

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22265

研究課題名（和文）新概念テルペノイド"スクアレン"の酸化制御で導く真のヒト体臭コントロールへの挑戦

研究課題名（英文）Challenges into the definite control of human odor by regulating the oxidation of a newly conceptualized terpenoid "squalene"

研究代表者

仲川 清隆（Nakagawa, Kiyotaka）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80361145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト体臭の多様性がスクアレンの酸化に起因することの証明に向け、（1）皮脂におけるスクアレンと脂肪酸の酸化評価、（2）スクアレン酸化物異性体由来の臭気成分の解析、（3）皮脂の酸化抑制を介した体臭制御に有効な抗酸化物質の探索、これらの課題に挑戦した。（1）を通じ、これまでに体臭の原因と考えられてきた脂肪酸の酸化と同様に、スクアレンの酸化も十分に体臭の原因となり得る可能性が見出された。加えて（2）により、スクアレンの酸化を介して生じる種々の臭気成分の化学構造や生成経路の一部を推定した。さらに（3）ではスクアレンの酸化、ひいては体臭の制御に有効と推測される抗酸化物質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2-ノネナールが体臭（特に加齢臭）の主原因とする二十年前の報告を契機に、ヒトの体臭に関する研究が広がり、現在では加齢臭という言葉は一般にまで広く認知されるに至った。また昨今は、体臭をはじめとする臭いによって他者に不快感を与えるスメルハラスメントが問題になるなど、社会的に体臭への関心が高まりつつある。しかし、こうした問題が生じるのは、結局のところ、既存の方法による体臭制御が未だ実現していないためである。こうした現状の中で、スクアレンの酸化を体臭の新たな原因と示唆する本研究成果の学術的・社会的意義とインパクト、波及性は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To prove that human odor is derived from the oxidation of squalene, we conducted (1) evaluation of the oxidation of squalene and fatty acids in human sebum, (2) analysis of odor components derived from squalene oxidation products, and (3) screening of antioxidants effective towards the regulation of human odor via controlling squalene oxidation. From (1), we were able to identify that squalene oxidation is a potential cause of human odor as in the known case of fatty acids. In (2), we analyzed the chemical structures of odor components derived from the oxidation of squalene, and partially estimated their generation pathways. In (3), we identified antioxidants that are effective towards preventing squalene oxidation, which potentially may be effective towards controlling human odor.

研究分野：食品科学

キーワード：テルペノイド 酸化 体臭

1. 研究開始当初の背景

2-ノネナールが体臭(特に加齢臭)の主原因とする二十年前の報告¹を契機に、ヒトの体臭に関する研究が広がり、現在では加齢臭という言葉は一般にまで広く認知されるに至った。また昨今は、体臭をはじめとする臭いによって他者に不快感を与えるスメルハラメントが問題になるなど、社会的に体臭への関心が高まりつつある。一方、2-ノネナールを標的とした既存の方法による体臭制御が未だ実現しておらず、真の体臭制御は実現していない。

我々は食品学の領域で、食品劣化や生体の細胞障害に関わる酸化物(特に脂質やビタミン等の酸化物)に着目し、定量に必須な標品を合成するとともに、MS/MS等の先端分析技術を活用して、これら酸化物の定量法の開発に成功した。さらに本法を駆使して、食品の酸化劣化やヒトの疾病における酸化障害の機構を解明し、食品成分による防御機能を明示してきた。最近では解析できる酸化物の構造を異性体レベルにまで発展させ、本技術を多様な領域に応用している。我々はその一環として、ヒト皮脂に含まれるテルペノイドであるスクアレンが酸化され、種々のスクアレン酸化物の異性体を生じることを見出した。加えてこれらのスクアレン酸化物から、体温ほどの温度でも極短時間の内に特徴的な酸味臭が生じることを発見し、スクアレンの酸化こそが体臭の主原因であるという新学説を着想するとともに、その酸化の抑制による体臭の制御に挑む、本研究を構想するに至った。

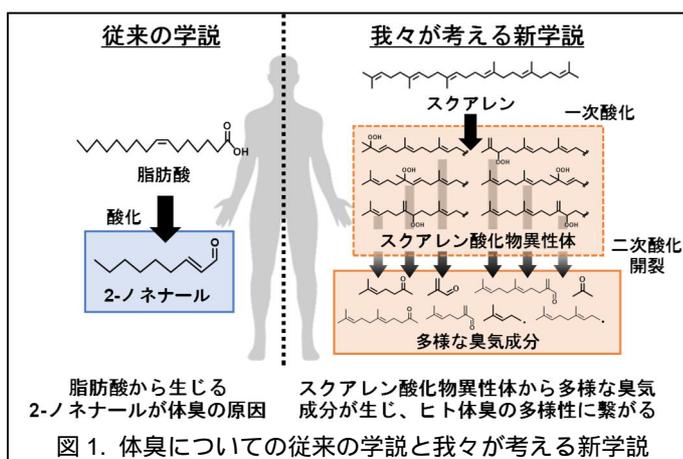
新たな体臭原因化合物の発見や、体臭制御に向けた新規方法論の確立が、学術的・社会的に強く望まれており、これに挑戦する本研究成果の社会的意義とインパクト、波及性は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

ヒトは誰しも匂い、即ち体臭を有する。現在、体臭(特に加齢臭)の主たる原因は皮脂の脂肪酸の酸化で生じる2-ノネナールと考えられ¹、その抑制に向けた試みが農・薬・医の多方面で行われている。しかし、2-ノネナールを標的とする体臭の抑制は、未だ達成されていない。2-ノネナールおよび他の臭気成分を生じさせ得る脂肪酸以外の新たな体臭原因化合物が皮膚にあり、その発見により、真の体臭制御の実現に繋がると我々は考えてきた。

我々は質量分析装置(MS/MS)を駆使し、食品や生体の酸化物を解析する中で、ヒトの皮脂にテルペノイドであるスクアレンの酸化物の異性体が存在することに気付いた^{2,3}。さらに極最近、こうした酸化物から、体温ほどの温度でも極短時間の内に特徴的な酸味臭が生じる手がかりを得た。故に、スクアレン酸化物の異性体が、それぞれ二次酸化・開裂を経て種々の臭気成分を生じ、ヒト体臭の多様性に繋がるという新学説が強く示唆される(図1)。

スクアレンは単一化合物として皮脂に最も多く、その化学構造的特徴から脂肪酸より容易に酸化されることも踏まえ、スクアレンこそが体臭原因化合物で、その酸化抑制を介した体臭制御が可能と推測するに至った。本研究ではこうした萌芽的新学説の証明を目的に、**(1)皮脂におけるスクアレンと脂肪酸の酸化評価、(2)スクアレン酸化物異性体由来の臭気成分の解析、(3)皮脂の酸化抑制を介した体臭制御に有効な抗酸化物質の探索**、これらの課題に挑戦した。



3. 研究の方法

(1) 皮脂におけるスクアレンと脂肪酸の酸化評価

上述のように、体臭の原因物質は脂肪酸酸化物由来であるとして考えられてきた。そこで、従来の学説と本研究における新学説の検証のために、スクアレンとリノール酸(皮脂における主要な不飽和脂肪酸)の酸化物について比較した。健常ボランティアから皮脂を採取し、スクアレンおよびリノール酸の酸化物をLC-MS/MSで解析した。

(2) スクアレン酸化物異性体由来の臭気成分の解析

スクアレン酸化物の種々の異性体を化学合成し、試験管試験(体温や湿度など実際の生活環境下を模した条件でインキュベート)による評価を進めた。GC-MSやLC-MS/MS等を用いて臭気成分を解析した。

(3) 皮脂の酸化抑制を介した体臭制御に有効な抗酸化物質の探索

皮脂の酸化抑制に効果的と予想される抗酸化物質を選定した。選定した抗酸化物質を添加した条件でスクアレンを酸化し、LC-MS/MS を用いて各抗酸化物質の皮脂酸化抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 皮脂におけるスクアレンと脂肪酸の酸化評価

皮脂の LC-MS/MS 分析の結果、測定した全ての被験者(通常の生活環境下)の皮脂からスクアレンおよびリノール酸(皮脂における主要な不飽和脂肪酸)の酸化物が検出された。その酸化物を定量して比較すると、スクアレンとリノール酸の酸化度は同程度であった。このことから、従来は体臭の原因物質の一つは脂肪酸由来と考えられていたが、本研究によりスクアレンも十分に体臭の原因となり得る可能性が見出された。

加えて、スクアレンとリノール酸の酸化物異性体の解析を通して、それぞれの酸化メカニズムを評価した。スクアレンは過去の我々の報告と同様に、一重項酸素酸化(光酸化)の関与が再確認された³。一方で、リノール酸の酸化にはフリーラジカルの関与が示され、スクアレンと脂肪酸は皮脂において異なるメカニズムで酸化を受けている可能性が新たに示唆された(図2)⁴。以上の結果から、皮脂の酸化抑制を介した体臭制御にあたっては、脂質種類ごとの酸化メカニズムを考慮する必要が見出された。

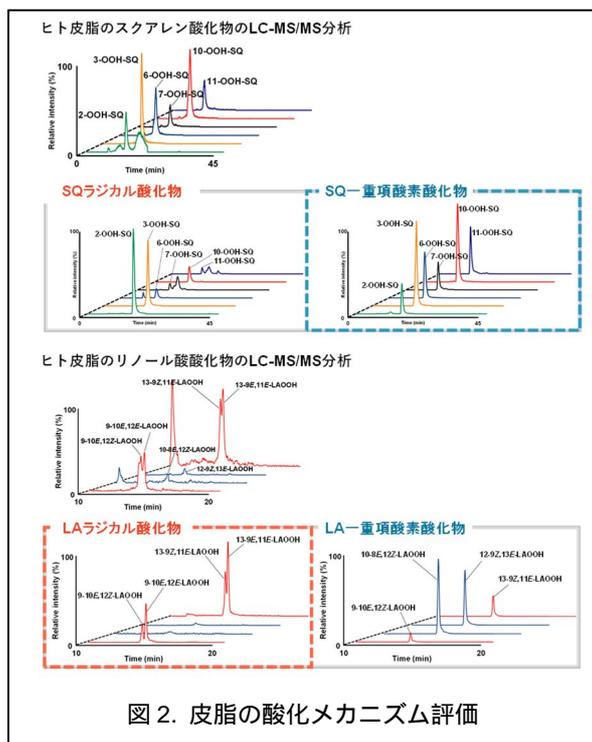


図2. 皮脂の酸化メカニズム評価

(2) スクアレン酸化物異性体由来の臭気成分の解析

上述の(1)の結果に基づき、スクアレンの酸化も十分に体臭の原因となり得る可能性が見出された。そこで、スクアレン酸化物の種々の異性体を化学合成し、体臭への影響評価を試みた。化学合成したスクアレン酸化物異性体を試験管内で乾固し、40℃でインキュベートすると、特徴的な酸味臭が生じるとともに、数時間の内に酸化物の量が半減した(図3)。したがって、体温ほどの温度でもスクアレン酸化物異性体は二次酸化・開裂を受け、臭気成分を生じる可能性が示唆された。インキュベートによって生じる臭気成分の同定に向けて各種条件を検討する中で、固相マイクロ抽出(SPME)とGC-MSを組み合わせた分析法を用いることで、スクアレン酸化物由来の臭気成分を分析できることを見出した。上記試験と同様の条件でスクアレン酸化物異性体をインキュベートし、構築したSPME-GC-MS法で臭気成分を解析した結果、スクアレンの開裂によって生成すると予想される臭気成分が確かに検出された(図3)。予備的にヒト皮膚由来の臭気成分を解析した際にも同様の化合物が検出されたため、更なるヒト試験を通じて体臭がスクアレン酸化物異性体由来であることが実証できると期待されたが、コロナウィルス感染症の感染拡大を受けて、被験者を募ってのヒト試験については研究期間内の実施を断念した。現在、関連機関と連携し、安全対策に十分に配慮しながらヒト試験の実施を計画中である。

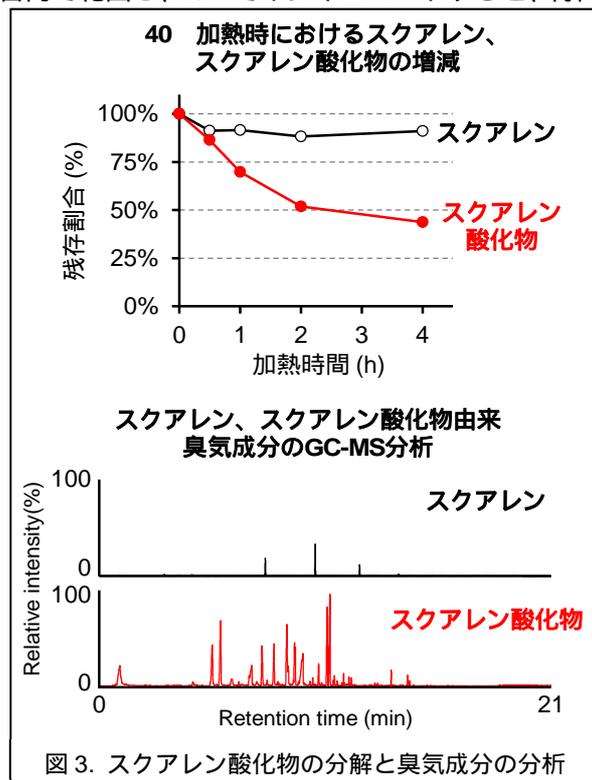


図3. スクアレン酸化物の分解と臭気成分の分析

(3) 皮脂の酸化抑制を介した体臭制御に有効な抗酸化物質の探索

上述(1)の結果より、皮脂の酸化抑制を介した体臭制御にあたっては、酸化メカニズムの種類を考慮する必要が見出された。そこで、スクアレンの一重項酸素酸化およびラジカル酸化を対象とし、各種抗酸化物質(約20種 A-S)によるスクアレンの酸化抑制効果を評価した。評価の結果、抗酸化物質の種類によって酸化抑制の程度が異なることに加え、抑制できる酸化メカニズムも異なることを見出された(図4)。一部の抗酸化物質では、一重項酸素酸化・ラジカル酸化の両者を抑制することも見出され、こうした抗酸化物質を用いることで皮脂の酸化抑制を介した体臭制御が可能であることが示唆された。当初、見出された抗酸化物質を実験動物に塗布し、それらの体臭への影響を評価する動物実験を計画していたが、コロナウィルス感染症の感染拡大により動物実験の実施が困難となったため、試験を断念した。動物試験についても関連機関と連携し、安全対策に十分に配慮しながら現在実施を計画中である。

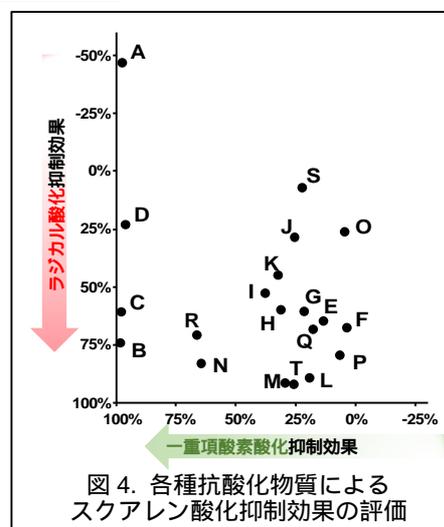


図4. 各種抗酸化物質によるスクアレン酸化抑制効果の評価

<引用文献>

1. 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 (4), 520-524 (2001).
2. Nakagawa K., Ibusuki D., Suzuki Y., Yamashita S., Higuchi O., Oikawa S., Miyazawa T. Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of squalene monohydroperoxide isomers in sunlight-exposed human skin. *J. Lipid Res.* 48 (12), 2779-2787 (2007).
3. Shimizu N., Ito J., Kato S., Eitsuka T., Saito T., Nishida H., Miyazawa T., Nakagawa K. Evaluation of squalene oxidation mechanisms in human skin surface lipids and shark liver oil supplements. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1457 (1), 158-165 (2019).
4. Ishikawa A., Ito J., Shimizu N., Kato S., Kobayashi E., Ohnari H., Sakata O., Naru E., Nakagawa K. Linoleic acid and squalene are oxidized by discrete oxidation mechanisms in human sebum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (in press).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Ayano, Ito Junya, Shimizu Naoki, Kato Shunji, Kobayashi Eri, Ohnari Hiroki, Sakata Osamu, Naru Eiji, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Linoleic acid and squalene are oxidized by discrete oxidation mechanisms in human sebum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水直紀, 伊藤隼哉, 加藤俊治, 永塚貴弘, 仲川清隆
2. 発表標題 ヒト皮脂中のスクアレンの酸化機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第154回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saoussane Khalifa, Naoki Shimizu, Junya Ito, Takahiro Eitsuka, Kiyotaka Nakagawa
2. 発表標題 Squalene oxidation and its effect on human keratinocyte cell line HaCaT
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF 2019) and The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲川清隆
2. 発表標題 脂質過酸化とファイトニュートリエントの有用性
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲川清隆
2. 発表標題 LC-MS/MS による脂質ヒドロペルオキシドの解析と酸化機構の評価
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会第20回日本NO学会 合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Khalifa Saoussane, Naoki Shimizu, Shunji Kato, Junya Ito, Takahiro Eitsuka, Kiyotaka Nakagawa
2. 発表標題 Squalene oxidation products and their effect on the human keratinocyte cell line HaCaT
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Khalifa Saoussane, 加藤俊治, 清水直紀, 伊藤隼哉, 永塚貴弘, 仲川清隆
2. 発表標題 スクアレン酸化物の合成・構造解析とヒト表皮角化細胞HaCaTに与える影響の評価
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川絢野, 伊藤隼哉, 小林エリ, 坂田修, 成英次, 仲川清隆
2. 発表標題 LC-MS/MSによるヒト皮膚のコレステロールエステルヒドロペルオキシドの存在証明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隼哉, 石川絢野, 清水直紀, 加藤俊治, 小林エリ, 坂田修, 成英次, 仲川清隆
2. 発表標題 LC-MS/MSによる皮脂における脂質過酸化メカニズムの評価
3. 学会等名 第45回日本化粧品学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Khalifa Saoussane, Kato Shunji, Enomoto Masaru, Nakagawa Kiyotaka
2. 発表標題 Squalene novel secondary oxidation product: structural elucidation, mechanism of formation and relative abundance in skin surface lipids
3. 学会等名 日本油化学会第59回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川絢野, 伊藤隼哉, 清水直紀, 加藤俊治, 小林エリ, 坂田修, 成英次, 仲川清隆
2. 発表標題 LC-MS/MSを用いたヒト皮脂の脂質酸化メカニズムの評価
3. 学会等名 日本油化学会第59回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学大学院農学研究科 機能分子解析学分野ホームページ https://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubun/index-j.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永塚 貴弘 (Eitsuka Takahiro) (30445895)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	伊藤 隼哉 (Ito Junya) (50781647)	東北大学・農学研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関