



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エイコサペンタエン酸エチルエステル(EPA-E)の脂質代謝に及ぼす作用に関する研究
Author(s)	水口, 清
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	乙第4261号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3071590
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51183
Type	doctoral thesis
File Information	000000265455.pdf



①

エイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E)

の脂質代謝に及ぼす作用に関する研究

北入中房 73 2004

水口 清

目次

	頁
目次	(1)
略語表	(3)
序論	
第1節 高脂血症治療薬の意義について	1
第2節 Ethyl all-cis-5,8,11,14-17-icosapentaenoate (EPA-E) について	2
第1章 実験的高脂血症病態モデル動物における血中脂質低下作用	
序説	6
第1節 正常動物（ラット、ハムスター）に対する作用	7
第2節 実験的外因性高脂血症モデル動物（ラット、ウサギ）に対する作用	9
第3節 実験的内因性高脂血症モデル動物（ラット）に対する作用	14
考察	17
第2章 ラットにおける血中コレステロール（CH）低下作用機序の解析	
序説	20
第1節 CHの消化管吸収に及ぼす影響	20
第2節 肝CH生合成活性に及ぼす影響	22
第3節 胆汁排泄に及ぼす影響	24
第4節 血中CHクリアランスに及ぼす影響	25
考察	28

	頁
第3章 ラット血清超低比重リポ蛋白質 (VLDL) の性質に及ぼす影響	
序説	32
第1節 VLDLの粒子径に及ぼす影響	32
第2節 VLDLの脂質組成に及ぼす影響	34
第3節 VLDLのアポ蛋白質組成に及ぼす影響	35
第4節 VLDLの脂肪酸組成に及ぼす影響	37
第5節 肝トリグリセリド (TG) 生合成活性に及ぼす影響	39
第6節 肝 TG 分泌速度 (TGSR) に及ぼす影響	40
第7節 血漿リポ蛋白質水解酵素活性に及ぼす影響	41
考察	43
総括	47
実験材料および方法	49
参考文献	59
謝辞	67

略語表

AA	arachidonic acid
apo	apolipoprotein
CE	cholesteryl esters
CH	cholesterol
CM	chylomicron
d	density
EPA	5,8,11,14,17-all-cis-icosapentaenoic acid
EPA-E	ethyl 5,8,11,14,17-all-cis-icosapentaenoate
FC	free cholesterol
FFA	free fatty acids
HDL	high density lipoprotein
HPLC	high-performance liquid chromatography
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HTGL	hepatic triglyceride lipase
IDL	intermediate density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipase
PL	phospholipids
PG	prostaglandin
PUFA	polyunsaturated fatty acids
TC	total cholesterol
TG	triglycerides
TX	thromboxane
VLDL	very low density lipoprotein

序 論

第1節 高脂血症治療薬の意義について

近年、冠動脈疾患は年々増加の一途をたどり、がん、糖尿病とならんで成人病の一角をなしている。また、冠動脈疾患が急性発症した場合の典型例は急性心筋梗塞であるが、これらは直接死亡と結びつくことが多く、医療技術の進歩や治療薬の開発にも関わらず依然として致命率が高い。冠動脈疾患の危険因子として、高脂血症、高血圧、喫煙、家族歴、糖尿病等が指摘されている。なかでも、高脂血症、高血圧、喫煙は冠動脈疾患の3大危険因子として重要視されており、虚血性心疾患の原因である冠動脈の粥状動脈硬化に最も深い関わりをもっているのが高脂血症である。

冠動脈疾患の発症と血清 CH 値の因果関係を初めて疫学的に明らかにしたのが有名な Framingham Heart Study¹⁾である。その後の大がかりな臨床調査結果によると、血清 CH を 1% 下げることにより、冠動脈疾患の発症頻度を 2% 減少させることができるという^{2,3)}。すなわち、血清 CH 値を 300 mg/dl から 200 mg/dl にすることで、理論上冠動脈疾患のリスクは半分以下になることになる。血清 TG レベルと冠動脈疾患との因果関係は長い間論議されてきたが、その後の Framingham Heart Study⁴⁾では、高 CH 血症のみならず高 TG 血症も冠動脈疾患の危険因子であると指摘されている。

高脂血症を是正し、冠動脈疾患発症を予防さらには治療する観点から、高脂血症に対する薬物療法が行われている。現在、薬物療法で多く使用されている薬剤は、胆汁吸着剤、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、ニコチン酸製剤、フィブレート製剤、プロブコール等である。これらは、その作用機序、作用強度ならびに作用プロファイルが各々異なっている。例えば、単純に血清脂質低下作用をみても、血清 CH を特に強く低下させる薬剤と血清 TG を強く低下させる薬剤があり、その特長に応じて使い分けられているのが現状である。一方では、これらの薬剤の副作用も取り沙汰されて

おり、胆汁吸着剤であるコレステラミンは消化器症状として便秘を、ニコチン酸製剤は約 10% の患者にフラッシング現象を伴うことから、服用し難い面がある。最近、臨床に応用され始めた HMG-CoA 還元酵素阻害剤は血清 CH 低下作用が特に強力であることから注目されているが、骨格筋融解症やとくにフィブラート系製剤と併用時の腎機能低下者での急性腎不全併発等の副作用⁵⁾も報告されており、投与時にはモニタリングが必須とされている。このような状況のなかで薬物療法の立場からは、既存の薬剤とは異なる作用機序を有し、且つ、安全性の高い血清脂質低下薬の開発が望まれている。

第2節 Ethyl all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E) について

all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoic acid (一般名: エイコサペンタエン酸, C22:5, ω 3; EPA) は、分子内二重結合を 5 個有する ω 3 系 PUFA の一種であり、魚介類に比較的多く存在する。この物質が注目されたのは、グリーンランドに住むエスキモー人の虚血性心疾患の発症率がデンマーク人と比べて極端に少ないという疫学調査結果が、Bang & Dyerberg⁶⁾によって報告されたことに端を発する。彼らは、また、このことは摂取する脂肪酸の種類の違いに由来し、食生活の多くを海産物に依存するエスキモー人の血漿脂肪酸に ω 3 系 PUFA が多く、その結果として PG の前駆体である AA (C20:4, ω 6) を初めとした ω 6 系 PUFA の脂肪酸構成比が相対的に低下していることを示した⁷⁾。時を同じくして Needleman ら^{8,9)}は、EPA も AA と同様に cyclooxygenase の基質と成り得ること報告した。この時、EPA は血小板では TX-A₃ に、また、血管壁では PG-I₃ に変換されるが、TX-A₃ は AA から産生される TX-A₂ と異なり血小板凝集作用を持たないのに対し、PG-I₃ は AA から産生される PG-I₂ と同様に血小板凝集抑制作用および血管拡張作用を有することも明らかとなった (図 1)。これらの事実を基に、EPA を初めとする ω 3 系 PUFA が生体内に増加すると、生体

で産生されるエイコサノイドのタイプが、TX-A₂ / PG-I₂ の 2 シリーズから TX-A₃ / PG-I₃ の 3 シリーズに変わることで、血栓形成能が低下し、血栓性疾患もしくは動脈硬化性疾患の予防治療につながるのではないかと仮説が提唱された^{10,11)}。

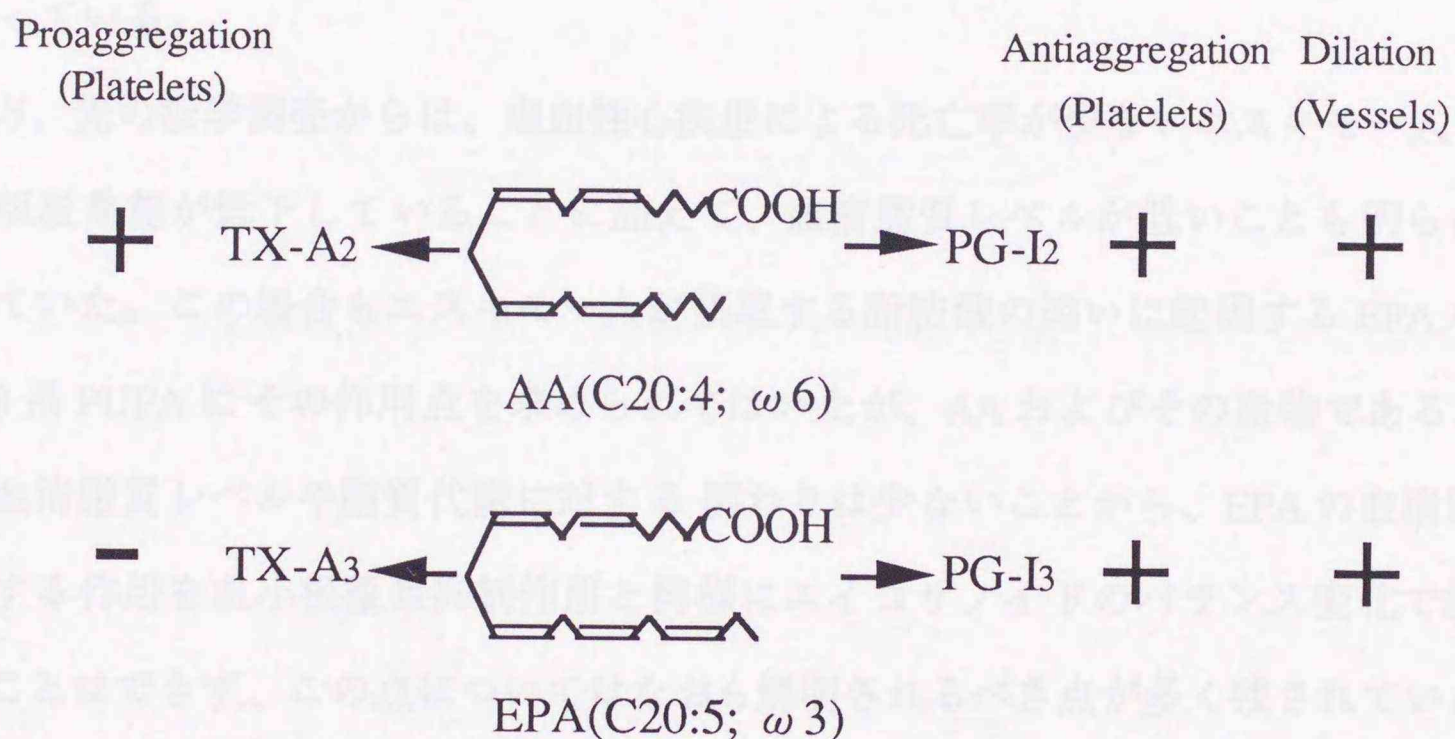


Fig. 1 Biological products of AA and EPA, and their biological functions.

それ以来、その作用本体と考えられる EPA を魚油またはその濃縮物として摂取させることによりこのことの検証が試みられてはきたが、いずれも低純度の EPA を用いた試験によるものであり、得られた成績が EPA に起因するものなのかあるいは他の脂肪酸によるものなのかは十分に解明されていなかった。最近になって、EPA のカルボキシ基をエチルエステル化 (ethyl-all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate, EPA-E, 図 2) することによって、高純度 (純度 90% 以上) で、しかも大量に得ることが可能となった。さらに、この高純度 EPA-E が末梢循環改善作用や抗血栓作用を示すことも明らかにされ^{12,13)}、ごく最近、閉塞性末梢循環不全治療薬として臨床応用されるに至っている。

一方、先の疫学調査からは、虚血性心疾患による死亡率が少ないエスキモー人では血小板凝集能が低下していることに加えて、血清脂質レベルが低いことも明らかとされていた。この場合もエスキモー人が摂取する脂肪酸の違いに起因する EPA などの ω 3 系 PUFA にその作用点を求められてはいたが、AA およびその産物である PG 等の血清脂質レベルや脂質代謝に対する関わりは少ないことから、EPA の血清脂質に対する作用を血小板凝集抑制作用と同様にエイコサノイドのバランス変化で説明することはできず、この点についてはなおも解明されるべき点が多く残されていた。

本研究の目的は、第一に EPA-E が高脂血症治療薬として臨床応用される可能性を探る観点から、本物質の病態モデルにおける血中脂質低下作用を明らかにし、第二に、その血中脂質、特に CH 低下の機序を明らかにすることである。第三に、本研究を進める過程で見いだされ、本物質に特徴的な作用と思われるリポ蛋白質の性質変化について VLDL を用いて明らかにし、リポ蛋白質代謝におけるその意義を考察することにある。

第1章 実験用高脂血症モデル動物における血中脂質低下作用

序論

実験用高脂血症モデル動物は、脂質代謝のしくみを知り、セトの高脂血症病態を
模倣する手段として重要である。古くは Amelchlow¹⁾ がウサギに高CH飼料を与え
て実験的高脂血症ならびに実験的動脈硬化症の発症に成功して以来、種々の方法に
よる実験的高脂血症モデル動物の作成が行われてきた。その多くは飼床における高脂血症創製にも成功することから、
高脂血症発症の経路およびそのプロファイルを知る手助けとして利用されている。

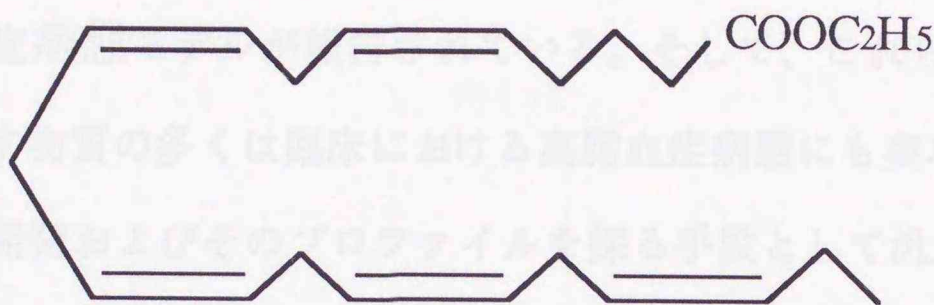


Fig. 2 Chemical structure of ethyl-all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E).

本章における目的は、既述の各種実験用高脂血症モデル動物に対する作用
を比較検討することである。まず、正常動物における脂質低下作用を検討し、続いて、
実験用高脂血症モデル動物に対する作用を検討した。実験用高脂血
症モデル動物として、化学的に合成された飼料に飼育した肥満性高脂
血症モデル、ならびに、食餌性脂質に飼育しないて発症される自発性高脂血症モデル
を用いた。なお、飼育する高脂血症動物種の中では肥満性高脂血症モデルを用いた。
また、飼育する高脂血症動物種の中では肥満性高脂血症モデルを用いた。

第1章 実験的高脂血症病態モデル動物における血中脂質低下作用

序説

実験的な高脂血症モデル動物は、脂質代謝のしくみを知り、ヒトの高脂血症病態を解明する手段として重要である。古くは Anitschkow¹⁴⁾ がウサギに高 CH 飼料を与えて実験的高脂血症ならびに実験的動脈硬化症の発症に成功して以来、種々の方法による実験的高脂血症病態モデルが報告されている。そして、これらの病態モデルにおいて有効性を示す物質の多くは臨床における高脂血症病態にも奏功することから、高脂血症治療薬の開発およびそのプロファイルを探る手段として汎用されている。

本章における目的は、EPA-E の各種実験的高脂血症病態モデル動物に対する作用を検討し、高脂血症治療薬としての可能性を探ることにある。病態モデル動物に対する作用の検討に先立ち、まず、正常動物における脂質低下作用を検討し、続いて、実験的に高脂血症を発症させたモデル動物に対する作用を検討した。実験的高脂血症誘発法として、食餌性脂質あるいは経口的に負荷した脂質に起因する外因性高脂血症モデル、ならびに、食餌性脂質に依存しないで惹起される内因性高脂血症モデルを用いた。なお、現存する高脂血症治療薬の中では比較的幅広い作用プロファイルを有するとされる clofibrate もしくは clinofibrate を、各実験の対照薬として用いた。

第1節 正常動物（ラット、ハムスター）に対する作用

正常ラットおよびハムスターに、EPA-E を7日間連日投与した時の血中脂質レベルを、図3および図4にそれぞれ示した。EPA-E 投与により、ラットの血漿TCが、また、ハムスターの血清TCおよびTGが低下したことから、EPA-E が正常動物において脂質低下作用を示すことが明らかとなった。

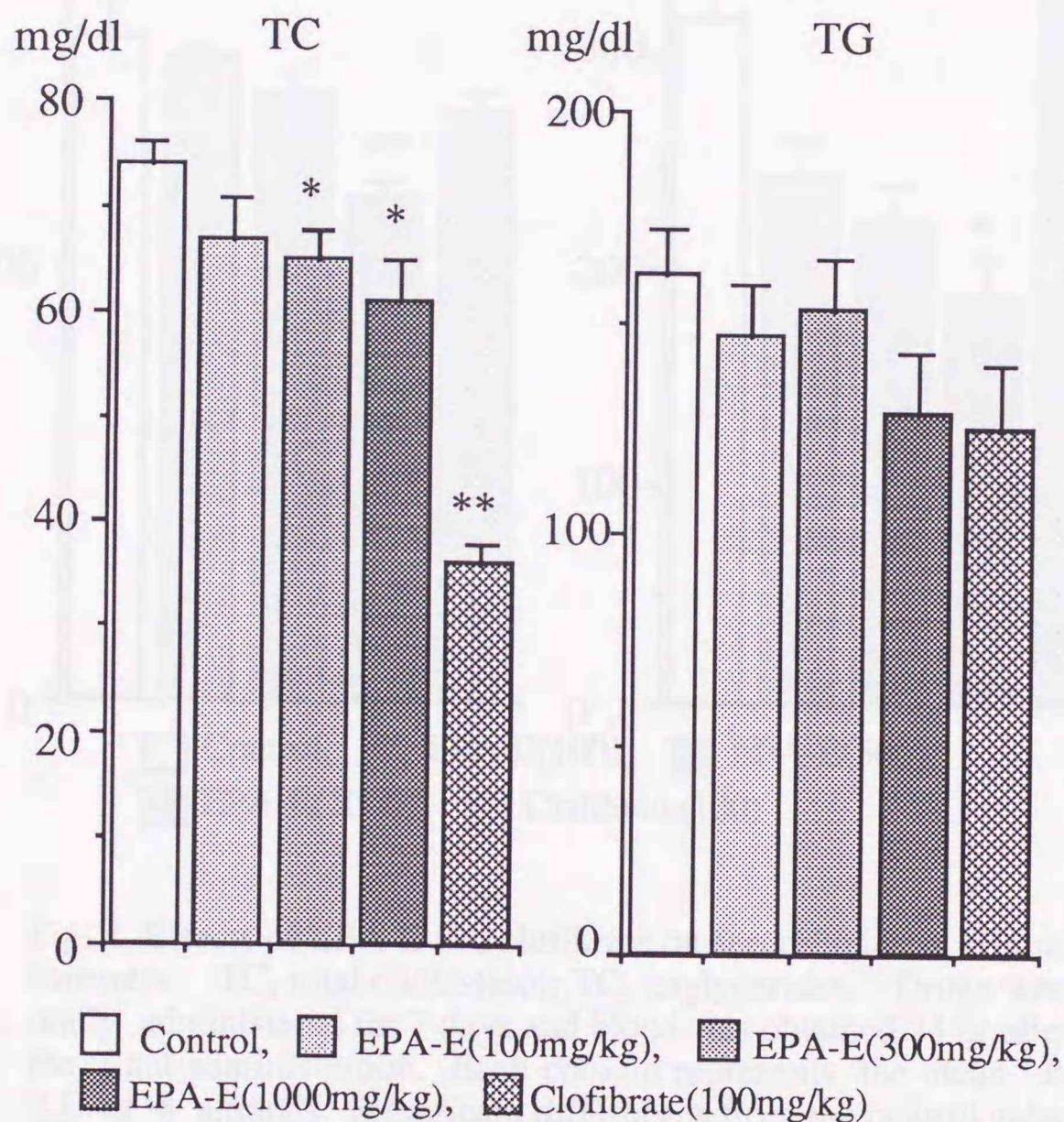


Fig. 3 Effects of EPA-E and clofibrate on plasma lipids in normal rats. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Drugs were orally administered for 7 days and blood was obtained 24 hr after the final administration. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 8 to 16 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

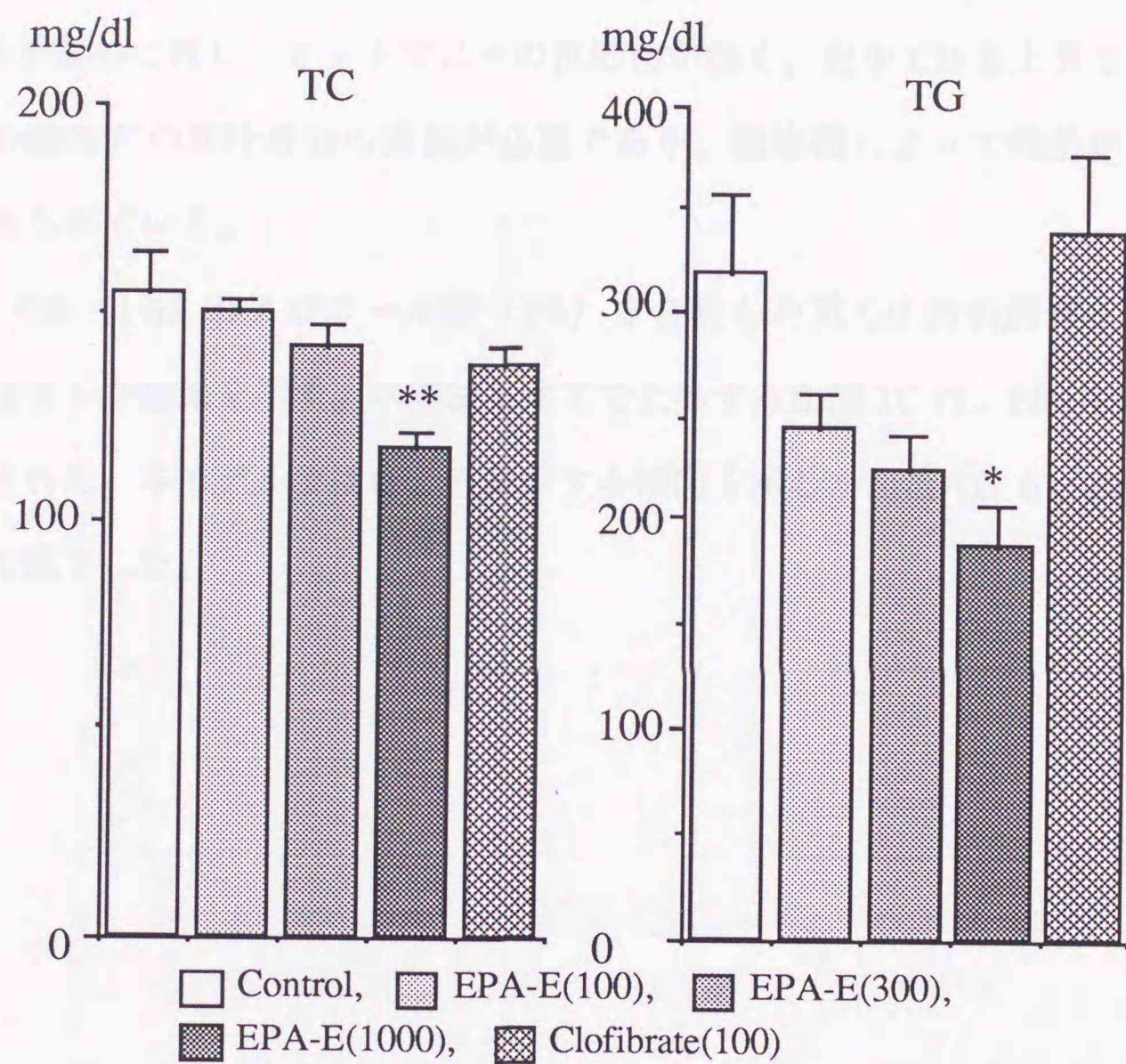


Fig. 4 Effects of EPA-E and clofibrate on serum lipids in normal hamsters. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Drugs were orally administered for 7 days and blood was obtained 24 hr after the final administration. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

第2節 実験的外因性高脂血症モデル動物（ラット、ウサギ）に対する作用

実験的高脂血症モデルのうち、外因性に高脂血症を誘発する方法として、高 CH 含有飼料で飼育することにより主に高 CH 血症を誘発する方法が一般的に用いられている¹⁵⁾。この場合、ウサギは低濃度の CH を飼料中に添加するだけで速やかに血中 CH が上昇するのに対し、ラットではその反応性が低く、血中 CH を上昇させるためにはコール酸などの胆汁成分の添加が必要であり、動物種によって種差があることも同時に知られている。

図5に、CH（1%）およびコール酸（1%）を含有した高CH飼料飼育ラットに、EPA-Eを投与した結果を示す。本実験条件下で上昇する血清TCは、EPA-E投与によって抑制された。本モデルではむしろ減少する傾向を示した血清TGも、EPA-Eの投与によって低下した。

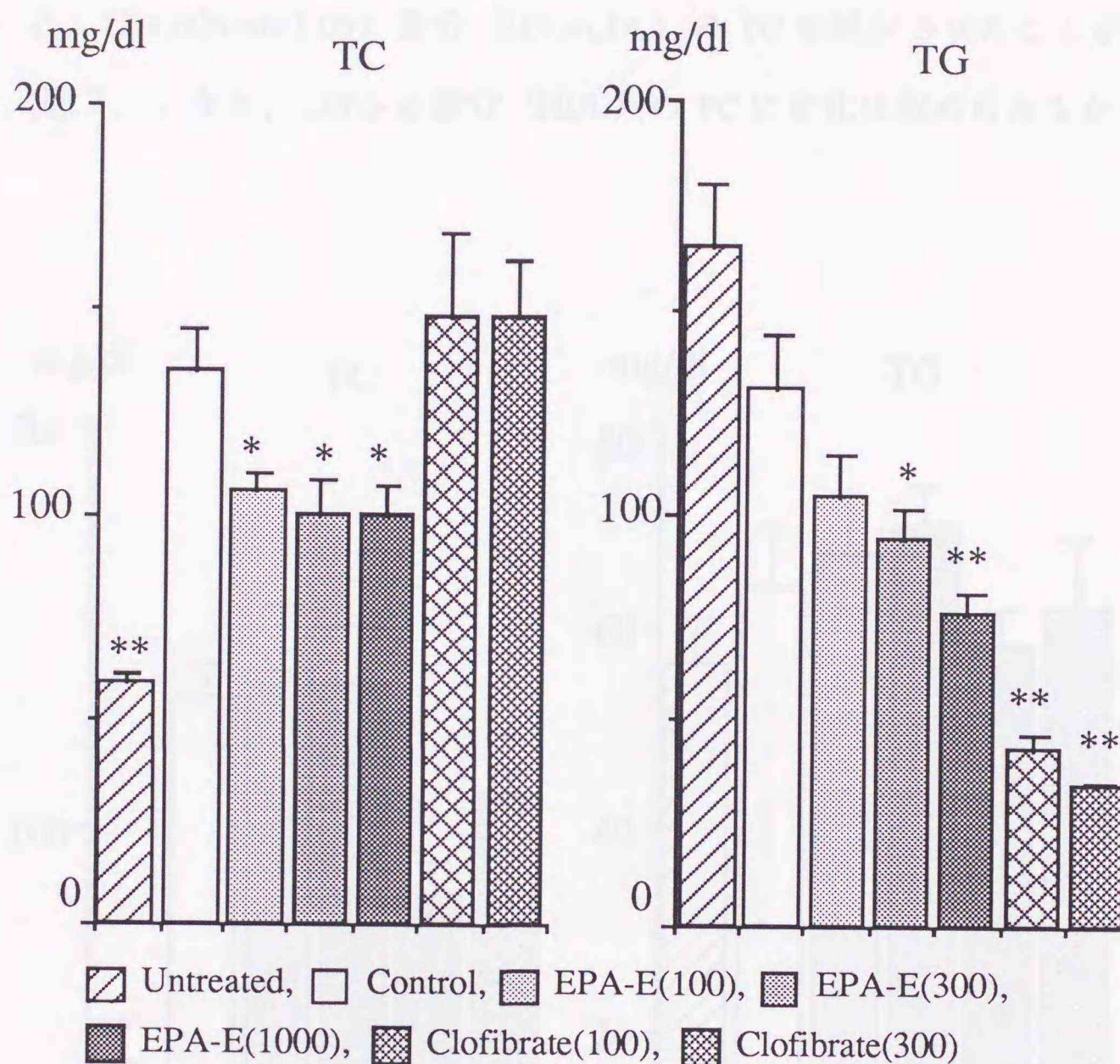


Fig. 5 Effects of EPA-E and clofibrate on serum lipids in rats fed high cholesterol diet. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Animals except for untreated ones were fed the diet containing both 1% cholesterol and 1% cholic acid for 4 weeks. Drugs were orally administered during the period and blood was collected 24 hr after the final administration. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

EPA-E の同様な作用は、ウサギにおいても確認された。すなわち、EPA-E は 0.1% の CH を添加した飼料により上昇したウサギの血清 TC を低下させた（図 6）。

この時の血清を超速心法により各リポ蛋白に分画すると、EPA-E は $d < 1.006$ 画分（VLDL）および $1.006 < d < 1.063$ 画分（IDL+LDL）の TC を減少させたことが明らかとなった（図 7）。なお、 $1.063 < d$ 画分（HDL）の TC に変化は認められなかった。

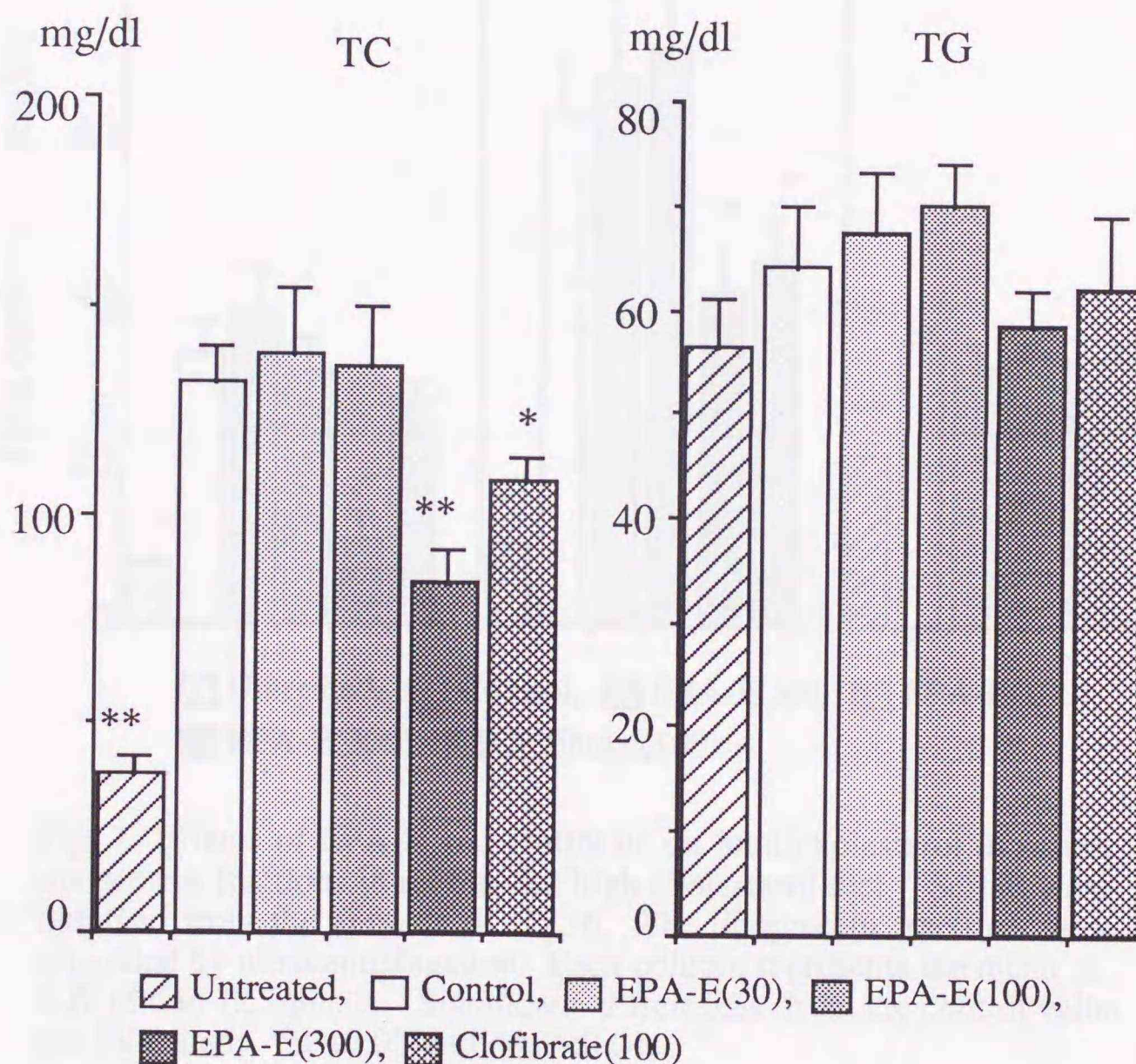


Fig. 6 Effects of EPA-E and clofibrate on serum lipids in rabbits fed high cholesterol diet. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Animals except for untreated ones were fed the diet containing 0.1% cholesterol, and drugs were orally administered for 4 weeks. Blood was collected 24 hr after the final administration. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 12 animals. Significant differences from the control value are indicated; *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$.

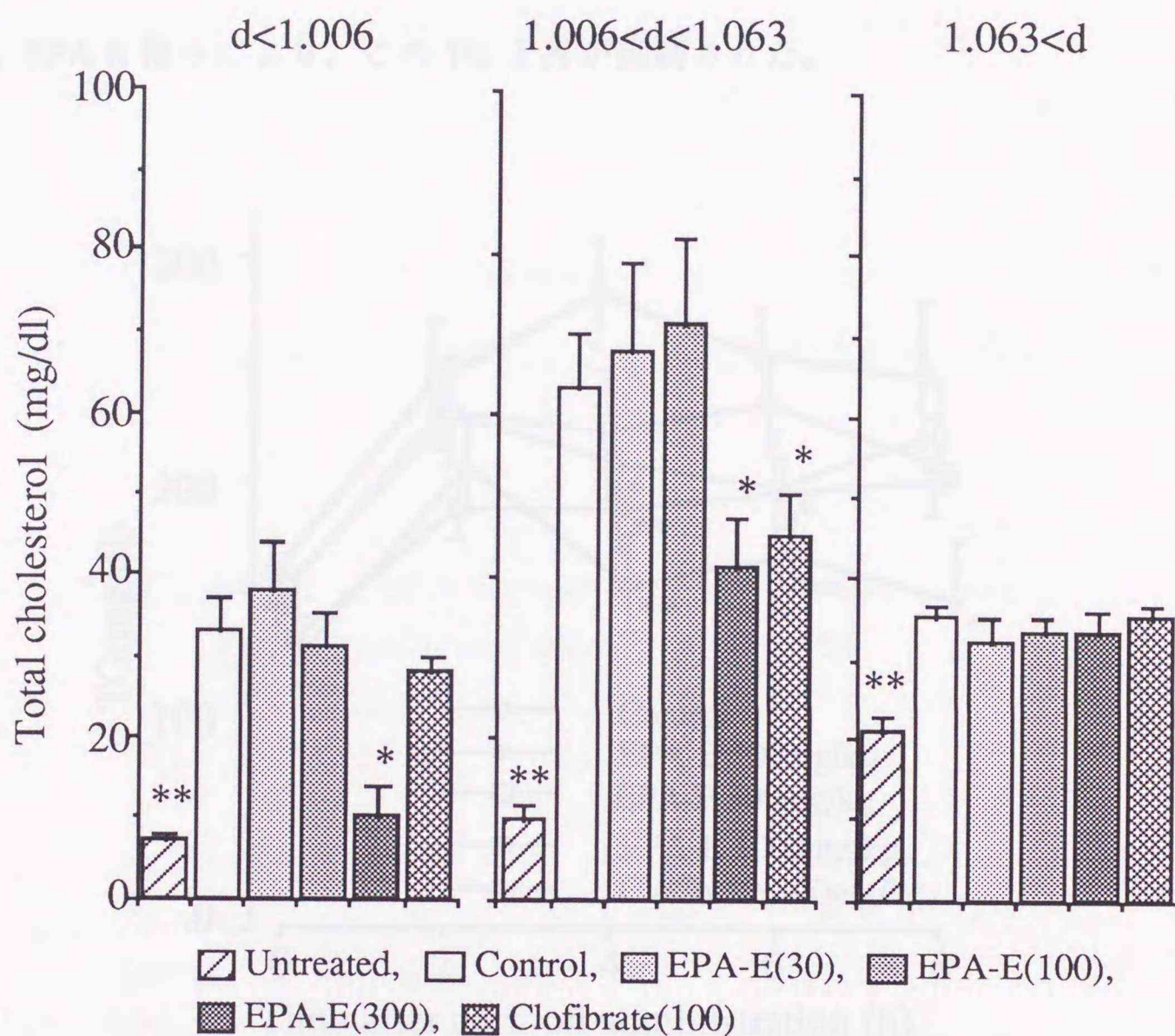


Fig. 7 Effects of EPA-E and clofibrate on total cholesterol in serum lipoprotein fractions in rabbits fed high cholesterol diet. Serum were obtained from the animals of Fig. 6. The lipoprotein fractions were separated by ultracentrifugation. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 12 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

外因性に高脂血症を誘発する方法としては、この他に高脂肪乳濁液を経口的もしくは静脈内に投与して高 TG 血症を誘発する方法が知られている¹⁵⁾。脂肪酸を経口的に負荷したラットに対する EPA-E の作用を検討した結果を図 8 に示す。ラットにコーン油を経口投与することにより、投与後 4 時間をピークとする血漿 TG の上昇が認められる。EPA-E 投与により、この TG 上昇が抑制された。

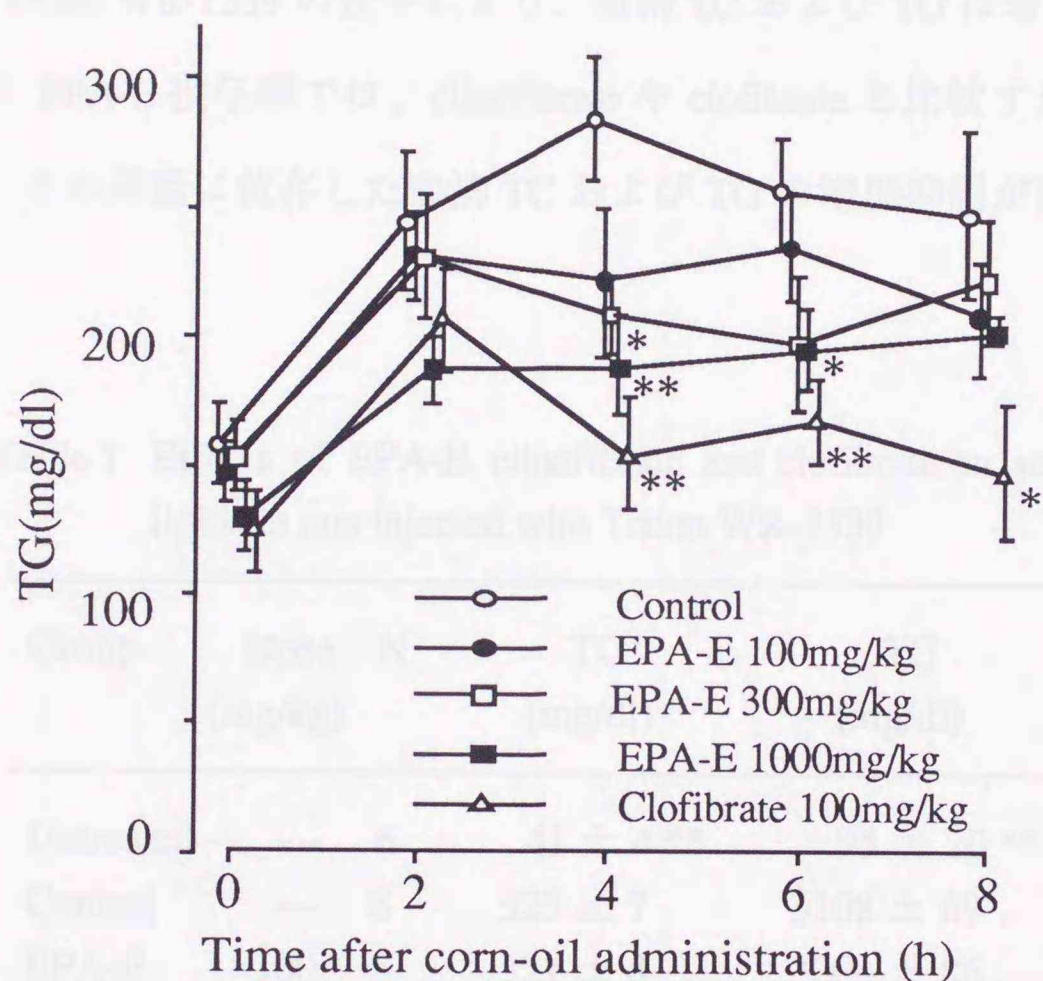


Fig. 8 Effects of EPA-E and clofibrate on plasma triglycerides (TG) after oral ingestion of corn oil in rats. Drugs were orally administered for 7 days, and emulsified corn oil (50%, w/w) at 10 ml/kg was given 24 hr after the final administration of the drugs. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. Significant differences from the control value are indicated; *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$.

以上の結果から、正常動物で認められた EPA-E の脂質低下作用は、ラットならびにウサギを用いた外因性高脂血症病態モデルにおいても認められることが明らかとなった。

第3節 実験的内因性高脂血症モデル動物（ラット）に対する作用

Triton WR-1339 などの界面活性剤をラットの静脈内に投与する¹⁶⁾ことや、高カゼイン無 CH 飼料をラット¹⁷⁾やウサギ¹⁸⁾に与えてアミノ酸バランスを乱すことによって食餌由来の脂質がなくても高脂血症状態を惹起することができる。

表1に、Triton WR-1339 (300 mg/kg) を静脈内投与したラットの血清 TC および TG を示す。Triton WR-1339 の投与により、血清 TC および TG は著明に上昇するが、これに対して EPA-E 投与群では、clinofibrate や clofibrate と比較すれば若干弱い作用ではあるが、その用量に依存した血清 TC および TG の増加抑制が認められた。

Table 1 Effects of EPA-E, clinofibrate and clofibrate on serum lipids in rats injected with Triton WR-1339

Group	Dose (mg/kg)	N	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)
Untreated	---	6	41 ± 4 **	95 ± 20 **
Control	---	8	323 ± 7	3108 ± 69
EPA-E	100	8	321 ± 8	3004 ± 86
	300	8	299 ± 3 *	2749 ± 82 **
	1000	8	293 ± 5 **	2670 ± 118 **
Clinofibrate	100	8	237 ± 9 **	2337 ± 88 **
Clofibrate	300	8	244 ± 8 **	1739 ± 54 **

TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Animals except for untreated ones were intravenously injected with 300 mg/kg of Triton WR-1339. After 12 hr, blood was collected. Drugs or the vehicle solution were orally administered 3 hr before the injection. Each value represents the mean ± S.E. Significant differences from the control value are indicated; *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$.

20%カゼイン含有無CH飼料飼育ラットにおける結果を図9に示す。対照群の血清TCおよびTGは、飼料交換1週間後より上昇したが、EPA-E投与群ではそれが抑制された。

この血清を各リポ蛋白質に分画してみると、EPA-E投与群では、 $d<1.006$ のリポ蛋白質画分(VLDL)のTC, TGおよびPL、 $1.063<d<1.125$ 画分(HDL₂)のTCおよびPL、ならびに、 $1.125<d$ 画分(HDL₃)のTGおよびPLの低下が認められた(図10)。

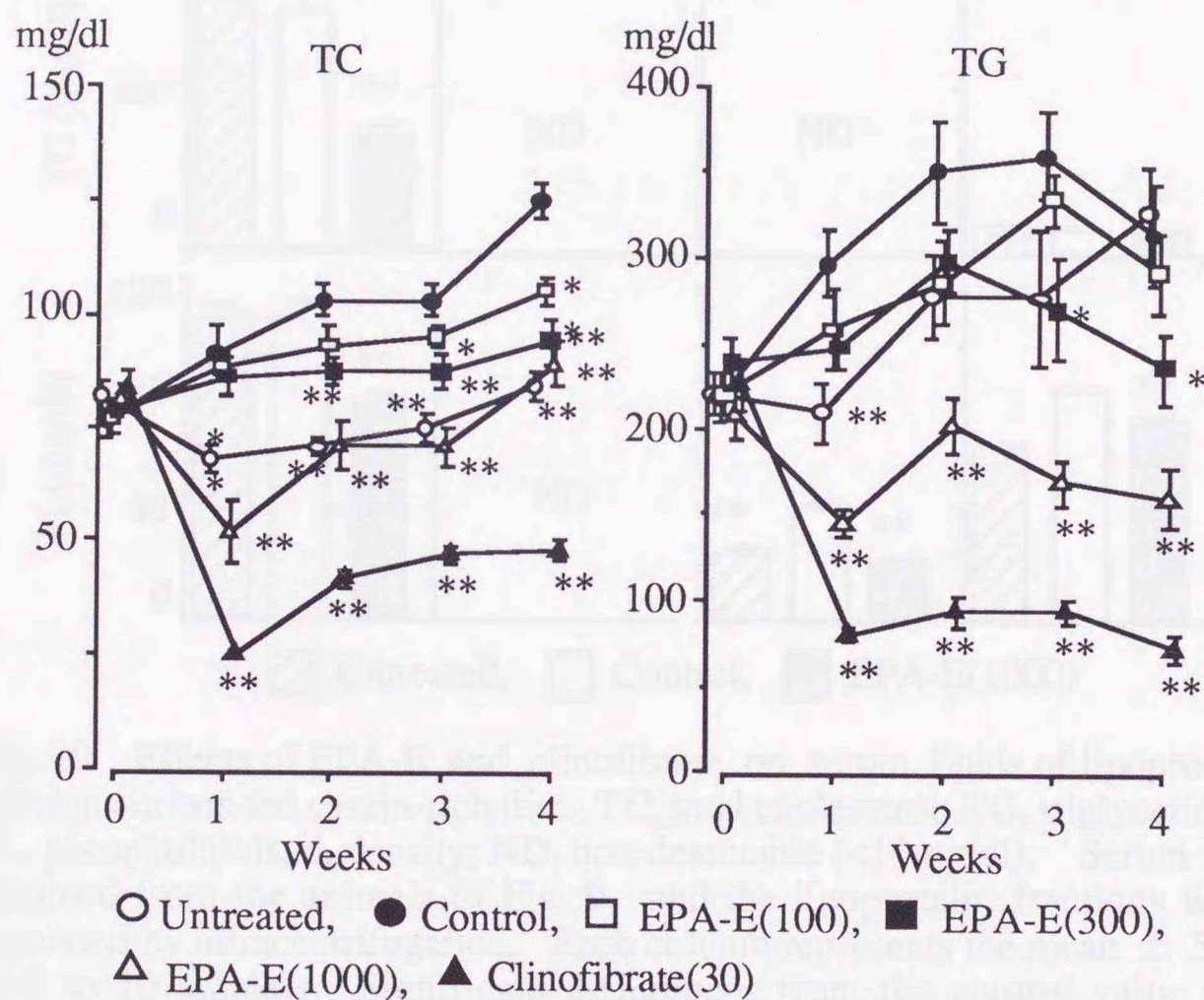


Fig. 9 Effects of EPA-E and clinofibrate on serum lipids in rats fed casein-rich diet. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Animals except for untreated ones were fed semisynthetic diet containing 20% casein without cholesterol for 4 weeks, and drugs were orally administered during the period. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 9 to 10 animals. Significant differences from the control value are indicated; *: $P<0.05$ and **: $P<0.01$.

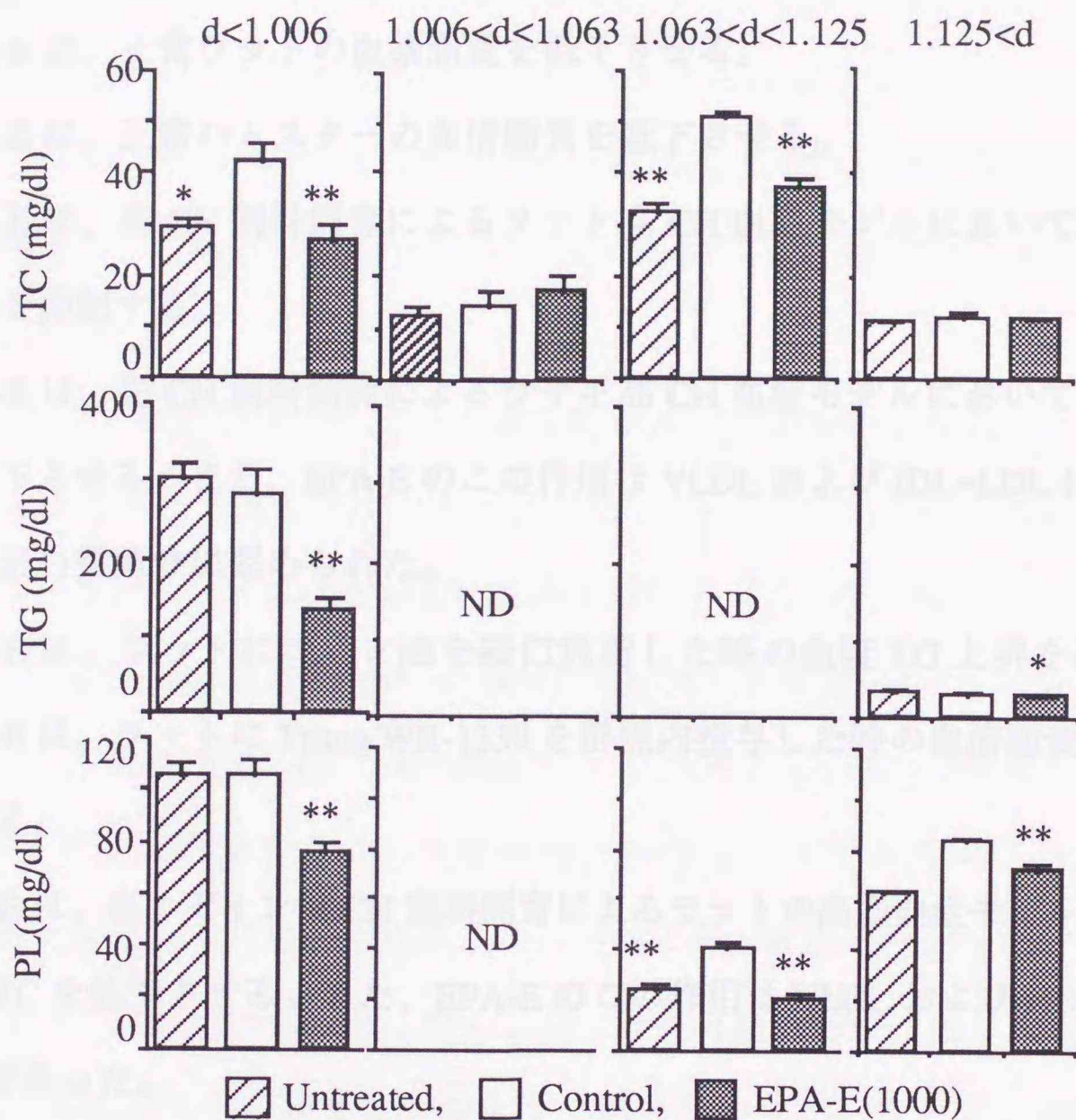


Fig. 10 Effects of EPA-E and clinofibrate on serum lipids of lipoprotein fractions in rats fed casein-rich diet. TC, total cholesterol; TG, triglycerides; PL, phospholipids; d, density; ND, non-detectable (<10mg/dl). Serum were obtained from the animals of Fig. 9, and the lipoprotein fractions were separated by ultracentrifugation. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 9 to 10 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

以上の結果から、EPA-E は内因性に誘発された高脂血症モデル動物においても脂質低下作用を示すことが明かとなった。

考察

本章では、次の諸点を明らかにした。

- 1) EPA-E は、正常ラットの血漿脂質を低下させる。
- 2) EPA-E は、正常ハムスターの血清脂質を低下させる。
- 3) EPA-E は、高 CH 飼料飼育によるラット高 CH 血症モデルにおいて、血清 TC 上昇を抑制する。
- 4) EPA-E は、高 CH 飼料飼育によるウサギ高 CH 血症モデルにおいて、血清 TC を低下させる。また、EPA-E のこの作用は VLDL および IDL+LDL に相当するリポ蛋白質画分に認められた。
- 5) EPA-E は、ラットにコーン油を経口負荷した時の血漿 TG 上昇を抑制する。
- 6) EPA-E は、ラットに Triton WR-1339 を静脈内投与した時の血清脂質上昇を抑制する。
- 7) EPA-E は、高カゼイン無 CH 飼料飼育によるラットの高脂血症モデルにおいて、血清 TC を低下させる。また、EPA-E のこの作用は VLDL および HDL₂ 画分に著明であった。

正常ラットならびにハムスターにおいて、EPA-E を 7 日間連日投与することにより血中 TC および TG が低下し、EPA-E の血中脂質低下作用が確認できた。

EPA-E の血中脂質低下作用は、高 CH 食飼育誘発高脂血症モデルラットおよびウサギにおいても確認された。高 CH 飼料飼育ウサギにおける EPA-E の血清 TC 低下作用は、VLDL および IDL+LDL に相当するリポ蛋白質画分、すなわち、atherogenic なリポ蛋白質において著しかった。本モデルで上昇した血清 TC の大部分は外因性に供給されているため、生体内での CH 合成はむしろ低下する¹⁵⁾。したがって、このようなモデルにおいては CH 生合成阻害薬は無効で、CH 吸収阻害あるいは CH 異化排

泄促進作用を有する薬物によって血清 TC が低下する¹⁵⁾ことから、EPA-E も同様な作用を有する可能性が示唆された。

脂肪酸経口的負荷モデルにおける血中 TG の上昇は、腸管の脂肪酸吸収抑制作用または LPL 活性亢進に基づく TG 分解促進作用を有する物質によって抑制される¹⁵⁾。EPA-E はラットにコーン油を経口負荷した高 TG 血症モデルにおける血漿 TG 上昇を抑制したことから、EPA-E が脂肪酸吸収抑制作用あるいは TG 分解促進作用を有する可能性が示唆された。

Triton WR-1339 の静脈内投与によって惹起される高脂血症モデルについては比較的良好に研究されており、Triton WR-1339 静脈内投与から 9 - 12 時間後では肝 CH 生合成活性が著しく亢進し、このことが高 CH 血症を誘発する大きな要因とされている^{19,20)}。事実、CH 生合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害し、CH 生合成を抑制する薬剤は、げっ歯類を用いた他の病態モデル動物では有効性が認められないが、特徴的に本モデルに奏功する²¹⁾。すなわち、少なくともマウスやラットにおける HMG-CoA 還元酵素阻害剤の血中脂質低下作用は、肝 CH 生合成活性が通常レベルもしくは低下している状態では発現し難く、肝 CH 生合成活性が亢進して血中への CH 供給が著しく高まっている本モデルのような場合にのみ認められる。今回の検討において、EPA-E は本モデルの血清脂質を用量依存的に抑制したことから、EPA-E の脂質低下作用に CH 生合成活性抑制作用も関与している可能性が示唆された。

カゼイン飼料飼育ラットにおいても、EPA-E は用量および投与期間に依存して、血清 TC および PL の上昇を抑制し、また、血清 TG を低下させた。EPA-E 投与により、 $d < 1.006$ のリポ蛋白質画分で TC, TG および PL がいずれも低下していたことや、血清 TG の低下の程度が $d < 1.006$ のリポ蛋白質画分での TG 低下の程度とよく一致することから、EPA-E の脂質低下作用に VLDL の低下が関与している可能性が考えられる。なお、この実験において、EPA-E が $1.063 < d < 1.125$ 画分 (HDL_2) の TC および

PL、また、 $d>1.125$ 画分 (HDL_3) の TG および PL を低下させた機序の詳細は不明であるが、血中でのリポ蛋白質の代謝過程において、HDL の脂質や一部のアポ蛋白質は VLDL などの TG-rich なリポ蛋白質から供給される²²⁾ことを考えると、HDL 画分で認められたこれらの変化は VLDL が低下したことに起因しているのかも知れない。

以上、EPA-E は通常飼料飼育動物、ならびに、高 CH 血症および高 TG 血症両者の実験的高脂血症モデル動物に対し有効性を示し、動物種においてもラットのみならずハムスターやウサギに対しても有効であった。特にハムスターやウサギは、CH 生合成やリポ蛋白質代謝などが比較的ヒトに類似していると考えられる²³⁾ことから、実験的高脂血症モデル動物として使用することが望ましい²⁴⁾との指摘もあり、本章で得られた実験結果は EPA-E が高脂血症治療薬として臨床上有用である可能性を示唆するものと考えられた。また、これらの実験結果から、EPA-E は、CH 吸収阻害作用、CH 生合成抑制作用、CH 異化排泄促進作用、脂肪酸吸収抑制作用あるいは TG 分解促進作用などを有しているの可能性が示唆され、EPA-E の血中脂質低下作用機序は多岐に渡っているものと推察された。

第2章 ラットにおける血中 CH 低下作用機序の解析

序説

血中 CH レベルは、血液中への CH の供給とその排泄とのバランスによって規定される。その供給は、ひとつには食餌に由来して消化管から吸収される CH であり、ひとつには生体内で合成される内因性の CH である。いずれに由来する CH も肝臓で一度 VLDL に組み込まれて血中に分泌された後、リポ蛋白質代謝を経て組織に分配され、残りは肝臓に戻る。一方、体内からの CH の排泄は、これも肝臓でその大部分が胆汁酸へ変換された後、胆汁を介して腸管内へ分泌される経路をとる。

本章では、EPA-E の血中脂質低下作用、特に CH 低下作用の機序を明らかにする目的で、CH 代謝に及ぼす EPA-E の作用点を検討した。すなわち、CH の腸管からの吸収、肝における生合成、胆汁中への排泄、ならびに、血中からのクリアランスに及ぼす EPA-E の作用を、いずれもラットを用いて検討した。

第1節 CH の消化管吸収に及ぼす影響

経口的に摂取された CH は消化管内で胆汁酸とミセルを形成して腸管粘膜に輸送され、ここで TG, PL およびアポ蛋白質と共に CM を構成し、リンパ管を経由して血中に分泌される。 $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH を経口投与すると、血中放射活性は漸次上昇し、また、その上昇は経口投後少なくとも 6 時間までは消化管からの CH の吸収をよく反映する^{25,26)}。図 1 1 に示すように、EPA-E を投与したラットに $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH を経口投与した後の血漿中放射能の上昇は、対照群に比べて低値を示すことから、EPA-E は CH の吸収機構に抑制的に働いていることが明かとなった。

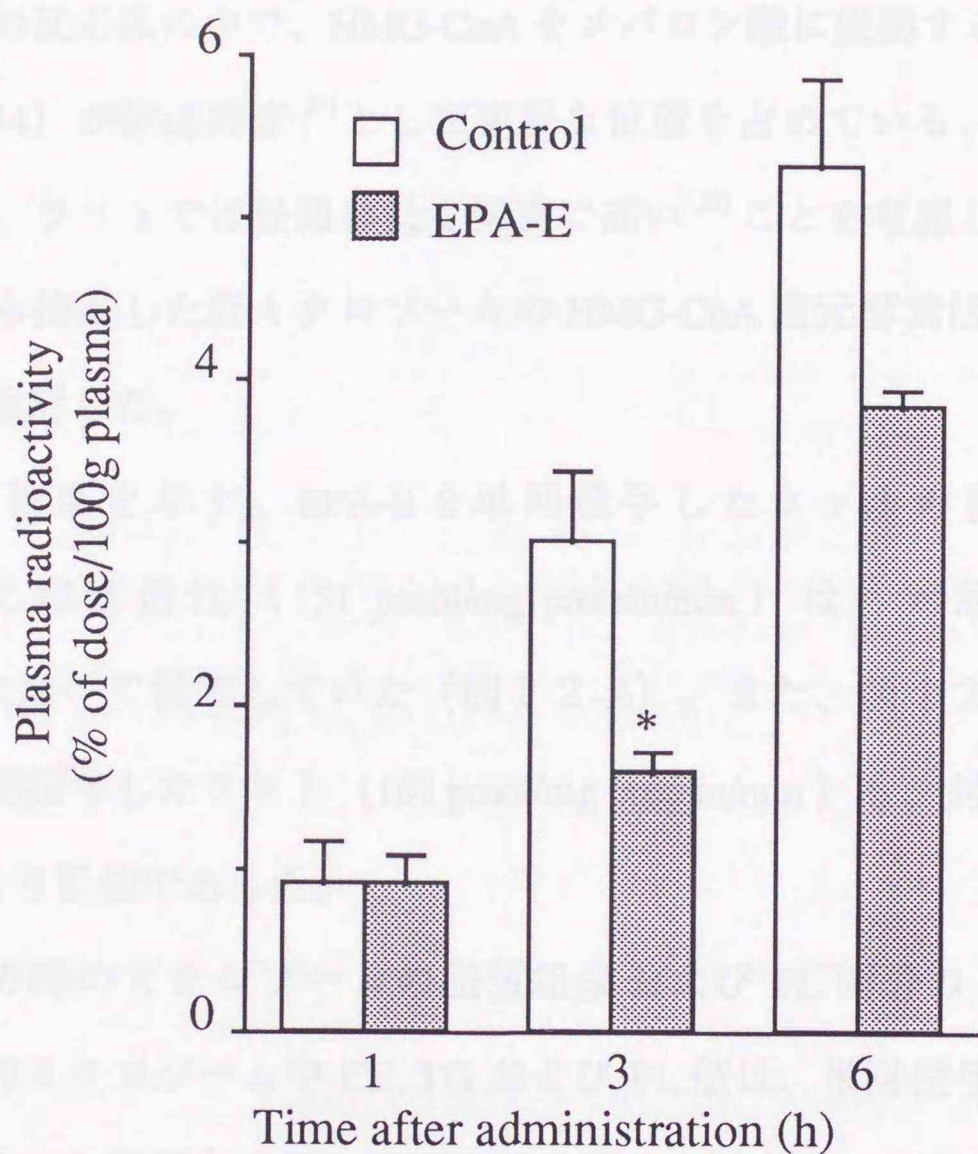


Fig. 11 Effect of EPA-E on the elevation of plasma radioactivity after an oral administration of [^{14}C]- cholesterol in rats. EPA-E at 1000 mg/kg was orally administered for 7 days. The content of radioactive cholesterol in plasma is expressed as the ratio of the radioactivity in 100 g of plasma to the net radioactivity given. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. Significant difference from the control value is indicated; *:P<0.05.

第2節 肝 CH 生合成活性に及ぼす影響

生体の大部分の組織は CH 生合成能を有しているが、その主役を演じているのは肝および小腸である。CH の生合成に際し、酢酸を出発材料として 20 数種の酵素反応からなる一連の反応系の中で、HMG-CoA をメバロン酸に変換する HMG-CoA 還元酵素 (EC 1.1.1.34) が律速酵素²⁷⁾として重要な位置を占めている。本酵素の活性は日内変動を有し、ラットでは昼間は低く深夜で高い²⁸⁾ことを考慮して、昼夜逆転飼育したラットから摘出した肝ミクロソームの HMG-CoA 還元酵素活性に対する EPA-E 投与の影響を検討した。

図 1 2 に、結果を示す。EPA-E を単回投与したラットの肝ミクロソームの HMG-CoA 還元酵素活性 (151 pmol/mg protein/min) は、対照群 (313 pmol/mg protein/min) に比べて低下していた (図 1 2 -A)。また、図 1 2 -B に示すように、EPA-E を 7 日間投与したラット (161 pmol/mg protein/min) も、対照群 (295 pmol/mg protein/min) より低値であった。

表 2 に、この時のミクロソームの脂質組成および PL 画分の EPA 含量を示す。EPA-E 投与群のミクロソーム中 CE, TG および PL 値は、単回投与および 7 日間投与のいずれの場合も対照群との間に著明な差は認められなかったが、FC 含量は EPA-E 投与により増加した。一方、EPA-E 投与動物のミクロソーム中 PL 画分の EPA 含量は、単回投与および 7 日間投与ともに著明に増加した。

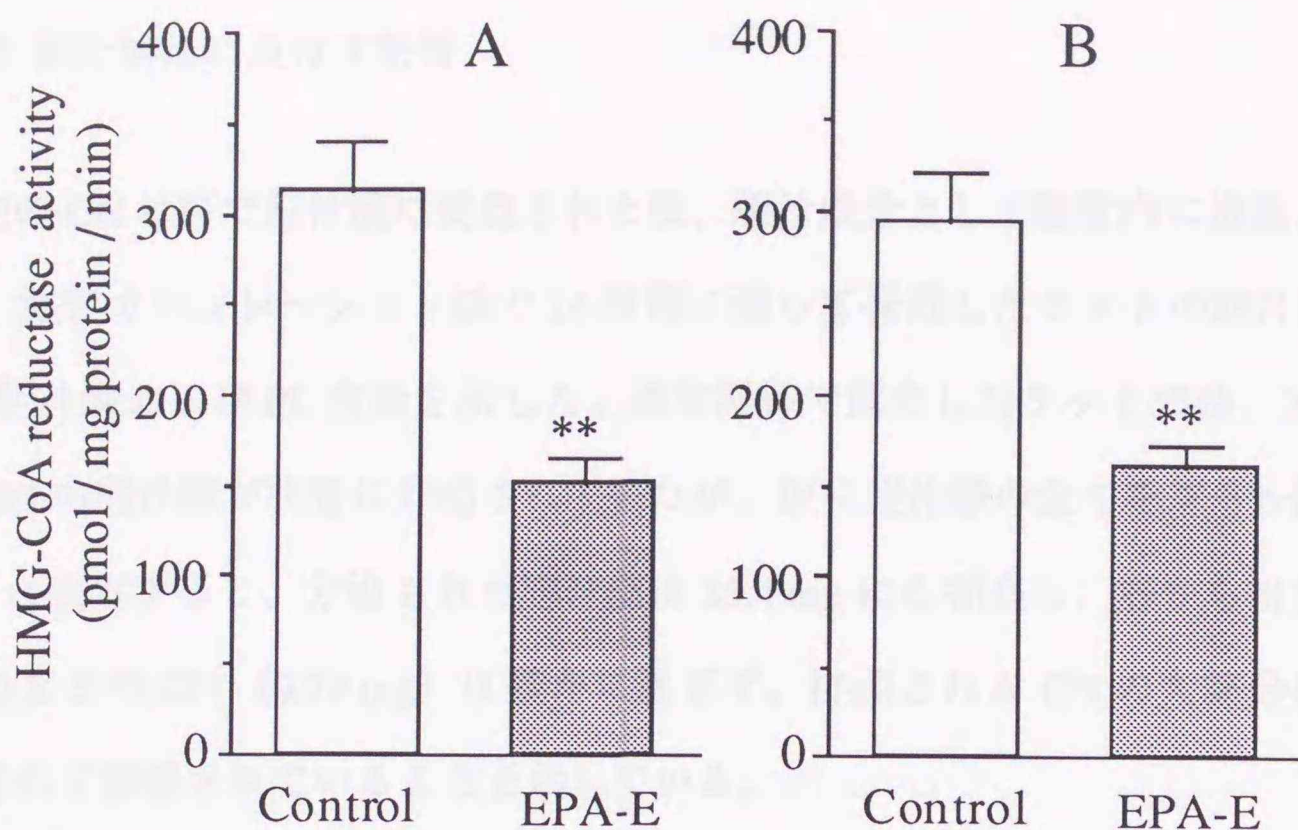


Fig. 12 Effect of EPA-E on the hepatic microsomal HMG-CoA reductase activity in rats. Liver microsomes were prepared after a single (A) or a multiple (7 days, B) administration of EPA-E at 1000 mg/kg. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. Significant differences from the control value are indicated; **:P<0.01.

Table 2 Effect of EPA-E on lipid composition and EPA content in rat hepatic microsomes.

Admini- stration	Group	Lipids (μ g/mg microsomal protein)				EPA content (μ g/mg PL)
		FC	CE	TG	PL	
Single	Control	15.5 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.5	24.5 $\pm$ 1.9	164 $\pm$ 4	2.7 $\pm$ 0.1
	EPA-E	16.9 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2	23.8 $\pm$ 1.0	156 $\pm$ 4	28.9 $\pm$ 5.5**
Multiple	Control	15.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	23.2 $\pm$ 0.6	157 $\pm$ 3	2.7 $\pm$ 0.2
	EPA-E	17.2 $\pm$ 0.6*	0.2 $\pm$ 0.1	22.0 $\pm$ 1.2	163 $\pm$ 6	50.3 $\pm$ 4.9**

FC, free cholesterol; CE, esterified cholesterol; TG, triglycerides; PL, phospholipids. Liver microsomes were prepared after a single or a multiple (7 days) administration of EPA-E (1000 mg/kg). Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

第3節 胆汁排泄に及ぼす影響

生体内の CH は肝で胆汁酸に変換された後、胆汁成分として腸管内に排泄される。表3に、胆管カニュレーション法で24時間に渡って採取したラットの胆汁量、胆汁中 CH、胆汁酸および PL 含量を示した。通常飼料で飼育したラットでは、24時間で $86.6 \mu\text{mol}$ の胆汁酸が胆管に分泌されていたが、仮に胆汁酸の全てをコール酸（分子量 409）と仮定すると、分泌された胆汁酸は 35.4 mg にも相当し、肝から排泄された未変化のままの CH（ 0.79 mg ）は僅かに過ぎず、排泄される CH の大部分は胆汁酸に変換されて排泄されていることを示している。

一方、高カゼイン飼料で動物を飼育したときに呈する高脂血症の機作のひとつとして、CH の排泄障害が指摘されている²⁹⁾。事実、本飼料飼育ラットでは通常飼料摂取の場合に比して胆汁中への胆汁酸排泄量が有意に減少していることが確認された（表3）。これに対し、EPA-E 投与群では胆汁量ならびに胆汁中への胆汁酸および PL 排泄量が増加したことから、EPA-E は胆汁排泄を亢進することが明らかとなった。

Table 3 Effect of EPA-E on hepatic biliary secretion in bile duct-cannulated rats.

Diet	EPA-E treatment	N	Bile flow (ml/24h)	Cholesterol (mg/24h)	Bile acids ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)	Phospholipids (mg/24h)
Standard diet	-	7	10.9 ± 1.5	0.79 ± 0.11	86.6 ± 3.9	12.0 ± 1.3
Casein-rich diet	-	8	10.4 ± 1.1	0.70 ± 0.09	$62.6 \pm 2.6\#$	$8.1 \pm 0.8\#\#$
	+	8	$13.8 \pm 1.0^*$	0.97 ± 0.11	$73.1 \pm 3.6^*$	$11.4 \pm 1.2^*$

Bile was collected for 24 hr through a cannula in the bile duct. EPA-E at 1000 mg/kg/day was orally administered daily for 4 weeks. Each value represents the mean $\pm$ S.E. Significant differences from the value in the standard diet and the value in the casein-rich diet are indicated; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$ and *: $P < 0.05$, respectively.

第4節 血中 CH クリアランスに及ぼす影響

EPA-E を投与したラットあるいは非投与ラットの血清より調製したリポ蛋白質画分 ($d < 1.210$) を、それぞれ別に用意したラットに静注した時の血清 TC 値の変動を図 13 に示す。リポ蛋白質静注 1 分後の血清 TC 値は、EPA-E 非投与動物由来リポ蛋白質静注群では $233 \pm 9 \text{ mg/dl}$ 、また、EPA-E 投与動物由来リポ蛋白質静注群のそれは $243 \pm 10 \text{ mg/dl}$ であり、リポ蛋白質の代わりに生理食塩水を静注した動物のそれが $73 \pm 1 \text{ mg/dl}$ であったのに比べて、いずれも著明に上昇した。EPA-E 非投与動物由来および EPA-E 投与動物由来リポ蛋白質静注群の血清 TC 値は、ともに静注 5 分後以降経時的に漸減したが、30, 60, 120 および 240 分後には、EPA-E 投与動物由来リポ蛋白質静注群の血清 TC 値が EPA-E 非投与動物由来リポ蛋白質静注群のそれに比して低値を示した。すなわち、EPA-E 投与動物由来のリポ蛋白質は、血中におけるクリアランスが速やかであることが示された。

この時の変化を各リポ蛋白質画分別に調べると、図 14 に示すように、EPA-E 投与動物由来リポ蛋白質静注群では、 $d < 1.006$ 画分の 60 分後および 240 分後、また、 $1.006 < d < 1.063$ 画分の 30, 60, 120 および 240 分後の TC 値が、EPA-E 非投与動物由来リポ蛋白質静注群のそれに比して有意な低値を示した。一方、 $1.063 < d$ 画分においては、両群に差を認めなかった。

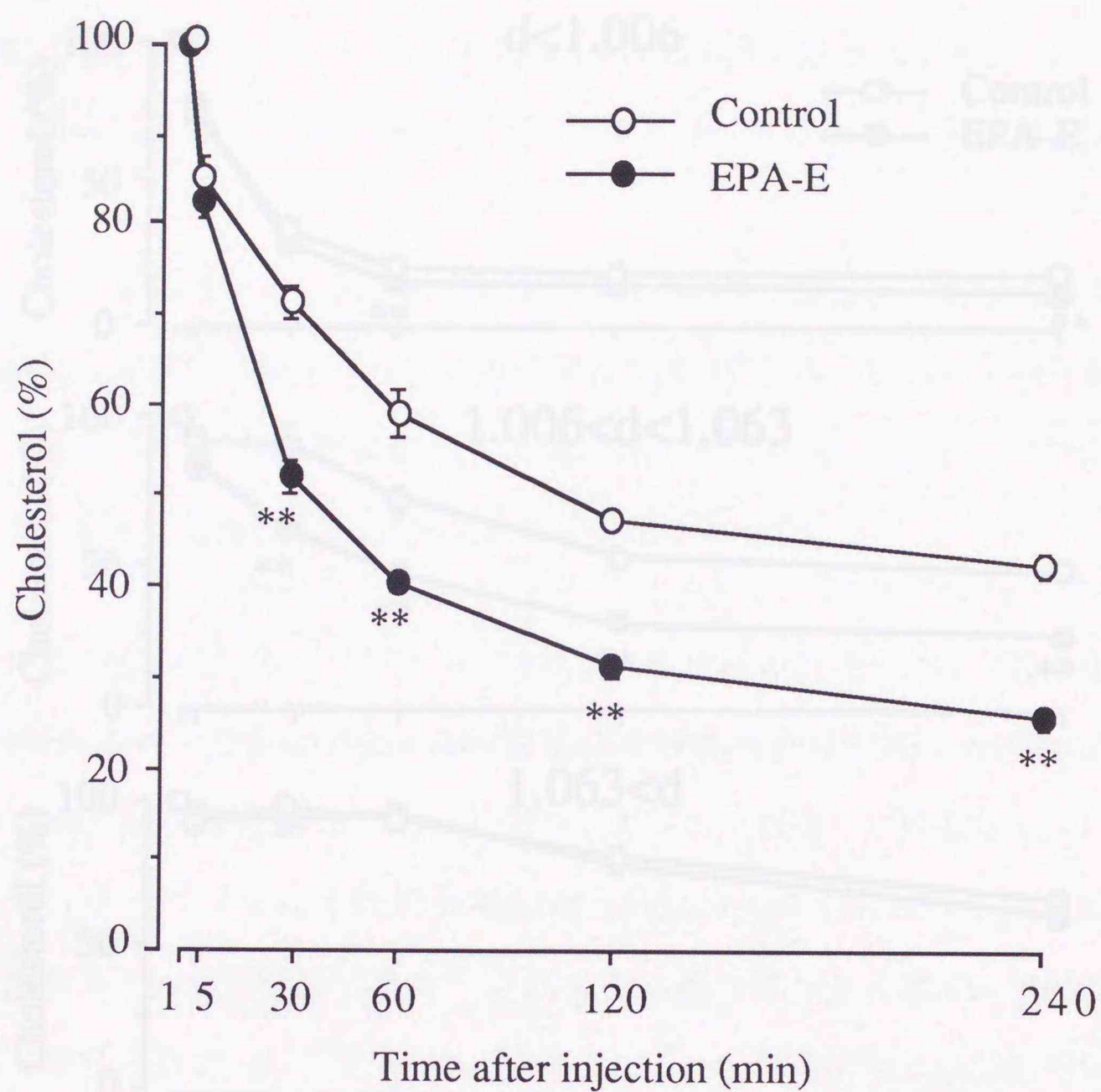


Fig. 13 Serum cholesterol clearance in rats after injection with exogenous lipoproteins. Serum total lipoprotein fraction ($d < 1.210$) prepared from rats given the vehicle (Control) or EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) was injected with 60 mg/kg of cholesterol. Blood samples were collected at 1, 5, 30, 60, 120 and 240 min after the injection. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. Significant differences from the control value are indicated; **: $P < 0.01$.

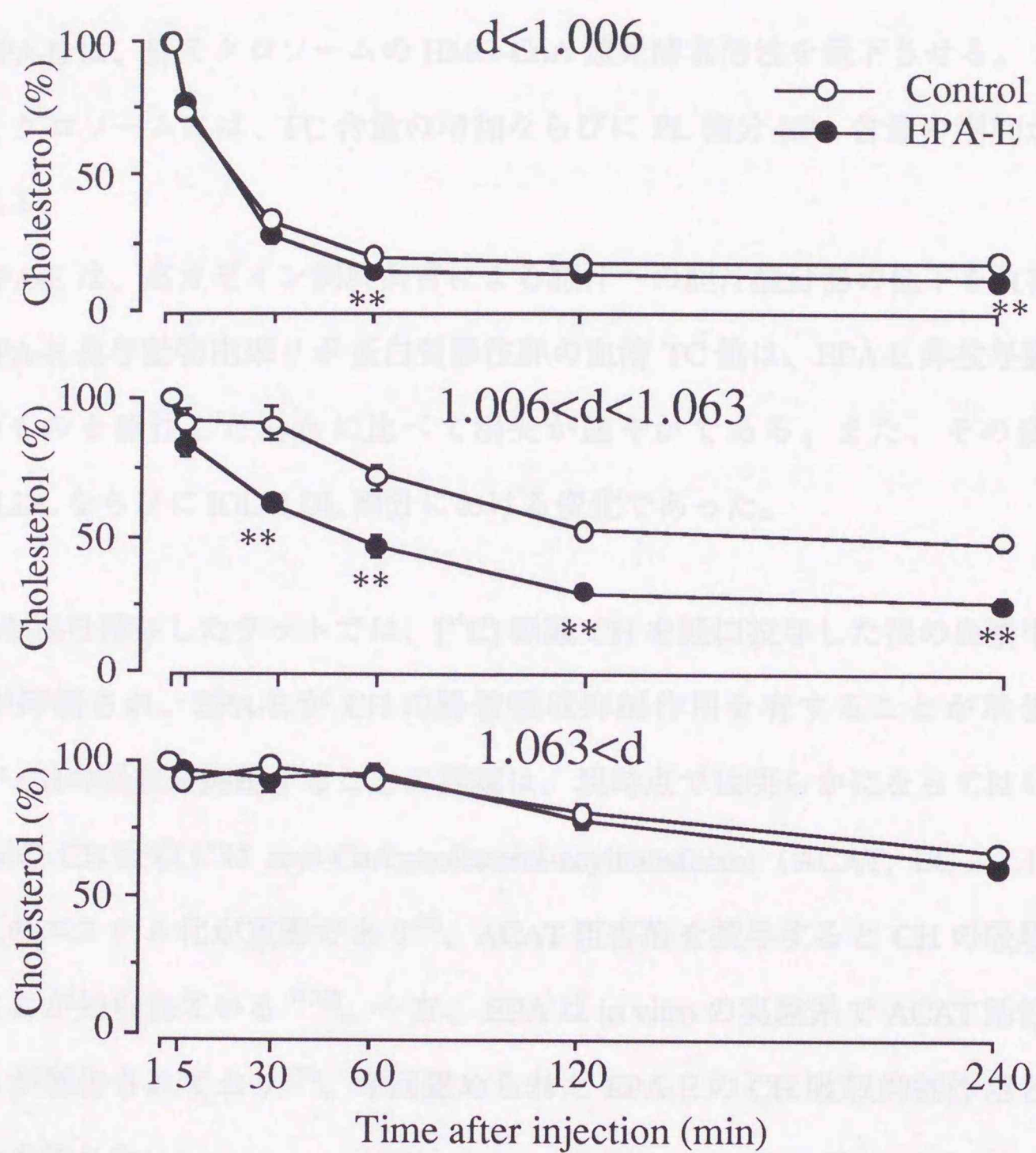


Fig. 14 Serum cholesterol clearance in rats after injection with exogenous lipoproteins. Serum were obtained from the animals of Fig. 13 and the lipoproteins were fractionated by ultracentrifugation. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. Significant differences from the control value are indicated; **:P<0.01.

考察

本章では次の諸点を明らかにした。

- 1) EPA-E は、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH 経口投与後の血中放射活性上昇を抑制する。
- 2) EPA-E は、肝ミクロソームの HMG-CoA 還元酵素活性を低下させる。この時のミクロソームには、FC 含量の増加ならびに PL 画分 EPA 含量の増加が認められる。
- 3) EPA-E は、高カゼイン飼料飼育による胆汁への胆汁酸分泌の低下を改善する。
- 4) EPA-E 投与動物由来リポ蛋白質静注群の血清 TC 値は、EPA-E 非投与動物由来のものを静注した場合に比べて消失が速やかである。また、その変化は、VLDL ならびに IDL+LDL 画分における変化であった。

EPA-Eを連日投与したラットでは、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH を経口投与した後の血漿中放射能の上昇が抑制され、EPA-E が CH の腸管吸収抑制作用を有することが示された。EPA-E が CH の吸収を抑制することの詳細は、現時点では明らかになってはいない。腸管からの CH 吸収には acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase (ACAT, EC 2.3.1.26) による CH のエステル化が重要であり³⁰⁾、ACAT 阻害剤を投与すると CH の吸収が抑制されることが知られている^{31,32)}。一方、EPA は in vitro の実験系で ACAT 活性を抑制することが報告されており³³⁾、今回認められた EPA-E の CH 吸収抑制作用と関係しているかも知れない。

CH 生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素活性が EPA-E を投与したラットのミクロソームでは低下していたことから、EPA-E は CH 生合成抑制作用を有することが明らかになった。EPA-E ならびに EPA の HMG-CoA 還元酵素活性に対する作用を in vitro の系で検討してはいないが、これらにの構造中にこれまでに知られている HMG-CoA 還元酵素阻害剤と共通する構造は見当たらず、既存の HMG-CoA 還元酵素

阻害剤のようにその活性を直接的に阻害したとは考え難い。一方、膜結合型酵素は置かれている微小環境によってその活性が大きく影響されることが一般に知られている。そのひとつである HMG-CoA 還元酵素の場合も、PUFA を与えたラットのミクロソームではその活性が低下することから、膜 PL のアシル基を構成する脂肪酸の違いがその活性発現に影響を及ぼすことが示されており、このことの少なくとも一部には膜流動性変化が関係しているものと指摘されている³⁴⁻³⁶⁾。すなわち、膜 PL のアシル基を構成する脂肪酸として PUFA が増加すると膜の流動性が亢進し、このことに連動して一方では膜の堅さを維持しようと膜構成要素である FC のプールサイズが増加する。HMG-CoA 還元酵素活性が FC の増加によって down regulation を受けることは広く知られており、ミクロソーム膜 PL 中の PUFA の増加は、結果として HMG-CoA 還元酵素活性の低下をもたらすと考えられている³⁴⁾。表2に示したように、EPA-E を投与することにより、ミクロソーム中 PL 画分の EPA 含量が著明に増加していた。同時に、この組成変化に連動した結果と思われる FC 含量の増加も観察された。おそらく EPA-E は、上述したようなミクロソーム膜 PL を構成する脂肪酸組成の変化を介して、間接的に HMG-CoA 還元酵素活性を低下させたものと推察される。

なお、ミクロソーム PL 画分の EPA 含量は、EPA-E の単回投与で 11 倍に増加したのに比べて、7 日間投与では 19 倍と更に増加していたが、CH 生合成抑制作用はそれ以上増強されず、PL の脂肪酸組成変化を介して CH 生合成活性を変化させる EPA の量としては、単回投与によって既に十分な量に達していたものと考えられる。

カゼイン添加飼料で飼育することにより胆汁分泌が抑制されることから、このことが高脂血症状態を誘発する要因のひとつと説明されている²⁹⁾。本実験においても、このことは確認された。一方、EPA-E は、胆汁量を有意に増加させ、胆汁中成分である胆汁酸、PL および CH の排泄量をそれぞれ増加させた。EPA-E が胆汁分泌を増加させた機序の詳細は不明であり、EPA-E が CH の胆汁酸変換における何らかの過

程に直接働きかけた結果である可能性と、EPA-E 投与によって血清 CH が低下したことに連動して単に肝臓の CH プールが増加した結果である可能性とが考えられる。いずれにしても、EPA-E がカゼイン飼料飼育ラットの血清脂質上昇を抑制するという前章で示した成績の一序と考えられる。

興味深いことに、EPA-E 投与ラット由来のリポ蛋白質は血中からのクリアランスが速いことが明らかになった。すなわち、EPA-E 投与動物由来のリポ蛋白質を投与したラットの血清 TC の低下が、非投与動物由来のリポ蛋白質の場合に比して速いことが示された。さらにこの変化は、リポ蛋白質としては $d < 1.006$ の画分 (VLDL) および $1.006 < d < 1.063$ の画分 (IDL + LDL) の変化として認められた。血中では肝から分泌された VLDL は IDL や LDL へと変換されつつ、それぞれ各リポ蛋白質受容体に依存した経路あるいは依存しない経路を経て主に肝臓に取り込まれる³⁷⁾。本章で示されたこの成績から、EPA-E 投与によって VLDL, IDL や LDL のリポ蛋白質がその異化代謝が亢進するよう機能的に修飾されていることが示唆された。

以上、本章においてはまず、EPA-E が CH 吸収および CH 生合成を抑制する作用、ならびに、胆汁分泌を亢進する作用を有することを明らかにした。なお、前章でも触れたようにヒトの脂質代謝を考慮した場合には実験動物としてウサギやハムスターを使用することが比較的望ましいとの指摘もある²⁴⁾が、本章で示した一連の成績は、現在もこの分野で汎用され、また、臨床で奏効している高脂血症治療薬の基礎実験として多数のデータが集積しているラットを用いて実施した結果であり、今後さらに動物種を変えて検討してみる必要もあろう。一方では、これらの成績は EPA を比較的多量に含有する魚油を用いて試験した成績からも支持される。すなわち、魚油の投与により、肝 HMG-CoA 還元酵素活性が低下することがラット³⁸⁾およびウサギ³⁹⁾で報告されており、また、胆汁分泌を増加させることがラットで報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。本章ではさらに、EPA-E を投与したリポ蛋白質が機能的に何らかの修飾を

受け、血中からのクリアランスが亢進するような状態になっていることを示した。以上の成績から、EPA-E は、CH の主要な代謝過程に多岐に渡って作用し、その結果、血中 CH の低下をもたらすものと考えらる。EPA-E がこのような多彩な作用を示すことは、本来このものが脂肪酸の一種であることに起因するのであろう。EPA-E を投与した際には、CH 代謝と密接な関係にある組織を含む種々の生体組織の脂肪酸成分として EPA が分布・置換し、CH 代謝に影響を及ぼしていると推察される。後述するように血中 CH の運搬体であるリポ蛋白質中にも EPA が取り込まれるが、その異化速度を速めていることは既存の脂質低下薬にはみられない特徴的な作用と考えられる。

第3章 ラット血清 VLDL の性質に及ぼす影響

序説

前章において、EPA-E を投与したラットの血清から調製したリポ蛋白質画分を別のラットに静注した際の血清 CH の消失が、EPA-E 非投与ラットより得たものと比較して速く、この変化は血清 $d < 1.006$ (VLDL) および $1.006 < d < 1.063$ (IDL + LDL) の画分で著しかったことを明らかにした。この成績から、EPA-E を投与することによって血中の脂質運搬体であるリポ蛋白質そのものの機能が修飾されている可能性が示唆され、この点についてより明らかにするために、EPA-E を投与したラットの VLDL の性質を EPA-E 非投与のものと比較検討した。

VLDL の性質として、粒子サイズ、脂質組成、アポ蛋白質組成および脂肪酸組成の観点から解析し、また、これらの変化をもたらす要因となる肝 TG 生合成活性、VLDL 分泌活性および血漿 LPL 活性、HTGL 活性に対する EPA-E 投与の影響についても併せて検討した。

第1節 VLDL の粒子径に及ぼす影響

ゲル濾過カラムを用いた HPLC によるラット血清の典型的な溶出パターンを、図 15-A に示す。血清中の TG を検出した本条件下では、最初の排除体積域に CM、次いで VLDL、さらに遅れて TG の検出対象としているグリセロールのピークがそれぞれ認められる。EPA-E 投与群の血清では、VLDL ピーク溶出時間の延長が認められたことから、その粒子サイズが小型化していることが示された (図 15-B)。

なお、対照群の VLDL ピーク下面積 ($371 \pm 39 \text{ mV} \cdot \text{min}$) に比べて、EPA-E 投与群の VLDL ピーク下面積 ($178 \pm 22 \text{ mV} \cdot \text{min}$) が減少していることも同時に認められた。

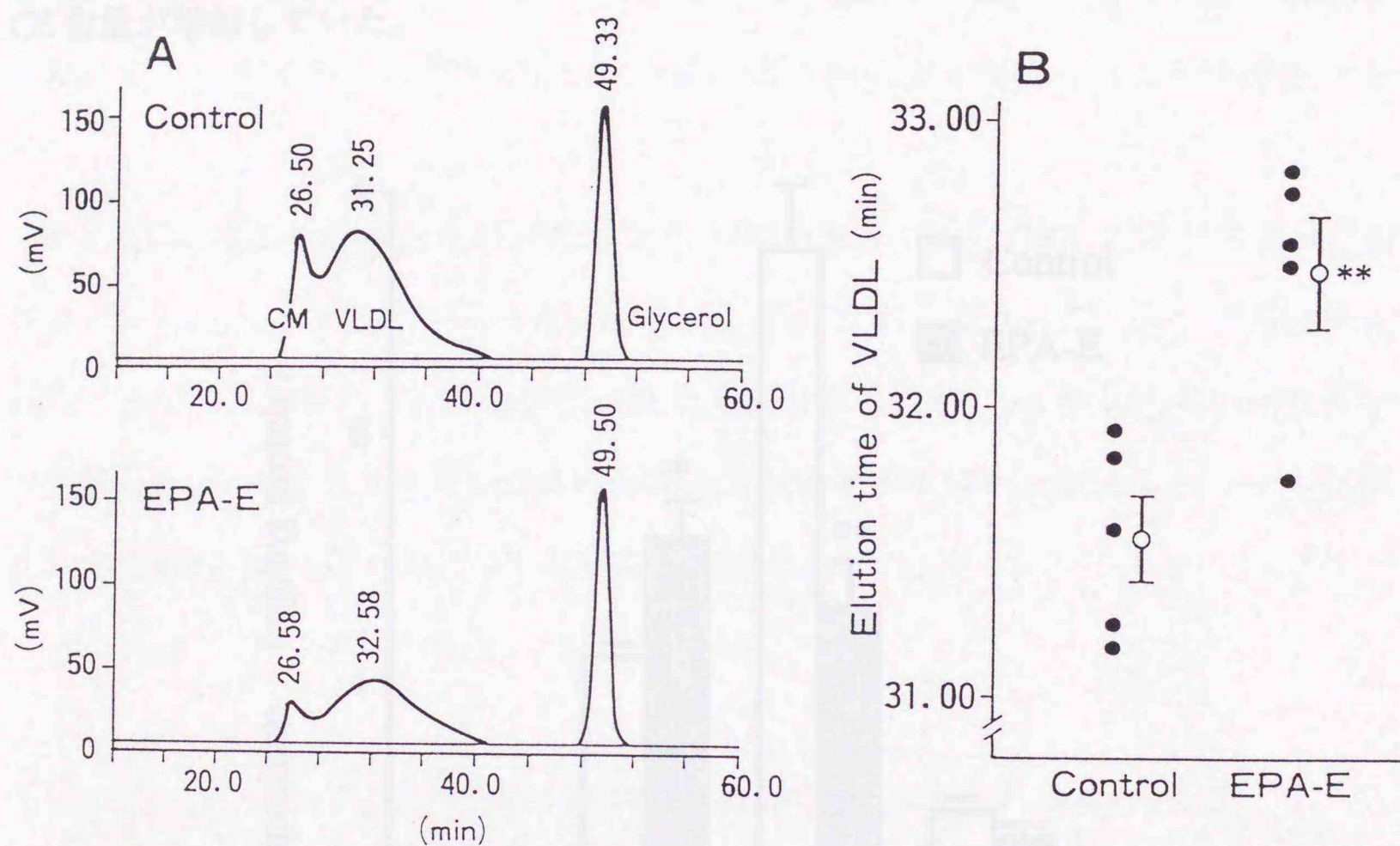


Fig. 15 Typical elution patterns of rat serum with HPLC (A) using a gel filtration column (TSK-GEL G5000PW; particle size $17 \pm 2 \mu$), and VLDL elution time (B). Serum was prepared from rats treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 4 weeks. Open circle in figure B represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. Significant difference from the control value is indicated; **: $p < 0.01$.

第2節 VLDLの脂質組成に及ぼす影響

VLDLは、血清中に存在するアポ蛋白質の中でもCMと共にTG-richリポ蛋白として知られる。図16にVLDLの脂質組成を示したが、EPA-E投与群のVLDLのTG含量は著しく減少していることがわかる。この時、PL含量に変化はなく、FCおよびCE含量が増加していた。

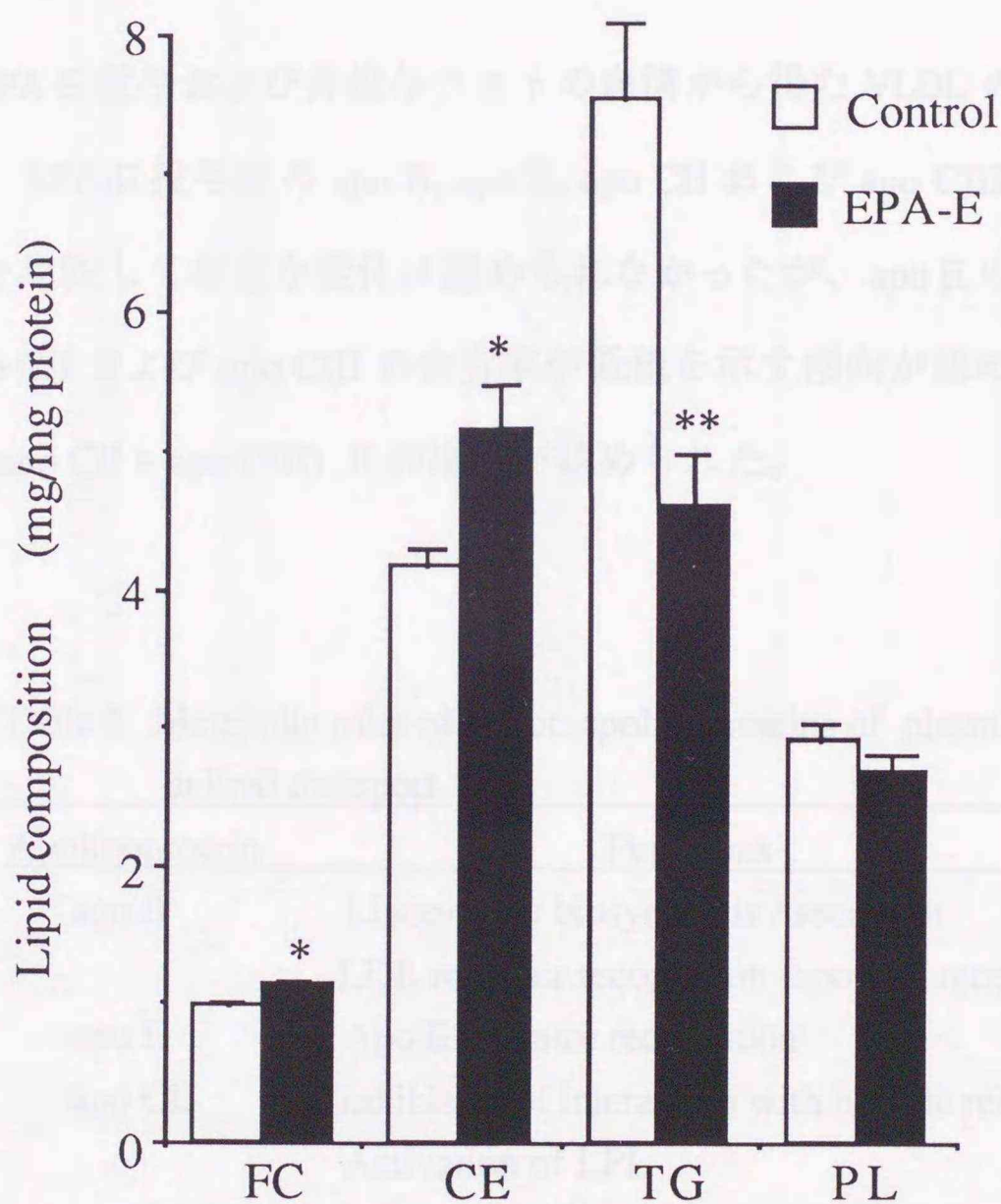


Fig. 16 Effect of EPA-E on lipid composition in VLDL. FC, free cholesterol; CE, cholesteryl esters; TG, triglycerides; PL, phospholipids. VLDL was separated by ultracentrifugation from rat serum treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 4 weeks. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 VLDL samples combined with 3 animals in each sample. Significant differences from the control value are indicated; *:P<0.05 and **:P<0.01.

第3節 VLDLのアポ蛋白組成に及ぼす影響

VLDLを構成する主要アポ蛋白質は apo B, apo E および apo C 群であり、脂質代謝におけるその役割を要約すると表4の如くなる⁴³⁾。apo BはVLDL粒子上に1分子存在し、肝臓から分泌されたVLDLがIDL, LDLへと異化されていく最終過程までとどまるのに対し、apo E および apo C 群は血漿中でVLDLが代謝を受ける過程で他のリポ蛋白質との間で相互の移動があり、VLDLの状態によって異なった量が存在する^{44,45)}。

図17に、EPA-E投与および非投与ラットの血清から得たVLDLの主要アポ蛋白質組成を示した。EPA-E投与群のapo B, apo E, apo CII および apo CIII 各アポ蛋白質含有率は対照群と比較して有意な変化は認められなかったが、apo Eの含有率が高値を示す傾向と apo CII および apo CIII の含有率が低値を示す傾向が認められ、その結果として apo E / (apo CII + apo CIII) 比の増加が認められた。

Table 4 Metabolic roles of major apolipoproteins of plasma VLDL in lipid transport⁴³⁾.

Apolipoprotein	Functions
apo B	Lipoprotein biosynthesis / secretion LDL receptor recognition (apo B/E receptor)
apo E	Apo E receptor recognition
apo CII	Inhibition of interaction with hepatic receptors Activation of LPL
apo CIII	Inhibition of interaction with hepatic receptors

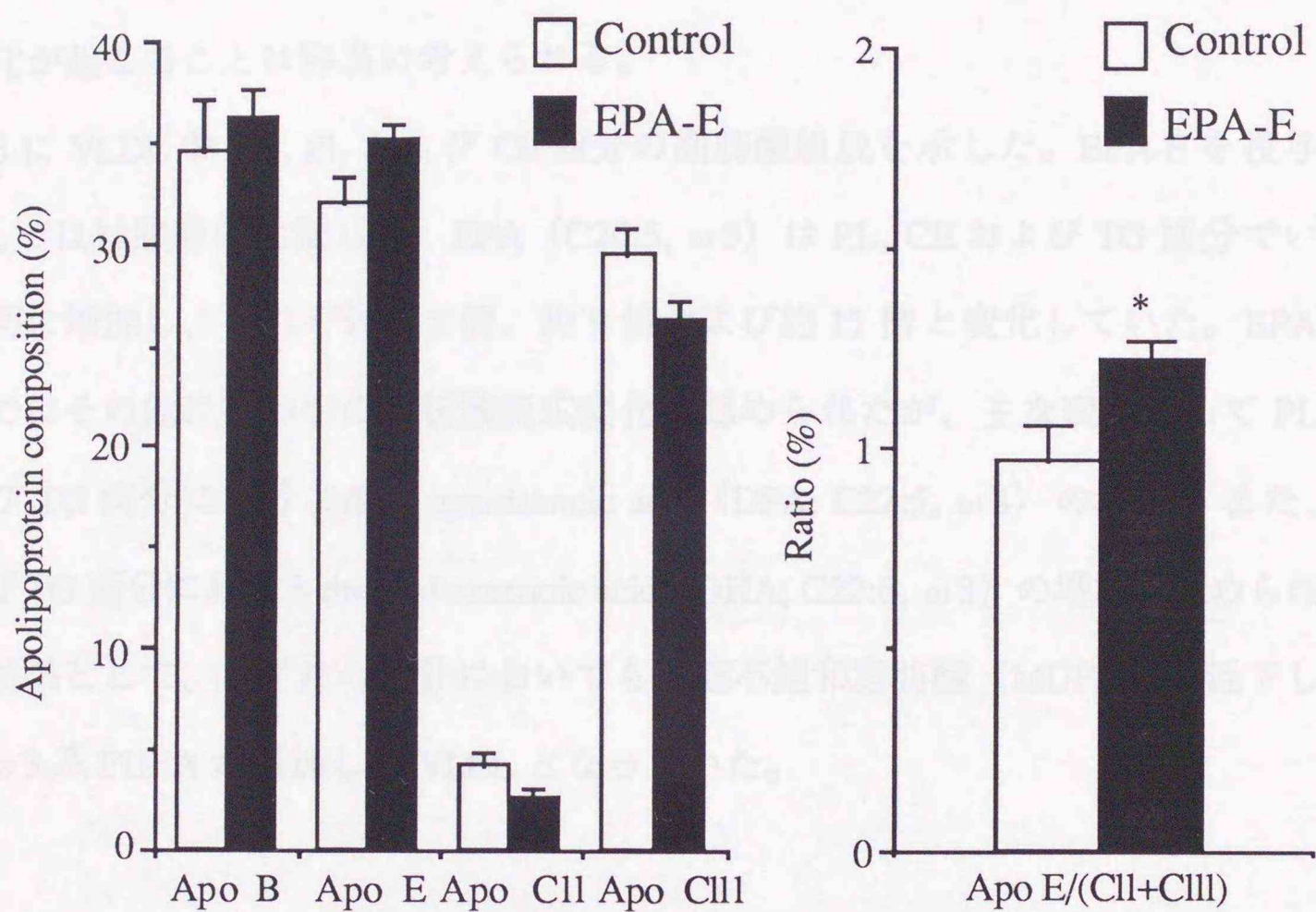


Fig. 17 Effect of EPA-E on apolipoprotein composition (left) and apo E/apo C ratio (right) in VLDL. VLDL was prepared by ultracentrifugation from rat serum treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 4 weeks. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 VLDL samples combined with 3 animals in each sample. Significant difference from the control value is indicated; *:P<0.05.

第4節 VLDLの脂肪酸組成に及ぼす影響

VLDLを含む血漿リポ蛋白質は、中心部に非極性の脂質であるTGおよびCEを有し、その表面をアポ蛋白ならびに極性脂質であるPLおよびFCが覆うことにより水溶性の粒子として存在している。これらの構成要素の中で、TG, PL および CE の構造中には脂肪酸のアシル基が含まれており、EPA-E を投与することによってその組成変化が起こることは容易に考えられる。

表5に VLDL 中 TG, PL および CE 画分の脂肪酸組成を示した。EPA-E を投与した VLDL では対照群に比較して、EPA (C20:5, ω 3) は PL, CE および TG 画分でいずれも著明に増加し、それぞれ約 8 倍、約 9 倍および約 11 倍と変化していた。EPA-E 投与群ではその他に幾つかの脂肪酸組成変化が認められたが、主な変化として PL, CE および TG 画分における docosapentaenoic acid (DPA; C22:5, ω 3) の増加、また、CE および TG 画分における docosahexaenoic acid (DHA; C22:6, ω 3) の増加も認められた。その結果として、いずれの画分においても一価不飽和脂肪酸 (MUFA) が低下し、また、 ω 3 系 PUFA が増加した VLDL となっていた。

Table 5 Effect of EPA-E on fatty acid composition in rat VLDL.

Fatty acid	PL (mol%)		CE (mol%)		TG (mol%)	
	Control	EPA-E	Control	EPA-E	Control	EPA-E
C16:0	22.8	25.4	15.0	15.0	22.0	21.6
C16:1	1.8	1.5	23.9	17.3	11.6	7.6
C18:0	15.5	16.3	1.3	1.6	1.5	1.9
C18:1	12.2	10.1	27.0	25.1	28.0	22.4
C18:2 ω 6	27.7	27.4	17.5	20.8	23.3	23.6
C18:3 ω 6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.24	0.16
C18:3 ω 3	0.03	N.D.	1.6	2.9	1.6	1.7
C20:4 ω 6	8.7	6.3	2.6	1.4	1.7	1.4
C20:5 ω 3	0.4	2.7	1.0	8.6	0.7	7.9
C22:5 ω 3	1.1	3.5	0.1	1.0	1.0	5.9
C22:6 ω 3	1.6	1.1	0.03	0.3	0.4	0.9
Others	8.2	5.7	10.0	6.0	8.0	4.9
Total	100	100	100	100	100	100
SFA	38.3	41.7	16.3	16.6	23.5	23.5
MUFA	14.0	11.6	50.9	42.4	39.6	30.0
PUFA ω 6	36.4	33.7	20.1	22.2	25.2	25.2
ω 3	3.1	7.3	2.7	12.8	3.9	16.4

PL, phospholipids; CE, cholesteryl esters; TG, triglycerides; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; N.D., not determined. VLDL was prepared from rat serum treated EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 4 weeks. Fatty acid analysis was performed by gas chromatography after extraction of PL, CE and TG from the VLDL. Each value represents the mean of 5 VLDL combined with 4 animals in each sample.

第5節 肝 TG 生合成活性に及ぼす影響

肝 TG 生合成能の指標として、ミクロソームを用いた $[^{14}\text{C}]$ 標識オレオイル CoA の TG 画分への取込み速度を図 18 に示したが、EPA-E 投与群では 36.8 ± 3.3 pmol/mg protein/min であり、対照群 (52.3 ± 3.2 pmol/mg) に比べて低値を示していた。

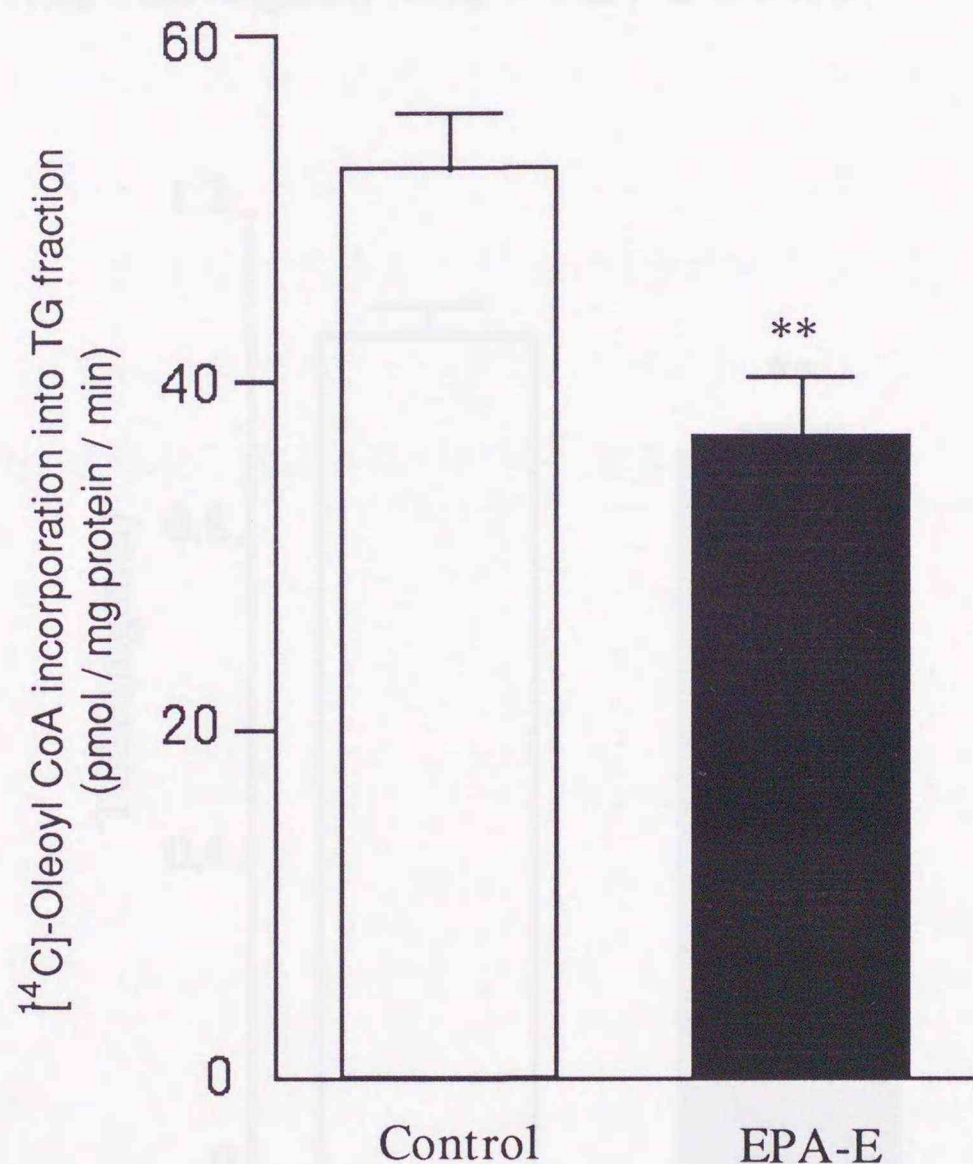


Fig. 18 Effect of EPA-E on triglyceride (TG) synthetic rate in rat hepatic microsomes. Hepatic microsomes were prepared from rat liver treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 7 days. TG synthetic rate was assayed by $[^{14}\text{C}]$ -oleoyl CoA incorporation into the TG fraction. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 6 animals. Significant difference from the control value is indicated; **:P<0.01.

第6節 肝TG分泌速度 (TGSR) に及ぼす影響

Triton WR-1339 (600 mg/kg) を静注した直後から少なくとも 90 分後までは VLDL 中 TG の水解が完全に阻止されて VLDL-TG が直線的に上昇することが明らかとなっており、このことを利用して求められる TGSR は肝 VLDL 分泌活性の指標とされている⁴⁶⁾。

図 19 にその結果を示したが、EPA-E 投与ラットの TGSR は 0.90 ± 0.03 mg/min であり、対照群 (1.05 ± 0.04 mg/min) に比べて低下していた。

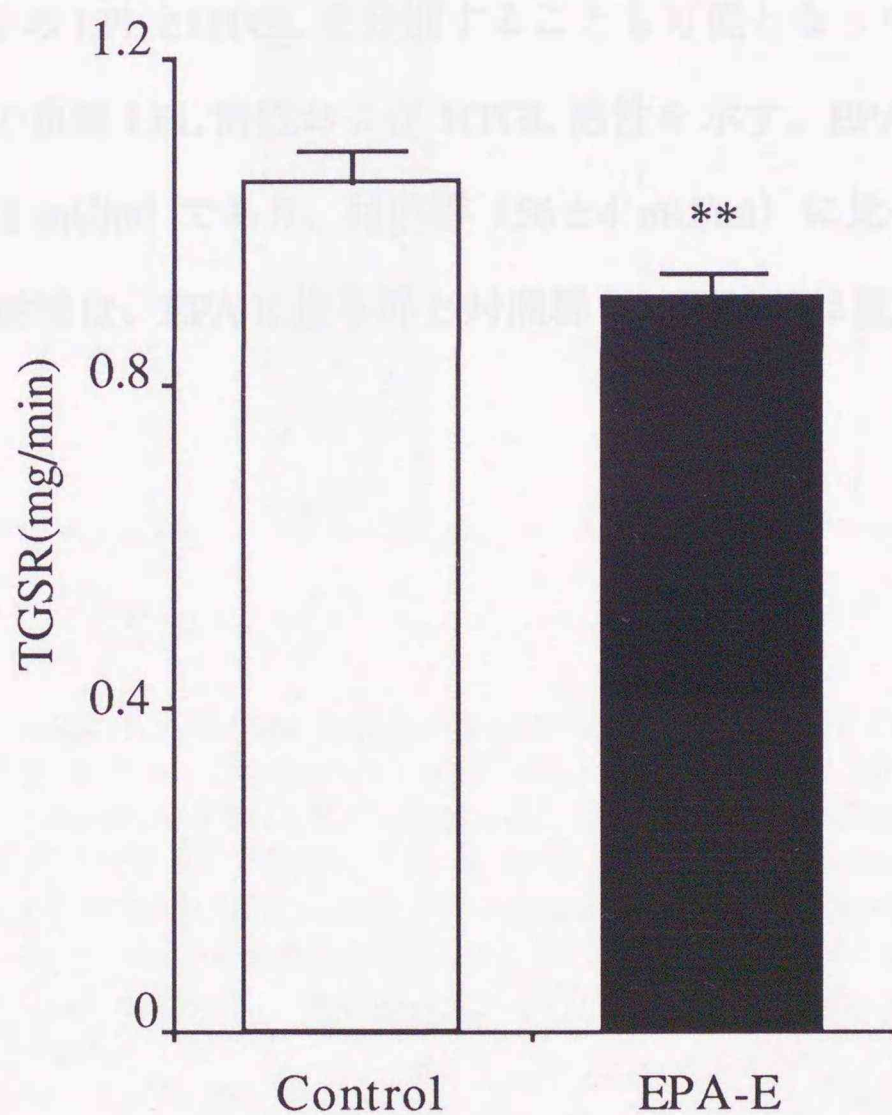
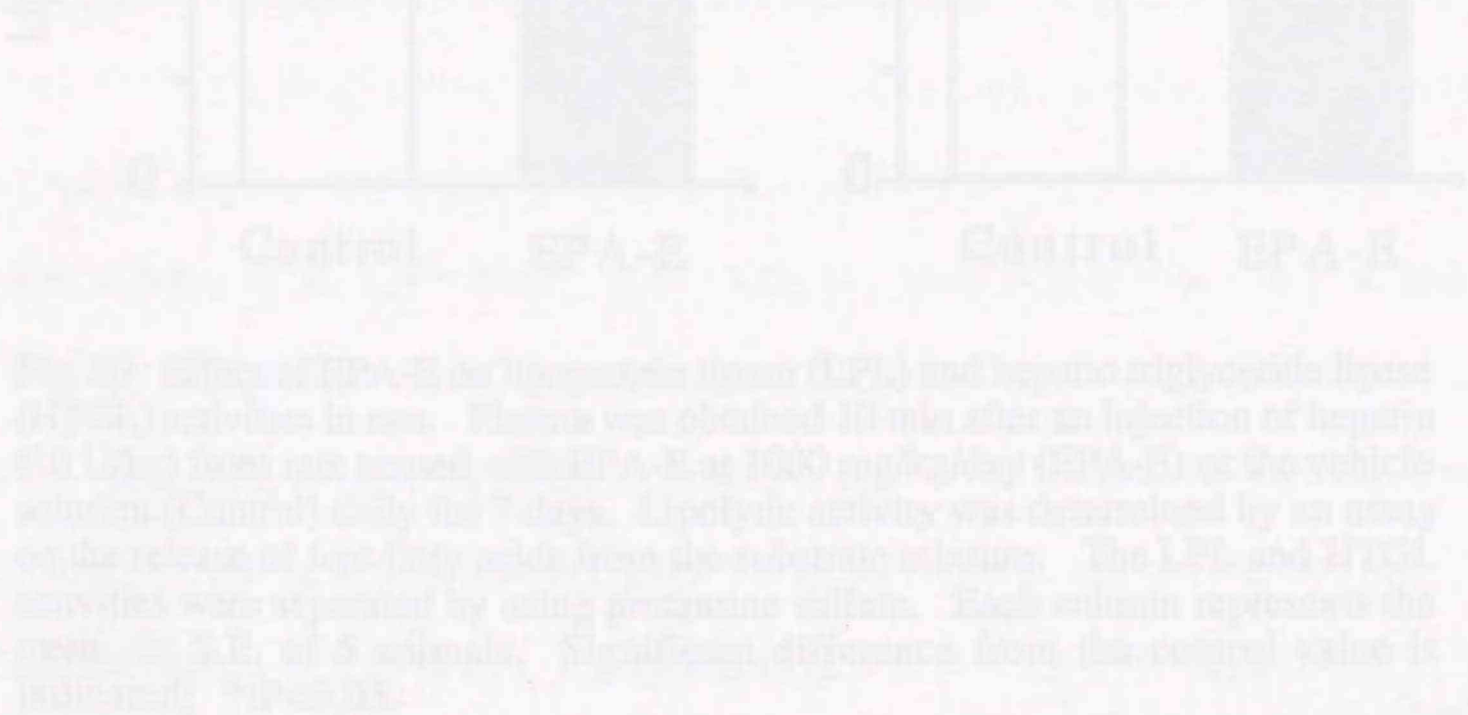


Fig. 19 Effect of EPA-E on triglyceride secretion rate (TGSR) in rats. TGSR was estimated by injection of Triton WR-1339 at 600 mg/kg to rats treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 7 days. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 10 animals. Significant difference from the control value is indicated; **: $P < 0.01$.

第7節 血漿リポ蛋白質水解酵素活性に及ぼす影響

血中においては、LPL および HTGL がリポ蛋白質の構成成分である TG を水解し、その代謝を促す。これらの酵素は毛細血管内皮表面にヘパラン硫酸の糖鎖を介して結合した状態で存在しているが、ヘパリンを静注することによって血漿中へ遊離される。これは、ヘパラン硫酸よりもヘパリンとの親和性が高い (K_d 0.03-0.16 μM vs. 0.006-0.044 μM ⁴⁷⁾) ことによるが、このことを利用してヘパリン静注後のリポ蛋白質水解活性 (post heparin lipolytic activity, PHLA) は血中のリポ蛋白質分解能の指標としてしばしば用いられる¹⁵⁾。更に、プロタミンに対する両酵素の抵抗性の違いを利用して、PHLA 中の LPL と HTGL を分別することも可能となっている⁴⁸⁾。

図20に PHLA の血漿 LPL 活性および HTGL 活性を示す。EPA-E 投与ラットの血漿 LPL 活性は 72 ± 5 mU/ml であり、対照群 (56 ± 4 mU/ml) に比べて高値を示した。一方、血漿 HTGL 活性は、EPA-E 投与群と対照群との間に差は認められなかった。



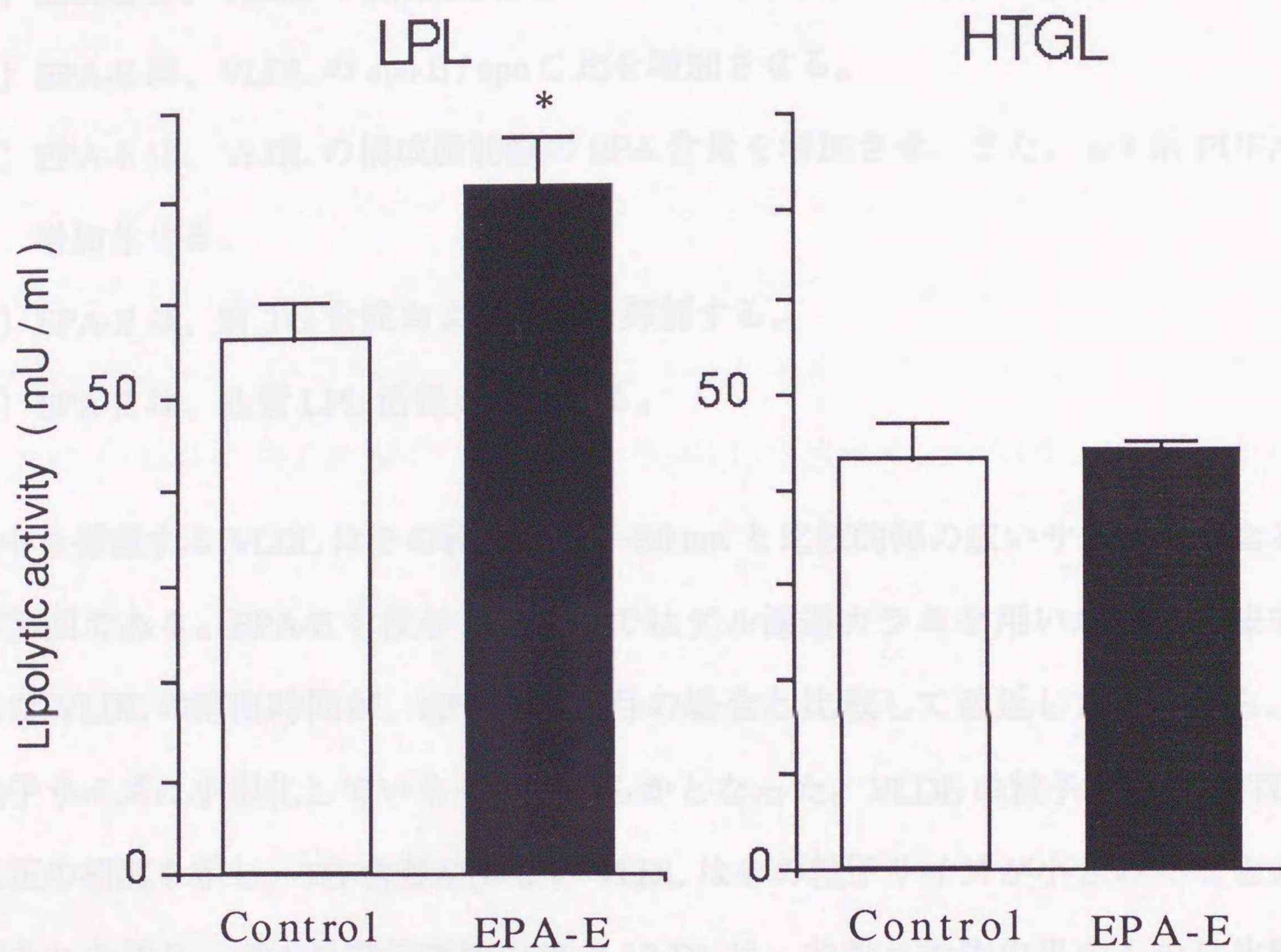


Fig. 20 Effect of EPA-E on lipoprotein lipase (LPL) and hepatic triglyceride lipase (HTGL) activities in rats. Plasma was obtained 10 min after an injection of heparin (10 U/kg) from rats treated with EPA-E at 1000 mg/kg/day (EPA-E) or the vehicle solution (Control) daily for 7 days. Lipolytic activity was determined by an assay on the release of free fatty acids from the substrate mixture. The LPL and HTGL activities were separated by using protamine sulfate. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. Significant difference from the control value is indicated; *:P<0.05.

考察

本章では次の諸点を明らかにした。

- 1) EPA-E は、VLDL の粒子サイズを小型化する。
- 2) EPA-E は、VLDL の構成脂質成分のうち、TG 含量を著減させる。
- 3) EPA-E は、VLDL の apo E / apo C 比を増加させる。
- 4) EPA-E は、VLDL の構成脂肪酸の EPA 含量を増加させ、また、 ω 3 系 PUFA を増加させる。
- 5) EPA-E は、肝 TG 合成および分泌を抑制する。
- 6) EPA-E は、血漿 LPL 活性を亢進する。

血中を循環する VLDL はその径が約 30~80 nm と比較的幅の広いサイズからなる粒子の集団である。EPA-E を投与した血清ではゲル濾過カラムを用いた HPLC 法で測定した VLDL の溶出時間が、EPA-E 非投与の場合と比較して遅延したことから、その粒子サイズは小型化していることが明らかとなった。VLDL の粒子サイズは TG 含量と正の相関を示し、TG 含量が少ない VLDL はその粒子サイズが小さい⁴⁹⁾ことから予想された通り、EPA-E 投与動物由来の VLDL は、非投与動物由来のものに比較して著しい TG 含量の減少が認められた。EPA-E 投与によって VLDL 中の CE および FC 含量の増加も認められ、特に CE の増加が著しかった。このことの詳細は明らかではないが、VLDL 粒子の非極性コア部分の構成成分である TG が著減したために、VLDL 粒子を構築するためにもう一方の非極性成分である CE が代償性に増加した可能性もある。なお、血清の HPLC 溶出パターンで VLDL のピーク面積が EPA-E 投与群で減少していたことは血清中の TG が減少していたことを示しているが、この結果は EPA-E がラットの血清 TG を低下させた第 1 章の成績とよく符号する。

図 18 に示したように、EPA-E は肝の TG 合成を抑制する。加えて、EPA-E 投与に

より TGSR が低下したことから、EPA-E は肝 TG 分泌を抑制することが示されたが、これは EPA-E によって TG 合成が抑制されたことが一因と考えられる。EPA が TG 合成を抑制することは、ウサギ⁵⁰⁾ およびラット⁵¹⁾ の初代培養肝細胞を用いた試験によっても示されている。

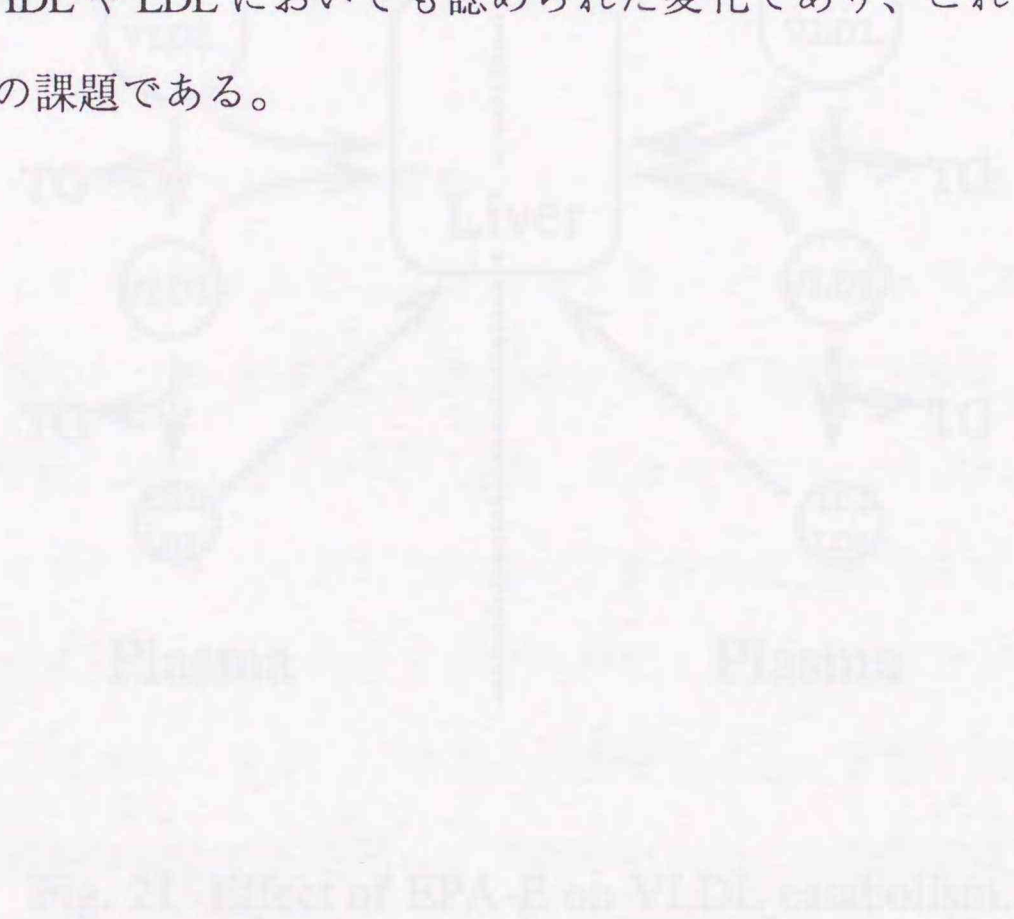
一方、EPA-E は、血中で VLDL の TG を分解する酵素である LPL の活性を上昇させた。食餌性に与えた PUFA がラットにおいてヘパリン静中後の HTGL 活性には影響せず、LPL 活性を上昇させること⁵²⁾ が報告されており、本章での結果と符号する。したがって EPA-E は、肝 TG 合成/分泌を抑制する作用と、TG の水解を亢進する両作用を介して、小型の VLDL を産生させると考えられる。小型の VLDL はより速やかに LDL に変換される⁵³⁾ ことから、EPA-E を投与した VLDL、すなわち小型 VLDL はこの画分から速やかに消失する可能性が考えられた。

さらに、EPA-E 投与後の VLDL では apo E / apo C の増加が認められた。血漿中で VLDL の TG が水解されて IDL へと異化される過程においては、apo C の離脱と apo E の付加を伴う^{44,45)}。したがって、EPA-E 投与によって生じる apo E / apo C が増加した VLDL は、いわば IDL の性質に近い状態の VLDL と言えよう。一方、apo E は肝およびその他の組織の apo B / E 受容体ならびに apo E 受容体に高い親和性を有している⁵⁴⁾。apo E を介したリポ蛋白の肝細胞に対する結合を apo C⁵⁵⁾ あるいは apo CIII⁵⁶⁾ が阻害し、apo E / apo C 比が高値を示す VLDL ほど肝に取り込まれやすくなることが示されていることから、EPA-E 投与動物の VLDL は血中から速やかに消失しやすくなっている可能性も示唆された。

最後に、EPA-E 投与ラットの VLDL では脂肪酸を構成成分に含む TG, PL および CE のいずれの画分においても EPA が著増していることが今回の検討で明らかになった。すなわち、PL, TG および CE のアシル基部分を構成する脂肪酸として EPA が置換したことを示している。EPA-E 投与によって DPA および DHA の増加も認められ

たが、これは EPA-E 投与に由来する EPA が脂肪酸鎖長伸長化酵素および不飽和化酵素によって代謝されて生じた産物⁵⁷⁾と考えられる。このことが VLDL の機能をどのように修飾しているかについては本研究では明らかにしてはいないが、最近、Berlin ら⁵⁸⁾によって興味深い報告がなされている。彼らは、PUFA の一種として リノール酸 (C18:2, ω 6) を豊富に取り込ませた LDL が肝受容体との親和性が高まることを示し、このことは PUFA-rich となった LDL の流動性が亢進していることに起因すると報告している。EPA を多量に取り込んだリポ蛋白質にも同様のことが言えるのかも知れない。

EPA-E 投与による血中 VLDL 異化過程の変化について、本章に述べた以上の内容を図 2 1 に模式化した。本研究では IDL や LDL の異化代謝に対する EPA-E の作用を明らかにしてはいないが、前章で明らかにした EPA-E 投与による血中リポ蛋白クリアランスの亢進は IDL や LDL においても認められた変化であり、これらについての詳細な解析は今後の課題である。



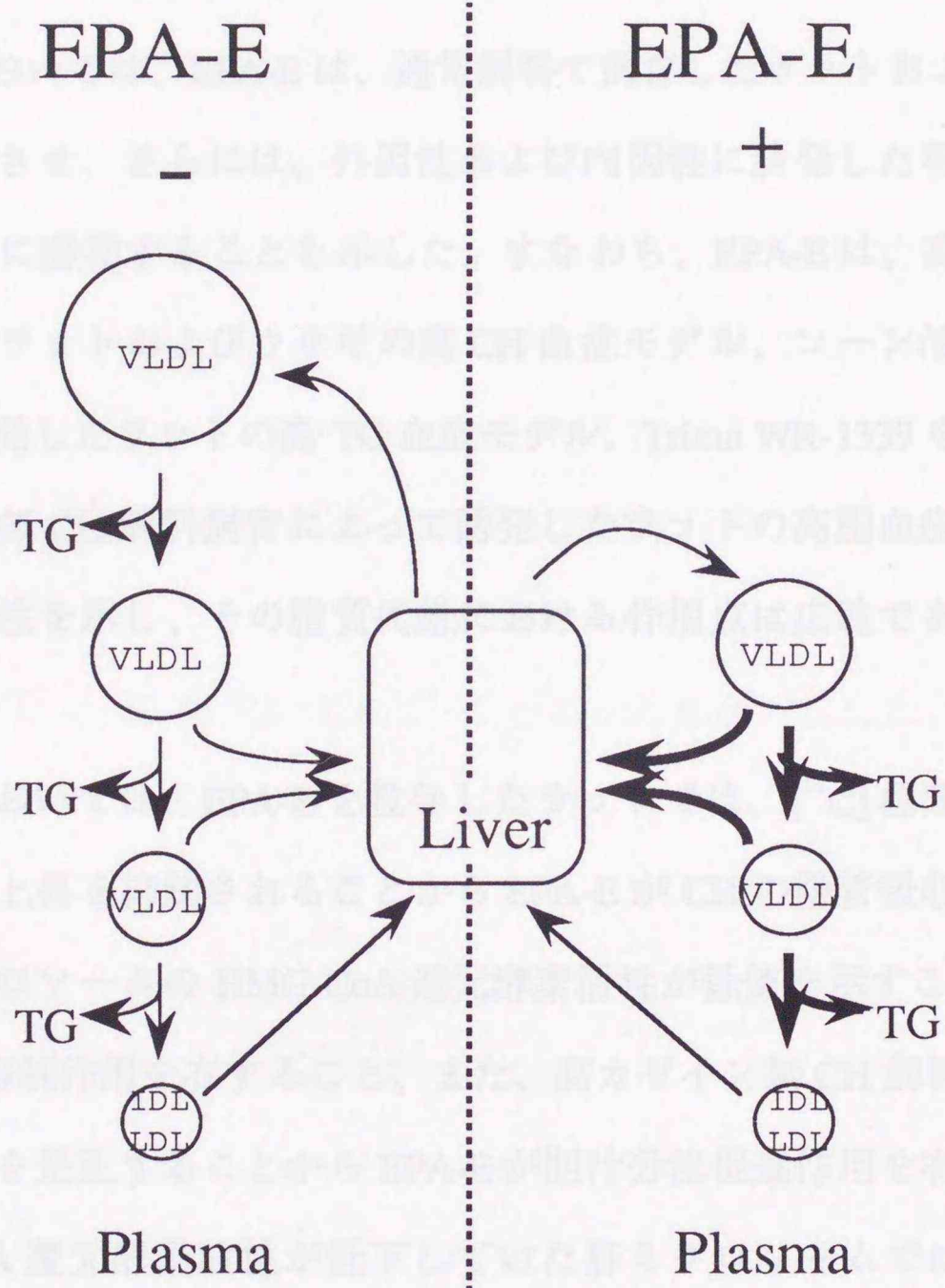


Fig. 21 Effect of EPA-E on VLDL catabolism.

総 括

本研究における目的は、高純度 EPA のエチルエステル体 EPA-E の病態モデル動物に対する作用を検討し、高脂血症治療薬としての臨床応用の可能性を探るとともに、その作用機序について考察することである。

まず第 1 章においては、EPA-E は、通常飼料で飼育したラットおよびハムスターの血中脂質を低下させ、さらには、外因性および内因性に誘発した種々の実験的高脂血症病態モデルに奏功することを示した。すなわち、EPA-E は、高 CH 飼料飼育によって誘発したラットおよびウサギの高 CH 血症モデル、コーン油を経口負荷することによって誘発したラットの高 TG 血症モデル、Triton WR-1339 を静脈内投与あるいは高カゼイン無 CH 飼料飼育によって誘発したラットの高脂血症モデルのいずれに対しても有効性を示し、その脂質代謝における作用点は広範であることが示唆された。

次に第 2 章においては、EPA-E を投与したラットでは、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH 経口投与後の血中放射活性上昇を抑制されることから EPA-E が CH の腸管吸収抑制作用を有すること、肝ミクロソームの HMG-CoA 還元酵素活性が低値を示すことから EPA-E が CH 生合成活性抑制作用を有すること、また、高カゼイン無 CH 飼料飼育によって低下した胆汁排泄を是正することから EPA-E が胆汁分泌促進作用を有することが示された。HMG-CoA 還元酵素活性が低下していた肝ミクロソームでは、膜 PL 画分の EPA 含量が著しく増加しており、このことが膜酵素である本酵素活性発現に影響したものと推察される。EPA-E 投与によって認められた CH 腸管吸収の低下および胆汁分泌の促進も、これら脂質代謝を担う組織の脂肪酸成分として EPA が置換した結果と予想している。興味深いことに、EPA-E を投与したラットから調製したリポ蛋白質は血中からのクリアランスが速いことが示された。このことから、EPA-E を投

与することによって血中脂質運搬体であるリポ蛋白質そのものの性質が修飾され、クリアランスされ易い機能を獲得していることが示唆された。

さらに、第3章においては、EPA-Eを投与したラットのVLDLはTG含量が著しく減少しそのサイズは小型化していること、また、この変化はEPA-EによってTG生合成能ならびにVLDL分泌が抑制されることと、LPLの活性が亢進することの両作用によってもたらされることを示した。さらに、EPA-Eを投与した時のVLDLはアポ蛋白質組成が変化し、apo E/apo C比が増加していることも示した。小粒子化したVLDLは血中リポ蛋白質異化過程における次のステップであるIDLやLDLにより速やかに変換され、また、apo E/apo C比が増加したVLDLはapo E受容体を介してより速やかに取り込まれ易いことから、EPA-E投与後のVLDLにみられたこれら一連の変化は、VLDLが血中から速やかに消失する性質を獲得していることを示唆している。さらに、EPA-E投与により、VLDLを構成するPL, TGおよびCEのアシル基としてEPAならびに ω 3系PUFAが増加していることを明らかにした。このような脂肪酸組成の変化がVLDLの機能をどのように修飾しているかについては本研究では明らかにしていないが、PUFAの一種としてリノール酸を豊富に取り込ませたLDLはその流動性が亢進し、肝受容体との親和性も高まることが報告されており、EPAを多量に取り込んだリポ蛋白質にも同様のことが起こっている可能性が考えられる。

以上、EPA-Eの脂質代謝に及ぼす作用に関する研究を行い、3つの章に分けて記述し、考察を加えた。EPA-Eが各種の安全性試験ならびに臨床において高い安全性を示すことは既に確認されているところであり、本物質が高脂血症治療薬として今後臨床応用されることは十分に期待される。

実験材料および方法

実験材料

1. 動物

雄性 Wistar 系ラット（体重 200～300 g） 雄性 Syrian 系ハムスター（体重 100～140 g, 以上、日本 SLC）および雄性ニュージーランド白色系ウサギ（体重 1.7～2.3 kg, 北山ラベス）を使用した。いずれの動物も試験期間を通じて恒温（ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ）・恒湿（ $55 \pm 5\%$ ）で飼育し、特に断らない限り摂餌および摂水に制限を与えなかった。

2. 飼料

通常飼料として、ラットの場合は魚粉抜き F1 固形飼料（船橋農場）を、ハムスターの場合は魚粉抜き F1 粉末飼料（船橋農場）を、また、ウサギの場合は RC-4 固形飼料（オリエンタル酵母）をそれぞれ使用した。ラットおよびハムスターは通常飼料で 2～3 週間、また、ウサギは通常飼料で 1 週間以上飼育した後、試験に供した。

高 CH 含有飼料として、ラットの場合は 1% CH + 0.2% コール酸添加魚粉抜き F1 固形飼料（船橋農場）を、また、ウサギの場合は 0.1% CH 添加 RC-4 固形飼料（オリエンタル酵母）を使用した。カゼインを 20% 含有し、CH を含まない半合成粉末飼料⁵⁹⁾ はオリエンタル酵母より購入した。

3. 薬物

EPA-E は、日本水産 (株) にて魚油から精製された純度 89.2% あるいは 90.7% のも

のを使用した。このものは、不純物としてオクタデカテトラエン酸エチルエステル (C18:4, ω 3) およびエイコサテトラエン酸エチルエステル (C20:4, ω 3) をそれぞれ 3% 未満、AA のエチルエステル (C20:4, ω 3) を 7% 未満含み、また、0.2% の α -トコフェロールを含有する。

対照薬としたクロフィブレートは和光純薬工業より購入し、また、クリノフィブレートはリポクリン錠 (住友製薬) をクロロホルムで抽出して再結晶させ、NMR スペクトルにより構造を確認した後使用した。これらの薬物は、用時、超音波細胞破碎機 (大岳製作所) を用いて 5% アラビアゴム水溶液に乳濁もしくは懸濁した後、ラットおよびハムスターには体重 1kg 当り 10 ml の容量で、また、ウサギには体重 1 kg 当り 2 ml の容量で、それぞれ経口投与した。対照群には、5% アラビアゴム水溶液を同様に経口投与した。

4. 試薬類

[14 C] 標識 CH (2.22 GBq/mmol), [14 C] 標識 HMG-CoA (2.146 GBq/mmol) および [14 C] 標識 oleoyl-CoA (2.00 GBq/mmol) はアマシャムジャパンより購入した。glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase (以上, ベーリンガー・マンハイム山之内), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺, オリエンタル酵母), 14% boron trifluoride methanol complex (BTMC), ethylenediaminetetraacetic acid 2Na (EDTA), sodium dodecylsulfate (SDS) および protamine sulfate (以上, 和光純薬), bovine serum albumin (BSA, Fraction V), thimerosal, sodium deoxycholate, sucrose, dithiothreitol (DTT) および tricosanoic acid (以上, Sigma), corn oil (ナカライテスク), Triton WR-1339 (Ruger chemical), heparin (持田製薬), Intralipid 10%[®] (Intralipid, KabiVitrum AB), protein assay kit (Bio-Rad), SDS-PAGE mini GRADIENT GEL[®], IEF mini GEL[®] (以上, テフコ) および Coomassie Brilliant Blue R 250 (半井化学) を使用した。その他、一般的な試薬は市販品

最高グレードのものを用いた。

実験方法

1. 第1章実験

1) 正常動物（ラット、ハムスター）に対する作用

動物に薬物を1日1回、7日間連日経口投与した。最終投与24時間後に採血し、血漿あるいは血清脂質を測定した。

2) 高CH飼料飼育ラットに対する作用

ラットの飼料を高CH飼料に変更した日から薬物投与を開始し、1日1回、4週間連日経口投与した。薬物最終投与の24時間後に、頸静脈より採血し、血清脂質を測定した。

3) 高CH飼料飼育ウサギに対する作用

ウサギに、高CH飼料を体重1kg当たり40gを1日1回与えて飼育した。高CH飼料飼育2週間後の血清TCが90~130mg/dlの動物を選別し、その日から薬物を1日1回、4週間連日経口投与した。2週間投与の翌日は耳介動脈から、また、4週間投与の翌日はペントバルビタール麻酔下に頸動脈から、いずれも前日の薬物投与24時間後に採血し、血清脂質を測定した。

4) コーン油経口負荷ラットに対する作用

上記1)のラットの採血終了後、直ちに、5%アラビアゴム水溶液に50% (w/w) となるよう乳濁したコーン油 10ml/kgを経口投与した。コーン油投与2, 4, 6および8時間後に頸静脈より採血し、血漿TGを測定した。

5) Triton WR-1339 誘発高脂血症ラットに対する作用

20 時間絶食したラットに薬物を経口投与し、その 3 時間後に Triton WR-1339 300 mg/kg を静脈内投与した。Triton WR-1339 投与 12 時間後に眼窩静脈叢より採血して、血清 TC および TG を測定した。

6) 高カゼイン無 CH 飼料飼育ラットに対する作用

ラットの飼料を 20% カゼイン含有無 CH 飼料に交換し、翌日より薬物を 1 日 1 回、連日経口投与した。投薬開始後 1 週毎に眼窩静脈叢より採血し、血清 TC, TG および PL を測定した。一部の実験群については、薬物最終投与の翌日にペントバルビタール麻酔下に腹部大動脈より採血し、各リポ蛋白質画分に分画し、各々の画分の TC, TG および PL を測定した。

7) 脂質の測定

血漿または血清中の TC, TG および PL は、全て酵素法による市販キット（和光純薬）を用いて測定した。血清中各リポ蛋白質画分中の脂質は、超遠心機（SCP70H, 日立工機）を使用し、微量超遠心機ローター（RPL-42T, 日立工機）を用いた微量超遠心法⁶⁰⁾によりリポ蛋白質画分を分離した後、血清の場合と同様に測定した。

2. 第 2 章実験

1) [¹⁴C] 標識 CH の消化管吸収に及ぼす影響の検討

Yamori ら²⁵⁾の方法に準じた。ラットに薬物を 7 日間連日投与し、最終投与の 24 時間後に [¹⁴C] 標識 CH を 0.4 mg/ml (3.57 KBq/ μ mol), コーン油を 60 mg/ml およびデオキシコール酸ナトリウムを 20 mM となるように懸濁した 5% アラビアゴム水溶液 10 ml/kg を経口投与し、その 1, 3 および 6 時間後に採血し、血漿中放射能を液体シン

チレーションカウンター (Liquid scintillation system LSC-700, アロカ) にて測定した。投与に用いた注射筒に残存した放射能を差し引いて正味の経口投与量を算出し、各採血時間の血漿中放射能の上昇を、正味の投与量に対する割合 (% of dose / 100g plasma) として算出した。

2) 肝ミクロソームの調製

ラットの肝ミクロソームの調製は Kuroda & Endo の方法⁶¹⁾ に準じた。3 週間以上、明暗周期逆転 (16:00 点灯, 4:00 消灯) の光周期下で飼育したラットに薬物を単回投与あるいは 7 日間連日投与し、その 12 時間後あるいは 18 時間後に、いずれも明暗周期における暗期の中間に屠殺し、直ちに肝臓を摘出した。肝臓を氷冷した生理食塩水で洗浄した後、テフロンガラスホモゲナイザーを用いて 3 倍容量の氷冷緩衝液 (100 mM リン酸カリウム, 30 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) 中でホモゲナイズした。12,000 x g で 20 分間超遠心分離 (SCP70H, 日立工機) した上清を、さらに 105,000 x g で 60 分間遠心した。得られた沈査 (ミクロソーム) を、ショ糖 (250 mM), EDTA (1 mM) および DTT (1 mM) を含んだ 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、使用するまで -80°C に保存した。

3) HMG-CoA 還元酵素活性の測定

Shapiro らの方法⁶²⁾ に準じて HMG-CoA 還元酵素活性を測定した。すなわち、2 mg/ml ミクロソーム蛋白, 30 mM グルコース 6 リン酸, 2 IU/ml グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ, 3 mM NADP⁺, 0.66 mM DTT, 20 mM EDTA, 167 mM NaCl および 0.3 mM [¹⁴C] 標識 HMG-CoA (0.1 KBq/nmol) 含有 50 mM カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.12 ml を 37°C で 15 分間保温し、10 N 塩酸 20 μ l を添加して反応を停止した。さらに、37°C で 30 分間保温して [¹⁴C] 標識メバロン酸から生成した [¹⁴C] 標識メバロノラクトンを、薄層クロマトグラフ (ベンゼン:アセトン, 1:1, v/v) で分画

した後、メバロノラクトン画分の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定し、1分間当りのメバロン酸生成量を HMG-CoA 還元酵素活性として表した。

4) ミクロソーム中 EPA 含量の測定

脂肪酸組成の分析は小沢ら⁶³⁾の方法に準じた。ミクロソームより、Folch ら⁶³⁾の方法によって総脂質を抽出し、薄層クロマトグラフ (石油エーテル:ジエチルエーテル:酢酸, 90:10:1, v/v/v) により PL 画分を分画採取した後、メタノールで脂肪酸を抽出し、BTMC で PL 中の脂肪酸をメチルエステル化した後ガスクロマトグラフ用試料とした。EPA 量は、トリコサン酸 (C23:0) を内部標準物質として求めた。

5) 胆汁排泄に及ぼす影響の検討

ラットをカゼイン飼料で7日間飼育し、その間薬物を1日1回、連日投与した。薬物最終投与の3時間後に、ペントバルビタール麻酔下に開腹し、胆管にカニューレ (SP-45, 夏目製作所) を逆行性に挿入した。ラットを Bollman ケージ (夏目製作所) に固定し、24時間胆汁を採取して、胆汁量ならびに胆汁酸, CH および PL 含量を測定した。

6) 血中 CH クリアランスに及ぼす影響の検討

ラットを高 CH 飼料で4週間飼育し、その間薬物を1日1回、連日投与した。薬物最終投与の3時間後に採血し、5匹毎のプール血清を各群5検体ずつ調製した。微量超遠心法により $d < 1.210$ の血清リポ蛋白質画分を採取し、別に用意した1群5匹の無処置ラットに、投与リポ蛋白質の TC 値が 60 mg/kg となるように静脈内投与した。リポ蛋白質静注 1, 5, 30, 60, 120 および 240 分後に採血して血清 TC 値を測定した。さらに、微量超遠心法により血清を $d < 1.006$, $1.006 < d < 1.063$ および $1.063 < d$ の画分に分画し、各々の画分の TC 値を測定した。得られた結果は、各採血時間における TC

値を、静注1分後のTC値(100%)に対する比率(%)で表した。

7) 脂質、蛋白量および胆汁酸の測定

血清およびリポ蛋白質画分の脂質の測定法は、前章の方法の項に記載した。ミクロソーム中の脂質含量は、総脂質をFolchらの方法⁶⁴⁾により抽出した後、血清の場合と同様に測定した。CE値は、TC値とFC値の差から求めた。蛋白量は、色素結合法(protein assay kit)を用いて測定した。胆汁酸は酵素法による市販キット(和光純薬)を用いて測定した。

3. 第3章実験

1) 血清およびVLDLの調製

高CH飼料飼育ラットに、EPA-Eもしくはその溶媒を1日1回、4週間経口投与した。薬物最終投与の24時間後、ペントバルビタール麻酔下に腹部大動脈より採血して血清を分離し、終濃度1 mg/mlのEDTAおよび0.1 mg/mlのチメロサルを添加して血清試料とした。

VLDLはHatch & Leesの超遠心法⁶⁵⁾により調製した。血清試料を26,000 x gで30分間超遠心(SCP70H, 日立工機)し、上層のカイロミクロンを除去し、残液に1 mM EDTAおよび0.1 mg/mlチメロサルを含むNaCl溶液を加えて比重を1.006に調整し、114,000 x gで16時間超遠心した上層をVLDLとして採取した。得られたVLDLは、脂肪酸組成の分析には4匹分毎にプールし、また、それ以外の実験には3匹毎にプールした。再度、1 mM EDTAおよび0.1 mg/mlチメロサル含NaCl溶液にて比重を1.006に調整し、さらに114,000 x gで16時間超遠心した上層をVLDL試料として、以下の分析に使用した。

2) HPLC による血清 VLDL の分析

水系ゲル濾過カラム (TSK-GEL G5000PW, TOSOH 8010 system, 東ソー) を用いた Hara & Okazaki ⁶⁶⁾ の HPLC 法に従って血清 VLDL を分析した。すなわち、血清試料 20 μ l をカラムに注入し、0.2 M NaCl 含有 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) を溶離液として毎分 0.5 ml の一定流速で溶出させた。溶出液を反応器 (CO-8010, 東ソー) に導き、TG を酵素法で発色させ、吸光度モニター (UVIDEC-100, Jasco) にて検出した。

3) VLDL の脂質組成の分析

血清の場合と同様にして、VLDL 試料の TC, FC, CE, PL ならびに TG 含量を測定した。VLDL 試料の蛋白質含量は色素結合法により測定し、VLDL の脂質組成は蛋白質重量当たりの脂質重量として表した。

4) VLDL のアポ蛋白質組成の分析

VLDL のアポ蛋白質組成の測定は、Arbeeny & Rifici の報告 ⁶⁷⁾ に準じた。すなわち、VLDL 試料を凍結乾燥し、冷エタノール / ジエチルエーテル (3:1, v/v) 液にて脱脂した後、5% SDS 溶液に再溶解して 3-20% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動を行った。泳動終了後に Coomassie Brilliant Blue-R 250 染色し、デンシトメーター (567nm, CS930, 島津製作所) によって apo B, apo E および apo C に相当するピーク面積を画像解析装置 (Ruzex-5000X, ニレコ) を用いて計測し、各ピーク面積を全ピーク面積の総和に対する相対比 (%) として表した。また、apo C 中の apo CII および apo CIII は Gidez らの方法 ⁶⁸⁾ に準じ、6.8 M 尿素含有 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて等電点電気泳動 (pH 4-6) を行った後、同様にして相対比を求めた。

5) VLDL の脂肪酸組成の分析

ミクロソームの場合と同様にして、TG, PL および CE の脂肪酸分析を行い、各々の脂肪酸含量を総脂肪酸に対するモル%で表した。

6) 肝 TG 生合成活性の測定

ラットに薬物を7日間連日投与し、最終投与の18時間後に屠殺した。直ちに肝臓を摘出後、前章と同様にミクロソーム画分を採取した。TG 生合成活性は、400 μ g/ml ミクロソーム蛋白, 1 mg/ml BSA, 30 μ M [14 C] 標識オレオイル CoA (7.4 KBq/ml) 含有 100 mM カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 250 μ l を 37°C で 5 分間保温し、エタノール 1 ml を加えて反応を停止した後、ヘキサンにて脂質を抽出し、薄層クロマトグラフ (石油エーテル:ジエチルエーテル:酢酸, 90:10:1, v/v/v) で分画した TG 画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、1 分間当りの TG 生成量を求めた。

7) 肝 TG 分泌速度 (TGSR) の測定

TGSR の測定は Steiner ら⁴⁶⁾の方法に準じた。ラットに薬物を7日間連日投与し、最終投与の24時間後に Triton WR-1339 600 mg/kg を静脈内投与した。Triton WR-1339 静注直前および60分後に採血して得た血清の TG 濃度を測定し、TG レベルの上昇をそれぞれのラットの体重から換算した血清量で補正⁶⁹⁾して、TGSR (mg/min) を求めた。

8) 血漿中リポ蛋白質水解酵素活性の測定

ラットに薬物を7日間連日投与し、薬物最終投与の24時間後に、ヘパリン 10 U/kg を静脈内投与した10分後に採血して血漿を得た。血漿中 post heparin lipolytic activity (PHLA) の測定は、Boberg ら⁷⁰⁾および Peterson ら⁷¹⁾の方法を参考にした。血漿 10 μ l と 20% BSA 含有 150 mM トリス塩酸緩衝液 50 μ l (pH 8.5) を混合した

血漿検体に、Intralipid と非働化ラット血清を等量加えて 37℃ で 30 分間振とうして作製した活性化基質 50 μ l を加え、生理食塩水で全量を 500 μ l とした反応液を、37℃ で 1 時間振とう保温し、遊離する FFA を酵素法による市販キット（和光純薬）を用いて測定した。PHLA は、1 分間に 1 μ mol の FFA を遊離させる活性を 1 U として表した。

PHLA 中の LPL 活性および HTGL 活性の分別にはプロタミン法⁴⁸⁾を用いた。すなわち、血漿検体を硫酸プロタミン (9.38 mg/ml) 存在下に 27℃ で 10 分間保温して LPL 活性を阻害した後に、同様に活性基質と生理食塩水を加えて振とう保温し、遊離する FFA を測定して、残存する HTGL 活性を求めた。LPL 活性は、PHLA と HTGL 活性との差から求めた。

4. 統計処理

得られた結果は、平均もしくは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。群間の平均値の差の検定は、分散分析 (ANOVA) を行なった後に Student's *t*-test を行い、危険率が 5% 以下の場合を有意とした。

参考文献

- 1) Kannel W.B., Castelli W.P., Gordon T. and McNamara P.M.: Serum cholesterol, lipoproteins and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* 74, 1-12 (1971)
- 2) Lipid Research Clinics Program: The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *J. Am. Med. Assoc.* 251, 351-364 (1984)
- 3) Lipid Research Clinics Program: The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *J. Am. Med. Assoc.* 251, 361-374 (1984)
- 4) William P. C.: The triglyceride issue: A view from Framingham. *Am. Heart J.* 112, 432-437 (1986)
- 5) Illingworth D.R.: Clinical implications of new drugs for lowering plasma cholesterol concentrations. *Drugs* 41, 151-160 (1991)
- 6) Bang H.O. and Dyerberg J.: Plasma lipids and lipoprotein in Greenlandic West Coast Eskimos. *Acta Med. Scand.* 192, 85-94 (1972)
- 7) Dyerberg J., Bang H.O. and Hjorne N.: Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenlandic Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 958-966 (1975)
- 8) Needleman P., Minkes M. and Raz A.: Thromboxanes: Selective biosynthesis and distinct biological properties. *Science* 193, 163-165 (1976)
- 9) Needleman P., Raz A., Minkes M., Ferrendelli J.A. and Sprecher H.: Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 944-948 (1979)

- 10) Dyerberg J., Bang H.O., Stoffersen E., Moncada S. and Vane J.R.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* (ii), 117-119 (1978)
- 11) Dyerberg J., Bang H.O.: Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in eskimos. *Lancet* (ii), 433-435 (1979)
- 12) 溝田雅洋, 甲木由紀夫, 水口 清, 遠藤彰二, 宮田治男, 小島正裕, 兼広秀生, 岡田美智子, 高瀬あつ子, 芹澤公子, 石黒淳三, 福武勝彦: エイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E) の家兎血栓形成抑制作用およびラット末梢壊疽抑制作用. *日薬理誌* 91, 81-89 (1988)
- 13) 溝田雅洋, 甲木由紀夫, 水口 清, 遠藤彰二, 宮田治男, 小島正裕, 兼広秀生, 岡田美智子, 高瀬あつ子, 石黒淳三, 国広靖之, 相澤 登: エイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E) の高コレステロール食飼育家兎における薬理学的研究. *日薬理誌* 91, 255-266 (1988)
- 14) Anistchkow N.: Über die veränderungen der kaninchenaorta bei experimenteller cholesterinsteatose. *Beitr. Path. Anat.* 56, 379-404 (1913)
- 15) 入倉 勉, 岡田孝道: 脂質代謝改善剤のスクリーニング法: 「新薬開発のための薬効スクリーニング法 - 最近の動向と実際 - Volume I」 (清至書院) p83 (1984)
- 16) Shurr P.E., Schults J.R. and Parkinson T.M. : Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hypolipidemic drugs. *Lipids* 7, 68-74 (1972)
- 17) Hevia P., Kari F.W., Ulman E.A. and Visek W.J.: Serum and liver lipids in growing rats fed casein with L-Lysine. *J. Nutr.* 110, 1224-1230 (1980)
- 18) Terpstra A.H.M., Harkes L.H. and van Veen F.H.: The effect of different proportions of casein in semipurified diets on the concentration of serum cholesterol and the lipoprotein composition in rabbits. *Lipid* 16, 114-119 (1981)
- 19) Kroda M., Tazawa K., Tsujita Y. and Endo A. : Mechanism for elevation of hepatic

- cholesterol synthesis and serum cholesterol levels in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. *Biochim. Biophys. Acta* 489, 119-125 (1977)
- 20) Goldfarb S.: Rapid increase in hepatic HMG-CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR-1339 injection. *J. Lipid Res.* 19, 489-494 (1978)
- 21) Endo A., Tsujita Y., Kuroda M. and Tanzawa K.: Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: Lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim. Biophys. Acta* 575, 266-276 (1977)
- 22) Tall A.R. and Small D.M.: Plasma high-density lipoproteins. *N. Engl. J. Med.* 229, 1232-1236 (1978)
- 23) Spady D.K. and Dietschy J.M.: Sterol synthesis in vivo on 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J. Lipid Res.* 24, 303-315 (1983)
- 24) 中村治雄, 板倉弘重, 梶山悟朗, 内藤周幸, 八杉忠男, 山本 章: 抗高脂血症薬の臨床評価方法に関するガイドライン. *医薬品研究* 19, 24-32 (1988)
- 25) Yamori Y., Kitamura Y., Nara Y. and Iritani N. : Mechanism of hypercholesterolemia in arteriolipidosis-prone rats. *Jap. circul. J.* 45, 1068-1073 (1981)
- 26) Iritani N. and Nogi J.: Cholesterol absorption and lymphatic transport in rat. *Atherosclerosis* 15, 231-239 (1972)
- 27) Rodwell V.W., Nordstrom J.L. and Mitschelen J.J.: Regulation of HMG-CoA reductase. *Advance Lipid Res.* 14, 2-26 (1976)
- 28) Edwards P.E. and Gould R.G.: Turnover rate of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase as determined by use of cycloheximide. *J. Biol. Chem.* 247, 1520-1524 (1972)
- 29) Nagata Y., Ishiwaki N. and Sugano M.: Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein type amino acid mixtures in relation

- to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.* 112, 1614-1625 (1982)
- 30) Suckling K.E. and Stange E.F. : Role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 26, 647-672 (1985)
 - 31) Balasubramaniam S., Simons L.A., Chang S., Roach P.D. and Nestel P.J.: On the mechanism by which an ACAT inhibitor (CL277082) influences plasma lipoproteins in rat. *Atherosclerosis* 82, 1-5 (1990)
 - 32) Heider J.G., Pickens C.E. and Kelly L.A.: Role of acyl CoA cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbits. *J. Lipid Res.* 24, 1127-1134 (1983)
 - 33) Rustan A.C., Nossen J. φ., Osmundsen H. and Drevon C.A.: Eicosapentaenoic acid inhibits cholesterol esterification in cultured parenchymal cells and isolated microsomes from rat liver. *J. Biol. Chem.* 263, 8126-8132 (1988)
 - 34) Mitropoulos K.A., Venkatesan S. and Balasubramaniam S. : On the mechanism of regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and of acyl coenzyme A : cholesterol acyl-transferase by dietary fat. *Biochim. Biophys. Acta* 619, 247-257 (1980)
 - 35) Ide T., Okamatsu H. and Sugano M. : Regulation by dietary fats of 3- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in rat liver. *J. Nutr.* 108, 601-612 (1978)
 - 36) Bochenek W. and Rodgers J.B. : Effects of saturated and unsaturated fats given with and without dietary cholesterol on hepatic cholesterol synthesis and hepatic lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 528, 1-16 (1978)
 - 37) Bradley W.A. and Gianturco S.H.: Lipoprotein receptors in cholesterol metabolism. In " *Biology of Cholesterol* " (ed. Yeagle P.L., CRC Press, Inc.), p.95 (1988)
 - 38) Choi Y.S., Goto S., Ikeda I. and Sugano M.: Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on

- cholesterol synthesis and degradation in rats of different ages. *Lipids* 24, 45-50 (1989)
- 39) Field F.J., Albright E.J. and Mathur S.N.: Effect of dietary fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit. *J. Lipid Res.* 28, 50-58 (1987)
- 40) Balasubramaniam S., Simons L.A., Chang S. and Hickie J.B.: Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat. *J. Lipid Res.* 26, 684-689 (1985)
- 41) Chautan M., Chanussot F., Portugal H., Pauli A.M. and Lafont H.: Effects of salmon oil and corn oil on plasma lipid level and hepato-biliary cholesterol metabolism in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1046, 40-45 (1990)
- 42) Smit, M.J., Temmerman A.M., Wolters H., Kuipers F., Beynen A.C. and Vonk R.J.: Dietary fish oil-induced changes in intrahepatic cholesterol transport and bile acid synthesis in rats. *J. Clin. Invest.* 88, 943-951 (1991)
- 43) Gotto A.M.Jr., Pownall H.J. and Havel R.J.: Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 128, 3-41 (1986)
- 44) Havel R.J.: Lipoprotein biosynthesis and metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 348, 16-29 (1980)
- 45) Alaupovic P.: The biochemical and clinical significance of the interrelationship between very low density and high density lipoproteins. *Canad. J. Biochem.* 59, 565-579 (1981)
- 46) Steiner G., Haynes F.J., Yoshino G. and Vranic M.: Hyperinsulinemia and in vivo very-low-density lipoprotein-triglyceride kinetics. *Am. J. Physiol.* 246 (Endocrinol. Metab. 9) E187-E192 (1984)
- 47) Clarke A.R., Luscombe M. and Holbrook J.J.: The effect of the chain length of heparin on its interaction with lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 747, 130-137 (1983)

- 48) Krauss R.M., Windmueller H.G., Levy R.I. and Fredrickson D.S.: Selective measurement of two different triglyceride lipase activities in rat post heparin plasma. *J. Lipid Res.* 14, 286-295 (1973)
- 49) Quarford S.H., Nathans A., Dowdee M. and Hildermann H.L.: Heterogeneity of human very low density lipoproteins by gel filtration chromatography. *J. Lipid Res.* 13, 435-444 (1972)
- 50) Benner K.G., Sasaki A., Gowen D.R., Weaver A. and Connor W.E.: The differential effect of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and VLDL secretion in rabbit hepatocytes. *Lipids* 25, 534-540 (1990)
- 51) Nossen J.O.A., Rustan A.C., Gloppestad S.H., Malbakken S. and Drevon C.A.: Eicosapentaenoic acid inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 879, 56-65 (1986)
- 52) Levy E., Thibault L., Garofalo C., Messier M., Lepage G., Ronco N. and Roy C. C.: Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J. Lipid Res.* 31 2009-2017 (1990)
- 53) Packard C.J., Munro A., Lorimer A.R., Gotto A.M. and Shepherd C.J.: Metabolism of apolipoprotein B in large, triglyceride-rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. *J. Clin. Invest.* 74, 2778-2792 (1984)
- 54) Windler E., Chao Y.S. and Havel R.J.: Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rats. *J. Biol. Chem.* 255, 5475-5480 (1980)
- 55) Windler E., Chao Y.S. and Havel R.J.: Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rats. *J. Biol. Chem.* 255, 8303-8307 (1980)
- 56) Shelburne F., Hanks J., Meyers W. and Quarfordt S.: Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J. Clin. Invest.* 65, 652-658 (1980)

- 57) Ishiguro J., Tada T., Ogihara T., Mizota M., Mizuguchi K., Ohzawa N., Kosuzume H. and Aizawa N.: Metabolism of ethyl eicosapentaenoate (EPA-E) in rats and effect of its metabolites on ellagic acid-induced thrombus formation in the stenosed femoral artery of rabbits. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2158-2167 (1988)
- 58) Berlin E., Judd J.T., Marshall M.W. and Kliman P.G.: Dietary linoleate increases fluidity and influences chemical composition on plasma low density lipoprotein in adult men. *Atherosclerosis* 66, 215-225 (1987)
- 59) Yagasaki K., Okada K., Takagi K. and Irikura T.: Effect of 4-(4'-chlorobenzyloxy) benzyl nicotinate (KCD-232) on cholesterol metabolism in rats fed an amino acid imbalance diet. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1417-1423 (1984)
- 60) 大野文俊, 末広 正, 高松和永, 川田益意, 安岡伸和, 宇賀茂敏, 山野利尚: RPL42T ローターを用いた微量超遠心法による血清リポ蛋白分析法と測定成績. *臨床と研究* 60, 1536-1542 (1983)
- 61) Kuroda M. and Endo A.: Inhibition of in vitro cholesterol synthesis by fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 486, 70-81 (1977)
- 62) Shapiro D.J., Nordstrom J.L., Mitschelen J.J., Rodwell V.W. and Schimke R.T.: Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 369-377 (1974)
- 63) 小沢昭夫, 中村恵以子, 神保裕恵, 藤田孝夫, 平井愛山, 寺野 隆, 浜崎智仁, 田村 泰, 熊谷 朗: 薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いたヒト血漿, 血小板, 赤血球膜の脂質画分の高級脂肪酸の定量法. *分析化学* 32, 174-178 (1983)
- 64) Folch J., Lees M. and Sloan-Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957)

- 65) Hatch F.T. and Lees R.S.: Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* 6, 1-68 (1968)
- 66) Hara I. and Okazaki M.: High-performance liquid chromatography of serum lipoproteins. *Methods Enzymol.* 129, 57-78 (1986)
- 67) Arbeeny C.M. and Rifici V.A.: The uptake of chylomicron remnants and very low density lipoprotein remnants by the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 259, 9662-9666 (1984)
- 68) Gidez L.I., Swaney J.B. and Murnane S.: Analysis of rat serum apolipoproteins by isoelectric focusing. 1. Studies on the middle molecular weight subunits. *J. Lipid Res.* 18, 59-68 (1977)
- 69) Bagdade J.D., Yee E., Albers J. and Pykalisto O.J.: Glucocorticoids and triglyceride transport: Effect on triglyceride secretion rate, lipoprotein lipase and plasma lipoproteins in the rat. *Metabolism* 25, 533-542 (1976)
- 70) Boberg J. and Carlson L.A.: Determination of heparin-induced lipoprotein lipase activity in human plasma. *Clin. Chim. Acta* 10, 420-427 (1964)
- 71) Peterson J., Olivecrona T. and Olivecrona G.B.: Distribution of lipoprotein lipase and hepatic lipase between plasma and tissues: Effect of hypertriglyceridemia. *Biochim. Biophys. Acta* 837, 262-270 (1985)

謝 辞

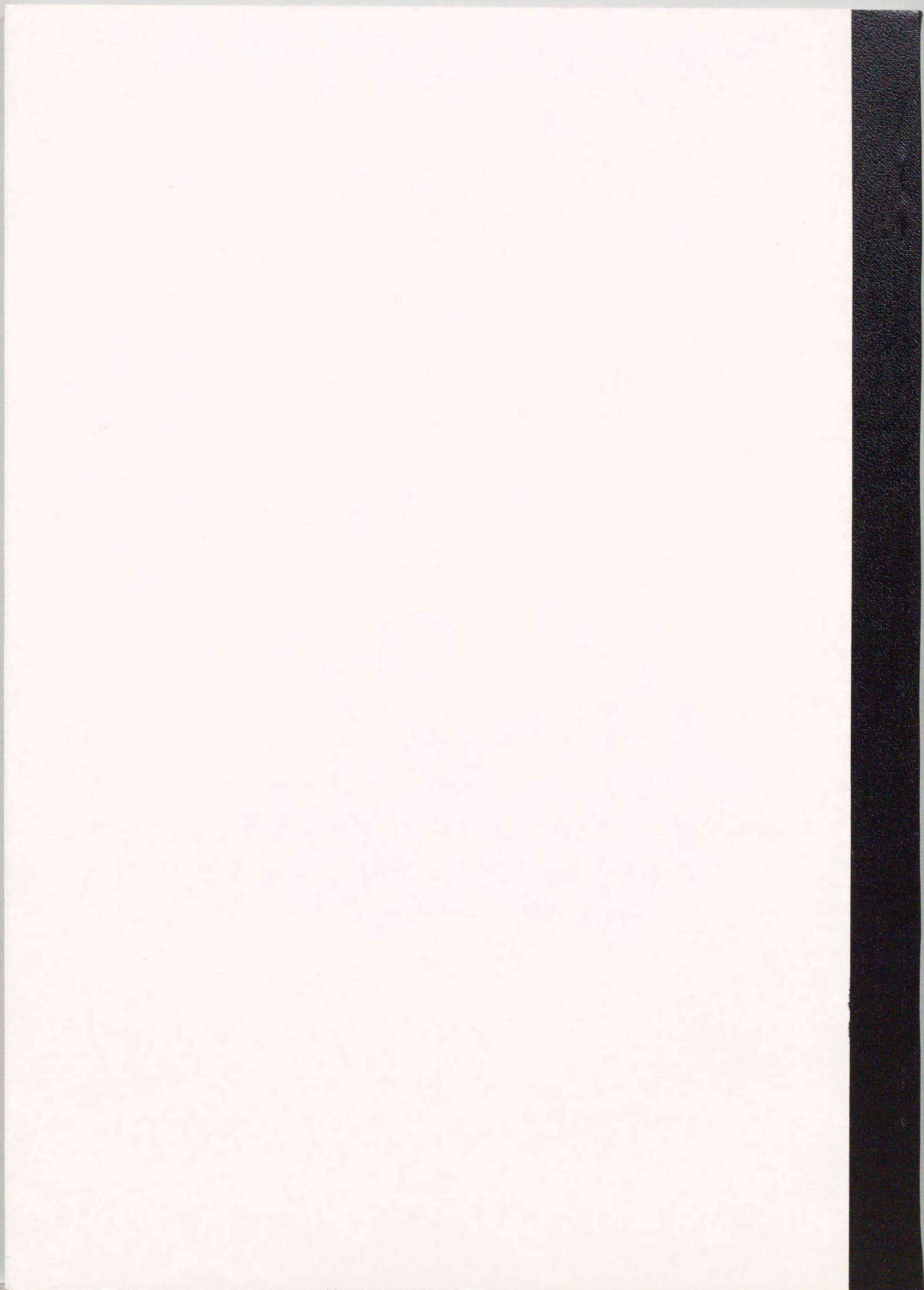
本論文の御校閲を賜わると共に、種々の御便宜をお計らい下さいました恩師 北海道大学薬学部 長澤滋治 教授に深甚なる謝意を表します。

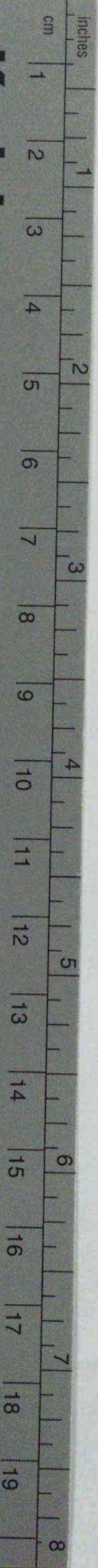
本研究の遂行に際し、終始御指導を賜わり、数々の貴重な御助言を戴きました千葉大学医学部 齋藤 康 博士に深謝致します。

本研究の機会を与えて戴きました持田製薬株式会社 代表取締役会長 持田 英 博士、同 代表取締役社長 渡辺 進 氏、同 代表取締役副社長 相澤 登 博士ならびに 同 常務取締役研究本部長 鈴木泰雄 氏に謹んで感謝の意を表します。

本研究は、持田製薬株式会社富士中央研究所部長 小雀浩司 博士、同 所長 溝田雅洋 博士、同 柳橋和利 博士、持田製薬株式会社研究管理部 稲場 均 博士ならびに持田製薬株式会社医薬研究推進室 山口和夫 博士の御指導のもとに行われたものであり、厚く深謝致します。

また、本研究は、持田製薬株式会社富士中央研究所 矢野 崇 氏、小島正裕 氏、田中靖生 氏、石橋正明 氏、正田篤弘 氏ならびに 同 安全性研究所 佐藤正巳 氏との共同研究であります。各氏の御協力と御支援に心より感謝致します。

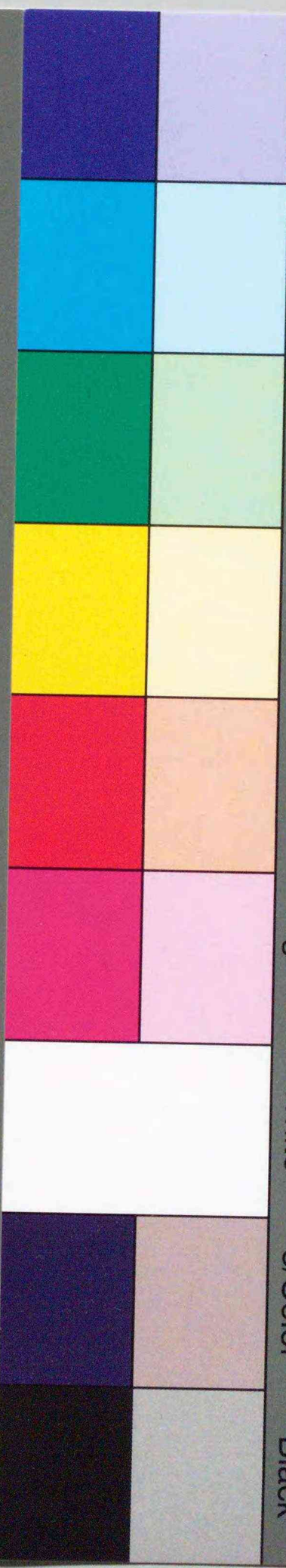




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

