

ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究

東京薬科大学 薬学部

小 谷 明

Free fatty acids (FFAs) in skin surface lipids function as a barrier to diseases caused by bacteria and keep the surface acidity constant. In this study FFAs in human skin surface lipids were determined by HPLC with electrochemical detection (HPLC-ECD). The electrochemical detection of FFAs was based on electrochemical reduction of quinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃) in unbuffered solution. The HPLC-ECD system was composed of a mobile phase of acetonitrile-ethanol (80:20), an ODS column, a sample injector, 6 mmol/L VK₃ solution containing 76 mmol/L LiClO₄ which was mixed with eluate, and an electrochemical detector.

The peak heights for lauric, myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, and arachidonic acids at a detection potential of -415 mV vs. a saturated calomel electrode (SCE) showed a linear relation to acid amounts in the range of 50-1600 pmol. FFAs from about 1 mg of skin surface lipids absorbed on oil absorbing paper 5 mm x 5 mm in size were extracted with 200 μ L of ethanol-acetonitrile (20:80) to prepare the test solution, of which 20 μ L was injected on the ODS column. This method requires small sample amounts and the procedure is quite simple without derivatization of FFAs, leading to a considerable reduction in analysis time. Since the lipid sample size was very small for the analysis by the method, it is easy to investigate the distribution of FFAs on a human face or scalp. Determination of FFAs in skin surface lipids at 50 points on the head of a male volunteer was carried out and FFA distribution on his face and scalp was mapped out. It has become apparent that oleic, linoleic, and palmitoleic acids are distributed at relatively high concentrations on the forehead and nose, and that stearic acid mainly distributed on the cheeks.

The sampling using a piece of oil absorbing paper can be applied to a human subject with skin trouble, as well as men and women of all ages. Furthermore, it is possible to determine the amounts of FFAs on human skin at pathological sites such as acne. Thus, the present method should be very useful in the cosmetic and clinical fields.

1. 緒 言

ヒトの皮膚表面は皮表脂質（以下、脂質と略す）という薄い脂肪膜で覆われている。脂質中の遊離脂肪酸は、皮膚常在細菌のリパーゼによるトリグリセリドの加水分解によって生成される¹⁾。脂質には、種々の遊離脂肪酸が含まれ、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸には抗白癬菌作用が、ラウリン酸、オレイン酸には表皮ブドウ球菌の発育抑制作用があるといわれている²⁻⁴⁾。また、肌のテカリや化粧崩れの原因にはパルミチン酸、オレイン酸が、尋常性ざ瘡（にきび）には起炎性を示す遊離脂肪酸が関与するといわれている⁵⁾。従来、ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の分離定量については、ガスクロマトグラフィーや蛍光検出 HPLC が利用されているが、いずれも遊離脂肪酸の誘導体化を行った上で分析を行っており、そのためある程度多量の試料量を確保する必要があった。従って、脂質の採取方法ではカップ法をはじめとする種々の方法が用いられた⁶⁾。これらの方法は、採取時間が長かったり、特別な大がかりな装置を

必要としたり、アセトンやヘキサンなどの有機溶媒を使用するため⁷⁾ 被験者に対し大きな負担を課するなど多くの欠点があった。

我々は過塩素酸リチウムを含む 2-methyl-1,4-naphthoquinone（ビタミン K₃, VK₃）の非緩衝溶液であるエタノール溶液に脂肪酸が存在すると、ボルタモグラム上にキノンの還元前置波が現れ、この波高（*i_h*）が酸の濃度に比例することを明らかにした（図 1）。さらに、この原理を利用した電気化学検出 - 高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD）を作製し、これにより、植物油⁸⁾、血漿⁹⁾ 中に含まれる遊離脂肪酸の高感度定量が可能であることを報告した。

本研究では、この HPLC-ECD を応用して、ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の動態を解析できる分離定量法を確立し、頭部 50 箇所 of 脂質中の遊離脂肪酸の分布とその組成を明らかにした¹⁰⁾。さらに、本法を利用して、脂質中の遊離脂肪酸の量の変動および組成を測定し、脂質の分泌を抑制する美容液や洗顔料の使用による影響を検討した。

2. 実 験

2・1 HPLC-ECD および測定条件

装置の概略図を図 2 に示す。電気化学検出器は、作用電極にグラッシカーボン、参照電極に飽和カロメル電極（SCE）、対極にステンレススチールを用いた三電極法の電気化学セルおよびポテンシオスタットを用いた。カラムには、市販の ODS カラム LiChrospher 100 RP-18



Effect of Indigenous Bacterium and Cosmetics on the Kinetics of Free Fatty Acids in Skin Surface Lipids

Akira Kotani

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

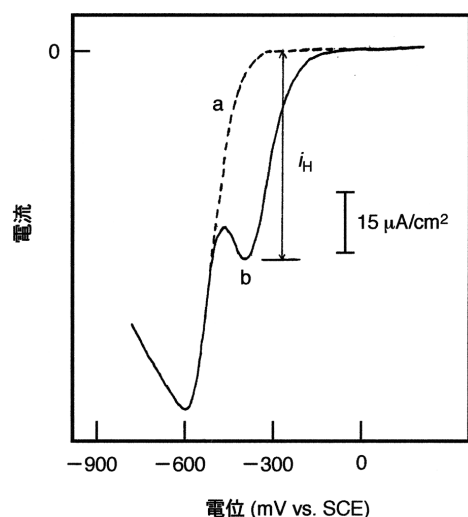


図1 ビタミン K³ (3.0 mmol/L) のボルタモグラム
(a), 0 mmol/L ; (b), 3.2 mmol/L パルミチン酸を含む。
測定条件：測定溶液, 38 mmol/L LiClO₄ のエタノール溶液；
作用電極, グラッシーカーボン；参照電極, 飽和カロメル電極 (SCE)；対極, 白金線；走査速度, 5 mV/s.

(250 mm × 4.0 mm i.d., 5 μm), 移動相にはアセトニトリル-エタノールの混合溶媒 (80:20), キノン溶液には 6 mmol/L VK³ と 76 mmol/L の過塩素酸リチウムを含むアセトニトリル-エタノールの混合溶媒 (80:20) とした。流速 1.1 mL/min, 検出電位は, -415 mV vs. SCE とした。

2・2 皮脂の採取方法および試料溶液の調製方法

健康な男性 7 人 (21-25 歳), 女性 5 人 (21-23 歳) を被験者とした。頭髪および顔面を石鹸を用いて洗った後, 被検部位への化粧および激しい運動による発汗を避け, 約 4 時間後に皮脂採取部位に油取り紙 (麻 100%, マックスファクター) を 30 秒間押し付けて, 皮脂を吸着させて採取した。油取り紙の大きさは 5 mm × 5 mm とした。

皮脂を採取した油取り紙をマイクロチューブに入れ, 50 μmol/L のマルガリン酸 (C17:0, 内標準物質) を含むアセトニトリル-エタノールの混合溶媒 (80:20) を加え, 30 秒間攪拌して遊離脂肪酸を抽出し, 試料溶液とした。このうち 20 μL を HPLC に注入し, クロマトグラムを得た。

2・3 美容液および洗顔料の使用による皮脂中遊離脂肪酸量・組成の比較

健康な男性 (26 歳) を被験者とし, 顔を石鹸で洗顔の後, テカリやにきびの予防が同時にできるジェル状美容液 (植物物語素肌力, ライオン) を塗布, または余分な皮脂を吸着する洗顔料 (レシピオ, コーセー) で洗顔した。美容液や洗顔料を使用した箇所と使用していない箇所から経時的に皮脂を 2・2 の方法で採取して, HPLC-ECD で皮脂中の遊離脂肪酸量および組成の変化を追跡した。

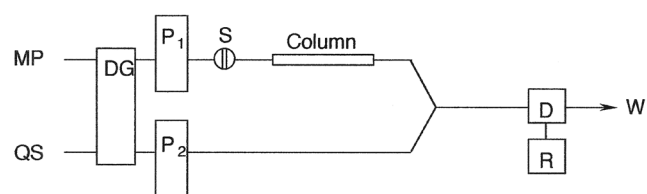


図2 HPLC の流路図: MP, 移動相: アセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v) ; QS, キノン溶液: 6 mmol/L VK³ + 76 mmol/L LiClO₄ のアセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v) ; DG, デガッサー; P₁ および P₂, ポンプ; S, 試料注入部 (20 μL); カラム, LiChrospher 100 RP-18 (250 mm × 4 mm i.d., 5 μm); D, 電気化学検出器 (電気化学セルとポテンシオスタット); R, 記録計; W, 廃液。

3. 結果および考察

3・1 額の皮脂に含まれる遊離脂肪酸

ラウリン酸 (C12:0), ミリスチン酸 (C14:0), パルミチン酸 (C16:0), マルガリン酸 (C17:0, 内標準物質), ステアリン酸 (C18:0), パルミトオレイン酸 (C16:1), オレイン酸 (C18:1), リノール酸 (C18:2), リノレン酸 (C18:3), アラキドン酸 (C20:4) の標準混合溶液 (5 × 10⁻⁵ mol/L) 20 μL を HPLC-ECD に注入して得たクロマトグラムを図 3 A に示す。ラウリン酸とリノレン酸, リノレン酸とアラキドン酸, パルミトオレイン酸とリノール酸の分離度は, それぞれ 0.15, 0.18, 0.12 であったため分離は困難だったが, 他の脂肪酸については, 10 分間以内に分離ができた。ピーク高さは, それぞれの脂肪酸量について 50-1600 pmol の範囲で良い直線性 ($r > 0.997$) を示した。上述した 9 種類の脂肪酸標準混合溶液 (1 × 10⁻⁵ mol/L) について 5 回の繰り返し測定を行ったところ, 相対標準偏差 (RSD) は, それぞれの脂肪酸について 1.5% 以下であった。また, 検出限界は, 50 pmol (S/N = 3) であった。上述の方法に従って, 額から採取した皮脂の試料溶液を HPLC に注入して得たクロマトグラムを図 3 B に示す。

表 1 に示すように, 25 歳男性の額の皮脂について繰り返し測定と添加回収試験を行ったところ, それぞれの遊離脂肪酸について RSD (n=5) は 4.5% 以下, 回収率は, 94% 以上と良好な結果が得られた。以上のことから, この HPLC-ECD により, ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の定量を精度良く行うことができることが明らかとなった。

続いて, 表 2 には男性 5 人, 女性 5 人について, 額から皮脂を採取し, 同上の方法で遊離脂肪酸の定量を行った結果を示す。遊離脂肪酸総量は, 上述の 9 種類の脂肪酸の総量であり, 脂肪酸組成は, その総量に対するそれぞれの脂肪酸の割合である。表 2 に示すように, 遊離脂肪酸の量および組成には個人差があることが示された。

被験者 (23 歳男性) について額および頭皮の遊離脂肪酸組成の 3 日間の日間変動を追跡したところ, 表 3 に示

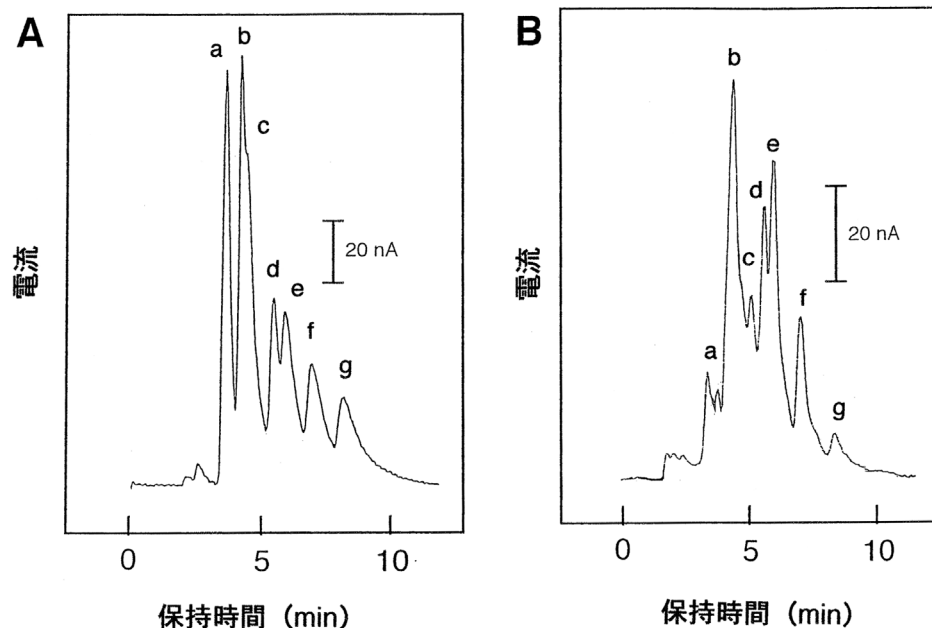


図3 (A) 遊離脂肪酸標準混合溶液 (5×10^{-5} mol/L) と (B) 皮脂中の遊離脂肪酸のクロマトグラム
 皮脂は、23 歳男性の額から採取した。HPLC の条件：移動相，アセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v)；キノン溶液，6 mmol/L VK³ と 76 mmol/L LiClO₄ を含むアセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v)；試料注入量，20 μ L；カラム，LiChrospher 100 RP-18, (250 mm $\times$ 4 mm i.d., 5 μ m)；カラム温度，室温；流速，1.1 mL/min；検出電位，-415 mV vs. SCE。ピーク：a, C12:0 + C18:3 + C20:4；b, C16:1 + C18:2；c, C14:0；d, C18:1；e, C16:0；f, C17:0 (内標準物質)；g, C18:0。

表1 ヒト皮脂中遊離脂肪酸の繰り返し測定と添加回収試験

遊離脂肪酸	繰り返し測定 (n = 5)		添加回収試験 (n = 5)		
	脂肪酸量 (nmol/cm ²)	RSD (%)	添加量 (nmol/cm ²)	回収率 (%)	RSD (%)
C12:0 + C18:3 + C20:4	12.6	4.5	13	94	2.3
C14:0	8.7	1.2	10	102	0.71
C16:0	15.0	3.4	10	94	2.9
C16:1 + C18:2	11.1	2.0	12	96	4.7
C18:0	4.8	1.5	5.0	103	1.6
C18:1	9.5	2.6	10	97	3.4

25歳男性の額から10 mm $\times$ 15 mm の油取り紙で皮膚を採取した。皮膚の吸着した油取り紙は、5 mm $\times$ 5 mm に細分し、それぞれにエタノール-アセトニトリル混合溶液を加え、遊離脂肪酸を抽出した。

表2 ヒト顔における皮脂中遊離脂肪酸の総量とその組成

被験者	遊離脂肪酸総量 (nmol/cm ²)	組成 (%)					
		C12:0 C18:3 C20:4	C14:0	C16:0	C16:1 C18:2	C18:0	C18:1
男性 1	112.2	46.3	9.8	11.6	17.8	2.0	12.5
2	67.5	31.1	10.8	23.7	13.2	4.9	16.3
3	79.4	17.6	13.9	26.4	22.7	3.0	16.4
4	114.2	14.0	14.0	4.9	42.0	3.2	21.9
5	42.0	33.3	10.5	16.4	19.0	10.7	10.0
女性 1	52.7	17.6	18.6	32.3	14.4	1.7	15.4
2	74.3	17.5	10.2	29.6	16.2	14.8	11.7
3	84.9	16.5	15.3	34.2	14.1	1.1	18.8
4	62.7	4.0	19.1	35.1	3.5	15.9	22.3
5	32.0	3.1	19.1	27.5	3.1	27.2	20.0

ように遊離脂肪酸組成の日間変動の RSD は 11 % 以下であった。このことから、同じ場所における皮脂の遊離脂肪酸の組成は日によってあまり変化しないことが示された。

3・2 頭部 50 箇所における遊離脂肪酸の組成

顔と頭皮 50 箇所の皮脂を上述の方法で採取し、遊離脂肪酸の定量を行った。顔 30 箇所についての結果を図 4 に、頭皮 20 箇所についての結果を図 5 に示す。円グラフは、その遊離脂肪酸の組成を示し、その大きさは遊離脂肪酸の総量を相対的に示している。その上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) を示す。図 4 が示すように、脂漏部位である額、鼻、顎は遊離脂肪酸量が多く、脂漏部位でない頬は、それらの部位に比べ遊離脂肪酸量が少ないことがわかった。また、頭皮では顔面より、遊離脂肪酸の量が多いことがわかった。

表3 顔と頭皮における皮脂中遊離脂肪酸の日間変動

遊離脂肪酸	顔		頭皮	
	組成 (%)	RSD* (%)	組成 (%)	RSD* (%)
C12:0 + C18:3 + C20:4	4.7	11	5.1	9.0
C14:0	21.2	3.3	30.0	0.50
C16:0	26.3	3.5	17.9	5.5
C16:1 + C18:2	18.8	5.8	15.0	5.3
C18:0	8.9	10	15.4	5.5
C18:1	20.0	5.2	16.5	1.9

*23歳男性の同じ場所の顔と頭皮から3日間皮膚脂を採取した。

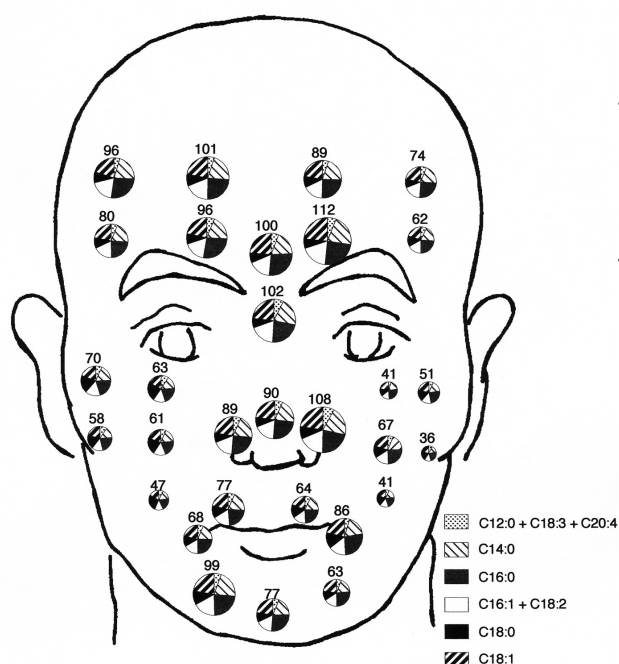


図4 顔における遊離脂肪酸の分布

皮脂は、23歳男性から採取した。円グラフの大きさは、遊離脂肪酸の総量を相対的に示し、上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) で表した。

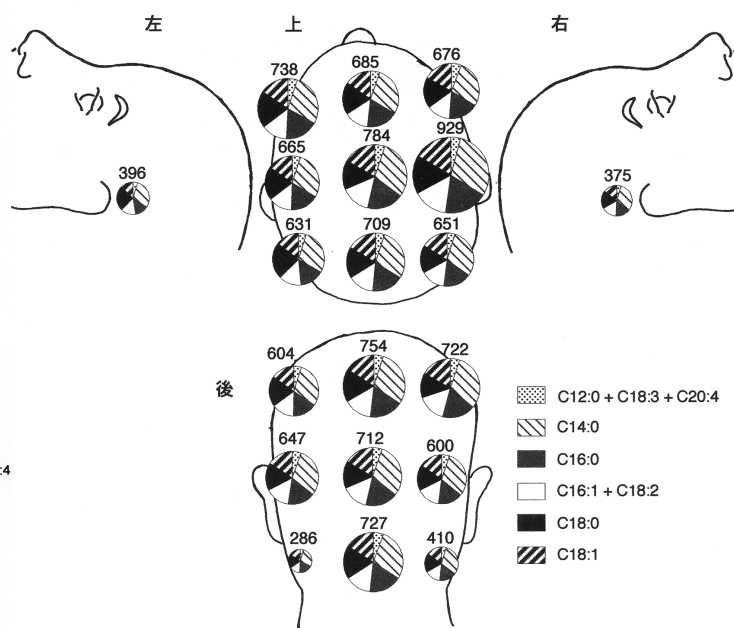


図5 頭皮における遊離脂肪酸の分布

皮脂は、23歳男性から採取した。円グラフの大きさは、遊離脂肪酸の総量を相対的に示し、上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) で表した。

特に、パルミトオレイン酸とリノール酸、オレイン酸は、脂漏部位である額、鼻、顎に多く存在し、頬にはあまり存在しないことがわかった。また、ステアリン酸は皮膚が乾燥しやすい頬に多く存在することがわかった (図6)。以上のように、本法は油取り紙に吸着させた極微量の試料で遊離脂肪酸の定量が行えるため、顔面および頭皮50箇所の遊離脂肪酸を定量し、分布図を作成することができた。

3・3 美容液および洗顔料の使用による皮脂中遊離脂肪酸量・組成の変化

本方法は、試料の採取方法、前処理方法が簡単であるので、化粧品や皮膚治療薬を塗布した後の皮脂中遊離脂肪酸の動態を細かく追跡することが可能であると考えられる。

そこで、市販の美容液と洗顔料を使用したとき、皮脂中の遊離脂肪酸量と組成に及ぼす影響について検討した。

図7Aには、テカリやにきび予防が同時にできるジェル状美容液 (植物物語素肌力) を塗布した場合と、使用していない場合の皮脂中遊離脂肪酸の総量の変化を示した。洗顔した直後は、皮脂中に遊離脂肪酸は検出されなかったが、時間が経つにつれて遊離脂肪酸は増加した。美容液を使用した部位の遊離脂肪酸の増加量は、使用していない場合に比べ抑制されていた。図7Bには、それぞれの遊離脂肪酸の組成を示した。遊離脂肪酸の組成は、美容液の使用に関らずあまり変化しなかった。

また、余分な皮脂を吸着する洗顔料 (レシピオ) を使用

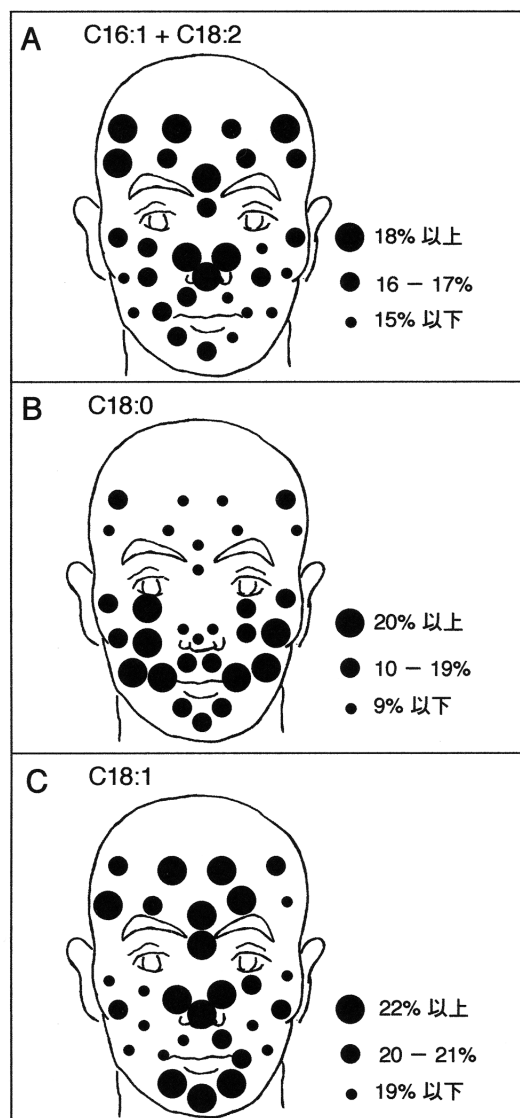


図6 顔における (A) パルミトオレイン酸 (C16:1) とリノール酸 (C18:2)、(B) ステアリン酸 (C18:0)、(C) オレイン酸 (C18:1) の分布
 皮脂は、23 歳男性から採取した。

した場合も同様に比較した (図8)。美容液と同様、皮脂中の遊離脂肪酸量の増加は抑制するが、組成にはあまり影響を与えなかった。

4. 総括

皮膚における遊離脂肪酸の機能を明らかにするために、皮脂中の遊離脂肪酸を HPLC-ECD で測定した。本法は、1 mg 程度の試料で測定が可能であり、サンプリングは 5 mm × 5 mm の油取り紙に皮脂を吸着させて採取した。皮脂の採取に要する時間は 30 秒であり、このため、幅広い年齢層の被験者やにきびなどといった皮膚の病変部位から皮脂を採取するのも容易であると考えられる。また、検出のための誘導体化も必要ないため、皮脂を採取する時間も含

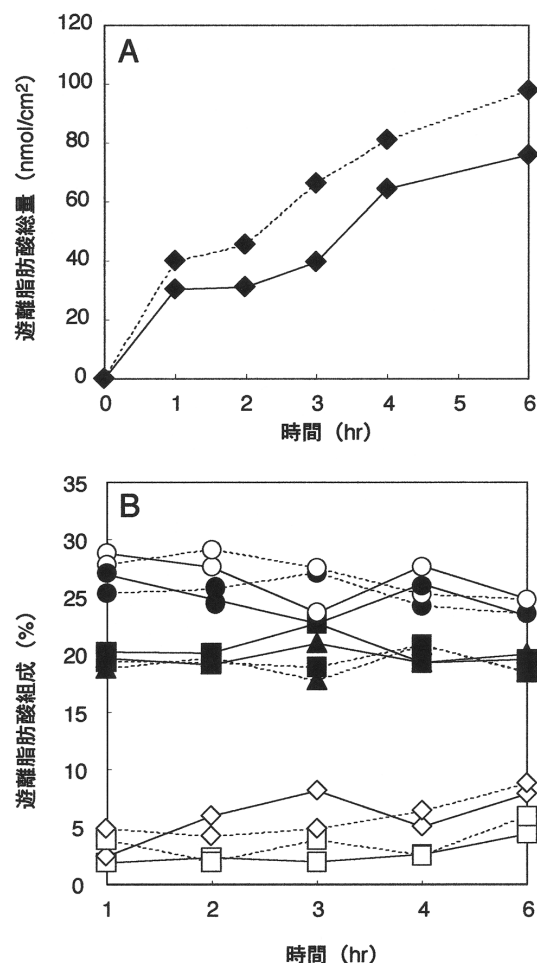


図7 ジェル状美容液 (植物物語素肌力) の使用による皮脂中遊離脂肪酸 (A) 総 および (B) 組成の変化

皮脂は、26 歳男性の額から採取した。(…), 美容液を塗布していない場所; (—), 美容液を塗布した場所; ◆, 遊離脂肪酸総量; □, C12:0 + C18:3 + C20:4; ■, C16:1 + C18:2; ▲, C14:0; ○, C18:1; ●, C16:0; ◇, C18:0.

めた測定時間は、わずか 15 分であり、従来の方法に比べ、被験者の協力も得やすく、より多くのサンプルを扱えることが可能である。また、美容液や洗顔料が皮脂中の遊離脂肪酸の生成に対する影響も本法によってモニターすることができる。殺菌効果、保湿効果、収れん作用などを有するその他の化粧品や皮膚治療薬を用いた場合でも、皮脂中の遊離脂肪酸量や組成を求めることが可能であり、皮膚常在細菌が生成する遊離脂肪酸の皮膚に対する影響を明らかにできると思われる。

本法は、上述した利点があるので、皮膚における遊離脂肪酸の役割および動態を明らかにするための有力な手段であり、化粧品領域だけではなく、生理学、薬理学、皮膚科学などといった幅広い分野に応用が可能であると考えられる。

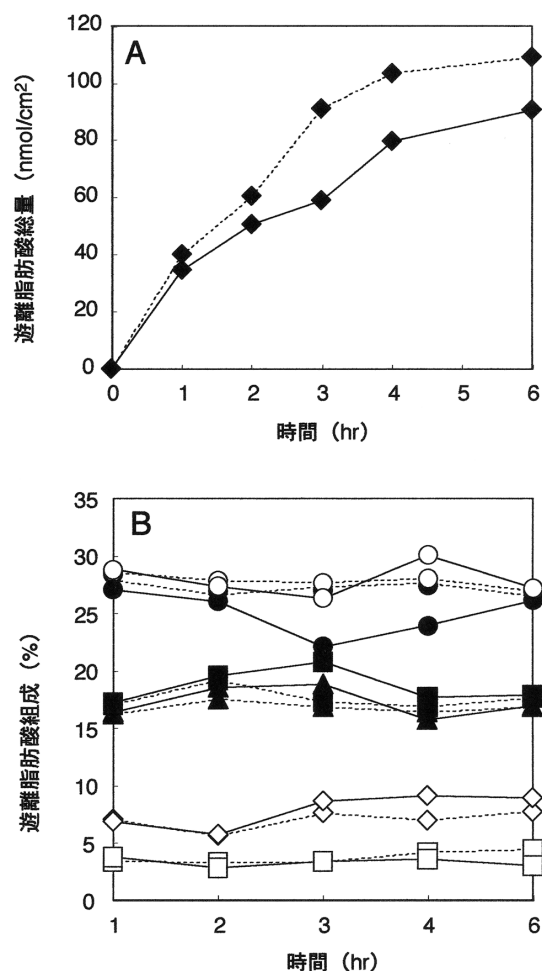


図8 洗顔料（レシピオ）の使用による皮脂中遊離脂肪酸（A）総および（B）組成の変化

皮脂は、26歳男性の額から採取した。（---），洗顔料を使用していない場所；（—），洗顔料を使用した場所；◆，遊離脂肪酸総量；□，C12:0 + C18:3 + C20:4；■，C16:1 + C18:2；▲，C14:0；○，C18:1；●，C16:0；◇，C18:0。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

（参考文献）

- 1) Strauss JS, Downing DT, Stewart ME: in Physiology, biochemistry, and molecular biology of skin. Goldsmith LA, ed., Oxford University Press, New York, 1991, 712-740.
- 2) 松尾丰朗, 犬飼則子, : 表皮脂質の生理的役割. 油化学, 37, 827-831, 1988.
- 3) Elias PM, Feingold KR, : Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. Semin. Dermatol. 11, 176-182, 1992.
- 4) Elias PM, Menon GK, : Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. Adv. Lipid Res. 24, 1-26, 1991.
- 5) Kellum RE, Strangfeld K, : Studies in pathogenesis: fatty acids of human surface triglycerides from patients with and without acne. J. Invest. Dermatol. 58, 315-318, 1972.
- 6) 安部 隆, : 皮脂の測定方法について. 香粧会誌, 7, 154-158, 1983.
- 7) Stewart ME, Steele WA, Downing DT, : Change in the relative amount of endogenous and exogenous fatty acids in sebaceous lipids during early adolescence. J. Invest. Dermatol. 92, 371-378, 1989.
- 8) Fuse T, Kusu F, Takamura K, : Determination of higher fatty acids in oils by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. A, 764, 177-182, 1997.
- 9) Kotani A, Fuse T, Kusu F, : Determination of plasma free fatty acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Anal. Biochem. 284, 65-69, 2000.
- 10) Kotani A, Kusu F, : HPLC with electrochemical detection for determining the distribution of free fatty acids in skin surface lipids from the human face and scalp. Arch. Dermatol. Res. 294, 172-177, 2002.