



950号 抜刷

昭和女子大学
令和元年12月

〔研究ノート〕

グリーンナッツオイルの摂取は マウスの DHA および EPA を増加させるか

竹山恵美子・大岩倫子・白川亜紗美・内藤水貴・
見月桂子・矢嶋沙記・福島正子

Does Green Nut Oil Intake Increase DHA and EPA in Mice?

Emiko TAKEYAMA, Michiko OIWA, Asami SHIRAKAWA, Mizuki NAITO,
Keiko MITSUKI, Saki YAJIMA and Masako FUKUSHIMA

In general, it has been recognized that n-3 fatty acids have the effect of suppressing inflammation and deterioration of cognitive ability. In addition, it is reported that α -linolenic acid is partially converted into DHA and EPA in the human body. On the other hand, like linseed oil and perilla oil, green nut oil (GNO) is rich in α -linolenic acid, one of the n-3 fatty acids, but not enough research on green nut oil has been done yet.

Therefore, using mice, we investigated the effects of green nut oil intake on fatty acid composition in the liver, erythrocyte membrane, and brain. The result suggested that α -linolenic acid in green nut oil increases DHA and EPA in the bodies of mice. While mice that ingested corn oil (as a contrast) showed a slight decrease in brain DHA in 20-week-old mice as compared with 8-week-old mice, mice that ingested green nut oil showed no significant difference between 8 and 20-week-olds.

Key words: green nut oil (グリーンナッツオイル), fatty acid (脂肪酸), DHA (ドコサヘキサエン酸), EPA (エイコサペンタエン酸)

I. 緒 言

グリーンナッツ (*Plukenetia volubilis* L.) は、ペルーのアマゾン熱帯雨林に分布するトウダイグサ科の蔓性常緑植物の種実で、完熟したものをコールドプレス法で搾油したものがグリーンナッツオイル (GNO) である¹⁾。グリーンナッツオイルは α -リノレン酸を約 47%、リノール酸を約 37% 含む。

α -リノレン酸は一部が、生体内で EPA や DHA に変換され、DHA の代謝物は炎症作用を抑制することが認められている²⁻⁴⁾。したがってグリーンナッツオイルは炎症性疾患のひとつである認知症の抑制にも効果があると考えられる⁵⁻⁸⁾。脳における DHA は、脳の生体膜の流動性を左右するとともに、

情報伝達関連の酵素たんぱく質の遺伝子発現を調節することで、記憶や学習および認知機能の改善に寄与すると考えられている^{2, 9-11)}。さらに、脳内 DHA は、認知症の原因のひとつとして知られる A β (アミロイド β) の沈着を防ぐ可能性が認められている^{9, 12, 13)}。

一方 Gamoh ら^{14, 15)} は若齢ラットに比べて、高齢ラットの大脳皮質や海馬における α -リノレン酸や EPA, DHA 量が低値を示したと報告している。さらに、Cha ら¹⁶⁾ はラット脳のリン脂質を構成する脂肪酸は食餌の内容に影響されることを認めている。しかし、グリーンナッツオイルの α -リノレン酸については十分な研究がなされていない。

そこで今回は、グリーンナッツオイル摂取がマウ

スの肝臓および赤血球膜と脳の脂肪酸組成に及ぼす影響について調べた。さらに、飼育期間がマウスの脳内 DHA 量に及ぼす影響について調べた。

II. 実験方法

1. 実験動物および飼育方法

(1) 実験動物

実験には日本チャールス・リバー (株) より購入した 8 週齢 (以下, 8w 群) と 20 週齢 (以下, 20w 群) の雄性 ICR マウスを用いた。

(2) 飼料

飼料は、1 週間の予備飼育では、日本チャールス・リバー (株) 製の固形飼料 CRF-1 を用いた。その後の飼育では、AIN-93G 大豆油抜き (オリエンタル酵母工業 (株)) を基本に用い、大豆油の代わりにグリーンナッツオイル (NPO 法人アルコイリス製) またはコーンオイル (CO) (オリエンタル酵母工業株式会社製) を各々 7.0% 添加した (Table 1)。 α -リノレン酸含量の多いグリーンナッツオイルとの比較のため、 α -リノレン酸含量の少ないコーンオイルを対照として使用した。そこに全体の約 40% 量の水を加えて、1 つ約 20 g の団子状にしたものを -20°C で冷凍保存し随時解凍して与えた。

(3) 飼育方法

マウスは、温度 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明暗サイクル 12 時

間 (明期: 7 時~19 時) の条件下で、1 ケージにつき 1 匹を飼育した。飲料水には水道水を用い、飼料とともに自由摂取とした。1 週間予備飼育後、それぞれ GNO 投与群 (GNO 群) と CO 投与群 (CO 群) に分け、6 週間飼育した。

(4) 解剖

それぞれのマウスは飼育最終日に 14 時間絶食し、2 時間絶水したのち、体重測定後イソフルランで麻酔し、断頭後解剖した。血液は、採取後直ちに赤血球膜を抽出し脂肪酸組成の分析に供した。なお、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、白色脂肪細胞は摘出後、分析するまで -80°C で保存した。

総脂質を抽出した後、前報の手順¹⁾に準じてナトリウムメチラート法の変法によりメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー (GC) により分析した。

なお、本研究は昭和女子大学動物実験委員会 (2013 年度) の承認を受け、「昭和女子大学動物実験委員会規定」を遵守し行った。

2. 統計処理

飼料期間の平均値の差の検定は、Two-way ANOVA に基づいて行った。飼料と群分けの交互作用が有意でない場合には、飼料の主効果の有意性を示し、有意な場合には、Bonferroni の方法により週齢群ごとに平均値の差の有意性を示した。

Table 1 Composition of the feed for this rearing

component (%)	GNO group	CO group
Casein	20.0	20.0
L-cystine	0.3	0.3
Cornstarch	39.7	39.7
α -Cornstarch	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0
AIN-93 mineral mix	3.5	3.5
AIN-93 vitamin mix	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.25	0.25
3-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014
Green nut oil	7.0	—
Corn oil	—	7.0
total	100	100

GNO; Green nut oil, CO; Corn oil

Ⅲ. 結果および考察

グリーンナッツオイルとコーンオイルの脂肪酸組成を Table 2 に示した。グリーンナッツオイルには α -リノレン酸とリノール酸, コーンオイルにはリノール酸とオレイン酸が最も多く含まれている。また, グリーンナッツオイルの α -リノレン酸はコーンオイルの約 22 倍含まれていた。

マウスの 8w 群および 20w 群の体重および摂食量は, GNO 群と CO 群の間で有意な差は認められなかった。

8w 群と 20w 群のマウスの肝臓, 赤血球膜および脳における脂肪酸組成を Table 3~5 に示した。肝臓および赤血球膜では, リノール酸, EPA, n-3 系 DPA および n-3 系脂肪酸の総量, 肝臓ではさらに α -リノレン酸で, 8w, 20w とともに CO 群に比べて GNO 群の方が有意に高い値を示した。また, いずれもアラキドン酸, n-6 系 DPA および n-6 系脂肪酸の総量は, GNO 群よりも CO 群の方が有意に高い値を示した。さらに, 肝臓の DHA と脳内のリノール酸は CO 群より GNO 群の方が有意に高値を示した。

グリーンナッツオイルおよびコーンオイルにはほとんど含まれていない EPA や DHA が, 8w 群マウスの肝臓・赤血球膜において, GNO 群の方が CO 群より高値を示したことから, グリーンナッツオイルの α -リノレン酸が体内で EPA や DHA に変換されたと推察される。

一方, リノール酸は GNO より CO に多く含まれるが, 赤血球膜のリノール酸量は GNO 群より CO 群の方が低値を示した。さらに, アラキドン酸量は GNO 群より CO 群の方が高くなっており, CO のリノール酸が GNO より多くアラキドン酸に変換さ

れたものと考えられた。Carola ら¹⁸⁾はリノール酸の摂取量が多くなると, リノール酸からアラキドン酸への変換が高まると報告している。今回の実験からも, 同様の傾向が認められた。 Δ -6-desaturase はリノール酸と α -リノレン酸を代謝する過程において競合的に作用すると考えられることから, α -リノレン酸を約 47%, リノール酸約 37% を含む GNO 群では, α -リノレン酸を約 2%, リノール酸を約 55% 含む CO 群に比べてアラキドン酸への代謝が抑制されたと推察される。その結果, GNO 群のマウスが赤血球膜において CO 群のマウスより多くのリノール酸が残存したと考えられる^{10, 18, 19)}。

EPA や DHA は代謝の過程でレゾルビンやプロテクチンを生成し, アラキドン酸カスケードを経て作られる炎症性のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) やロイコトリエン B₄ (LTB₄) などの働きを抑制すると考えられている²⁻⁴⁾。このことからグリーンナッツオイルはリノール酸の代謝を一部抑制するとともに, α -リノレン酸から EPA や DHA を生成することでその誘導物質であるレゾルビンやプロテクチンの生成量を増加させ, 認知症などの炎症性疾患の抑制に効果をもたらす可能性が期待される。

一方, 8w 群マウスの脳におけるアラキドン酸および DHA 量は GNO 群と CO 群を比較したとき肝臓や赤血球膜程には大きな差は認められなかった。それに対してリノール酸は GNO 群の脳において 8w 群より 20w 群の方が有意に低値を示した。CO 群においては 8w と 20w の間に有意な差は認められなかった。全脳中の DHA 量は, CO 群の場合 8w 群より, 20w 群でわずかに低い値を示したが, GNO 群では 8w と 20w ではほとんど差が認められなかった。

Table 2 Main fatty acid composition of Green nut oil and Corn oil

fatty acid composition (%)	Green nut oil	Corn oil
Palmitic acid	3.58	9.71
Stearic acid	3.10	2.17
Oleic acid	8.85	30.7
Linoleic acid	37.0	55.3
α -Linolenic acid	47.4	2.11

Table 3 Fatty acid composition in liver of mice of different groups

	8w GNO group	20w GNO group	8w CO group	20w CO group
Myristic acid	- ^b	-	- ^b	-
Palmitic acid	17.58	17.45	20.44	19.32
Palmitoleic acid	0.74	0.85	0.91	0.65
Stearic acid	15.43	15.53	14.25	14.35
Oleic acid	6.37 ^b	6.27	8.31 ^b	7.41
Linoleic acid	26.69 ^a	26.17 ^c	18.05 ^a	17.50 ^c
γ -linolenic acid	0.21	2.31	2.35	0.29
α -linolenic acid	4.64	3.48	-	-
Eicosenoic acid	-	-	-	-
Homo- γ -linolenic acid	1.49	1.49	0.90	1.14
Arachidonic acid	10.16 ^a	10.45 ^c	23.59 ^a	25.20 ^c
ETE	-	-	-	-
EPA	4.44 ^a	6.84 ^c	- ^a	- ^c
DTA	-	-	1.40	-
DPA (n-6)	- ^a	- ^g	2.95 ^a	1.17 ^g
DPA (n-3)	1.11 ^a	1.27	- ^a	-
DHA	12.46 ^a	11.65 ^c	9.68 ^a	9.25 ^c
n-3 total	22.43 ^a	22.04 ^c	9.68 ^a	9.25 ^c
n-6 total	37.96 ^a	38.61 ^c	47.58 ^a	45.30 ^c

8w; 8-week-old, 20w; 20-week-old, GNO; Green nut oil, CO; Corn oil. Data are mean \pm SD (n=6). Significant difference: ^ap<0.01, ^bp<0.05 compared with 8w GNO group or 8w CO group, ^cp<0.01, ^dp<0.05 compared with 8w CO group or 20w CO group. Significant differences were determined by two-way ANOVA and Bonferroni test.

Table 4 Fatty acid composition in erythrocyte membrane of mice of different groups

	8w GNO group	20w GNO group	8w CO group	20w CO group
Myristic acid	-	-	0.30	0.04
Palmitic acid	35.31	35.54	32.87	34.22
Palmitoleic acid	0.15	0.39	1.20	0.12
Stearic acid	14.01	13.40	11.80	12.27
Oleic acid	14.28	13.79	14.68	15.79
Linoleic acid	20.12 ^a	20.65 ^c	15.26 ^a	14.90 ^c
γ -linolenic acid	2.48	2.31	0.06	0.03
α -linolenic acid	1.60	0.41	0.26	-
Eicosenoic acid	0.07	0.07	0.12	0.05
Homo- γ -linolenic acid	1.24	1.11	1.64	1.78
Arachidonic acid	7.27 ^a	6.24 ^c	19.80 ^a	18.36 ^c
ETE	-	-	-	-
EPA	3.03 ^b	3.52 ^c	0.08 ^b	- ^c
DTA	0.06 ^a	0.13 ^d	1.54 ^a	1.96 ^d
DPA (n-6)	- ^a	- ^d	2.02 ^a	1.63 ^d
DPA (n-3)	2.67 ^a	2.51 ^c	- ^a	- ^c
DHA	6.49 ^b	5.83 ^d	3.06 ^b	3.81 ^d
n-3 total	10.45 ^a	11.27 ^c	2.90 ^a	3.17 ^c
n-6 total	28.68	28.34	38.57	*36.87

8w; 8-week-old, 20w; 20-week-old, GNO; Green nut oil, CO; Corn oil. Data are mean \pm SD (n=6). Significant difference: ^ap<0.01, ^bp<0.05 compared with 8w GNO group or 8w CO group, ^cp<0.01, ^dp<0.05 compared with 20w GNO group or 20w CO group. Significant differences were determined by two-way ANOVA and Bonferroni test.

Table 5 Fatty acid composition in brain of mice of different groups

	8w GNO group	20w GNO group	8w CO group	20w CO group
Myristic acid	-	-	-	-
Palmitic acid	21.98	21.53	21.84	22.57
Palmitoleic acid	0.71	0.61	0.58	0.54
Stearic acid	23.23	22.70	23.25	23.33
Oleic acid	19.34	20.64	18.12	18.81
Linoleic acid	1.60 ^{a,e}	1.15 ^e	1.02 ^a	1.11
γ -linolenic acid	-	-	-	-
α -linolenic acid	0.60	-	-	-
Eicosenoic acid	3.01	2.72	2.81	2.73
Homo- γ -linolenic acid	0.86 ^b	0.94 ^c	0.59 ^b	0.55 ^c
Arachidonic acid	9.24 ^a	9.61 ^d	10.81 ^a	10.70 ^d
ETE	-	-	-	-
EPA	-	-	-	-
DTA	2.74 ^a	2.74 ^c	3.67 ^a	3.78 ^c
DPA (n-6)	- ^a	- ^c	0.73 ^a	0.62 ^c
DPA (n-3)	0.41 ^e	0.55 ^{c,e}	-	- ^c
DHA	17.12	17.22	17.38	15.64
n-3 total	17.53	17.66	17.38	15.64
n-6 total	14.44 ^a	14.45 ^c	16.82 ^a	16.63 ^c

8w; 8-week-old, 20w; 20-week-old, GNO; Green nut oil, CO; Corn oil. Data are mean \pm SD (n=6). Significant difference: ^ap<0.01, ^bp<0.05 compared with 8w GNO group or 8w CO group, ^cp<0.01, ^dp<0.05 compared with 20w GNO group or 20w CO group, ^ep<0.01 compared with 8w GNO group or 20w GNO group. Significant differences were determined by two-way ANOVA and Bonferroni test.

Gamohら^{14,15)}は、大脳皮質や海馬における α -リノレン酸やEPA, DHA量は、若齢ラットよりも老齢ラットの方が低値を示したと報告しており、加齢が脳内DHA量に負の影響を及ぼす可能性を示唆している。これらのことから、加齢によって減少する傾向にある脳内DHA量をGNOは α -リノレン酸から誘導されるDHAで補う可能性が示唆された。

ただ、マウスの飼育期間が20wと短期間であったため、今後さらに長期間の実験を行い、加齢による影響について詳細に検討する。

References

- 1) Emiko Takeyama, Masako Fukushima: Physicochemical properties *Plukenetia volubilis* L. seeds and oxidative stability of cold-pressed oil (Green Nut Oil). *Food Sci. Technol. Res.*, **19**(5), 875-882 (2013).
- 2) Teruo Miyazawa, Teruyoshi Yanagita, Kenshiro

Fujimoto: Lipid nourishment and health, (Kenpakusha, Tokyo), pp. 217-237 (2005).

- 3) Gerd Schmitz, Josef Ecker: The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, **47**(2), 147-155 (2008).
- 4) Gerard Bannenberg, Charles N. Serhan: Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1801**(12), 1260-1273 (2010).
- 5) Takahide Nagase: Topics of asthma-related mediators. *J. Jpn. So. Intern. Med.*, **98**(12), 3013-3018 (2009).
- 6) Hisao Satake: AA, EPA, DHA-Polyunsaturated fatty acid, (Kouseishakouseikaku, Tokyo), pp. 171-185 (1995).
- 7) Manabu Sakakibara: Effects of PUFA, especially arachidonic acid on the aged brain function and it's mechanisms. *Oleoscience*, **12**(7), 273-282 (2012).
- 8) Harumi Okuyama, Tomohito Hamazaki: Is arachidonic acid supplementation necessary for

- elderly people?. *J. Lipid Nutr.*, **22**(1), 25-34 (2013).
- 9) Michio Hashimoto: Improvement effect of docosahexaenoic acid on neurological function and its application to neurological disorders. *Oleoscience*, **6**(2), 67-76 (2006).
- 10) Kenji Hara: Biochemistry and application of EPA and DHA: Bioactive lipid, (Saiwaishobo, Tokyo), pp. 139-147 (1996).
- 11) Yuichi Takakuwa: Structure and function of biomembrane. *MEMBRANE*, **20**(2), 92-102 (1995).
- 12) Gulnaz Begum, Hong Q Yan, Liaoliao Li, Amneet Singh, C Edward Dixon, Dandan Sun: Docosahexaenoic acid reduces ER stress and abnormal protein accumulation and improves neuronal function following traumatic brain injury. *J. Neurosci.*, **34**(10), 3743-3755 (2014).
- 13) Mieko Otsuka: Dietary nutritional factors and Alzheimer's disease. *J. Juntendo Med.*, **47**(1), 36-44 (2001).
- 14) Shuji Gamoh, Michio Hashimoto, Kozo Sugioka, Shahdat Hossain, Noriaki Hata, Yoshihisa Misawa, Sumio Masumura: Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *J. Neurosci.*, **93**(1), 237-241 (1999).
- 15) Shuji Gamoh, Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Sumio Masumura: Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **28**(4), 266-270 (2001).
- 16) Jae-Young Cha, Young-Su Cho, Teruyoshi Yanagida: Effects of α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on brain phospholipid metabolism in rats. *Bull. Fac. Agr.*, **83**, 49-58 (1998).
- 17) Teruo Miyazawa, Tairou Fujino: Introduction to lipid/oxidized lipid analysis method, (Academic Press Center), pp. 44-45 (2003).
- 18) Carola I. F. Janssen, Amanda J. Kiliaan: Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog. Lipid Res.*, **53**, 1-17 (2014).
- 19) Makoto Arita: Fatty acid balance and the regulation of inflammation. *J. JSPEN*, **28**(4), (2013).

(たけやま みえこ 管理栄養学科)
 (おおいわ みちこ 管理栄養学科)
 (しらかわ あさみ 平成 26 年度健康デザイン学科
 卒業生)
 (ないとう みずき 平成 26 年度健康デザイン学科
 卒業生)
 (みつぎ けいこ 平成 26 年度健康デザイン学科
 卒業生)
 (やじま さき 平成 26 年度管理栄養学科卒業生)
 (ふくしま まさこ 女性健康科学研究所)