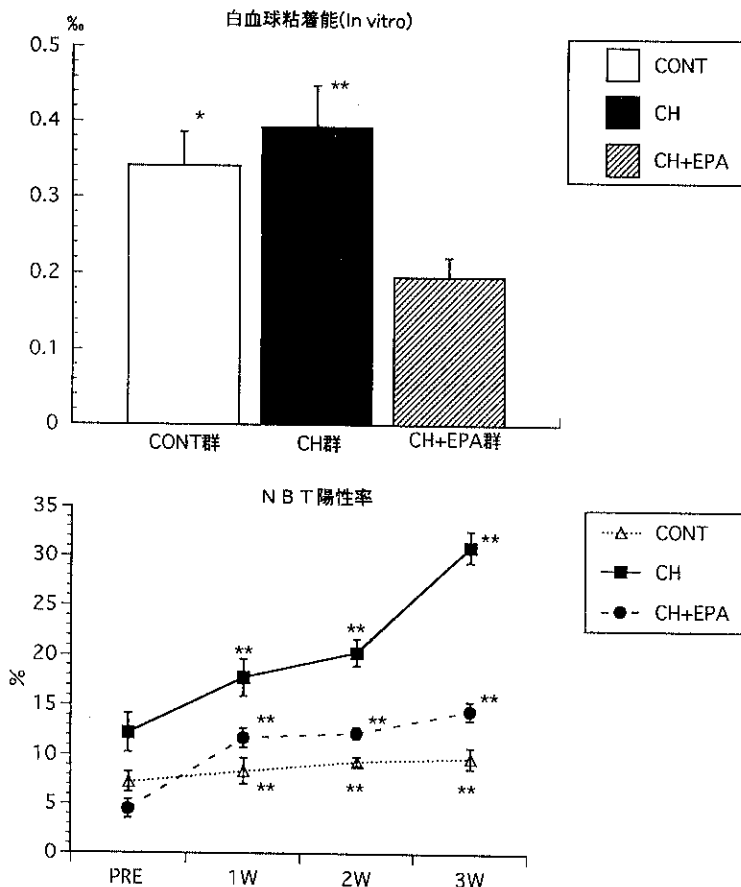


図 4 In vitro 法 (毛管法) により計測した白血球粘着能と好中球 NBT 還元能
実験開始 3 週後の時点での末梢血中白血球粘着能 (上段) と各測定時点の
NBT 還元能 (下段) を示す. 上段の * は, CH+EPA 群との間に, また,
下段の * は, 各実験群において実験開始前値 (図中 PRE) との間に (** ;
 $p < 0.01$, * ; $p < 0.05$) 推計学的な有意差があることを示す.

c. 好中球 NBT 還元能

全群ともに週を追って増加し、PRE との間に各時点で有意差 ($p < 0.01$) が認められたものの、その増加率は群によって異なり、CONT 群と比較して CH 群および CH+EPA 群がともに高値を示した (図 4, 表 1).

d. 血液像

①WBC 数

CONT 群では経時的な増加は認められず、2W で有意 ($p < 0.05$) な低下を示した。一方、CH 群及び CH+EPA 群では週を追って増加し、PRE と比較して CH 群では 2W, 3W で、CH+EPA 群では 1W で有意差 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) が認められた (表 1)。群間比較では、CONT 群と比較して実験開始後の全期間 (CH+EPA 群の 3W を除く) を通して CH 群、CH+EPA 群が有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な高値を示した (表 2)。

②RBC 数

CH+EPA 群を除く各群で、週を追って PRE と比較して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な低下を示した (表 1)。

③Hb 量

全群週を追って PRE と比較して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な低下を示した (表 1)。

④Ht 値

全群 (CONT 群の 2W を除く)、週を追って PRE と比較して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な低下を示した (表 1)。群間比較では、CH 群、は実験開始後いづれの時点でも CONT 群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低値を示し、CH+EPA 群は 3W で CONT 群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低下を示した (表 2)。

⑤EBL 数

CONT 群は認むべき変化を示さなかった。CH 群では全時点で、CH+EPA 群では 1W で PRE と比較して、有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な増加を示した

表 3 胸部大動脈の脂質沈着面積と偏光顕微鏡で計測された REC 組織内コレステロール・エステル数

上段は各実験群における胸部大動脈伸展標本で観察された脂肪斑の面積 (S) と REC 内で観察されたマクロファージにより貪食・代謝されたコレステロール・エステル数の個別実測値とその平均値 (±標準誤差)。なお、CH+EPA 群の #1036, #1043 は REC が途中で脱落したため、コレステロール・エステル数の計測は不可能。下段は胸部大動脈での脂質沈着の有無によって CH 群および CH+EPA 群を再群別した場合の REC 組織内コレステロール・エステル数。下左側は脂質沈着有り群、下右側は脂質沈着無し群の各個別実測値とその平均値 (±標準誤差)。

CONT			CH			CH+EPA		
NO.	S(ml)	COUNT	NO.	S(ml)	COUNT	NO.	S(ml)	COUNT
1016	0	0	1022	28.9	0	1017	0	18
1030	0	0	1028	10.4	22	1019	0	24
1040	0	0	1035	31.8	29	1026	0	5
1047	0	0	1045	24.3	53	1029	32.4	86
1048	0	0	1046	20.8	47	1037	0	22
1051	0	0	1049	31.8	120	1053	0	10
			1052	0	17	1036	0
						1043	0
平均±SE	0±0	0±0	平均±SE	24.7±3.1	41.1±14.8	平均±SE	4.1±4.1	27.5±11

脂質沈着 (+)			脂質沈着 (-)		
NO.	S(ml)	COUNT	NO.	S(ml)	COUNT
1022	28.9	0	1017	0	18
1028	10.4	22	1019	0	24
1029	32.4	86	1026	0	5
1035	31.8	29	1037	0	22
1045	24.3	53	1052	0	17
1046	20.8	47	1053	0	10
1049	31.8	120			
平均±SE	25.8±2.8	51±15.4	平均±SE	0±0	16±2.7

(表1). 群間比較では, CH 群では全期間, CH+EPA 群では3Wに CONT 群と比較して有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な高値を示した (表2).

3) 胸部大動脈

①脂質沈着面積

実験終了後に大動脈を摘出して切開伸展すると, CONT 群では何ら変化がみられないのに対して, CH 群の7匹中6匹 (ID=1022, 1028, 1035, 1045, 1046, 1049) と, CH+EPA 群の8匹中1匹 (ID=1029) に脂質沈着が認められ, 明らかに CH+EPA 群では大動脈への脂質沈着が CH 群に比較して有意 ($p < 0.01$) に少ないことが分かった (表3).

②クレーター様硬化

実験終了後に大動脈を摘出すると, 脂質沈着とは性質の異なる硬化 (いわゆるクレーター様硬化¹⁰⁾) が CH 群の1匹 (ID=1052) と CH+EPA 群の2匹 (ID=1036, 1043) に認められた (図5).

4) 微小循環系指標

①血管内 WBC 挙動

Rolling 数は, CH 群では, 2W で大きく増加したもののその変動幅が大きく, PRE との間に有意差は認められなかった. 一方, CH+EPA 群では逆に PRE と比較して1W および2W では推計学的に有意な減少 ($p < 0.01$) が認められた (図6).

②間質組織内大型細胞の挙動

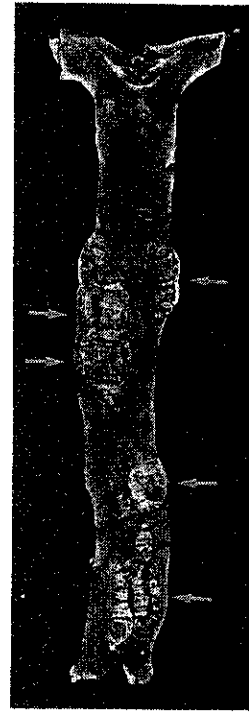


図5 大動脈クレーター様硬化
実験終了時の胸部大動脈伸展標本. 矢印はクレーター様硬化を示す.

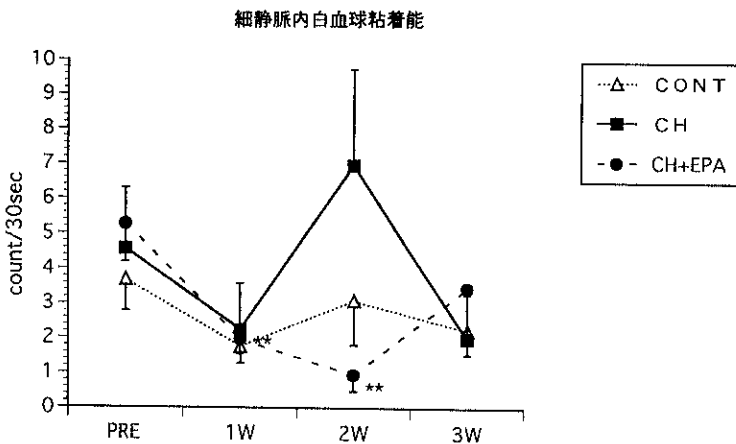


図6 細静脈における白血球粘着能
各測定時点の同一細静脈における白血球粘着能の変化. 図中の*, 各実験群において実験開始前値 (図中 PRE) との間に (**; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$) 推計学的な有意差があることを示す.

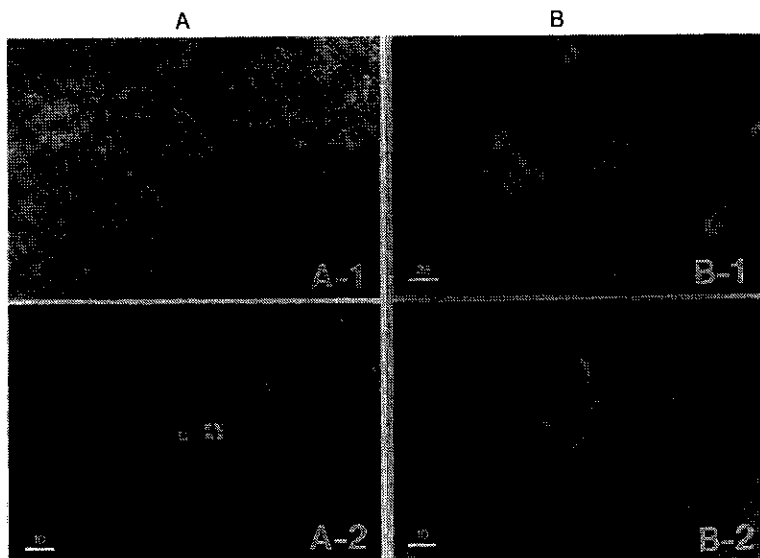


図7 泡沫細胞化したマクロファージとその胞体内コレステロール・エステル(異方十字像)とホルマリン固定後のREC組織内に存在するコレステロールの結晶
 AはREC組織内で泡沫細胞化したマクロファージ(A-1)とこれの偏光顕微鏡写真(左A-2)。指標:10 μ m。Bはホルマリン液で固定された後に観察されたREC組織内のコレステロール結晶。B-1は弱拡大写真,指標:25 μ m。B-2は強拡大写真,指標:10 μ m。

C群においては全期間を通じて観察されることはなかったが,CH群及びCH+EPA群において,初期には血管外壁に沿って,その後は組織間隙を満たすように無数の粗大顆粒状物質を内包した大型細胞の配列するのが観察された。WBCより著しく大きく,不整形あるいは不整楕円形で様々な形を呈していた。CH摂取日数が進むにつれて,結合組織間隙にその数を増し,ブロッコリー様の外観を呈する不定型増殖物となった。この大型細胞に含まれる顆粒状物は,比較的,粒径の揃った状態で存在していたが,やがて大ききの不揃いな滴状物に変化した。4 μ mから12 μ m近くまでの直径を有した滴状物は,偏光照明によって異方十字像を呈する胞体内CHエステルと判断された(図7)。観察された胞体内CHエステルの個数の平均値 \pm SEは,CONT群では0 \pm 0,CH群では48 \pm 14.1,CH+EPA群では27.5 \pm 11.0で,CH群に比較してCH+EPA群では低値を示したものの,両者の間には有意な差は認められなかった(表3)。一方,CH群あるいはCH+EPA群の群分けを無視して,大動脈への脂質沈着の有無で,両群を分けた場合(表3),脂質沈着有り

表4 ホルマリン固定後のREC組織内に存在するコレステロールの結晶数
 左側はCH群,右側はCH+EPA群の各個体別実測値とその平均値(±標準誤差)。なお,CH+EPA群の#1036,#1043はRECが途中で脱落したため,コレステロール結晶数の計測は不可能。

CH		CH+EPA	
NO.	Crystal Count	NO.	Crystal Count
1022	0	1017	13
1028	167	1019	13
1035	122	1026	5
1045	0	1029	11
1046	92	1037	7
1049	30	1053	3
1052	44	1036
		1043
平均 \pm SE	65 \pm 24.2	平均 \pm SE	8.7 \pm 1.6

群の胞体内CHエステル数は59.5 \pm 13.8,沈着無し群は16.0 \pm 2.7と両群間に有意差(p<0.05)が認められ,且つ大動脈への脂質沈着面積と胞体内CHエステルとの間に有意な相関r=0.62(p<0.05)が認められた。
 ③REC内間質組織内CH結晶

10%PBS ホルマリン液で固定後1ヶ月にRECを再度鏡検したところ、図7のような針状結晶構造物がCH群およびCH+EPA群で観察されたので、その数を表4に示す。CH群に比較してCH+EPA群は明らかに有意な ($p < 0.05$) な低値を示した。なお、大動脈脂質沈着面積とこの針状結晶数との間には相関は見られなかった。

4. 考 察

CH群ではCH添加食摂取に伴って、広域循環系における血中脂質レベル、WBC数、WBC粘着能の上昇と共に、全身性貧血、大動脈への脂質沈着が発現した。また、微小循環系では血管外間質組織内マクロファージの増殖と共にマクロファージ胞体内CHエステルの存在が確認された。これらの結果はこれまでの報告¹¹⁾と一致している。

CH負荷による白血球粘着能亢進現象をEPA投与が著しく抑制した。粥状動脈硬化発生機序の初期段階に、好中球がなんらかの機序で内皮細胞に粘着し、種々の因子が放出され動脈硬化症の引き金になるという血管内皮障害説が提唱されている¹²⁾。この因子のひとつとしてLehr等¹³⁾は、変性LDL (low density lipoprotein) が非常に強力な白血球活性化作用を有するロイコトリエンB₄ (LTB₄) を産生させ、これが好中球の血管内皮に対する粘着性亢進の引き金になることを生体顕微鏡的にハムスターで証明し、さらには、EPAやDHAを含有する魚油の摂取がこの反応を抑制すると指摘している¹⁴⁾。一方、EPAはアラキドン酸からのLTB₄の産生を抑制すると共に、走化性や粘着性の弱いLTB₅を産生することが指摘されており¹⁵⁻¹⁶⁾、且つ、強力な白血球活性化作用を有するPAF (platelet activating factor) のヒト単球における産生も、EPAやDHAなどのn-3系多価不飽和脂肪酸の投与により抑制されることから¹⁹⁾、本実験のEPA投与による白血球粘着能の低下の背景にも関連があると考えられる。LTB₄合成経路をEPAは約84%も抑制すると報告されている¹⁶⁾。しかしその血中濃度は40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、我々の血中EPA濃度は1Wで358 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2Wで399 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3Wで529 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、と抑制効果が発揮されると推定される濃度をはるかに越えている。よって、CH負荷による変性LDLの生成が引き金となって生じる

LTB₄産生増加とEPAによるLTB₄産生抑制が拮抗し、結果としてはCH負荷に伴う白血球粘着性亢進作用がEPAにより抑制されたものと考えられる。

好中球のNBT還元能でも、CH食摂取に伴って明らかな増強が認められ、WBC粘着能のみならず食食時の活性酸素による酸化還元反応を増強していることが確認された。しかし、CH+EPA群では、白血球粘着能亢進現象に見られる程の強い抑制作用はなく、EPAの白血球活性酸素生成能と粘着能への効果に差異を見せている。

CH+EPA群で、血漿CH濃度、WBC数が上昇したが、血漿CH濃度は、CH群とほぼ同程度乃至高値を示し、EPAにはウサギに対する血中CH代謝を調節する働きはないと思われる。しかし、ラットへのCH負荷に対するEPAの効果としてCHレベルを低下させる働きがあり、この作用としてCHクリアランスの推進を示唆する報告がある²⁰⁾。今回のウサギでの実験結果との相違は、おそらく種差に起因するのかも知れない。また、CH+EPA群でも週を追ってCH群同様に全身性貧血が発現したがCH群に比較してその程度は軽度であった。一方、血漿TG濃度はHolub等による報告²¹⁾と同様に実験前値に比較して明らかな低下を示した。

CH負荷による広域循環系大型血管に及ぼす影響として、CH群では7例中6例に胸部大動脈に肉眼的にも明らかな脂質沈着が認められた。一方CH+EPA群での沈着例は8例中1例であり、脂肪沈着発生率はCH群に比較して明らかに低かった。血中CH値が高いと動脈硬化が発生しやすいとされているが、今回の実験では、CH+EPA群においてCH群に比較して血中CH濃度は高いにもかかわらず大動脈での脂質沈着は抑制された。脂肪斑は粥状動脈硬化症の初期状態であるので、今回のEPA投与による脂質沈着抑制所見からEPAは抗動脈硬化に働くことが実験的に示されるとともに、血中高CH状態以外の要因が粥状動脈硬化発生に関与していることを示唆している。

次に大動脈への脂質沈着に及ぼす因子を検討してみた。CH群及びCH+EPA群の2群を、①CH-脂質沈着有り群 (n=6)、②CH-脂質沈着無し群 (n=3)、③CH+EPA-脂質沈着有り群 (n=1)、④CH+EPA-脂質沈着無し群 (n=7) の4群に分け、我々が行った

in vitro での各指標（白血球粘着能、NBT 還元能、血液像、血液粘度、各血漿脂質血清濃度、大動脈伸展性）変化について比較したところ、いずれも脂肪斑の有無との間に有意な相関は得られなかった。そこで全体を CH 群及び CH+EPA 群の群分けを無視して、脂質沈着の有り群と無し群の 2 群に分け、胸部大動脈への脂質沈着と広域循環系ならびに微小循環系の各指標との関係を検討したところ、REC 内組織間隙で偏光顕微鏡により異方十字形として観察される泡沫細胞化したマクロファージ内の CH エステル数（表 3）が脂質沈着有り群では脂質沈着無し群に比べて多く観察され、両群の間には推計学的に有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。さらにはこの CH エステル数と脂質沈着面積との間にも正の相関 ($r = 0.62$) が認められた。以上のことから REC 内組織間隙で観察される CH エステルの数が胸部大動脈に生じる脂質沈着をある程度推定できる指標となり得ることが示唆された。我々は、遺伝性高脂血症 (WHHL) ウサギを対象とした生体顕微鏡的観察結果でも REC 内にマクロファージによる CH エステル化を観察すると共に、腸管膜や胸部大動脈でも同様の CH エステル形成を確認している²²⁾。よって、REC 内微小循環系 REC 内組織間隙のマクロファージ内エステルの CH を指標にすれば広域循環系に属する大動脈での粥状動脈硬化の程度を経時的・定量的に推測できることが証明されたこととなり、動物実験ではあるもののその意義は深いと思われる。

一方、ホルマリン固定した後に観察される REC 内針状結晶は、CONT 群では観察されず且つホルマリン液へ CH のエタノール溶解液を滴下した際に生じる針状結晶が顕微鏡的に形態が酷似していることから、この針状結晶は CH 由来の構造物と思われた。本針状結晶構造物の数が、CH 群および CH+EPA 群、両群の血中 CH 濃度関係とは逆に、CH 群に比較して CH+EPA 群で有意な低値を示したことから、EPA には白血球の活性化を抑制する以外に、血液中の CH が間質組織へ移行するのを抑制する何らかの作用を有している可能性がある。今後この作用についてより詳しい研究が必要であろう。

なお、末梢血中の赤血球系指標の推移を見ると、CONT でも CH 群や CH+EPA 群に比べてその程度は弱いものの貧血傾向が窺える。これまでも、CH 負荷

群で全身性貧血が惹起されているが¹⁰⁻¹¹⁾、CONT 群では見られなかった。おそらく、飼料から魚粉・動物性たんぱくを除去したこと、連日の経口投与によるストレスが関連すると思われる。

また、一部の個体において、CH 負荷あるいは EPA 投与の有無に拘らず大動脈にクレーター様変化¹⁰⁾が認められた。CH 群でもみられることから EPA の作用とは考えられず、且つこの変化は大動脈の中膜の増殖性変化であり、高脂血症由来の粥状変化とは性質を異にしている。CONT 群では 1 例も発生していないものの、おそらく経口投与によるストレスに関連があるものと推察された。今後検討すべき事象と思われる。

5. 結 論

ウサギにおける EPA 600mg の 1 日 1 回宛、3 週間 にわたる経口投与は CH 添加食餌摂取による実験的粥状動脈硬化発生過程にあって白血球粘着能亢進と NBT 還元能陽性率上昇を抑制するとともに大動脈脂質沈着を抑制することが明らかになった。また、REC 内微小循環系で泡沫細胞化マクロファージ内コレステロールエステルの性状は粥状動脈硬化の生体内指標に供し得ることが示唆された。

〔謝辞：本実験を実施するにあたり、石毛貴子、今井桂子、内田尚子、林 宣春の諸姉に多大な技術的援助賜った。また、エイコサペンタエン酸は持田製薬㈱から提供して頂いた。ここに改めて深く謝意を表す。〕

参 考 文 献

- 1) Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S., Vane, J.R.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, II, 117-119, 1978
- 2) Bang, H.O., Dyerberg, J.: Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimo, *Adv. Nutr. Res.*, 3: 1-2, 1980
- 3) Herold, P.M. and Kinsella, J.E.: Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular diseases: a comprison of findings from animal and human feeding trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566-598, 1986
- 4) Davis, H.R., Bridenstine, R.T., Vesselinovitch, D., Wissler, R.W.: Fish oil inhibits development of

- atherosclerosis in rhesus monkeys. *Arteriosclerosis*, **7**: 441-449, 1987
- 5) Kim, D.N., Schmee, J., Thomas, W.A.: Dietary fish oil added to a hyperlipidemic diet for swine results in reduction in the excessive number of monocytes attached to arterial endothelium. *Atherosclerosis*, **81**: 209-221, 1990
- 6) 浅野牧茂, 吉田敬一, 田多井吉之介: Rabbit ear chamber による微細循環動態の研究法について. 生体の科学, **13**: 285-294, 1962
- 7) Ohkubo, C. and Asano, M.: Changes in the adhesiveness of leukocytes during development of experimental atherosclerosis in the rabbit. In *Microcirculation annual 1985*, Tsuchiya, M., Asano, M. Oda, M. and Okazaki, I. eds., Excerpta Medica, Amsterdam-Princeton-Geneva-Tokyo, pp. 56-62, 1985.
- 8) Park, B.H., Firrig, S.M., Swithwick, E.M.: Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet*, **II**: 532-534, 1968
- 9) Asano, M., Ohkubo, C.: Physiological and pathophysiological events of cutaneous microcirculation observed in the rabbit ear chamber. In *Intravital observation of organ microcirculation*, Tsuchiya, M., Wayland, H., Oda, M., Okazaki, I. ed., Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, pp. 31-48, 1982.
- 10) 浅野牧茂, 大久保千代次, 広川章子, 佐々木昭彦, 沢登公勇: 粥状動脈硬化発生過程の広域循環系および微小循環計におけるたばこ煙吸入の影響に関する研究. 1, 昭和58年度喫煙と健康に関する委託研究報告概要, 196-203, 1984
- 11) Asano, M., Ohkubo, C., Hirokawa, A., Sasaki, A., Tochiara, Y., Chiba, Y.: Intravital-microscopic observations on the intravascular behavior of blood cell components during dietary-induced hyperlipidemia in the rabbit. *Biorheology*, **25**: 329-338, 1988
- 12) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **313**: 488-500, 1986
- 13) Lehr, H.A., Hübner, C., Finckh, B., Angermüller, S., Nolte, D., Beisiegel, U., Kohlschütter, A., Messmer, K.: Role of leukotrienes in leukocyte adhesion following systemic administration of oxidatively modified human low density lipoprotein in hamsters. *J. Clin. Invest.*, **88**: 9-14, 1991
- 14) Lehr, H.A., Hübner, C., Finckh, B., Nolte, D., Beisiegel, U., Kohlschütter, A., Messmer, K.: Dietary fish oil reduces leukocyte/endothelium interaction following systemic administration of oxidatively modified low density lipoprotein. *Circulation*, **84**: 1725-1731, 1991
- 15) Goldman, D.W., Pickett, W.C., Goetzl, E.J.: Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**: 282-288, 1983
- 16) Lee, T.H., Mencial-Huerta, J.M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R.A., Austen, K.F.: Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1922-1933, 1984
- 17) Lee, T.H., Hoover, R.L., Williams, J.D., Sperling, R. I., Ravalese, J. III, Spur, B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A., Austen, K.F.: Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N. Engl. J. Med.*, **312**: 1217-1224, 1985
- 18) Nathaniel, D.J., Evans, J.F., Leblanc, Y., Léveillé, C., Fitzsimmons, B.J., Ford-Hutchinson, A.W.: Leukotriene A₅ is a substrate and an inhibitor of rat and human neutrophil LTA₄ hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**: 827-835, 1985
- 19) Sperling, R.J., Robin, J.L., Kylandae, K.A., Lee, T. H., Lewis, R.A., Austen, K.F.: The effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids on monocytes. *J. Immunol.*, **139**: 4186-4191, 1987
- 20) 斎藤 康: 高コレステロール血症動物における EPA エチルエステルの血清コレステロールおよび動脈弾性への作用. 動脈硬化の発症と多価不飽和脂肪酸, 第3回心臓血管薬物療法国際会議サテライト・シンポジウム講演記録集, メデイカルトリビューン社, 東京, 57-64, 1990
- 21) Holub, B.J.: Dietary fish oils containing eicosapentaenoic acid and the prevention of atherosclerosis and thrombosis. *Can. Med. Assoc. J.*, **139**: 337-381, 1988
- 22) Ohkubo, C., Yamada, S., Asano, M.: Comparative studies on microcirculatory events between Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) and dietary-induced hyperlipidemic rabbits. In *Microcirculation annual*, Vol. 11, 1995., Tsuchiya M., Asano, M., Kamiya, A., eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, in press, 1995