J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.
報 文
27 (1) 33 - 40 (1993)

ヒト表皮における脂質過酸化反応

河野善行, 萩野滋延, 森 眞輝, 阪本興彦, 中村哲治, 高橋元次
株式会社資生堂研究所†

Lipid Peroxidation on a Human Skin Surface

Yoshiyuki Kohno, Shigenobu Hagino, Masaaki Mori, Okihiko Sakamoto,
Tetsuji Nakamura and Motoji Takahashi
SHISEIDO Research Center.†

The peroxidation of human skin surface lipids was investigated by a CL-HPLC (chemiluminescence-high performance liquid chromatography) system. Squalene mono-hydroperoxide was produced at the forehead and the scalp as well as in the dandruff under daily life conditions in most of the cases. Therefore it was considered that squalene was the first target lipid on a human skin surface by an oxidative stress. In order to confirm the effect of squalene mono-hydroperoxide on proliferation of cultured cells and TESTSKIN™ (Living Skin Equivalent), an authentic squalene mono-hydroperoxide was prepared by a dye-sensitized photooxidation and its chemical structure was identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and FAB-MS. Detection limit of squalene mono-hydroperoxide in CL-HPLC system was as little as 1 pmol. We also found that cosmetics containing antioxidants had a preventive effect against the lipid peroxidation on a Human Skin Surface.

1. 緒 言

従来より油脂化学, 食品化学や化粧品科学の立場から不飽和脂肪酸などの酸化劣化反応について多くの研究がなされており, 著者らも化粧品原料としての油脂の酸化安定性を検討してきた¹⁾。たとえばオリーブ油は, 過氧化物価(POV)が20前後から劣化臭を発しそれが感じられるようになる。これを原料として用いて化粧品を作るとその商品価値は著しく減ぜられる。また, 酸化劣化が進行した油分は, それを塗布すると皮膚刺激が発現する。それゆえ化粧品原料としての油分の酸化安定性を保証する重要性は認識されていた。

ところで皮膚の油脂である皮脂の酸化は一体ど

の様に進行していくのであろうか, また, それは生体皮膚に対してはどのような影響があるのであろうか。生体内脂質の過酸化反応は, 最近特に癌や老化との関連で注目を浴びてきている^{2), 3)}。脂質の酸化は一般にフリーラジカル連鎖反応メカニズムで進行し, まず最初の生成物としてヒドロペルオキシドを与える。これはさらに分解や酵素的修飾を受け, エポキシド, アルコール, ケトン, アルデヒドなどの酸化二次生成物を与える。それゆえ生体成分の脂質過酸化反応一次生成物である脂質ヒドロペルオキシドの同定や定量を行うことにより, 生体中でどの脂質がどの程度過酸化を受けたかなどの定量的議論ができると考えられる⁴⁾。

皮膚をターゲットとした脂質過酸化反応の研究に関しては, 主としてチオバルビツール酸法(TBA法)が用いられてきた。大城戸, 吉野らは,

† 〒223 横浜市港北区新羽町1050; 1050 Nippa-cho, Kohoku-ku Yokohama 223 Japan

皮膚における脂質過酸化反応について検討しており、生体皮膚が抗酸化力を有していること^{6),7)}、また、皮膚における脂質過酸化物質(正確にはチオバルビツール酸反応物質; TBARS)の主な起源はスクアレンであると推定し、それはたとえばUV照射等によって増加することを報告している^{8)~10)}。また皮膚の近赤外スペクトルを直接測定することによってヒト、ウサギ、マウスである一定以上の年齢を越すと急激にヒドロペルオキシド量が増大するという現象も報告されている¹¹⁾。早川らも、総脂質量に対する脂質過酸化物質(TBARS)の量は20歳代で最低値を示し、年代が上がるに従って徐々に増加することを報告している¹²⁾。10歳代では20歳代より高い値を示している理由として、皮膚の調節機能が未成熟であるためと考察している。さらに女子顔面黒皮症、肝斑等において、総脂質量に対する脂質過酸化物質(TBARS)量が10~10数倍に上昇していることを報告している¹³⁾。さらに最近では、真皮まで包含した皮膚と活性酸素との関連についても、脂質過酸化反応のみでなくグルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ等の酵素の誘導すなわち総合的な皮膚酸化防止システムの能力をも含めた議論もなされるようになってきている¹⁴⁾。これらの研究では、皮膚はたえず酸素に接し紫外線に暴露された皮脂や光感作物質が存在するため、活性酸素や脂質過酸化物質を巻き込んだ光生物学反応が惹起されやすい部位であるという認識にたっている。

このように今までの皮膚における脂質過酸化反応の研究に関しては、主としてチオバルビツール酸法(TBA法)が用いられてきたが、この方法では脂質過酸化反応の一次生成物であるヒドロペルオキシドを限定して測定することはできなかった。TBA法によりヒドロペルオキシド、マロンアルデヒド、アルカナール、アルケナール、アルカジエナール等多くの脂質過酸化反応によって生じる成分がまとめて測定されていたと考えられる¹⁵⁾。また、この方法ではどの脂質クラスが酸化を受けているかを明らかにすることはできないと考えられる。

一次生成物である脂質ヒドロペルオキシドを脂

質クラスのレベルで定量することは、皮膚における脂質過酸化反応の解明、ひいてはそれを防止する効果的な薬剤の選択に有用であると考えられる。そこで著者らは、脂質過酸化反応一次生成物である脂質ヒドロペルオキシドの同定と定量を行うことによりヒト皮膚で生起している脂質過酸化反応の解明を目的とした。具体的には、ヒドロペルオキシドに対する高選択性と高感度性を有し、生体試料にも応用可能な分析手段である化学発光(CL)検出器を用いるCL-HPLC法に着目して、酸化ターゲットを皮膚とした場合のこの方法論の有効性について検討した^{5),16)~19)}。

2. 実 験

2.1 試薬

メタノールはナカライテスク HPLC 用を、チトクロムC(馬心筋製, タイプVI)はシグマ社製試薬を使用した。スクアレンは日本石油(株)より購入し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し使用した。その他の試薬は、試薬特級をそのまま使用した。

2.2 CL-HPLC 条件

以下に CL-HPLC システムのブロック図および CL-HPLC 条件を示した^{4),16)}。

2.3 皮膚脂質の採取と CL-HPLC 分析

ヒト皮膚脂質を、20~30歳代の健康な男性のひたい部より、アセトン含浸脱脂綿を用いて採取した。また、頭皮脂質は、内径約2.6mmのガラスキャピラリーを用いてアセトンで採取した。この時毛髪にキャピラリーが触れないようにし、頭皮脂質のみを限定して採取した。またフケ脂質は、乾燥状態で採取したフケをアセトンに30分間浸漬させ抽出した。それぞれの脂質溶液は、30°C以下、窒素気流下アスピレータにより減圧乾固した。その後試料をほぼ一定濃度になるように1-ブタノールで希釈し、CL-HPLC システムに注入した。

2.4 スクアレンヒドロペルオキシドの調製

スクアレンの光増感酸化反応により、スクアレンヒドロペルオキシドを調製した²⁰⁾。光増感剤としては、メチレンブルーを用いた。高圧水銀灯

Schematic diagram of the CL-HPLC
PMT, photomultiplier.

CL-HPLC Conditions

HPLC column	: CAPCELL-PAC C18 25cm × 4.6mm i.d.
Column temp.	: 25°C
Eluant	: Methanol, flow rate 1.1ml/min
Post column CL reagent	: 10µg/ml cytochrome c and 1.0µg/ml luminol in borate buffer (pH=9.3) flow rate 1.0ml/min
Detector	: UV=204nm; JASCO UVIDE- C-100-V : CL ; JASCO 825-CL
Integrator	: Labchart 180

は、理工科学産業(株)の光化学用水銀灯 400W を用い、7°C 以下で約 100mg のスクアレン標準試料を 20ml のメタノール、1-ブタノール 1 対 1 混合溶媒に溶解し、40分間反応を行った。得られた反応混合物より直接 HPLC にてスクアレンモノヒドロペルオキシド画分、スクアレンジヒドロペルオキシド画分を分取してそれぞれの標準品を調製した。

2.5 スペクトルの測定

NMR スペクトルは、試料を重クロロホルムに溶解し、日本電子社製 GX-400 を用いて測定した。また FAB-MS スペクトルは、Finnigan MAT 社製 MAT-90 を用い、m-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとして測定した。

2.6 スクアレンヒドロペルオキシドの生体系に及ぼす影響

スクアレンヒドロペルオキシドの細胞毒性は、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞を用いて単層培養細胞密度計 (Monocellater) により細胞増殖率を測定した²¹⁾。試料はジメチルスルホキシドに溶解して系に加えた。また、ヒト皮膚再構築系に対する障害性は Organogenesis 社製 TEST-SKIN™ (Living Skin Equivalent) を用いて MTT 法により測定した^{22), 23)}。試料は希釈せずそのまま TESTSKIN™ 表面上に適用した。

3. 結果と考察

3.1 表皮における脂質過酸化反応

Fig.-1 に太陽光を照射したヒトひたい部より採取した脂質の CL-HPLC パターンを示した。

Fig.-2 に洗髪より所定時間後に採取したヒト頭皮脂質の CL-HPLC パターンを示した。また、Fig.-3 に洗髪より所定時間後に採取したヒトフケ脂質の CL-HPLC パターンを示した。

それぞれの図中で保持時間約 6.7 分に溶出してくる化学発光ピークは、スクアレン自動酸化物に含有されるスクアレンモノヒドロペルオキシド (スクワレン分子に 1 個ヒドロペルオキシル基が付いたもの)、および光増感酸化反応により調製されたスクアレンモノヒドロペルオキシドと ODS 系 HPLC により保持時間が等しいこと、またこの化学発光ピークは水素化ホウ素ナトリウムによる還元処理で消失することにより、スクアレンモノヒドロペルオキシドであることを確認した。

通常の生活環境下でヒトが受ける太陽光等によっても生体脂質成分であるスクアレンが過酸化反応を受け、皮表上でスクアレンモノヒドロペルオキシドが生成すると考えられる。同様にヒト頭皮脂質においても洗髪後経時でスクアレンモノヒドロペルオキシドの生成を観察した。

ヒトフケ脂質からは Fig.-3 の様にスクアレンモノヒドロペルオキシド以外のヒドロペルオキシドを検出した例も認めた。フケは皮表において存在している時間が長いと考えられスクアレン以外の脂質も過酸化反応を受けたためと考えられる。

Fig.-1 Detection of Peroxidized Squalene at the Human Forehead by CL-HPLC
Sun light exposure; 3min. July, fine

Fig.-2 CL-HPLC Pattern of Scalp Lipids
Scalp lipids were prepared 2days after shampoo

Fig.-3 CL-HPLC Pattern of Dandruff lipids
Dandruff lipids were prepared 2days after shampoo

2. 4項と同様にして調製したトリオレインヒドロペルオキシド、リノレン酸コレステロールヒドロペルオキシドとこの HPLC 条件における保

持時間がほぼ等しいことにより、これらのヒドロペルオキシドは、トリアシルグリセロールヒドロペルオキシド、コレステロール不飽和脂肪酸エステルヒドロペルオキシドと推定された。

また、紫外線被曝量とヒト皮表におけるスクアレンモノヒドロペルオキシド生成量との関係を **Fig.-4** に示した。具体的には1月晴天の日に、スキー場平面で太陽光照射エネルギーを計測しながら、通常の活動をしたパネル(20歳代~40歳代)ひたい部よりアセトンを含浸させた脱脂綿にて皮表脂質を採取した。理想的にはスキー場で顔面は、平面での太陽光照射エネルギーの約72%を受けると考えられている²⁴⁾。

Fig.-4 Lipid Peroxidation on a Human Skin Surface

sun light exposure : Jan., fine weather at a ski area

個人によって感受性は異なるが、スキー場で快晴時1時間活動した時スクアレンモノヒドロペルオキシドは、 1×10^{-2} mol/SQ.mol 程度生成した。

以上のようにスクアレンモノヒドロペルオキシドはその存在量に関しては個体差は認められるが今までに経験したほとんどの試料に関して検出された。このことは、ヒト皮表における第一の酸化ターゲット脂質はスクアレンであることを強く示唆すると考えられる。

3.2 スクアレンモノヒドロペルオキシドの調製と CL-HPLC システムの検証

前項で述べてきたように、スクアレンはヒト表皮で大変興味深い酸化挙動をするようである。そこで光増感酸化反応によりスクアレンモノヒドロペルオキシド標品を調製し、スペクトルにより同定した。さらにこれにより著者らが主な方法論として用いている CL-HPLC システムの検証を行った。なおスクアレンモノヒドロペルオキシド標品は、ヨードメトリーによりヒドロペルオキシル基の定量を行った結果、標品の精秤重量とよく一致した。

精製スクアレンおよびスクアレンモノヒドロペルオキシドの ^{13}C -NMR スペクトル, ^1H -NMR スペクトルを測定し特徴的なシグナルの帰属を Fig.-5, Fig.-6 に示した。

スクアレンの環境の違う 3 個の 2 重結合がそれ

ぞれほぼ等しく 1 重項酸素に攻撃されていることを明らかにすることが出来た¹⁸⁾。すなわちスクアレンの 1 重項酸素による酸化生成物は、1 重項酸素に攻撃された位置の相違による 2 種類の構造が 3 個ずつの異性体として混在する。スクアレンモノヒドロペルオキシドの FAB-MS スペクトルも、スクアレンがヒドロペルオキシル基を有する構造を支持した。

スペクトル測定より明らかにされたスクアレンモノヒドロペルオキシドの化学構造を Fig.-7 に示した。

次にこのスクアレンモノヒドロペルオキシド標品を用いて CL-HPLC システムの検量線を作成したが、スクアレンモノヒドロペルオキシドの濃度が、1~100pmol の濃度範囲で良好な直線関係が得られることを確認した。

また、CL-HPLC システムの検出限界を検討

Fig.-5 ^{13}C -NMR Spectra of Squalene and Squalene monohydroperoxide

Fig.-6 ^1H -NMR Spectra of Squalene and Squalene monohydroperoxide

Squalene (SQ)

Squalene Hydroperoxide (SQHP)

Fig.-7 Molecular Formulae of Squalene and Squalene monohydroperoxide Obtained by a Dye Sensitized Photooxidation

し、結果を **Fig.-8** に示した。

Fig.-8 の中央に CL 検出器におけるスムージング処理をしていない生のクロマトグラムを示したが、0.91pmol の濃度のスクアレンモノヒドロペルオキシドでも SN 比1.5~2.0で十分に検出されることがわかった。すなわち CL-HPLC システムは、1 pmol 以下のスクアレンモノヒドロペルオキシドを十分に検出することが出来ると考えられる。

Fig.-8 Detection Limit of Squalene monohydroperoxide in CL-HPLC
Squalene monohydroperoxide=0.91 pmol

3.3 スクアレンモノヒドロペルオキシドの生体系に及ぼす影響と化粧品による皮表における過酸化反応の防御

ヒト皮表においては皮脂線由来のスクアレンが、たとえばひたい部では洗顔12時間後で約30~40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度存在している²⁵⁾。それゆえヒト皮表において、一般生活環境下で生起している過酸化反応により生じるスクアレンモノヒドロペルオキシドの生理的影響も興味深い。今までも酸化させた脂質類の皮膚への刺激性の検討や、培養細胞系への細胞毒性に対する影響の検討はなされてきており、一般に酸化させた脂質の混合物が局所刺激性、細胞毒性に関与している事は報告されている^{7),26)}。

著者らは、スクアレンモノヒドロペルオキシド標品を用いて培養細胞系におよぼす影響を検討し、結果を **Fig.-9** に示した。

同条件において、1,2-エポキシテトラデカンのLD₅₀ 値は 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であり、スクアレンモノヒドロペルオキシドは中程度の細胞毒性を示した。また、ヒドロペルオキシル基が2つ付加したスクアレンジヒドロペルオキシドの方がスクアレンモノヒドロペルオキシドより強い細胞毒性を発現した。

これらに対して精製スクアレンは、高濃度領域においても全く細胞毒性を発現しなかった。スクアレンが過酸化されることにより細胞毒性を示すようになると考えられた。

ヒト表皮細胞、ヒト線維芽細胞を用いて作られたヒト皮膚再構築系(TESTSKINTM)に対するスクアレンモノヒドロペルオキシドの影響を検討し、結果を **Fig.-10** に示した。

スクアレンモノヒドロペルオキシドは、皮表に24時間接触させた時に特異的に障害反応を示した。ラジカル反応により角層脂質内をスクアレンモノヒドロペルオキシド由来のラジカルが伝播していき皮膚細胞に障害を与えたと推定した。

ヒトひたい部を用いて、太陽光曝露前にUV吸収剤、酸化防止剤含有の化粧水を塗布してスクアレンモノヒドロペルオキシド生成量の比較をし、結果を **Fig.-11** に示した。

Fig.-9 Effect of Squalene monohydroperoxide on Proliferation of Cultured Cells

Cell : Fibroblast from Lung of Chinese hamster
 Medium : 10% CSMEM 2ml/Plate
 Sample : DMSO sol. 48hrs treated

Fig.-10 Effect of Squalene monohydroperoxide on TESTSKIN™

化粧水塗布部はスクアレンモノヒドロペルオキシド生成を有意に抑制していた。皮表における過酸化反応防御という意味で化粧品の有用性を言及出来る 1 例と考えられる。

Fig.-11 Protection against Lipid Peroxidation on a Skin Surface by Cosmetics
 n=7, MEAN±SD, paired t-test

4. 総 括

1) ヒトのひたい、頭皮皮表脂質およびフケ脂質よりスクアレンモノヒドロペルオキシドを検出した。ヒト皮表においてはスクアレンが第一の酸化ターゲットであると考えられる。

2) 光増感酸化反応によりスクアレンモノヒドロペルオキシドを調製して各種スペクトルを測定

し同定した。

3) CL-HPLC によって 1 pmol 以下の感度でスクアレノモノヒドロペルオキシドを検出することができた。

4) スクアレノモノヒドロペルオキシドは、中程度の細胞毒性を有していた。

5) 皮表上に存在するスクアレノモノヒドロペルオキシドは、ラジカルの伝播により皮内に影響を及ぼすことを、ヒト皮膚再構築系である TEST SKIN™ を用いて明らかにすることができた。

6) 皮表に抗酸化剤、UV 吸収剤を適用することで、ヒト皮表における脂質過酸化反応を有意に防御することができた。

文 献

- 1) 植原計一, 富田健一, フレグランスジャーナル, No. 76, 48-53 (1986)
- 2) 八木國夫, 中野稔監修, “活性酸素” (1987) ㈱医歯薬出版
- 3) 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, “活性酸素” 蛋白質核酸酵素臨時増刊, 33 (1988)
- 4) 宮澤陽夫, 油化学, 38(10), 800-808 (1989)
- 5) 河野善行, 阪本興彦, 富田健一, 堀井和泉, 宮澤陽夫, 油化学, 40(9), 715-718 (1991)
- 6) 吉野和廣, 松尾聿郎, 大城戸宗男, 日皮会誌, 91(1), 1175-1179 (1981)
- 7) 吉野和廣, 皮膚と美容, 17(1), 2693-2699 (1985)
- 8) Ohkido M, Yoshino K, Matsuo I, “Biochemistry of Normal and Abnormal Epidermal Differentiation. Tokyo. Univ. of Tokyo Press, 269-278 (1980)
- 9) 吉野和廣, 日皮会誌, 90(12), 1081-1087 (1980)
- 10) 吉野和廣, 松尾聿郎, 日皮会誌, 91(1), 53-57 (1981)
- 11) Lippman RD, *Exp. Geront.*, 20, 1-5 (1985)
- 12) 早川律子, 上田 宏, 井沢洋平, 浅井淳平, 香粧会誌, 2(1), 6-12 (1978)
- 13) 早川律子, 日皮会誌, 81(1), 11-29 (1971)
- 14) 宮地良樹, 日本臨床, 46(10), 2252-2256 (1988)
- 15) Kosugi H, Kato T, Kikugawa K, *Anal. Biochem.*, 165, 456-464 (1987)
- 16) Miyazawa T, Yasuda K, Fujimoto K, *Anal. Lett.*, 20(6), 915-925 (1987)
- 17) Miyazawa T, Yasuda K, Fujimoto K, Kaneda T, *Anal. Lett.*, 21(6), 1033-1044 (1988)
- 18) 河野善行, 阪本興彦, 中村哲治, 宮澤陽夫, 油化学, 42(3), 204-209 (1993).
- 19) 小山和夫, 酒井 剛, 福井守正, 今尾正隆, 小西宏明, 粧技誌, 24(3), 202-206 (1991)
- 20) 福沢健治, 寺尾純二, “脂質過酸化反応実験法” (1990), ㈱広川書店
- 21) 石館 基監修, “染色体異常試験データ集 (改定増補版)” p. 16 (1987), ㈱エル・アイ・シー
- 22) Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A, *Toxin. in Vitro*, 6(4), 303-315 (1992)
- 23) Bell E, Parenteau N, Gay R, Nolte C, Kemp P, Bilbo P, Ekstein B, Johnson E, *Toxin. in Vitro*, 6(4), 305-315 (1992)
- 24) 末継 勝, 富田健一, 東 孝雄, 粧技誌, 23(3), 207-216 (1989)
- 25) Greene RS, Downing DT, Pochi PE, Strauss JS, *J. Invest. Dermatol.*, 54(3), 240-247 (1970)
- 26) 田中隆義, ビタミン, 53(12), 577-586 (1979)

(1992年9月10日受理)