

魚油摂取ラットにおける エンドトキシン投与の影響

浦田 尚巳

近畿大学医学部第2外科学教室

Effects of dietary-fish-oil feeding on endotoxin administered rats

Takashi Urata

Second Department of Surgery, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

Eicosapentaenoic acid (EPA) is believed to be responsible for the anti-inflammatory activity of fish oil. However, EPA also causes production of a lipid peroxide (LPO) in vivo because it has one more double bond than arachidonic acid (AA). We studied both effects of fish oil on administered lipopolysaccharide (LPS). Male Wistar rats were allowed to take a low-fat feed containing 15% cod-liver oil (FO Group) or 15% safflower oil (SO Group) for 6 weeks and then administered intraperitoneally 10 mg/kg of LPS. Controls were given physiological saline alone. Blood and liver-tissue leukotriene B₄ (LTB₄) and LPO were determined 2 and 4 hours after administration of LPS or saline. LPS significantly enhanced blood LTB₄ levels (pg/ml) 4 hours after administration in comparison with the saline administered group: significantly higher levels in the SO Group (1,313.0±389.6, n=8) than in the FO Group (594.0±151.7, n=7) (p<0.001). White blood cell count (WBC; /mm³) was lowered in the SO Group than in the FO Group 4 hours after administration of LPS (2,013±422 vs 3,200±697, p<0.01). The concentration of LTB₄ varied in liver tissue (pg/wet·g) as well as in blood (425.3±96.0 in the FO Group (n=7); 704.8±117.8 in the SO Group (n=8), p<0.001). Plasma GOT and GPT indicated more severe hepatic dysfunction in the FO Group. The FO Group showed significantly higher LPO levels in plasma and liver tissue prior to LPS administration (p<0.001 in both). These findings suggested that dietary-fish-oil feeding lowered the levels of LTB₄ and reduction of WBC induced by LPS while it increased the accumulation of LPO and that it aggravated hepatic disorder caused by LPS.

Key words : fish oil, eicosapentaenoic acid, lipopolysaccharide, leukotriene B₄, lipid peroxide

緒 言

Dyerberg ら¹⁻⁴ の疫学的調査により、現在では魚油の血漿脂質低下作用や抗動脈硬化作用が報告されている⁵⁻⁷。抗動脈硬化作用については魚油中に含まれている eicosapentaenoic acid (EPA) が arachidonic acid (AA) に代わって、アラキドン酸カスケードにおける cyclooxygenase 系の代謝産物を変化させるためと考えられている^{5,7}。一方、AA の 5-lipoxygenase による代謝産物である leukotriene (LT) は、その構造からみて LTB₄ と peptide LT である LTC₄, LTD₄, LTE₄ に分けられる。それらのなかで LTB₄ は多核白血球 (PMN) に対してきわめて少量で化学遊走、粘着凝集反応や脱顆粒を生じさせ⁸、また、炎症のメディエーターとしても最近注目されている⁹。ところで EPA は 5-lipoxygenase 系の基質ともなり、その代謝産物として 5 シリーズの LT を産生する¹⁰。この 5 シリーズの LT は、AA から産生される 4 シリーズの LT と比較して生物学的活性がほとんどみられず、LTB₅ ではその活性は LTB₄ の 1/10~1/100 以下とされている^{10,11}。したがって EPA は抗炎症作用があると考えられている^{12,13}。しかし EPA は AA と比べて二重結合が 1 つ多いことより生体内で過酸化されやすく、生成された過酸化脂質 (lipid peroxide; LPO) は細胞膜の構造上の変化や流動性の低下と同時に、タンパク質との相互作用も引き起こす。そのため膜の脆弱化、透過性の亢進、膜結合性酵素の不活性化などが引き起こされ、ついには細胞を死にいたらしめる^{14,15}。これら魚油の各々の影響についての報告は多いが、今日まで、抗炎症作用と LPO の形成という相反する 2 つの作用を同時に検討した報告はほとんどない。そこでこの 2 つの側面を持つ魚油について、endotoxin (lipopolysaccharide; LPS) 腹腔内投与時の全身的な炎症反応におよぼす影響を検討した。

材料および方法

1. 実験動物

5 週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア) を、恒温恒湿、12 時間照明の飼育室で 1 週間汎用飼料 CE-2 (日本クレア) で飼育した。その後 Mascioli ら¹⁶ に準じて低脂肪食+タラ肝油 (Fish oil 群, FO 群) (日本クレア) を 6 週間投与した。魚油に対する対照群として、現在、食用油として一般的に用いられているサフラワーオイル (べにばな油) を用いて、低脂肪食+サフラワーオイル (Safflower oil 群, SO 群) を 6 週間投与した。それぞれの飼料の構成成分と linoleic acid, AA, EPA, EPA/AA 比は Table 1 に示した。飼育中の飼料および水分は自由摂取とした。

2. 脂肪酸の定量

血中 PMN, 肝組織中の linoleic acid, AA,

Table 1 Composition of experimental diets and fatty acid composition of the dietary oils

	Fish oil diet	Safflower oil diet
Corn starch	36.5%	36.5%
Casein	24.5%	24.5%
Granulated sugar	10.0%	10.0%
Cellulose powder	5.0%	5.0%
Vitamin mix	1.0%*	1.0%*
Mineral mix	7.0%	7.0%
Safflower oil	0.0%	15.0%
Cod liver oil	15.0%	0.0%
Others	1.0%	1.0%
Total	100%	100%
	Cod liver oil	Safflower oil
Linoleic acid	6.7%	63.7%
AA	2.6%	0.6%
EPA	16.0%	ND.
EPA/AA	6.15	—

AA : arachidonic acid

EPA : eicosapentaenoic acid

* contain 100mg/kg of vitamin E

EPA, EPA/AA 比を測定するため, ラットを約12時間絶食後 pentobarbital sodium (Dainabot) 40 mg/kg 腹腔内投与で麻酔し, 開胸, 開腹した. 右心房から採血後, 冷生理食塩水で門脈から灌流後, 肝臓を摘出した.

2.1. PMN の採取

松本らの方法¹⁷ に準じ, Histopaque-1077 液 (SIGMA) を用いて PMN を採取した. 集めた PMN の一部をチュルク液 (和光純薬) で染色し Burker-Turk 型計算板 (Erma) を用いて細胞数を測定した. この方法では約 80% が PMN であり残りの 20% はリンパ球または単球であった.

2.2. PMN および肝組織からの脂質の抽出

1 ml の蒸留水に浮遊させた PMN および前述の方法で摘出した肝組織 1 g より, 山川らの方法¹⁸ を用いて抽出し, 窒素気流下に乾固した.

2.3. 脂肪酸のメチルエステル化

斎藤らの方法¹⁹ に準じ, 5% 塩酸 methanol (ナカライテスク) を用いて行った. さらに内部標準 (C_{23-0}) を加え n-hexane に溶解後, ガスクロマトグラフィーで脂肪酸を定量した.

2.4 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の定量

島津 GC-8A 型ガスクロマトグラフィーを用い, カラムは内径 0.3 mm, 全長 40 m のキャピラリーガラスカラムで, 液相には Advance-DS (耐熱性 Diethylene glycol succinate, 信和化工) を用いた. carrier gas は N_2 で 1.25 kg/cm² の圧力で流し, scavenger rate は 45 ml/min とした. 注入口は split 方式を用い split ratio は 1/100 とした. 注入口の温度およびカラム温度はそれぞれ 250, 200°C とし, 検出部には水素炎イオン化型検出器 (FID) を用いた. retention time の決定には標準物質を用いた. 以上脂肪酸の定量における全行程の回収率は 80% 以上であった.

3. LPS 投与モデルの作製

15~18時間絶食後のラットの腹腔内に LPS (lipopolysaccharide, Escherichia coli Sero-

type 055 : B5, SIGMA) 10 mg/kg を 0.8 ml の生理食塩水に溶解して投与した. 対照群には同量の生理食塩水のみを投与した.

各群をさらに 2 群に分け LPS および生食投与後 2 時間, 4 時間後に前記と同様の麻酔下に開腹, 腹部大動脈からの採血および冷生理食塩水で門脈から灌流した肝臓を摘出し, 実験に使用した.

4. LTB₄ の測定

4.1. 血液からの LTB₄ の抽出

全血 4 ml を採血後ただちに, 4 倍量の ethanol (99.5%) と混合し氷冷中に 30 分放置後, 1,500 g × 90 min の遠心で得られた上清を窒素気流下に乾固し, 10% ethanol 溶液とした.

4.2. 肝臓からの LTB₄ の抽出

摘出した肝臓 4 g を直ちに液体窒素で凍結後, 4 倍量の ethanol (99.5%) とともに氷冷下に Polytron PT-10 homogenizer にてホモジナイズし (full speed, 2 bursts for 5 sec each), 氷冷中に 30 分放置した. その後 1,500 g × 90 min の遠心で得られた上清を窒素気流下に乾固し, 10% ethanol 溶液とした.

4.3. Sep-Pak® C18 カラムによる LTB₄ の濃縮

Shak²⁰ の方法を一部変更して行った. すなわち上記の血液および肝臓から抽出した試料を 1N-HCl で pH 3 に調節し, ethanol (99.5%) 10 ml, 蒸留水 10 ml で前処置したカラムに通した (2 ml/min). 次に 10% ethanol 20 ml, 20% ethanol 20 ml で洗浄後, 60% ethanol 10 ml で LTB₄ を含む分画を採取した. 60% ethanol 分画は窒素気流下に乾固され, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の移動相 400 μl に溶解し, このうち 200 μl を HPLC にて分離精製した.

4.4. HPLC による LTB₄ の精製

橋本らの方法²¹ に準じて行った. pump には Waters 社 Model 510 を用い, injector には Waters U6K を用いた. 検出器は Waters Model 481 を用い, 270 nm の波長で検出した. カラムは Nucleosil 5C₁₈, 4.6 φ × 250 m/m (ナ

ーゲル社)を用い, カラム温度は35°Cとした. 移動相は methanol:蒸留水:酢酸=70:30:0.01 (v/v/v) でアンモニアを用いて pH 5.7 に調節し, 流速は 1 ml/min とした. retention time の決定は標準物質を用いて行い, LTB₄ 分画を採取した.

4.5. Radioimmunoassay (RIA) 法による LTB₄ の定量

採取した LTB₄ 分画を窒素気流下に乾固し, RIA キット (TRK. 940, Amersham) の測定用緩衝液で適宜希釈後, 上記のキットを用いて定量した. 測定値は血液中; pg/ml, 肝組織中; pg/wet·g で表した. 標準物質によるこれら全行程の回収率は85%以上であった.

5. 血漿中 GOT, GPT の測定

日立736型自動分析装置で測定した.

6. 白血球数の測定

コーワ NE8000 または 3000自動分析機を用いて測定した.

7. 血漿中 LPO の測定

八木法^{22,23}を用いて, ソマック RF5000 自動分析機で測定した. 測定値は血漿 1 ml あたりの malondialdehyde 量 (n mon/ml) で表した.

8. 肝組織中の LPO の測定

Uchiyama ら²⁴の方法を用いて測定した. 測定値は湿肝組織 1g あたりの malondialdehyde 量 (n mol/wet·g) で表した.

9. 統計学的処理

上記の実験で得られた結果は mean±SD で表した. 有意差の検定は独立 2 群の t 検定を用いて行い, 5% 未満をもって有意差ありとした.

結 果

1. 実験食投与ラットの体重の変化 (Fig. 1) SO 群, FO 群, とともに体重は週齢をおうごとに増加し, 両群における各週齢での体重に有意の差はなかった.

2. PMN および肝臓における脂質構成の変化 (Table 2)

Linoleic acid, AA, EPA, EPA/AA 比からみた脂質構成は, PMN および肝組織中において同様であった. すなわち FO 群は SO 群に対して linoleic acid, AA の含有量が有意に低かった ($p < 0.001$). EPA 含有量は SO 群では測定限界以下 (PMN; 0.1 ng/(2.0×10^5 PMN) 以下, 肝組織; 1 μ g/wet·g 以下) であった. したがって EPA/AA 比は FO 群のみに算出可能で PMN が 1.84, 肝臓では 1.80 であった.

3. 血中 LTB₄ 値 (Fig. 2)

LPS 投与 4 時間後の LTB₄ 値は, FO 群で 594.0 ± 151.7 , SO 群で $1,313.0 \pm 389.6$ と, 両群ともに対照群に比し有意に高かった (ともに $p < 0.001$). 特に, SO 群での 4 時間値は FO 群の 4 時間値に比べて有意の高値を示した ($p < 0.001$). また各実験食投与時の対照群の血

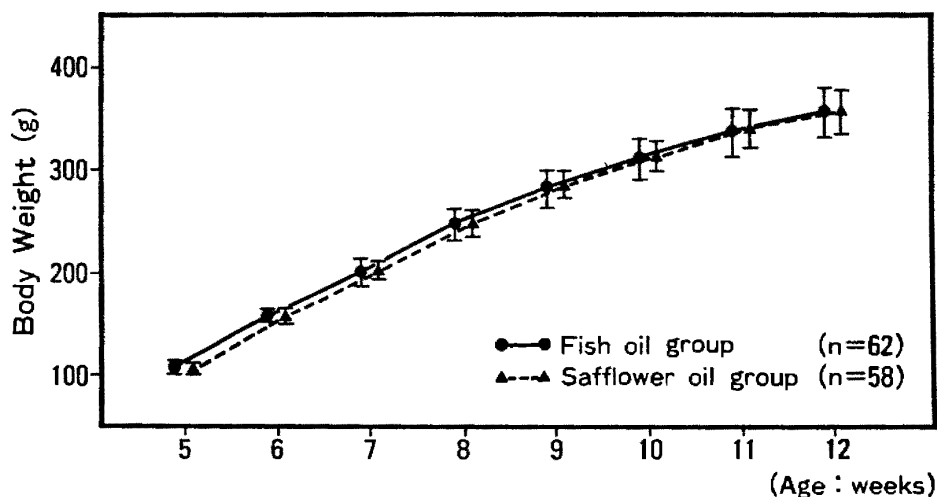


Fig. 1 Serial changes of the body weight in experimental animals

Table 2 Comparison of fatty acids content in experimental animals

Polymorphonuclear leukocyte (PMN) (n=10)			
	Fnish oil group	Safflower oil group	p-value
Lnoileic acid	2.1±0.4	11.2±5.0	<0.001
AA	3.8±0.9	13.6±4.5	<0.001
EPA	7.0±2.0	ND.	—
EPA/AA	1.84	—	—

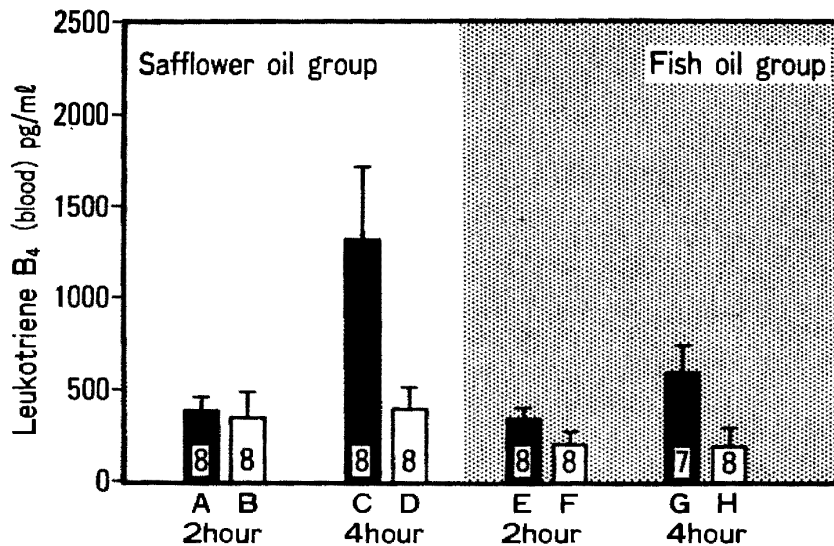
Unit : ng/(2.0×10⁵PMN)

Liver (n=10)			
	Fish oil group	Safflower oil group	p-value
Linoleic acid	0.8±0.1	3.4±0.4	<0.001
AA	1.5±0.1	5.7±0.5	<0.001
EPA	2.7±0.3	ND.	—
EPA/AA	1.80	—	—

Unit : mg/wet·g

AA : arachidonic acid

EPA : eicosapentaenoic acid

**Fig. 2** Changes of blood LTB₄ following LPS administration

■; LPS administration, □; Control

Each bar represents mean ± SD for the number of preparations shown at the bottom. p<0.05; B vs. F

p<0.01; E vs. F, D vs. H

p<0.001; C vs. D, G vs. H, A vs. C, E vs. G, C vs. G

LTB₄: leukotriene B₄, LPS: lipopolysaccharide

中にも LTB₄ は認められ (FO 群 2 時間値 ; 207.5±68.6, 4 時間値 ; 199.1±91.6, :SO 群 2 時間値 ; 351.8±130.5, 4 時間値 ; 395.5±117.4), この値においても実験食により有意の

差を認めた (2 時間値 ; p<0.05, 4 時間値 ; p<0.01).

4. 肝組織中の LTB₄ 値 (Fig. 3)

血中と同様の変動を示した. すなわち, LPS

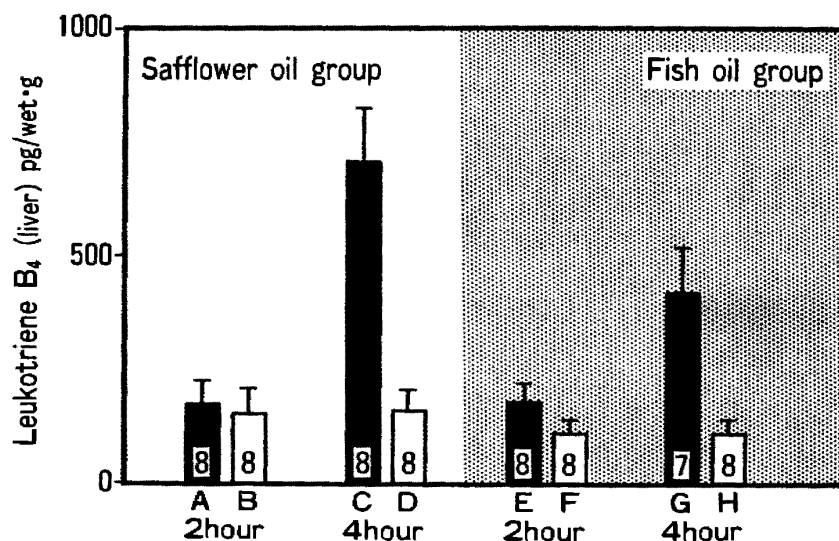


Fig. 3 Changes of liver LTB₄ following LPS administration

■; LPS administration, □; Control

Each bar represents mean \pm SD for the number of preparations shown at the bottom.

$p < 0.05$; D vs. H

$p < 0.001$; C vs. D, E vs. F, G vs. H, A vs. C, E vs. G, C vs. G

LTB₄: leukotriene B₄, LPS: lipopolysaccharide

Table 3 Changes of white blood cell counts, plasma GOT and plasma GPT following LPS administration

		White blood cell counts (/mm ³)		
		Fish oil group	Safflower oil group	p-value
LPS	(2h)	2,975 \pm 333 (n=8)	3,800 \pm 2,715 (n=7)	—
Control	(2h)	7,643 \pm 1,658 (n=7)	7,525 \pm 1,106 (n=8)	—
LPS	(4h)	3,200 \pm 697 (n=8)	2,013 \pm 422 (n=8)	<0.01
Control	(4h)	8,488 \pm 2,389 (n=8)	8,071 \pm 1,649 (n=8)	—
		GOT (IU/ml/37°C)		
		Fish oil group	Safflower oil group	p-value
LPS	(2h)	104.1 \pm 7.6 (n=8)	96.1 \pm 15.1 (n=8)	—
Control	(2h)	80.0 \pm 7.9 (n=8)	73.0 \pm 6.8 (n=8)	—
LPS	(4h)	529.3 \pm 145.6 (n=8)	185.3 \pm 45.3 (n=8)	<0.001
Control	(4h)	78.1 \pm 3.1 (n=8)	76.6 \pm 8.2 (n=8)	—
		GPT (IU/ml/37°C)		
		Fish oil group	Safflower oil group	p-value
LPS	(2h)	33.3 \pm 2.4 (n=8)	26.4 \pm 1.1 (n=8)	<0.001
Control	(2h)	35.4 \pm 8.2 (n=8)	22.0 \pm 0.8 (n=8)	<0.001
LPS	(4h)	557.0 \pm 222.0 (n=8)	66.1 \pm 46.0 (n=8)	<0.001
Control	(4h)	30.6 \pm 5.0 (n=8)	24.0 \pm 3.5 (n=8)	<0.01

LPS : lipopolysaccharide

投与4時間後の LTB_4 値は、両実験食群ともに対照群と比べ有意に高値を示し (FO 群; 425.3 ± 96.0 , SO 群; 704.8 ± 117.8 , ともに $p < 0.001$), SO 群における値は FO 群の値に比べて有意の高値を示した ($p < 0.001$). さらに肝組織中の対照群にも LTB_4 が認められた (FO 群 2時間値; 115.9 ± 29.3 , 4時間値; 116.0 ± 27.4 , SO 群 2時間値; 159.7 ± 55.2 , 4時間値; 164.7 ± 43.7). しかし、肝組織中では4時間の対照群にのみ実験食による有意の差がみられた ($p < 0.05$).

5. 血中白血球数 (Table 3)

FO 群, SO 群ともに LPS 投与2時間後から各対照群と比較して著明な減少を示した (FO 群 2, 4時間値, SO 群 4時間値; ともに $p < 0.001$; SO 群 2時間値; $p < 0.01$). しかも LPS 投与4時間後の値では SO 群が FO 群に比べて有意に減少していた ($p < 0.01$).

6. 血漿中 GOT および GPT 値 (Table 3)

GOT 値は, FO 群, SO 群とも LPS 投与2時間後から各対照群と比較して有意の高値を示した (FO 群 2, 4時間値, SO 群 4時間値 ともに $p < 0.001$; SO 群 2時間値 $p < 0.01$).

しかも LPS 投与4時間後の値では, FO 群が SO 群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.001$). LPS 投与4時間後の GPT 値は, FO 群, SO 群ともに対照群と比較して有意に高値を示した (FO 群; $p < 0.001$, SO 群; $p < 0.05$). また両実験食群の対照群および LPS 投与後各時間の GPT 値を比べると, すべて FO 群において有意に高値であった.

7. 血漿中の LPO (Fig. 4)

血漿中の LPO は SO 群において, 対照群の2時間値は 3.61 ± 0.34 , 同4時間値は 3.54 ± 0.40 , LPS 投与後2時間値は 3.98 ± 0.07 , 同4時間値は 3.71 ± 0.29 で, LPS 投与により2時間後の値のみに有意の高値 ($p < 0.05$) を示した. 一方, FO 群では LPS の投与により2時間後, 4時間後ともに有意の高値を示した (対照群 2時間値; 6.31 ± 0.77 , 4時間値; 6.16 ± 0.73 , LPS 投与群 2時間値; 7.83 ± 0.45 , 4時間値; 8.00 ± 0.68 ; ともに $p < 0.001$). さらに FO 群と SO 群の対照群および LPS 投与後の各時間の値を比較すると, いずれも FO 群が有意に高値であった (いずれも $p < 0.001$).

8. 肝組織中の LPO (Fig. 5)

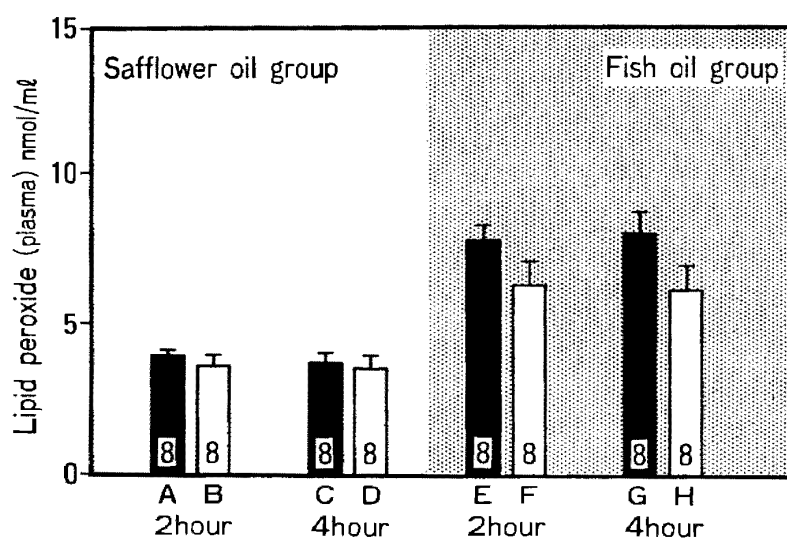


Fig. 4 Changes of plasma LPO following LPS administration

■; LPS administration, □; Control

Each bar represents mean \pm SD for the number of preparations shown at the bottom. $p < 0.05$; A vs. B, A vs. C

$p < 0.001$; E vs. F, G vs. H, A vs. E, C vs. G, B vs. F, D vs. H

LPO: lipid peroxide, LPS: lipopolysaccharide

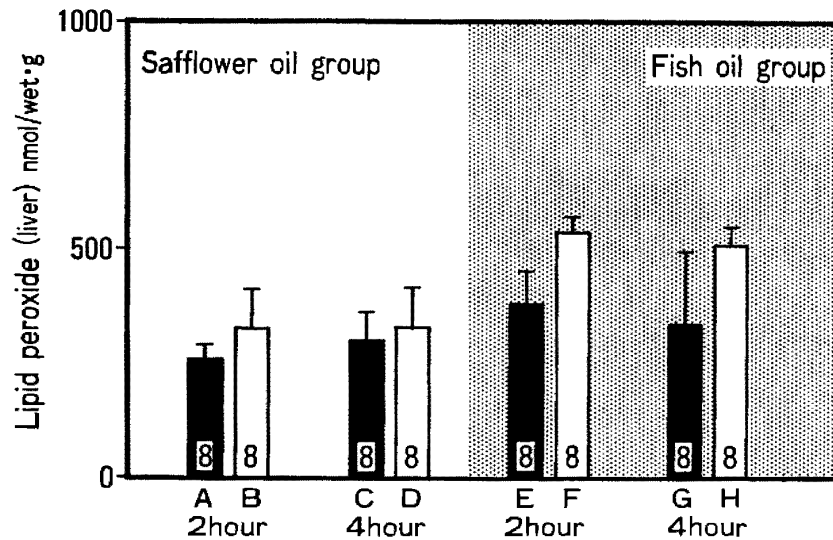


Fig. 5 Changes of liver LPO following LPS administration

■; LPS administration, □; Control

Each bar represents mean \pm SD for the number of preparations shown at the bottom.

$p < 0.05$; A vs. B, G vs. H

$p < 0.001$; E vs. F, A vs. E, B vs. F, D vs. H

LPO: lipid peroxide, LPS: lipopolysaccharide

FO 群, SO 群ともに LPS の投与により各対照群と比較して低値を示した (FO 群, 対照群 2 時間値; 531.6 ± 40.4 , 4 時間値; 504.0 ± 42.4 , LPS 投与群 2 時間値; 381.3 ± 70.3 , 4 時間値; 338.1 ± 152.8 , SO 群, 対照群 2 時間値; 329.2 ± 80.9 , 4 時間値; 328.5 ± 83.6 , LPS 投与群 2 時間値; 259.8 ± 27.7 , 4 時間値; 301.3 ± 59.0). その差は FO 群の 2 時間値で $p < 0.001$, 4 時間値で $p < 0.05$, SO 群の 2 時間値で $p < 0.05$ であった. また FO 群と SO 群を比べると対照群では FO 群が有意に高値を示し (ともに $p < 0.001$), LPS 投与群では投与 2 時間後のみ FO 群が有意に高値を示した ($p < 0.001$).

考 察

EPA は二重結合 5 コを有する炭素数 20 コの多価不飽和脂肪酸で, 生体内ではほとんど合成されず, おもにタラやニシンなどの海産魚類などを介して体内に取りこまれる¹¹. 今回, FO 群に用いた魚油は EPA を含有し, その脂肪酸組成における EPA/AA 比は 6.15 であった. 対照として用いた SO 群のサフラワーオイルは

EPA を含まず, AA の前駆体となる linoleic acid²¹ を多く含有していた (Table 1). これらの実験食を投与することによって, FO 群は SO 群に比べて PMN および肝組織中に含まれる AA 量が有意に低く, EPA が有意に高くなった (Table 2). しかし摂食状況や体重増加からみた発育程度に両実験食群で差はみられなかった (Fig. 1).

炎症モデル作製に用いた LPS は, グラム陰性桿菌の菌体内毒素で, 白血球減少作用, 各種メディエーターの産生, 活性酸素の産生, 補体系活性化作用など多様な生物学的活性を示す物質である^{9,25}. 三宅²⁶ の報告によると, 腹腔内に投与された LPS は 4 時間後には, その大部分が血液中および肝組織に取り込まれる. このような状態においては, 補体系や血小板活性化因子 (PAF) を介して LTB_4 が産生されるとの報告もみられる^{27,28}. LTB_4 は, 5-lipoxygenase 経路によって AA から形成されるケミカルメディエーターで, 生体が受ける種々の刺激により PMN や macrophage などから産生される²⁹. また, 肝臓の Kupffer 細胞からの産生も指摘されている^{30,31}. さらに河田ら³² は

LPS 投与により引き起こされる肝障害において、肝組織中の LTB_4 が有意に増加することから、 LTB_4 がこの肝障害の発生機序に関与すると指摘している。

ところで、EPA から産生される LTB_5 は LTB_4 より生物学的活性が $1/10\sim 1/100$ 以下と極めて低く^{10,11}、安定した測定値をとらえにくいので、今回の実験では LTB_4 を測定対象とした。

本実験で、腹腔内から循環血中に入った LPS は、血中白血球を刺激し、PAF やその他のメディエーターを介して白血球の凝集、粘着、遊走を起こし、結果として白血球数の減少を生じたと思われた。さらに、活性化された PMN (おもに好中球) はケミカルメディエーターのひとつとして、その細胞膜中にある AA から LTB_4 を産生し、産生された LTB_4 は白血球の凝集、粘着、遊走をさらに増加させ、白血球数をより減少させたと考えられた。ところで FO 群は SO 群に比べて PMN に含まれる AA 量が有意に低値を示し、EPA が有意に高値を示していた (Table 2)。したがって、FO 群では LPS の刺激により PMN の細胞膜から放出される AA が少く、代わって EPA が多く放出され、 LTB_5 に代謝されていくと考えられた。このため LPS 投与 4 時間後において血中の LTB_4 値は、SO 群において FO 群に比較して有意に高値を示したものと考えられた。この LTB_4 には、PMN に対してきわめて少量で化学遊走や粘着凝集反応などを生じさせる作用があるため⁸、SO 群により高度の白血球減少が生じたものと考えられた。ところで LPS 投与による LTB_4 の増加率 (LPS/control) であるが、LPS 投与 2 時間後では FO 群が 1.64、SO 群が 1.11 と FO 群に高くなっている。これは対照群の値に差があるため、この差は、開腹や採血の刺激による LTB_4 の産生量の差と考えられた。つまり対照群における LTB_4 の産生量において、AA を多く含有する SO 群が、AA の含有量の少ない FO 群と比較して、有意に高値を示していたためである。しかし、

LTB_4 の生物学的活性は nM オーダーから μM オーダーで生じるため⁸、最終的な LTB_4 濃度とその生物学的活性に関与していると考えられた。つまり両群における LPS 投与 4 時間後の白血球数の差は、 LTB_4 の産生量の差と考えられた (Fig. 2, Table 3)。

肝組織内の LTB_4 も血中と同様の変動を示した。つまり LPS 投与 2 時間後の増加率 (LPS/control) は FO 群に高く (FO 群; 1.61, SO 群; 1.13)、この差は対照群の LTB_4 値の差、つまり開腹や灌流の刺激による LTB_4 の産生量の差と考えられた。さらに SO 群では LPS 投与 4 時間後において、FO 群と比較して、 LTB_4 値が有意に高く、増加率も高かった (Fig. 3)。河田ら³² が指摘しているように、この LTB_4 値の上昇が LPS 投与時における肝障害に関与しているとするれば、SO 群においてより高度な肝障害が生じるはずである。しかし血漿中の GOT、GPT 値からみた肝障害は、むしろ FO 群においてより高度であった (Table 3)。この原因を考えるに著者は血中および肝組織中の LPO に注目した。LPO とは一般に脂質が酸化されその分子内にヒドロペルオキシド (-OOH) 基や、ペルオキシド (-O-O-) 構造をもつ脂質群をいう³³。この LPO の細胞膜中の増加は、前述したが膜の脆弱化、透過性の亢進、膜結合性酵素の不活性化などを引き起こす^{14,15}。ところで FO 群の肝細胞の膜中には AA より二重結合が 1 つ多い EPA が多量に含まれている。二重結合が 1 つ多いことは、過酸化されやすい活性メチル基が増加することを示している³⁴。つまり FO 群では生体内で細胞膜などのリン脂質の自動酸化により、LPO がより多く産生されている状態にあるといえる。実際、肝組織中の対照群の LPO 値は、FO 群において SO 群と比較して有意に高値であった (Fig. 5)。EPA をより多く含有する FO 群の肝細胞は、細胞膜やミトコンドリア、ミクロソームなどの膜リン脂質中において自動酸化による LPO の蓄積が SO 群と比較してより高度となり、細胞障害が引き起こされやすい状態と

なっていたものと考えられた。このため LPS の投与により肝組織中の LTB_4 の産生が少ないにも関わらず、より高度に肝細胞が傷害されたものと考えられた。なお、著者の報告以外に調べ得た範囲では、魚油摂取時の LPS 投与における LTB_4 と LPO の両者の相関について述べた報告はみられなかった。LPS の投与後に肝組織中の LPO 値が低下するのは、おそらく Robak の報告³⁵にあるように、肝組織におけるチトクローム P450 の活性低下や、死滅した肝細胞からの流出が原因ではないかと考えられる。したがって、血漿中の LPO 値が LPS の投与後に上昇するのは、肝臓などの傷害された組織からの逸脱によると考えられた³⁵。さらに魚油中には docosahexaenoic acid のような EPA よりさらに二重結合の多い脂肪酸も含まれており、これらの影響も関与している可能性も考えられたが¹⁴、今回は EPA と LPO に限定して考察した。

まとめると、魚油の摂取は、サフラワーオイル摂取時と比較して、アラキドン酸代謝産物である LTB_4 値を低下させ、白血球の減少など LPS 投与時における全身的な反応を軽減させるが、一方では、生体内に LPO をより多く蓄積させることにより、LPS 投与時における肝障害を増悪すると言う二面性を持つことが示唆された。ヒトにおいても長期間かつ大量に魚油を摂取する場合には、後者の過酸化脂質の蓄積による障害の重要性が指摘された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました近畿大学ライフサイエンス研究所久山 健教授、近畿大学医学部心臓外科城谷 均教授に深謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり終始御指導、御助言を頂きました近畿大学医学部救命救急センター笠原 洋診療講師、近畿大学医学部第2外科山田 幸和臨床講師、ならびに第2外科教室の各位に心から感謝いたします。

本論文の要旨およびその一部は1991年10月、第33回消化器病学会大会(久留米)、1991年7月、第30回近畿大学医学会学術講演会で発表した。

文 献

1. Bang HO, Dyerberg J. Plasma lipid and lipoprotein pattern in greenlandic west-coast Eskimos. *Lancet* 1971; 1: 1143-1146.
2. Dyerberg J, Bang HO, Hjörne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* 1975; 28: 958-966.
3. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978; 2: 117-119.
4. Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 1979; 2: 433-435.
5. Smith CB, Gibney MJ, Gallagher PJ, Jewell R, Hillier K. Effect of polyunsaturated fatty acids of the n-3 and n-6 series on lipid composition and eicosanoid synthesis of platelets and aorta and on immunological induction of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1989; 72: 29-35.
6. Hagve TA, Christophersen BO. Mechanisms for the serum lipid-lowering effect of n-3 fatty acids. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 813-816.
7. 田村 泰, 平井愛山, 寺野 隆, 齊藤博幸. エイコサペンタエン酸と動脈硬化. *内科* 1990; 66: 33-36.
8. 室田誠逸. ロイコトリエンの生物活性と薬理作用. *医の歩み* 1987; 143: 297-301.
9. 西川浩平. エンドトキシンショックのメディエータ. *代謝* 1989; 26: 453-463.
10. Terano T, Salmon JA, Moncada S. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B_5 . *Prostaglandins* 1984; 27: 217-232.
11. 寺野 隆, 平井愛山, 田村 泰. エイコサペンタエン酸とロイコトリエン. *代謝* 1987; 24: 229-240.
12. 寺野 隆. 白血球アラキドン酸代謝を介する eicosapentaenoic acid の抗炎症作用. *炎症* 1987; 7: 63-71.
13. Fisher M, Upchuech KS, Levine PH, et al. Effects of dietary fish oil supplementation on polymorphonuclear leukocyte inflammatory potential. *Inflammation* 1986; 10: 387-392.
14. 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝偏. 過酸化脂質と生体. 東京: 学会出版センター, 1985.
15. 寺尾純二. 脂質のラジカル連鎖過酸化反応と膜障

- 害. 日臨 1988 ; 46 : 2149-2154.
16. Mascioli EA, Iwasa Y, Trimbo S, Leader L, Bistrrian BR, Blackburn GL. Endotoxin challenge after menhaden oil diet: effects on survival of guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 1989 ; 49 : 277-282.
17. 松本 正, 中川原章, 中村 亨ら. 白血球の採取法. 日本生化学会. 続生化学実験講座 8 血液(下). 東京: 東京化学同人, 1987 ; 679-690.
18. Kates M 編, 山川民夫, 斎藤国彦, 林 陽訳. 脂質研究法. 東京: 東京化学同人, 1975. *Techniques of lipidology*. 1972.
19. 斎藤国彦, 河村成子, 武富 保, 山川民夫, 矢野郁也. 脂質の構成成分. 日本生化学会. 生化学実験講座 3 脂質の化学. 東京: 東京化学同人, 1974 ; 181-231.
20. Shak S. Leukotriene B₄ catabolism: quantitation of leukotriene B₄ and its ω -oxidation products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1987 ; 141 : 355-371.
21. 橋本篤司, 片桐雅博, 鳥居新平, 奥山治美. ラット好中球のロイコトリエン類産生に及ぼす食餌の α -リノレン酸/リノール酸バランスの影響. *アレルギー* 1988 ; 37 : 157-165.
22. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med Metab Biol* 1976 ; 15 : 212-216.
23. 八木国夫. 過酸化脂質. *Med Technol* 1980 ; 8 : 1080-1082.
24. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978 ; 86 : 271-278.
25. 芝 哲夫, 楠本正一. エンドトキシン活性部位の構造. *代謝* 1989 ; 26 : 403-412.
26. 三宅 孝. 正常および腹膜炎ラットにおける⁵¹Cr-エンドトキシンの体内動態に関する研究. *名古屋市大医学会誌* 1985 ; 36 : 6-18.
27. 柴 忠明, 池田正規, 原 彰夫ら. Leukotrienes. *救急医* 1989 ; 13 : 937-944.
28. Stimler NP, Bach MK, Bloor CM, Hugli TE. Release of Leukotrienes from guinea pig lung stimulated by C5a anaphylatoxin. *J Immunol* 1982 ; 128 : 2247-2252.
29. 腰原康子. ロイコトリエン産生細胞. *代謝* 1983 ; 20 : 1185-1194.
30. 溝口靖紘. 肝細胞障害とロイコトリエン. *代謝* 1989 ; 26 : 1097-1106.
31. 阪上吉秀, 溝口靖紘, 河田則文ら. Kupffer 細胞からのロイコトリエン B₄ 遊離. *肝臓* 1988 ; 29 : 753-755.
32. 河田則文, 阪上吉秀, 申 東植ら. ラット肝組織中ロイコトリエンの検出. *日消病会誌* 1988 ; 85 : 2193-2196.
33. 宮沢陽夫. 高まる過酸化脂質への関心と定量法の開発. *なんせき* 1988 ; 163 : 100-103.
34. 藤本健四郎. 過酸化脂質とは. *臨采* 1988 ; 73 : 129-133.
35. Robak J. Adjuvant-induced and carrageenin-induced inflammation and lipid peroxidation in rat liver, spleen and lungs. *Biochem Pharmacol* 1978 ; 27 : 531-533.