

固相マイクロ抽出法に基づく体臭成分の高感度分析法の開発と 化粧品・食品摂取やストレスによる体臭変化の解析

就実大学薬学部

片岡 洋行

Since the odors and emanations released from human body can include essential information about the state of health and diseases, chemical analysis of their components is attracting attention as an objective quantitative evaluation. In this study, we developed a non-invasive analytical method for the determination of 2-nonenal as a body odor component by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME/ GC-MS). 2-Nonenal in skin emissions and secretions collected by gauze wiping were easily extracted onto the SPME fiber, and then analyzed sensitively by GC-MS. Using this method, we analyzed body odor changes by use of cosmetics, food intake, cigarette smoking and stress load.

1. 緒言

近年、清潔志向が高まり、口臭や体臭、加齢臭を気にする体臭恐怖症(自臭症)が増加しており、消臭化粧品やデオドラント関連製品が開発されている。また、体臭は健康状態を示すバロメーターであり、ストレスや生活習慣病のサインとも言われ、心身症とも関連して社会生活の障害となっている¹⁾。しかし、体臭は周囲の指摘が困難で判断基準も曖昧であることから、体臭の客観的な定量評価法が開発が望まれている。体臭にはスパイシー臭、脂肪酸臭、硫黄臭などがあり、汗腺や皮脂腺などの分泌物が皮膚細菌によって分解された揮発成分や体外から摂取された化合物成分に由来すると考えられている。特に、皮脂腺から分泌される9-Hexadecenic acidが酸化・分解されて生成する2-Nonenalなどの不飽和アルデヒド類が加齢臭の原因の一つとなっている(図1)²⁾。しかし、体臭成分分析の鍵となるサンプリング器材や分析手法が確立されてないため、それらの発生の実態や動態については、十分解明されていない¹⁻⁴⁾。特に、皮膚表面から発生する“におい”は複雑で極微量であるため、官能的に感知できても分析機器で検出困難な場合があり、成分を分離同定・定量するためには、サンプリングや前処理を効率化した高感度分析法の開発が重要な課題となっている。従来、皮膚ガスサンプリング法として、手のひらをPVFバッグに入れて採取する方法が報告されているが、気密性や定量性に問題がある。また、体臭成分の分析法として、ヘッドスペースサンプリングや溶媒抽出後、GC分析する方法が報告されているが、感度

や定量性に問題がある。そこで、我々がこれまでに開発してきた固相マイクロ抽出(SPME)法⁵⁻⁷⁾を用いれば、簡単な器具でサンプリングと同時に抽出濃縮ができることから、皮膚ガス及び皮膚滲出液中の体臭成分を生体から直接サンプリングして定量評価できると考えられる。

本研究では、サンプリング・前処理の重要性に着目し、ファイバー SPME法を用いて皮膚ガス・皮膚滲出液中の揮発成分を非侵襲的かつ簡便迅速にサンプリング、抽出濃縮し、ガスクロマトグラフ-質量分析(GC-MS)法との連結により高感度分析する方法を開発した。また、本法を用いて、体臭成分の一つである2-Nonenalをバイオマーカーとした皮膚ガス・滲出液サンプリング分析法を検討し、さらに化粧品使用や食品摂取、ストレスや喫煙など内的、外的要因による体臭への影響を解析した。初年度は不飽和アルデヒド類のSPME/GC-MS法の開発、最終年度は2-Nonenalに的を絞って体臭分析を行った。

2. 実験

2.1 試薬

体臭関連の分析対象標準物質として、2-Nonenal(ナカライテスク製)を用い、LC-MS用メタノールに溶かして1 mg/mLとし、密栓して冷蔵(4℃)保存した。これを用時、LC-MS蒸留水で希釈して用いた。

2.2 装置及び測定条件

GC-MS分析は、島津QP-2010 GC-MS装置を用い、SPME/GC-MS法により、SIMモード(2-Nonenal:m/z=55, 83, 111)で分析した。GC分離は、DB-1(60m×0.25mm i.d.)キャピラリーカラムを用い、190℃(2分間保持)から230℃まで5℃/minの昇温で行った。

2.3 ファイバー SPME 操作法

SUPELCO社製のSPMEホルダー及びファイバーアッセンブリーからなるSPMEユニットを使用した。ファイバ



Development of sensitive analytical method of body odor components using solid-phase microextraction, and analysis of their changes by use of cosmetics, food intake and stress load

Hiroyuki Kataoka
School of Pharmacy, Shujitsu University

ーアッセンブリーとして、次の異なる固定相を固定化した7種のファイバーを使用した。

<吸収型>

- ① PDMS (Polydimethylsiloxane、膜厚100 μ m)
- ② Polyacrylate (膜厚85 μ m)

<吸着型>

- ③ Stable Flex PDMS/DVB (PDMS/divinylbenzene、膜厚65 μ m)
- ④ CAR/PDMS (Carboxen/PDMS、膜厚75 μ m)
- ⑤ Stable Flex CAR/PDMS (膜厚85 μ m)
- ⑥ CW/DVB (Carbowax/DVB、膜厚65 μ m)
- ⑦ DVB/CAR/PDMS (膜厚50/30 μ m)

<操作手順>

試料溶液をホットプレートスターラーに乗せ、試料を加熱する。この時の加熱温度を「抽出温度」と表記する。次にバイアルのセプタムにSPME針を貫通させ、続いてファイバーをヘッドスペース (HS) 中に露出し、加熱により気化した物質を吸着させる。この時のファイバー露出時間

を「抽出時間」と表記する。一定時間放置後、ファイバーを収納して針を抜き、GC-MSの試料気化室に導入し、抽出された化合物を加熱により脱離する(図2)。SPMEによる抽出条件は本研究により最適化した。

2.4 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法

皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング方法として、図3に示す4つの方法を比較検討した。皮膚を石鹸で洗浄して3時間後にサンプリングを行った。

2.5 拭き取り法または貼り付け法による体臭分析

本学研究倫理安全委員会の承認のもと、20歳代から50歳代の男女4名の被験者に対して、実験の趣旨を説明し、同意を得て皮膚ガス・皮膚滲出液をサンプリングした。図3の③または④の方法に従い、0.1gの乾燥ガーゼを用いて、額、腕、耳裏、腋は拭き取り法、胸部、背中からは貼り付け法によりサンプリングし、2-NonenalをHS-SPME/GC-MS分析した。

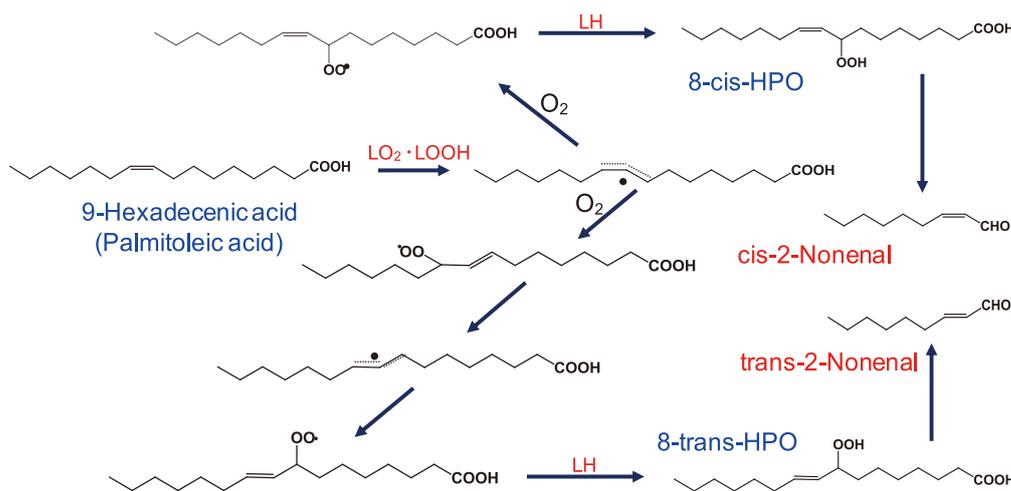


図1 脂質過酸化反応による2-Nonenalの推定生成機構²⁾

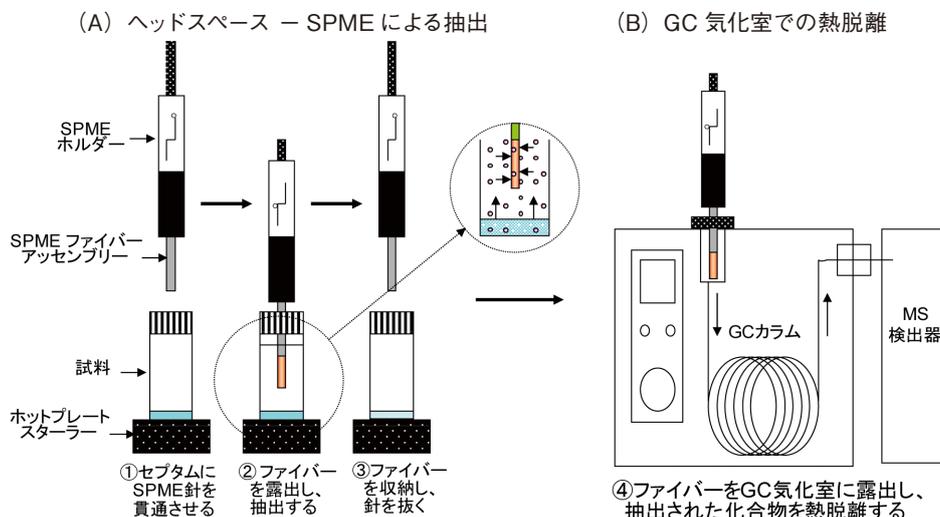


図2 ヘッドスペースファイバー SPME/GC-MS法の概要

また、化粧品の使用、食品摂取、喫煙やストレスなどによる体臭変化を解析するために、これらの事前・事後における皮膚ガス・皮膚滲出液を上記の方法によりサンプリングし、2-NonenalをHS-SPME/GC-MS分析した。

3. 結果

3.1 GC-MS分析法の確立

スキャンモード (m/z : 30-150) GC-MS法により、2-Nonenal (分子量140) 標準溶液のマスペクトルを分析した結果、図4に示すように分子イオンは検出されなかつ

たが、特徴的なフラグメントイオンとして、 $m/z=55$ 、83、111が検出されたことから、これらを選択してSIMモードで測定を行うこととした。また、図5に示すように同濃度の溶液をヘッドスペース法による直接注入 (MeOH溶液, 1 μ L) と、ファイバー SPME法を用いて比較したところ、SPME法により効率よく濃縮できることがわかった。

3.2 HS-SPME条件の最適化

SPME法は分配係数に従った化合物の移動による抽出法であるため、迅速かつ高い抽出率をあげるためには化合物

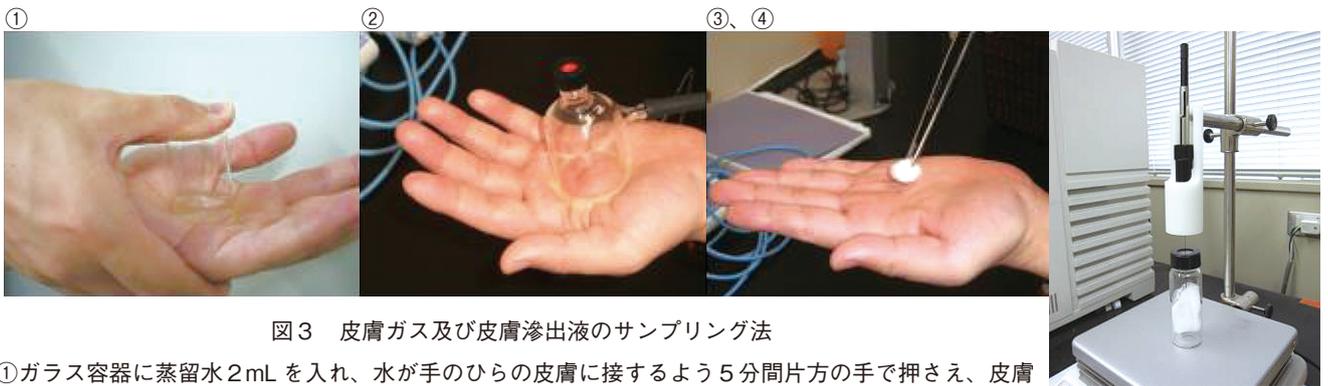


図3 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法

- ①ガラス容器に蒸留水2 mLを入れ、水が手のひらの皮膚に接するよう5分間片方の手で押さえ、皮膚滲出液を蒸留水中に抽出し、この溶液をバイアルに入れてHS-SPME抽出する。
- ②吸引カップを用いて、セプタムを通してSPMEファイバーを手のひらの上部に挿入し、直接HS-SPME法で5分間抽出する。
- ③脱脂綿またはガーゼ0.1 gで手のひら2 cm角の範囲を1分間拭き取り、バイアルに入れて、直接HS-SPME抽出する。(拭き取り法)
- ④脱脂綿またはガーゼ0.1 gを手のひらにテープで貼り付け、3時間後にバイアルに入れて、直接HS-SPME抽出する。(貼り付け法)

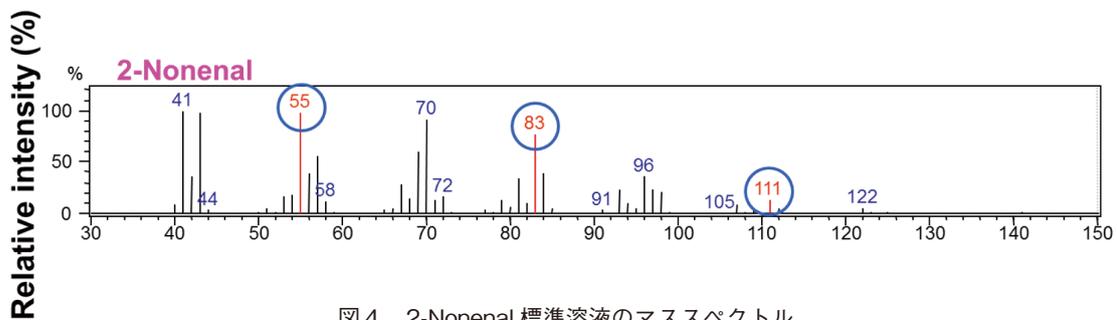


図4 2-Nonenal 標準溶液のマスペクトル

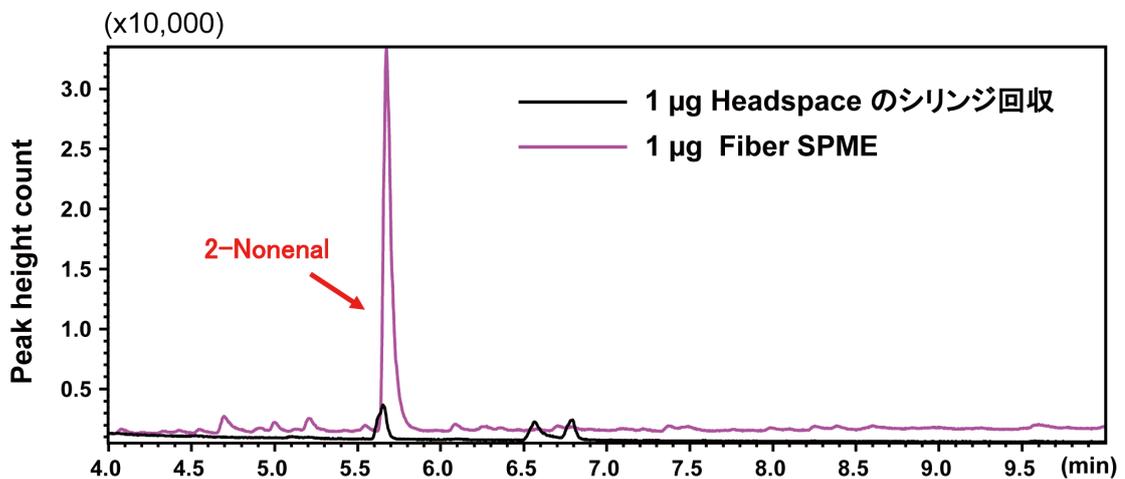


図5 ヘッドスペース法とSPME法により得られたクロマトグラム

のファイバー固定相への分配率を上げることが重要である。そこで、7種のファイバーを検討したところ、65 μ m Stable Flex PDMS/DVBファイバーを用いるとき、2-Nonenalを効率よく抽出できることから、以後の実験ではこのファイバーを用いることにした。

また、ガーゼ0.1gに5 ngの2-Nonenalを染みこませて、40 mLバイアル中で65 μ m Stable Flex PDMS/DVBファイバーを用いてHS-SPME抽出条件を最適化したところ、抽出温度50 $^{\circ}$ Cで45分間ファイバーをヘッドスペース中に曝露することにより、効率よく抽出濃縮できることがわかった。

3.3 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法の検討

図3の①～④の方法に従い、0.1gの脱脂綿またはガーゼを用いて、手のひらから皮膚ガス・皮膚滲出液をサンプリングし、HS-SPME/GC-MS分析したところ、図6に示すように、拭き取り法が最も効率よく2-Nonenalを回収できることがわかった。そこで、拭き取りに用いる脱脂綿とガーゼからの2-Nonenalの回収を比較するために、脱脂綿またはガーゼ0.1gをバイアル瓶に入れ、2-Nonenalを5 ng添加して、経時的にこれらの素材からの2-Nonenal

の回収量を測定した。図7に示すように、脱脂綿では回収にばらつきが見られ、ガーゼを使用することにより安定して回収できることから、拭き取り法及び貼り付け法ではガーゼを使用することにした。

ガーゼを用いた拭き取り法による2-Nonenalの回収率を求めるために、5 ngの2-Nonenalをシャーレにとり、ガーゼ0.1gで拭き取ってバイアルに入れ、HS-SPME/GC-MS分析した。直接5 ngの2-Nonenalをバイアルに入れて測定した場合と比較して、約60%の2-Nonenalが回収できることがわかった。

また、ガーゼでサンプリングした皮膚ガス・皮膚滲出液中の2-Nonenalの安定性を調べるために、2-Nonenal 1 μ g/mL標準溶液を40mLバイアルに入れて、密栓して室温、冷蔵、冷凍で保存し、24時間後に2-Nonenalの抽出、測定を行った。図8に示すように、冷凍保存することにより2-Nonenalの減少率は低かったことから、ガーゼでサンプリングした後、直ちにセプタム付バイアル瓶に入れて凍結保存すれば、2-Nonenalの分解を防ぎ安定した結果が得られることがわかった。

そこで、ガーゼを用いた拭き取り法による2-Nonenalの検量線、検出限界及び再現性について検討した。ガーゼ

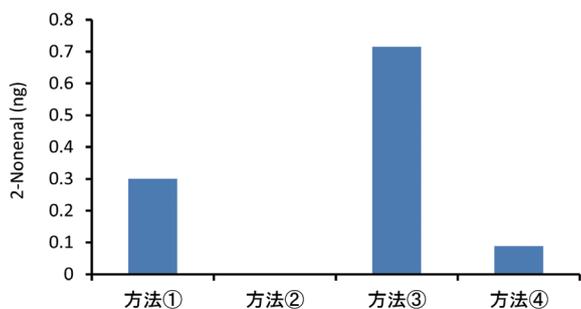


図6 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法の比較

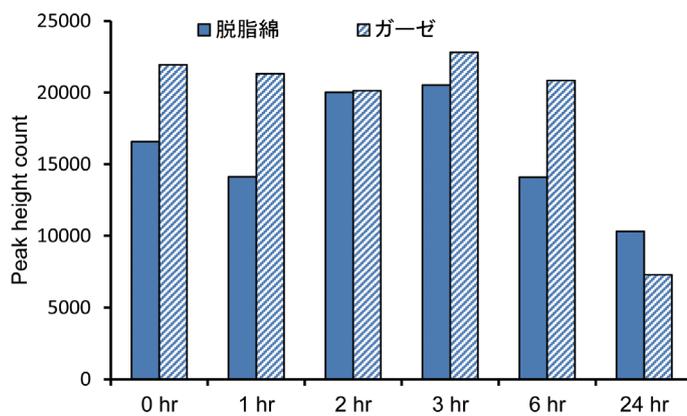


図7 サンプリング素材の比較

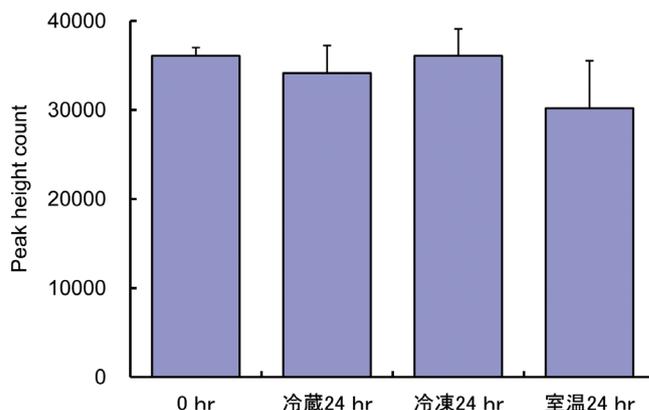


図8 サンプリング後のガーゼの保存条件の検討

0.1 g に 1 ~ 50 ng の 2-Nonenal を滴下し、HS-SPME/GC-MS 分析した結果、表 1 に示すように、相関係数は 0.991 と良好な直線性を示し、検出限界は 171 pg (S/N=3) と高感度に検出できることがわかった。また、日内及び日差変動における相対標準偏差 RSD は、それぞれ 9.6% 及び 3.6% と再現性良く定量できることがわかった。

3.4 体の各部位からの 2-Nonenal 分泌量と日内変化

被験者 3 名 (A: 20 代女性, B: 20 代男性, C: 30 代男性) について、体を石鹸で洗浄後、6 時間の通常の生活において分泌される 2-Nonenal を、額、腕、耳裏、腋からガーゼ拭き取り法 (0.1 g) により採取し、また、胸部、背中、枕からはガーゼ貼り付け法 (0.1 g) により採取し、HS-SPME/GC-MS 分析した。図 9 に示すように、個人差はあるものの、2-Nonenal は額、腕、耳裏から比較的多く分泌されていることがわかった。

そこで、洗浄した額 (2 cm × 2 cm 四方) の 4 箇所について、3 時間毎にガーゼ拭き取り法 (0.1 g) により皮膚ガス・皮膚滲出液を採取し、HS-SPME/GC-MS 分析したところ、2-Nonenal は 13 ~ 16 時の午後の時間帯に比較的多く分泌されていることがわかった。

3.5 化粧品使用、食品摂取、ストレスや喫煙などによる体臭への影響

体臭成分の一つである 2-Nonenal は、緒言に述べたよう

に、脂肪酸と過酸化脂質の反応によって生成すると言われており、脂肪や脂肪酸を多く含む食品の摂取や、脂質過酸化に関与する活性酸素の発生が大きな要因となっている。従って、飲酒や喫煙、ストレスなども体臭変化に影響すると考えられる。また、化粧品や体臭を消すと言われている消臭石鹸の使用も体臭変化に影響すると考えられる。そこで、本研究で開発した方法を用い、2-Nonenal をバイオマーカーとして化粧品使用や食品摂取、ストレスや喫煙など内的、外的要因による体臭への影響を解析した。

表 2 に示すように、低脂肪食 (肉を含まない) と高脂肪食 (牛焼肉 500 g) の後、12 時間後にガーゼ拭き取り法により額からサンプリングし、HS-SPME/GC-MS 分析したところ、高脂肪食で有意に 2-Nonenal が増加することがわかった。また、化粧水使用の有無や喫煙の前後においては、若干の 2-Nonenal の増加が認められたが有意な差ではなかった。ストレス負荷として、会議の前後 (精神的ストレス) や運動前後 (肉体的ストレス) においては、有意に 2-Nonenal が増加し、特に運動後は大量の 2-Nonenal が発生していることがわかった。これは、運動による発汗で皮脂腺から脂肪酸や過酸化脂質の分泌が増加し、体表中の常在細菌によって 2-Nonenal への酸化分解が促進されたものと思われる。

一方、最近デオドラント製品として市販されている柿渋石鹸による消臭効果を 50 歳代男性で調べた。普通の石けん水 (無添加) 及び柿渋石鹸 (柿タンニン配合) でそれぞれ

表 1 ガーゼ拭き取り法によるファイバー SPME/GC-MS 法のバリデーション

化合物	検量線			検出限界 (pg) ²⁾	日内変動 RSD(%) ³⁾	日差変動 RSD(%) ³⁾
	傾き	切片	相関係数			
2-Nonenal	6548.1	-19428	0.991	171	9.6	3.6

1) Calibration range: 1 ~ 50 ng, 7 point (n=21)

2) S/N=3

3) n=3

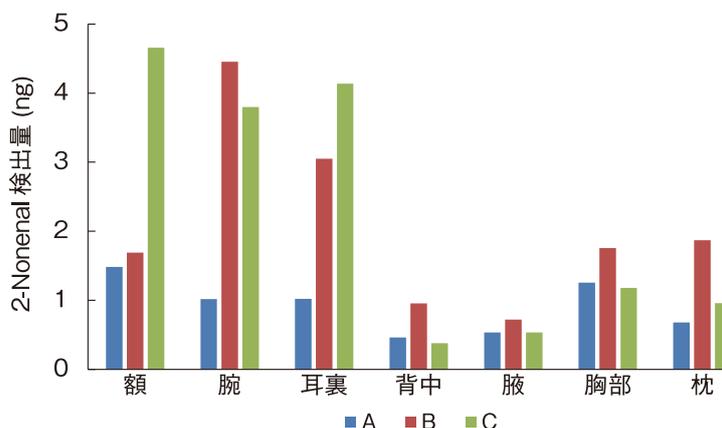


図 9 体表の各部位における 2-Nonenal 検出量の比較

表2 様々な生活習慣による体臭変化の解析

生体側の 状態	サンプリング			2-Nonenal 含量 (ng)	T-test
	体表部位	採取方法	時間	平均値±SD (n=3)	P 値
低脂肪食	額	拭き取り	12	0.487±0.096	
高脂肪食	額	拭き取り	12	0.697±0.088	0.0243
化粧なし	額	拭き取り	6	0.228±0.039	
化粧あり	額	拭き取り	6	0.263±0.077	0.2617
喫煙前	額	拭き取り	2	0.268±0.081	
喫煙後	額	拭き取り	2	0.373±0.097	0.1131
会議前	額	拭き取り	6	0.228±0.039	
会議後	額	拭き取り	6	0.353±0.093	0.0499
運動前	背中	貼り付け	6	0.045*	
運動後	背中	貼り付け	6	4.573*	↑
普通石鹸	胸部	貼り付け	7	0.433**	
柿渋石鹸	胸部	貼り付け	7	0.000**	↓
普通石鹸	首	貼り付け	7	0.886**	
柿渋石鹸	首	貼り付け	7	0.033**	↓

*含量は2回の測定の平均値、**含量は1回の測定結果である。

体を洗浄後、ガーゼ貼り付け法により、胸部及び首にガーゼを貼り、一晚睡眠後、起床時にガーゼを回収し、HS-SPME/GC-MS分析したところ、柿渋石鹸使用により、2-Nonenalの発生がほとんど認められなかった。これは、柿渋エキスによる殺菌効果によるものと思われる。

4. 考 察

本研究により、体臭成分の一つである2-NonenalをHS-SPME/GC-MSにより簡便かつ高感度に分析できることがわかった。皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法については、ガーゼ拭き取り法が効果的ではあるが、拭き取り方を一定にする必要があり、回収率や定量性に関してもまだ検討の余地がある。また、体臭は複合臭であり、2-Nonenalだけでなく他の体臭成分との相互作用や、前駆物質である9-Hexadecenic acidの動態についても解析する必要がある。今後、さらに効率的かつ簡便なサンプリング手法に改良し、2-Nonenalや他の体臭成分の生成及び分解のメカニズムを明らかにして、食習慣や生活習慣の改善による効果的な体臭対策法を検討していく予定である。

(謝 辞)

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Kataoka H., Saito K., Kato H., Masuda K., Non-invasive analysis of volatile biomarkers in human emanations for health and early disease diagnosis. (Review) *Bioanalysis*, 5 (11), 1443 – 1459, 2013.
- 2) Haze S., Gozu Y., Nakamura S., Kohno Y., Sawano K., Ohta H., Yamazaki K., 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J. Invest. Dermatol.*, 116, 520 – 524, 2001.
- 3) Pandey S.K., Kim K.-H., Human body-odor components and their determination. *Trends Anal. Chem.*, 30, 784 – 796, 2011.
- 4) Jiang R., Cudjoe E., Bojko B., Abaffy T., Pawliszyn J., A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Anal. Chim. Acta*, 804, 113 – 119, 2013.
- 5) Kataoka H., Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 339 – 364, 2010.
- 6) Kataoka H., Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 926 – 950, 2011.
- 7) Kataoka H., Solid-phase Microextraction: Biomedical Applications. in *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Edited by Jan Reedijk (Elsevier, Academic Press: Oxford, UK), 2014, in press.