

オグラ マサツネ  
小倉 正恒

共同研究者

岸野 重信  
(京都大学農学研究科 准教授)

## 略 歴

1998年 3月 防衛医科大学校  
医学教育部医学科 卒業  
海上自衛隊医官を経て  
2012年 4月 防衛医科大学校  
リハビリテーション部  
兼抗加齢血管内科 助教  
2013年 10月 国立循環器病研究センター研究所  
病態代謝部 上級研究員  
2016年 5月 同 脂質代謝研究室長  
現在に至る

## 動脈硬化プラークの軽減に有用な脂肪酸とプロバイオティクスの組み合わせ

**【研究背景・目的】** 心血管疾患や脳血管疾患など動脈硬化性疾患は、我が国において悪性新生物と並ぶ主要な死因を占めている。これらの後遺症である心不全や麻痺、歩行障害や認知症は健康寿命の短縮に直結しており、動脈硬化症そのものの発症予防や治療法の確立が喫緊の課題である。動脈硬化症はマクロファージなどの末梢細胞にコレステロールが蓄積し、血管壁にプラークを形成することにより進行する。高密度リポタンパク質 (HDL) はマクロファージからコレステロールを引き抜き、肝臓へと運搬し体外へ排泄する機能 (コレステロール逆転送機能) を持つため、動脈硬化症の治療標的として注目されている。特にマクロファージに発現するコレステロールトランスポーター ATP 結合カセットトランスポーター A1 (ABCA1) を介したアポリポ蛋白 A- (アポ A-I: HDL の主要な担体蛋白) によるコレステロール搬出反応は、コレステロール逆転送機能の最初のステップとして重要である。研究代表者らは現在までに ABCA1 発現増強やコレステロール搬出反応を促進する食品成分について研究を進めてきた。*α*リノレン酸 (ALA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、ドコサペンタエン酸 (DPA) に代表される $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸は、動脈硬化を予防する「体によい」脂質として注目され、 $\omega$ 3脂肪酸の介入試験が多数実施された。しかし、現在までに $\omega$ 3脂肪酸投与の動脈硬化性疾患予防効果については一定の結論が得られておらず、我々はその理由としてヒトの腸内細菌の多様性に伴う代謝産物が個人個人で異なるためと考え、共同研究先の京都大学農学部の先生方が調製した $\omega$ 3脂肪酸代謝物 (乳酸菌等の酵素で代謝したもの) のコレステロール搬出反応をスクリーニングした。その結果、既存の脂肪酸 (ALA、DPA、DHA) はコレステロール搬出反応を抑制したが、それらの代謝物のうち複数の化合物が 40  $\mu$ M の濃度でコレステロール搬出反応を促進することを見出した。このことは腸内細菌叢の違いにより、 $\omega$ 3脂肪酸摂取後の動脈硬化抑制効果には個人差があるかもしれないことを示唆しており、重要な知見と考える。また現在の臨床現場で利用されている血中 EPA/AA 比などのバイオマーカーに代わる新たなマーカーの開発などにもつながる可能性もある。今後はメカニズムの解明や他の代謝物のスクリーニングを進めるとともに、その腸内細菌を用いて調製したプロバイオティクスと $\omega$ 3脂肪酸 (基質) を組み合わせた食品の開発、動脈硬化プラークを退縮させる食べ合わせなどへ研究を進めていきたい。

## 1. 研究背景

超高齢社会に突入したわが国の課題の一つに健康寿命の延伸がある。平均寿命は男性 81.25 歳、女性 87.32 歳（2018 年）である一方、「健康上の問題で日常生活が制限されることがなく生活できる期間」である健康寿命は 2016 年時点で、男性 72.14 歳、女性 74.79 歳であった。10 年前後存在する平均寿命と健康寿命の差は日常生活に制限のある「不健康な期間」を意味し、個人や家族の生活の質（Quality of Life: QOL）の低下とともに医療費や介護給付費などの社会保障費増大を招いている。

心血管疾患や脳血管疾患など動脈硬化を基盤とした疾患は、我が国において悪性新生物と並ぶ主要な死因を占めている。これらの後遺症である心不全や麻痺、歩行障害や認知症は健康寿命の短縮に直結しており、動脈硬化症そのものの発症予防や治療法の確立は喫緊の課題である。

動脈硬化症はマクロファージなどの末梢細胞にコレステロールが蓄積し、血管壁にプラークを形成することにより進行する。高密度リポタンパク質（HDL）はマクロファージからコレステロールを引き抜き、肝臓へと運搬し体外へ排泄する機能（コレステロール逆転送機能）を持つため、動脈硬化症の治療標的として注目されている。特にマクロファージに発現するコレステロールトランスポーター ATP 結合カセットトランスポーター A1（ABCA1）を介したアポリポ蛋白 A-I（アポ A-I: HDL の主要な担体蛋白）によるコレステロール搬出反応は、コレステロール逆転送機能の最初のステップとして重要である。研究代表者らは現在までに ABCA1 発現増強やコレステロール搬出反応を促進する食品成分について研究を進めてきた<sup>1,2,3</sup>。

亜麻仁油やエゴマ油に含まれる $\alpha$ リノレン酸（ALA）、魚油に含まれるエイコサペンタエン酸（EPA）およびドコサヘキサエン酸（DHA）、アザラシ油に多く含まれるドコサペンタエン酸（DPA）に代表される $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸は、動脈硬化を予防する「体によい」脂質として注目されてきた。古くはグリーンランドの先住民族イヌイットに急性心筋梗塞の発症が少ないことが、彼らが習慣的に摂取するアザラシなどに含まれる $\omega$ 3脂肪酸と関係するとして報告されていた<sup>4</sup>。以降、多くの疫学研究が実施され、わが国では Japan Public Health Center-Based Study Cohort I（JPHC）において、40-59歳の一般住民 41,578 名を 11 年間追跡したところ、魚を週に 180g（平均週 8 食、 $\omega$ 3脂肪酸換算で 2.1g 相当）摂取する人は、23g（週に 1 食）しか食べない人に比較して、冠動脈疾患リスクが 37%、心筋梗塞リスクが 56%減少したことが報告された<sup>5</sup>。また、JACC Study（The Japan Collaborative Cohort Study）<sup>6</sup>や NIPPON DATA80<sup>7</sup>でも魚摂取の多い群で心血管死亡率が少ないことが報告された。これらの研究から、 $\omega$ 3脂肪酸摂取による心血管イベント発症予防効果が期待され、 $\omega$ 3脂肪酸の介入試験が多数実施されることとなった。

しかしながら、考察で詳述するように $\omega$ 3脂肪酸投与による心血管イベント抑制効果はメタ解析によると否定的との報告も多い<sup>2</sup>。 $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸はコレステロール逆転送機能活性化に寄与することが in vivo や ex vivo 実験において報告されているが、コレステロール搬出反応についてはむしろ減弱化するとの in vitro 実験結果が報告されている。 $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸の摂取が必ずしも動脈硬化性疾患を予防するという明確なエビデンスが得られていないことや in vivo 実験と in vitro 実験で結果が異なる理由として、我々は $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸が代謝される過程で腸内細菌が何らかの影響を与えている可能性を想定した。すなわち、ヒトや動物の消化管には約 1000 種類 100 兆個もの腸内細菌が存在しており、人種や環境によっても異なる。それに伴い、 $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸の

代謝も異なるため、 $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸そのものではなく、腸内細菌の多様性に伴う代謝産物が個人個人で異なるために上記のような結果が得られたのではないかと仮説を立てた。また $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸と一緒に摂取する食物に含まれる微生物による消化管内での代謝およびその代謝産物の多様性も影響していると仮説を立てた。

## 2. 研究目的

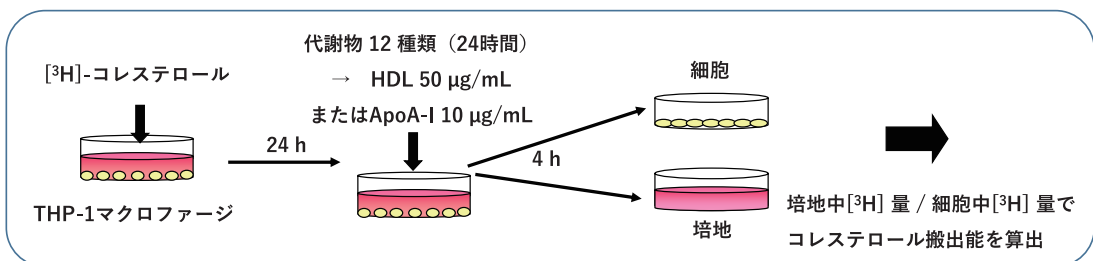
上記研究背景から、アポ A-I を介したコレステロール搬出反応を促進する n-3 系脂肪酸由来代謝物をスクリーニングし、その作用メカニズムを明らかにするとともにコレステロール逆転送系を活性化させ、動脈硬化を予防する機能性食品の開発につながることを最終目的とした。本研究では、 $\omega$ 3系脂肪酸由来代謝物のマクロファージ様細胞からのコレステロール搬出反応および ABCA1 タンパク発現に及ぼす影響について検討することを目的とした。

## 3. 研究方法

$\omega$ 3系脂肪酸由来代謝物は基質である $\omega$ 3脂肪酸 (*α*/ノレン酸、EPA、DPA、DHA) と腸内細菌 (乳酸菌等数種類) 等の酵素の組み合わせを変えて合成された脂質代謝物 (京都大農学部・岸野重信准教授から提供) の中から、コレステロール搬出反応を促進する化合物をスクリーニングした。

コレステロール搬出能の測定は  $^3\text{H}$ -Cholesterol をマクロファージ様細胞に取り込ませたのち、HDL の主要な構成タンパク質であるアポ A-I または HDL を添加することで培地中に搬出された  $^3\text{H}$  および細胞中に残存する  $^3\text{H}$  の放射活性を測定することで行った。実験が適切に実施されているか否かを確認するために positive control として ABCA1 発現を促進することが報告されている LXR アゴニスト T0901317 を用いた。

図1. 実験方法



### <実験方法>

1. ヒト単球由来 THP-1 細胞 (浮遊細胞)  $1 \times 10^6$  個/mL に PMA 200  $\mu\text{M}$  を 72 時間作用させ、THP-1 マクロファージ (接着細胞) に分化させた。
2. THP-1 マクロファージに 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  の  $^3\text{H}$ -cholesterol (Perkin-Elmer) で 24 時間ラベルし、PBS で 2 回 wash 後、代謝物 9 種類を 24 時間作用させた。
3. PBS で 2 回 wash し、アクセプターとして HDL 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  または アポ A-I 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を 4 時間作用させ、培地中および細胞内 (ヘキサン + イソプロパノールで脂質抽出) の  $^3\text{H}$ -cholesterol を液体シンチレーションカウンターでカウントし、搬出能を算出した。

細胞は THP-1 を選択した。THP-1 はヒトの急性単球性白血病患者から得られた単球細胞であり、PMA を用いてマクロファージ様細胞に分化する。THP-1 はヒト由来細胞である点がマウス由来細胞株である RAW264.7 細胞や J774.1 細胞よりも本研究内容に適していると考えた。

$\omega$ 3 系脂肪酸由来代謝物がアポ A-I または HDL を介したコレステロール搬出反応を亢進するのであれば、その機構は 2 つ考えられる。1 つは  $\omega$ 3 系脂肪酸由来代謝物がアポ A-I または HDL 粒子を修飾することで、もう 1 つは、 $\omega$ 3 系脂肪酸由来代謝物がマクロファージの ABCA1 タンパク発現を亢進すること、または細胞膜の脂肪酸組成を変化することで ABCA1 の活性に影響を与え、アポ A-I へのコレステロール搬出を高めることである。今回の研究では、ABCA1 発現増強への直接的な作用または細胞膜の脂肪酸組成の変化に伴う間接的な ABCA1 活性の増強を期待し、 $\omega$ 3 系脂肪酸由来代謝物を予め作用させた細胞にアポ A-I または HDL を添加した際のコレステロール搬出反応を検討した (図 1)。

## 4. 結果

### 1) $\omega$ 3 脂肪酸由来代謝物の調製

表 1 に示す 12 種類の  $\omega$ 3 脂肪酸代謝物が共同研究者である岸野准教授により調製され、当研究所まで送付され、コレステロール搬出能のスクリーニングに用いられた。なお今後の特許申請等の可能性を踏まえて化合物名は「基質 metabolite A, B, C …」すなわち ALA metabolite A、DPA metabolite C などとする。各脂肪酸代謝物の濃度は、基質である DHA などの脂肪酸のヒトにおける血中濃度が数 100 $\mu$ M であることから、それよりも低い 40 $\mu$ M に設定した。

表 1. スクリーニングに用いた  $\omega$ 3 脂肪酸代謝物 12 種類  
(京大 小川順先生、岸野重信先生からご供与)

基質となる脂肪酸	代謝物
$\alpha$ リノレン酸 (ALA)	metabolite A-D: 5 種類
ドコサペンタエン酸 (DPA)	metabolite A-G: 5 種類
ドコサペンタエン酸 (DPA)	metabolite A-G: 2 種類

知財の関係上、腸内細菌名や酵素名、化合物の構造式は省略させていただきます

### 2) ALA 由来代謝物のコレステロール搬出反応に及ぼす影響

結果を図 2 に示す。基質である ALA はアポ A-I および HDL を介したコレステロール搬出反応を抑制する傾向を示したが、5 つの代謝物のうち ALA-A, B, E の 3 種類はアポ A-I を介した搬出反応を、ALA-A, B は HDL を介した搬出反応を促進した。

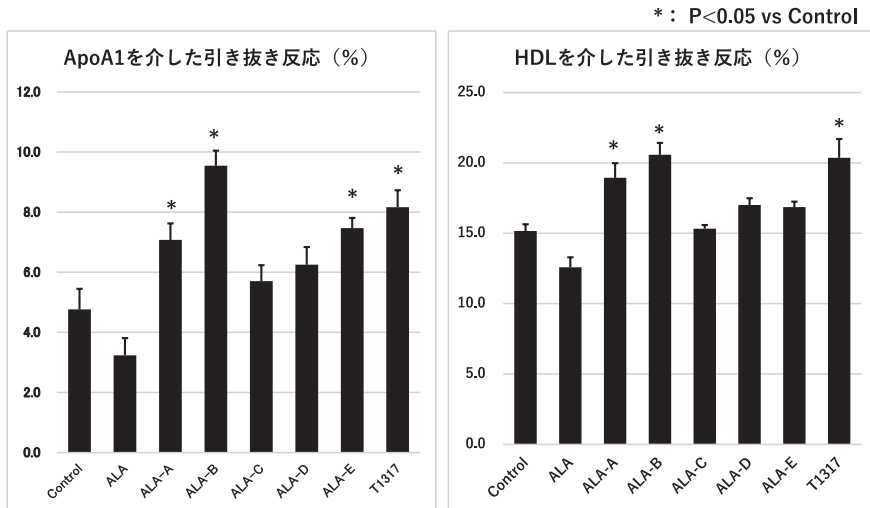
### 3) DPA 由来代謝物のコレステロール搬出反応に及ぼす影響

結果を図 3 に示す。基質である DPA はアポ A-I を介したコレステロール搬出反応を有意に抑制したが、HDL を介するコレステロール搬出反応を変化させなかった。5 つの代謝物のうち DPA-C はアポ A-I を介した搬出反応を促進したが、HDL を介する搬出反応を促進する代謝物は見いだせなかった。

#### 4) DHA由来代謝物のコレステロール搬出反応に及ぼす影響

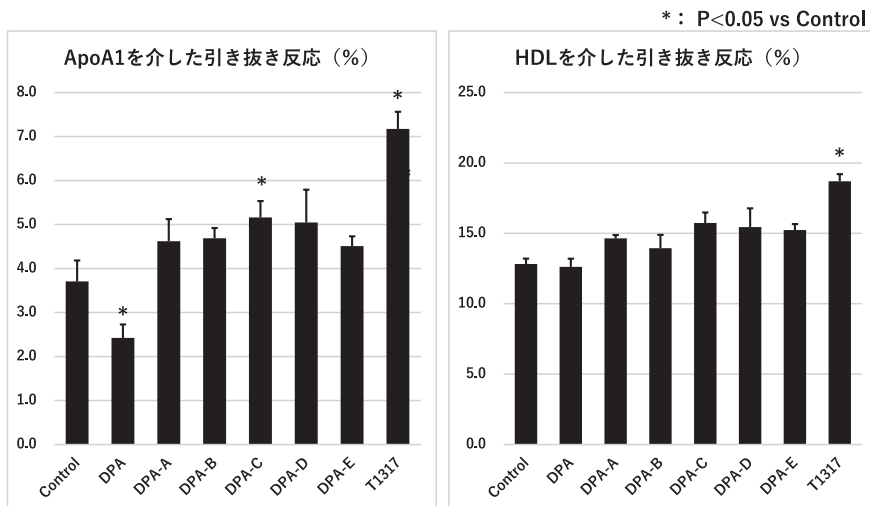
結果を図4に示す。基質であるDPAはアポA-Iを介したコレステロール搬出反応を有意に抑制し、HDLを介するコレステロール搬出反応を濃度依存的に抑制する傾向を示した。2つの代謝物のうちDHA-AはアポA-Iを介した搬出反応を促進したが、HDLを介する搬出反応を促進する代謝物は見いだせなかった。

図2. スクリーニング結果(1): ALAとその代謝物(40 $\mu$ M)



T1317: T0901317 (LXR アゴニスト) → ABCA1 と ABCG1 の発現を促進する positive control  
 基質である ALA は引き抜き反応を減弱する傾向を示すが、その代謝物の多くは引き抜き反応をむしろ促進した。

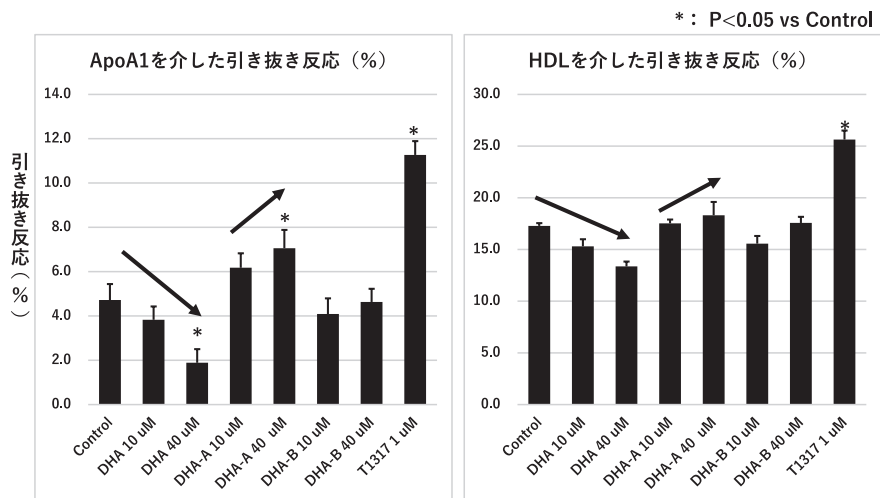
図3. スクリーニング結果(2): DPAとその代謝物(40 $\mu$ M)



T1317: T0901317 (LXR アゴニスト) → ABCA1 と ABCG1 の発現を促進する positive control  
 基質である DPA はアポA-Iを介する引き抜き反応を減弱したが、その代謝物の多くは引き抜き反応を不変もしくは促進した。



図4. スクリーニング結果 (3): DHA-AとDHA-Bの用量依存性



T1317: T0901317 (LXR アゴニスト) → ABCA1とABCG1の発現を促進するpositive control

基質であるDHAは用量依存的にApoA-Iを介した引き抜き反応を減弱するが、その代謝物DHA-Aは用量依存的に引き抜き反応を促進した。

#### 4. 考察

本研究において既存の $\omega$ 3脂肪酸(基質そのもの)ではなく、その代謝物のうち複数においてアポA-IまたはHDLを介したコレステロール搬出反応を促進するものを見出した。一部の代謝物は既存の $\omega$ 3脂肪酸を基質としてある乳酸菌の水和酵素により代謝された脂肪酸代謝物である。本乳酸菌はヒトの小腸下部から大腸にかけて存在する定住型菌で、古くから世界中で発酵乳などに利用されている。したがってこれらの代謝物のABCA1発現増強作用の機序解明などが進めば、例えば本乳酸菌を用いて調製した乳製品(プロバイオティクス)と基質の脂肪酸を組み合わせた食品の開発などは大変魅力的である。

現在までに $\omega$ 3脂肪酸がコレステロール搬出反応を促進するか否かという検討では、我々と同じin vitro実験系においては生体内と同程度の濃度のEPAを投与し細胞膜の脂肪酸の分布をEPAもしくは脂肪酸長が伸長したDPAが増加しアラキドン酸(arachidonic acid, AA)を減らした場合に、むしろABCA1発現を低下し、コレステロール搬出反応を低下させることが報告されている<sup>8</sup>。一方でHDLについては質を改善する可能性がある。神戸大学の研究では、高純度EPAの投与によりHDL粒子内のEPA/arachidonic acid(AA)比が上昇し、HDLによるコレステロール搬出能を改善したと報告されている<sup>9</sup>。我々の研究結果でも基質となるEPAやDPA、DHAの添加濃度を高めた場合にはABCA1を介した搬出反応は低下していたが、その乳酸菌代謝物の中に上記反応を促進するものを見いだせたことは、腸内細菌叢の違いにより、 $\omega$ 3脂肪酸摂取後の動脈硬化抑制効果には個人差があるかもしれないことを示唆しており、重要な知見と考える。

またこれらの所見を臨床医学に応用して考えると、現在用いられている血中のEPA/AA比よりも優れたマーカーの開発につながる可能性もある。 $\omega$ 3系脂肪酸であるEPAと $\omega$ 6系脂肪酸であるAAは炎症作用および血小板凝集作用において対照的な働きをすること、またAAカスケードに関連する

酵素群に対して EPA は AA に対して競合的阻害薬として作用すること、さらに EPA と AA から代謝され生成される脂質メディエーターの炎症や血小板凝集に及ぼす作用も対照的であることから、血中におけるこれらの比、すなわち EPA/AA 比は慢性炎症の程度のマーカーとして有用と考えられ、その数値が高いほど抗炎症的（または炎症収束的）と考えられる。疫学研究から EPA/AA 比が低いほど、ASCVD リスクが増加することが示唆されているし<sup>10,11</sup>、EPA 製剤の内服投与に伴う EPA/AA 比の増加は、経皮的冠動脈インターベンション後の心血管イベント再発リスクを低下させることも報告された<sup>12</sup>。したがって心血管リスクマーカーの一つとして EPA/AA 比を重要視する医師も多い。しかし、真の動脈硬化抑制脂質が EPA そのものではなく例えばその代謝物であった場合には、その代謝物をマーカーにした方が良好だろう。

研究背景でも紹介した通り、 $\omega$ 3 系脂肪酸による心血管イベント発症の抑制効果は否定的との報告も多い。2017 年に発表された 14 のランダム化比較試験を対象にしたメタ解析においては、 $\omega$ 3 系脂肪酸の摂取を増やすことは、確かに心血管死をわずかに減らしたことが示された<sup>13</sup>。しかし、2018 年に発表された 10 個の臨床試験（少なくとも 500 名以上の研究参加者、1 年間以上のフォローアップ期間を満たす試験で合計患者数 77,917 人）を対象にしたメタ解析では  $\omega$ 3 脂肪酸の投与は致死性冠動脈疾患、非致死性冠動脈疾患、脳卒中、その他の血管疾患を含む心血管イベントおよび全死因死亡を予防しないことが示された<sup>14</sup>。同年の Cochrane Library では、79 のランダム化比較試験を対象としたメタ解析の結果、 $\omega$ 3 系脂肪酸の摂取を増やすことは全死因死亡率、心血管死亡率、心血管イベント、冠動脈心疾患死亡率、脳卒中または不整脈をほとんどまたは全く予防しないことが示された<sup>15</sup>。実際、 $\omega$ 3 脂肪酸による心血管イベント抑制効果を疑問視する意見もある<sup>16</sup>。現在までの代表的な介入試験結果を表 2 にまとめた。

表 2. オメガ3脂肪酸の心血管イベント抑制効果は結果が安定しない

試験名	報告年	用量/日	対象	期間(年)	評価項目	アウトカム HR (95% CI)
GISSI-P	1999	850mg EPA+ DHA	亜急性心筋梗塞 (MI)	5	死亡、非致死性 MI + 脳卒中	HR: 0.85 (0.74 - 0.98)
JELIS	2007	1,800mg EPA	高コレステロール血症	4.6	心臓突然死、致死/非致死性 MI、不安定狭心症または再狭窄	HR: 0.81 (0.69 - 0.95)
OMEGA	2010	84 mg EPA+ DHA	亜急性 MI	1	心臓突然死	HR: 0.95 (0.56 - 1.60)
ORIGIN	2012	840mg EPA+ DHA	ASCVD 高リスク	6.2	心血管死亡	HR: 0.98 (0.87 - 1.10)
ASCEND	2018	840mg EPA+ DHA	ASCVD 無の糖尿病	7.4	非致死性 MI + 脳卒中、血管死	HR: 0.97 (0.87 - 1.08)
VITAL	2018	840mg EPA+ DHA	ASCVD 無	5.3	MI、脳卒中、心血管死	HR: 0.97 (0.58 - 1.12)
REDUCE-IT	2019	EPA 4g	ASCVD 二次予防またはハイリスク糖尿病	5	心血管死、非致死性 MI、不安定狭心症または再狭窄	HR: 0.73 (0.65 - 0.81)
STRENGTH	2020?	EPA+DHA カルボキシル酸 4g	ASCVD 二次予防またはハイリスク糖尿病	5	心血管死、非致死性 MI、不安定狭心症または再狭窄	効果不十分で中止
RESPECT - EPA Japan	2022 予定	EPA 1.8g	安定冠動脈疾患の二次予防	5	継続中	継続中
OMEMI Norway	2020 予定	EPA+DHA 1.8g	MI 二次予防	2-4	継続中	継続中

今後の課題としては①さらなる $\omega$ 3脂肪酸代謝物のスクリーニング、② ABCA1 や ABCG1 タンパク質および mRNA の発現検討、③ コレステロール引き抜き反応促進のメカニズム解明、④ヒトにおける $\omega$ 3脂肪酸代謝物の血中濃度測定、⑤その他の脂肪酸（飽和脂肪酸や単価不飽和脂肪酸、 $\omega$ 6脂肪酸）代謝産物のスクリーニングなどが挙げられる。

## 結 論

本研究の結果から、 $\omega$ 3脂肪酸の ASCVD 予防効果の臨床試験結果が一定しない理由として、 $\omega$ 3脂肪酸が代謝される過程で腸内細菌が何らかの影響を与えている可能性が想定される。また $\omega$ 3系脂肪酸と一緒に摂取する食物に含まれる微生物による消化管内での代謝およびその代謝産物の多様性も影響している可能性もある。

我々は京都大学農学研究科の小川順先生、岸野重信先生らとともに $\omega$ 3脂肪酸の腸内細菌等による代謝産物のうち、抗動脈硬化作用を有するものの探索を継続しており、好ましい生理活性を有する脂肪酸代謝産物を見出すことができれば、EPA や DHA と同時に摂取すべき食品やプロバイオティクスなどの新しい食習慣の提案などが可能になると考えている。

## 謝 辞

本研究をご支援賜りました公益財団法人 アサヒグループ学術振興財団と選考委員の先生方、関係者の皆様に深謝申し上げます。

1. Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, et al. Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circ Res.*106(4):779-787.
2. Uto-Kondo H, Ayaori M, Nakaya K, et al. Citrulline increases cholesterol efflux from macrophages in vitro and ex vivo via ATP-binding cassette transporters. *J Clin Biochem Nutr.*55(1):32-39.
3. Hirata H, Uto-Kondo H, Ogura M, et al. Xanthohumol, a hop-derived prenylated flavonoid, promotes macrophage reverse cholesterol transport. *J Nutr Biochem.* 2017;47:29-34.
4. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet.* 1978;2(8081):117-119.
5. Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, et al. Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation.* 2006;113(2):195-202.
6. Yamagishi K, Iso H, Date C, et al. Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(12):988-996.



7. Miyagawa N, Miura K, Okuda N, et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids intake and cardiovascular disease mortality risk in Japanese: a 24-year follow-up of NIPPON DATA80. *Atherosclerosis*. 2014;232(2):384-389.
8. Fournier N, Tardivel S, Benoist JF, et al. Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(4):331-341.
9. Tanaka N, Ishida T, Nagao M, et al. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):577-583.
10. Ninomiya T, Nagata M, Hata J, et al. Association between ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid and risk of cardiovascular disease: the Hisayama Study. *Atherosclerosis*. 2013;231(2):261-267.
11. Nelson JR, Raskin S. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease. *Postgrad Med*. 2019;131(4):268-277.
12. Domei T, Yokoi H, Kuramitsu S, et al. Ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids and the incidence of major adverse cardiac events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circ J*. 2012;76(2):423-429.
13. Maki KC, Palacios OM, Bell M, Toth PP. Use of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and risk for cardiac death: An updated meta-analysis and review of research gaps. *J Clin Lipidol*. 2017;11(5):1152-1160 e1152.
14. Aung T, Halsey J, Kromhout D, et al. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals. *JAMA Cardiol*. 2018;3(3):225-234.
15. Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS, et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;11:CD003177.
16. Jia X, Kohli P, Virani SS. Omega-3 Fatty Acid and Cardiovascular Outcomes: Insights From Recent Clinical Trials. *Curr Atheroscler Rep*. 2019;21(1):1.