共役リノール酸単独または他の脂肪酸との混合投与による皮膚特性の修飾

九州大学大学院農学研究院
古瀬　充宏

The effects of conjugated linoleic acid (CLA), γ-linolenic acid (GLA) and linoleic acid (LA), and their combinations, on skin properties were investigated in mice. Mice (8-week-old) were orally administrated with either LA, GLA, CLA, LA + GLA, LA + CLA, or CLA + GLA for 4 weeks. Then, the skin was analyzed for triacylglycerol content, fatty acid composition, and collagen content. Additionally, thicknesses of the dermis layer and subcutaneous tissue layer, and the size and number of adipocytes were measured histologically. The skin fatty acid composition was modified depending upon the fatty acid composition of supplemented oils. In each oil-alone group, skin triacylglycerol content was the highest in LA, followed by GLA and CLA. Combinations with CLA reduced triacylglycerol content comparable to the level of CLA alone. No significant changes in collagen content were observed among any treatments. The results for the thickness of subcutaneous tissue were similar to the results obtained in triacylglycerol contents, while no significant difference was detected in the thickness of the dermis layers. The numbers of adipocytes were also reduced by CLA. These results suggest that supplementation with CLA alone or in combination with other fatty acids has an anti-obesity effect on skin properties in mice.

1　緒言

細菌や紫外線などの外部環境から生命を保護するために皮膚は重要な役割を果たしている[3]。表皮、真皮および皮下組織の３層に皮膚は分けられるが、真皮は皮膚の弾力性や柔軟性に関わり、皮下組織は脂肪細胞として脂質を蓄積する。その皮膚の機能と魅力さは栄養状態によって大きく変化を受ける。例えば、摂取した脂肪酸は皮膚特性に影響を及ぼす[3]。長鎖 n-6 系および n-3 系不飽和脂肪酸は必須脂肪酸であり、伸長反応や不飽和化を受け代謝される。n-6 系不飽和脂肪酸において、リノール酸（LA）は、γ-リノレン酸（GLA）、ジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）、プロスタグランジン E_1（PGE_1）やアラキドン酸（AA）へと代謝される。プロスタグランジン E_2（PGE_2）やロイコトリエン B_4（LTB_4）などの AA 由来のエイコサノイドは、皮膚において炎症やアレルギーを引き起こすことが報告されている[10, 12]。また、LA 欠乏によって、ラットで皮膚の角質化が観察された[25]。この事実は、LA が皮膚の健康維持における重要な因子の一つであることを示唆する。一方、LA は皮膚に豊富に存在するが[21]、過剰な LA の摂取は皮膚を含む様々な器官で炎症やアレルギー反応の原因となる[7, 9]。

マツヨイグサ油、クロスグリ油とボラージ油には、GLA が豊富に含まれるが、これら植物油の補給で消炎や免疫調節性効果が報告されている[6, 30]。PGE_1 または 15-ヒドロキシエイコサトリエン酸（15-HETrE）は、シクロオキシゲナーゼまたは 15-リポキシゲナーゼで DGLA から産生され、生理活性脂質として作用するロイコトリエンを阻害する[31]。

共役リノール酸（CLA）は、LA の構造および幾何異性体の総称であって、主に反芻動物から作り出される食品材料に含まれる。CLA は、精巣上体と腸間膜の白色脂肪組織重量と皮下の組織の脂肪細胞を減少させることが報告された[19, 21, 28]。CLA は n-6 系不飽和脂肪酸における LA から GLA への代謝を阻害する[4]。結果としていくつかの組織において AA と PGE_2 の水準は減少する[1]。さらに、CLA は癌細胞の成長を阻害し、肝臓と脂肪組織においてアポトーシスを誘発することも知られている[1]。

加えて、摂取した CLA は皮膚に容易に移行[21]し、アレルギー性そう痒症に影響を及ぼすことが報告[11]された。これらの点から、CLA は皮膚性状に有益であると理解される。しかし、CLA はマウスにおいて肝臓の重量を増加させることが報告されていた[18, 28]。その後、Nakanishi *et al.*[18] は CLA と GLA の組合せが CLA によって誘発される脂肪肝を予防すると報告した。これらの事実は、CLA によって修飾される皮膚性状が他の脂肪酸との相互作用により影響を受ける可能性を示唆する。

本研究の目的は、マウスの皮膚性状における CLA, GLA あるいは LA 単独の効果とそれぞれの組合せによる効果を調査することである。

Modification of skin properties by CLA alone or with combination of other fatty acids

Mitsuhiro Furuse

Faculty of Agriculture, Kyushu University

2　実験

2．1　動物

雄マウス（8週齢、Sea:ddY 系統、セアック吉冨、福岡県より購入）は 24℃、12 時間照明条件で個別飼育し、市販飼料（MF、オリエンタル酵母、東京）と水を自由摂取させた。マウスは体重によって 5 匹ずつで 6 つのグループに分けた。LA、GLA および CLA 単独投与区はそれぞれの油脂を毎日 250μℓ ずつ 4 週間経口投与した。組み合わせ投与区（LA + GLA、LA + CLA ならびに CLA + GLA 区）は各油脂をそれぞれ 250μℓ ずつ（計 500μℓ ずつ）を毎日 4 週間経口投与した。LA 区を対照区とし、71.8% LA を含む紅花油（リノール油脂、名古屋）を与えた。GLA 区は 95.0% GLA（出光テクノファイン、東京）を、CLA 区は 70.8% CLA（リノール油脂、名古屋）を含む油脂を用いた。CLA の内訳は、9c, 11t-CLA が 32.4%、10t, 12c-CLA が 33.2% であった。これらの油脂の脂肪酸組成を表 1 に示す。

2．2　皮膚組織の採集

実験終了時にジエチルエーテル麻酔によりマウスを屠殺し、毛と共に全皮膚を剥がした。皮膚シート（1 ㎝ ×1 ㎝）を組織学検討のために背側から切り取った。残りの皮膚の半分はコラーゲン分析のために、他の半分は脂肪酸組成測定のために用いた。重量測定後、皮膚は分析まで－80℃で保存した。

2．3　コラーゲン含量の測定

皮膚サンプルは、10mL の 0.15M NaCl 溶液中で 1 時間超音波破砕を行った。その後、20mL の 6 N HCl を加え、懸濁液を 20℃で 24 時間加水分解した後、120℃で 10 時間保った。加水分解したサンプルは、フィルター後、蒸留水で 100mL に定容した。サンプル（1 mL）は蒸発乾固後、蒸留水で希釈した。サンプル 0.2mL とイソプロパノール 0.4mL を混ぜ、そして 0.2mL のオキシダント溶液（75% wt/vol のクロラミン T と酢酸塩 / クエン酸塩バッファー（pH 6.0）を 3 ： 1 の比率で混合したもの）を混合した。室温で 4 分間保った後に 2.6mL のエールリッヒ試薬溶液を加え、60℃で 25 分間培養した。冷却後、6.6mL のイソプロパノールで希釈した。サンプル溶液の中のヒドロキシプロリン濃度は、分光光度計で 560nm の波長で測定した [2]。

表 1　試験油脂の組成（脂肪酸の%）

	LA	GLA	CLA
C16:0	6.5	-	6.6
C18:0	2.5	-	2.4
C18:1	17.1	-	16.6
C18:2 (n-6)	71.8	-	1.5
CLA	-	-	70.8
9c, 11t-	-	-	32.4
10t, 12c-	-	-	33.2
c, c-	-	-	2.3
t, t-	-	-	2.9
C18:3 (n-6)	-	95.0	-
他	2.1	5.0	2.1

略語: LA, リノール酸; CLA, 共役リノール酸; GLA, γ-リノレン酸。

2．4　トリアシルグリセロール含量および脂肪酸組成の測定

皮膚の総脂質は Folch の変法で抽出した [8, 24]。トリアシルグリセロール含量は、市販キット（トリグリセリド－ワコー、和光純薬、大阪）で、脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィーで測定した [14]。

2．5　皮膚層の観察

皮膚サンプルは常法により処理を行った [20]。標本はリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈した 3 %グルタルアルデヒドを用い 4℃で固定した。固定サンプルは、4 日間 10% NaOH に、それから 3 日間蒸留水に浸漬した。その後、1 % タンニン酸溶液に 2 時間、2 % 四酸化オスミウム溶液に 1 時間浸漬した。エタノールにより脱水後、t- ブチルアルコールに留置し、凍結乾燥した。サンプルを、アルミニウムホルダーにのせ、Pt Pd で蒸着し、ss-550 走査型電子顕微鏡で観察を行った。真皮層および真皮層と筋膜にはさまれた皮下組織層の厚さを顕微鏡写真で測定した。

2．6　脂肪細胞のサイズの測定

標本はリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈した 3 %グルタルアルデヒドを用い 4℃で固定した。その後、1 % タンニン酸溶液に 30 分、1 % 四酸化オスミウム溶液に 1 時間浸漬した。その他は、上述通りであった。皮下組織層の脂肪細胞のサイズと数を測定した。脂肪細胞のサイズは、細胞の長径と短径の平均で求めた。1 ㎟当たりの直径 10 μm 以上の脂肪細胞の数を測定し、20μm の間隔でグループ分けした。

2．7　統計方法

データは、一元配置分散分析法によって統計学的に解析した。有意な効果が検出された時、Fisher の PLSD 検定または Tukey-Kramer の検定を行い個々のグループを比較した。統計的な有意差は、$P<0.05$ とした。結果は、平均値 ± 標準誤差で示した。

3　結果

図 1 には皮膚トリアシルグリセロール含量に及ぼす

CLA、GLA、LA あるいはそれらの組み合わせの効果を示した。個々の油脂間の比較では、LA 区が最も高く、GLA、CLA の順となった。LA と GLA を組み合わせるとトリアシルグリセロール含量は LA 単独よりむしろ GLA 単独区に近かった。LA+CLA あるいは CLA+GLA 区のトリアシルグリセロール含量は CLA 単独区に近いものであった。コラーゲン含量には、どの区間においても有意な差は認められなかった（データは示さず）。

皮膚の脂肪酸組成に及ぼす油脂源とそれらの組み合わせ効果については表２に示す。脂肪酸組成は明らかに投与した油脂に依存して変化した。特に、LA, GLA および CLA の量は投与した油脂により修飾を受けた。LA 単独区または LA+GLA および LA+CLA 組み合わせ区の LA 含量は 33％以上であったが、残りの３区では 28％以下であった。GLA 含量は、GLA 単独区よりも GLA と他の油脂を組み合わせた区で高くなった。しかし、CLA 含量においては

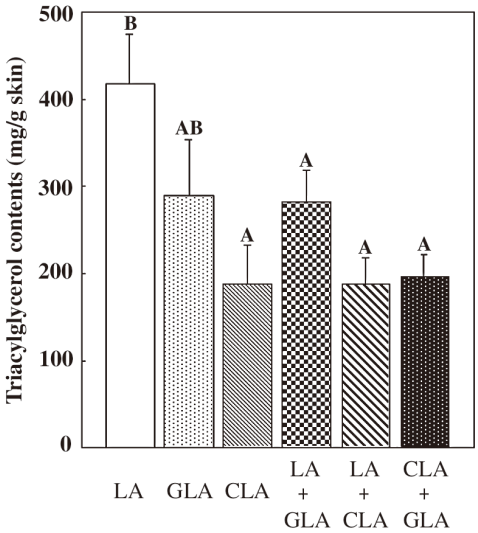

図１　LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮膚のトリアシルグリセロール含量。マウスは１区当たり５頭用いた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

表２　皮膚の脂肪酸組成（％）

Oil	LA	GLA	CLA	LA+GLA	LA+CLA	CLA+GLA
C14:0	1.17±0.07[a]	1.71±0.37[b]	0.83±0.13[a]	1.02±0.06[a]	0.74±0.02[a]	1.05±0.08[a]
C16:0	18.78±0.65[bc]	20.72±0.80[c]	20.56±0.60[c]	17.54±0.37[a]	18.10±0.40[bc]	19.41±0.63[ab]
C16:1	4.41±0.40[bc]	5.84±0.71[c]	2.28±0.59[a]	4.13±0.44[b]	2.45±0.66[a]	2.42±0.16[a]
C18:0	2.60±0.16[a]	3.29±0.44[ab]	4.31±0.27[c]	2.84±0.10[a]	3.89±0.14[bc]	3.81±0.26[bc]
C18:1	31.77±0.64[b]	31.10±0.53[ab]	34.14±0.56[c]	29.15±0.54[a]	30.86±1.03[ab]	29.36±0.69[a]
C18:2	36.31±0.75[d]	27.65±0.79[b]	23.71±1.49[a]	35.15±0.55[cd]	33.35±0.99[c]	25.16±0.64[ab]
CLA	0.50±0.07[a]	0.49±0.13[a]	8.11±0.63[c]	0.56±0.14[a]	5.29±0.36[b]	6.98±0.80[c]
9c,11t	0.29±0.04[a]	0.27±0.07[a]	4.71±0.37[d]	0.32±0.08[a]	3.02±0.19[b]	3.84±0.42[c]
10t,12c	0.13±0.02[a]	0.13±0.05[a]	2.77±0.25[c]	0.09±0.04[a]	1.78±0.16[b]	2.53±0.33[c]
c,c	0.01±0.01[a]	0.03±0.01[ab]	0.28±0.02[d]	0.08±0.03[b]	0.20±0.01[c]	0.27±0.03[d]
t,t	0.08±0.01[a]	0.05±0.00[a]	0.35±0.01[b]	0.06±0.01[a]	0.29±0.02[b]	0.33±0.04[b]
C18:3 (n-6)	0.37±0.17[a]	2.99±0.31[b]	0.23±0.09[a]	4.72±0.56[c]	0.42±0.21[a]	4.50±0.52[c]
C18:3 (n-3)	1.05±0.06[c]	1.14±0.04[c]	0.63±0.10[a]	1.03±0.08[c]	0.57±0.04[a]	0.84±0.06[b]
C20:3	0.23±0.04[a]	0.51±0.05[cd]	0.42±0.12[bc]	0.67±0.04[de]	0.31±0.05[ab]	0.83±0.01[e]
C20:4	0.48±0.04	1.08±0.37	0.75±0.18	0.84±0.07	0.75±0.10	1.42±0.29
他	11.60±0.17	3.49±1.00	4.03±0.61	2.30±0.14	3.25±0.20	4.25±0.61
飽和脂肪酸	23.1±0.62	27.0±1.10	27.1±1.02	22.0±0.49	23.8±0.34	25.9±0.70
不飽和脂肪酸	76.9±0.62	73.0±1.10	72.9±1.02	78.0±0.49	76.2±0.34	74.1±0.70

略語: LA, リノール酸; CLA, 共役リノール酸; GLA, γ-リノレン酸。マウスは１区当たり５頭用いた。値は平均値±標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

CLA 単独区の方が CLA と他の油脂を組み合わせた区よりも高かった。CLA の異性体では、9c, 11t-CLA が 10t, 12c-CLA に比して高かった。AA 含量に関しては処理の効果は認められなかった。

図 2 には CLA、GLA、LA あるいはそれらを組み合わせて投与したマウスの真皮ならびに皮下組織層の走査型電子顕微鏡写真を示す。真皮層の厚さにおいては処理間に有意な差は認められなかった。一方、皮下組織層においては処理による有意な効果が検出され、他の区に比して LA 区で最も厚かった（図 3）。また、LA+CLA 区で最も薄くなった。

図 4a は、走査型電子顕微鏡による皮下組織層の代表的な写真を示す。図 4b は、皮下組織の脂肪細胞の数を 20μm の間隔で区分した結果を示す。脂肪細胞の数は、LA+ GLA 区で最も多かった。割合では、CLA 区で 10−30μm の直径の脂肪細胞が高かった。

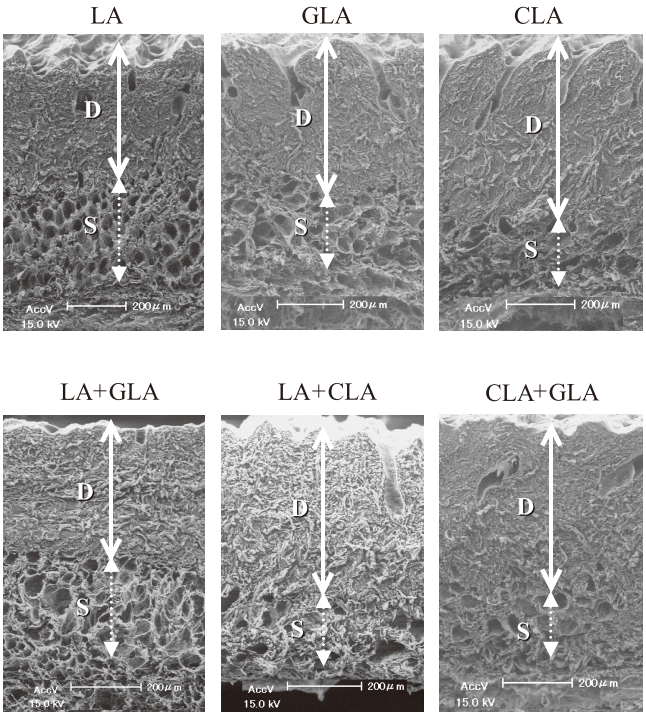

図 2　LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの真皮と皮下組織の代表的走査電子顕微鏡写真。略語：D, 真皮層；S, 皮下組織層。バーは 200 μm を示す。

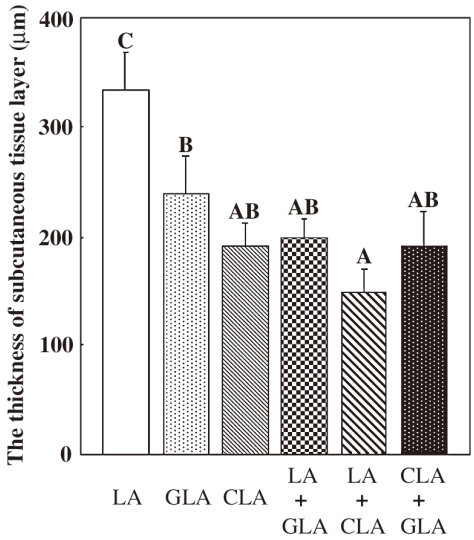

図 3　LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮下組織層の厚さ。マウスは 1 区当たり 5 頭用いた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

4　考察

本研究で用いた CLA 油脂は、主に 9c, 11t-CLA（32.4%）と 10t, 12c-CLA（33.2%）から構成された。しかし、CLA 区における 9c, 11t-CLA の割合は、10t, 12c-CLA の 1.7 倍となった。この結果は前報と良く一致している[21]。他の脂肪酸と混合して与えた際にも 9c, 11t-CLA の割合は 1.7 倍（LA+CLA 区）と 1.5 倍（CLA+GLA 区）高かった。CLA を投与しなくともマウスの皮膚にはわずかながらの CLA が含まれ、9c, 11t-CLA の割合は 10t, 12c-CLA の

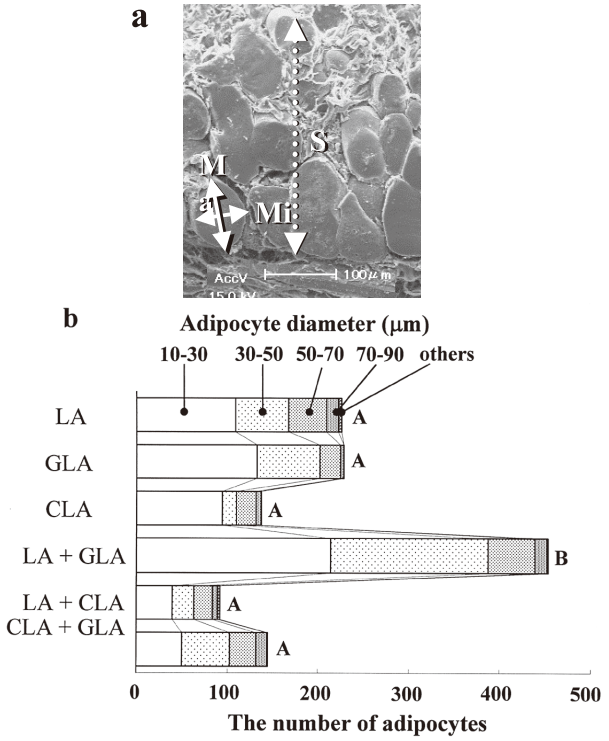

図 4　a; LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮下組織の代表的走査電子顕微鏡写真。略語：Ma、長径；Mi、短径；S, 皮下組織層。バーは 100 μm を示す。b; LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの脂肪細胞の総数。マウスは 1 区当たり 5 頭用いた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

2.2−3.6 倍高いものであった。これらの結果は、CLA は天然に存在する脂肪酸であり、9c, 11t-CLA は皮膚に移行しやすい脂肪酸であることを示す。また、9c, 11t-CLA と 10t, 12c-CLA の比は同時に投与される脂肪酸により変化を受けることが示唆される。一方、Brown *et al.*[5] は 10t, 12c-CLA が体脂肪の蓄積を抑制すると報告している。それは肝臓のステアロイル − CoA 不飽和化酵素を阻害する効果[22] やリポタンパク質リパーゼの活性に影響を及ぼす[17] からである。まとめると、本研究で得られたトリアシルグリセロール含量の減少や皮下脂肪組織の薄さは、9c, 11t-CLA よりはむしろ 10t, 12c-CLA によるものかもしれない。

CLA は内臓脂肪の蓄積を阻害する[19, 28]。その反面、過剰の CLA 摂取はマウスにおいて脂肪肝を誘発する[18]。CLA によって誘発される脂肪肝は、GLA を同時に投与することにより抗肥満効果を有したままで改善されると Nakanishi *et al.*[18] は報告した。本研究でも、CLA+GLA 区と CLA 単独区が皮膚のトリアシルグリセロールと皮下組織層の厚さを抑えた（図 1 と 3）。CLA の効果は内臓脂肪ばかりか皮膚にも及ぶことが明らかとなった。

GLA の割合は、GLA 単独区よりも LA+GLA 区と CLA+GLA 区で高くなった。LA+GLA 区においては、LA から GLA の代謝により GLA の割合が高くなったと考えられる。CLA+GLA 区で高くなった理由は明らかでないが、何らかの代謝に CLA が影響した可能性がある。さらに、皮下組織の厚さは LA 単独区よりも GLA 単独区で薄くなった（図 3）が、これは GLA によりカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼとペルオキシソームの β-酸化活性が高まったことによると考えられる[26, 27]。

PGE_2 はコラーゲン合成を高め[16]、PGE_1 はヒトの培養線維芽細胞においてコラゲナーゼの遺伝子発現を抑制した[23]。本研究においてプロスタグランジンは測定していないが、CLA によって減少することは報告されている[1]。しかし、真皮の厚さとコラーゲン含量に区間で差は認められなかった。これらの結果は、前報と同様であった[21]。

食餌由来の LA は容易に皮膚に移行した（表 2）。LA は AA を介して産生される PGE_2 の起源であるために、過剰の LA 摂取は皮膚に炎症を誘発することが報告されている[7, 9]。PGE_2 は皮膚の炎症を強く誘導する[13]。CLA は LA の不飽和化酵素[1, 15] を阻害し、リン脂質からの AA の放出と AA からのエイコサノイドの産生を抑制する[29] ために、CLA により皮膚の PGE_2 は減少する可能性がある。

結論として、CLA は皮膚の脂肪酸組成を変え、トリアシルグリセロール含量と皮下組織の厚みと脂肪細胞の数を減少させる。その上、CLA の効果は他の脂肪酸を同時に投与しても機能することが明らかとなった。

（引用文献）

1）Belury MA, :Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action, Annu Rev Nutr., 22, 505–531, 2002.

2）Bergman I, Loxley R, :Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline, Anal Chem., 35, 1961–1965, 1963.

3）Boelsma E, Hendriks FJH, Roza L, :Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids, Am J Clin Nutr., 73, 853-864, 2001.

4）Bretillon, L, Chardigny JM, Gregoire S, *et al.*, :Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro, Lipids, 34, 965–969, 1999.

5）Brown JM, Halvorsen YD, Lea-Currie YR, *et al.*, :Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue, J Nutr., 131, 2316–2321, 2001.

6）Chung S, Kong S, Seong K, *et al.*, :γ-linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs, J Nutr., 132, 3090–3097, 2002.

7）Fogh K, Kragballe K, :Eicosanoids in inflammatory skin diseases, Prostaglandins Other Lipid Mediat., 63, 43–54, 2000.

8）Folch J, Lees M, Stanley GHS, :A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J Biol Chem., 226, 497–509, 1957.

9）Gleich GJ, Kita H, :Bronchial asthma: Lessons from murine models, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 2101–2102, 1997.

10）Horrobin DF, :Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema, Am J Clin Nutr., 71 suppl., 367S-372S, 2000.

11）Ishiguro K, Oku H, Suitani A, *et al.*, :Effects of conjugated linoleic acid on anaphylaxis and allergic pruritus, Biol Pharm Bull., 25, 1655–1657, 2002.

12）James MJ, Gibson RA, Cleland LG, :Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production, Am J Clin Nutr., 71 suppl., 343S-348S, 2000.

13）Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, *et al.*, :Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of langerhans cells, Nat Med., 9, 744–749, 2003.

14）Kamegai T, Kasai M, Ikeda I, :Improved method for preparation of the methyl ester of conjugated linoleic acid, J Oleo Sci., 50, 237–241, 2001.

15) Kavanaugh CJ, Liu KL, Belury MA, :Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE2 production and hyperplasia in mouse epidermis, Nutr Cancer, 33, 132-138, 1999.

16) Levi-Schaffer F, Baram D, Segal V, *et al.*, :Prostaglandin E2 production by chronic graft-versus-host disease dermal fibroblasts, Immunol Lett., 48, 11–15, 1955.

17) Lin Y, Kreeft A, Schuurbiers JAE, *et al.*, :Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes, J Nutr Biochem., 12, 183-189, 2001.

18) Nakanishi T, Oikawa D, Koutoku T, *et al.*, :g-linolenic acid prevents conjugated linoleic acid-induced fatty liver in mice, Nutrition, 20, 390–393, 2004.

19) Nakanishi T, Ohgushi A, Yamashita T, *et al.*, :Effect of orally administered conjugated linoleic acids on behaviors and tissue fatty acid compositions in mice, J Appl Anim Res., 20, 157–170, 2001.

20) Ohtani O, Ushiki T, Taguchi T, *et al.*, :Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: A demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method, Arch Histol Cytol., 51, 249-261, 1988.

21) Oikawa D, Nakanishi T, Nakamura Y, *et al.*, :CLA and DHA modify skin properties in mice, Lipids, 38, 609-614, 2003.

22) Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, *et al.*, :Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives, Biochim Biophys Acta, 1486, 285–292, 2000.

23) Salvatori R, Guidon PT Jr, Rapuano BE, *et al.*, :Prostaglandin E1 inhibits collagenase gene expression in rabbit synoviocytes and human fibroblasts, Endocrinology, 131, 21–28, 1992.

24) Seya K, Ohkohchi N, Shibuya H, *et al.*, :A chemiluminescent assay for hydroperoxide level of phosphatidylcholine hydroperoxide fraction purified by two sep-pak cartridges in biological samples, J Pharm Biomed Anal., 23, 515–520, 2000.

25) Sinclair HM, :History of essential fatty acids, In Omega-6 Essential Fatty Acids: pathophysiology and roles in clinical medicine (Horrobin DF, ed.), New York: Alan R Liss Inc., 1990, 1-20.

26) Takada R, Saitoh M, Mori T, :Dietary gamma-linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid beta-oxidation in rats, J Nutr., 124, 469–474, 1994.

27) Takahashi Y, Ide T, Fujita H, :Dietary gamma-linolenic acid in the form of borage oil causes less body fat accumulation accompanying an increase in uncoupling protein 1 mRNA level in brown adipose tissue, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 127, 213–222, 2000.

28) Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, *et al.*, :Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice, Diabetes, 49, 1534–1542, 2000.

29) Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, *et al.*, :The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells, Biochim Biophys Acta., 1580, 150–160, 2002.

30) Wu D, Meydani M, Leka LS, *et al.*, :Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects, Am J Clin Nutr., 70, 536–543, 1999.

31) Ziboh VA, Miller CC, Cho Y, :Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites, Am J Clin Nutr., 71 suppl., 361S–366S, 2000.