

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02333

研究課題名(和文)生活素材の経日劣化による生体有害性アルデヒドの発生とその防止対策に関する研究

研究課題名(英文) Research on the generation of biohazardous aldehydes due to degradation of the daily use materials over time and measures to prevent the generation of biohazardous aldehydes

研究代表者

前田 憲寿 (Maeda, Kazuhisa)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：50454137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ある特定の界面活性剤(可溶化剤)に経時劣化によってアルデヒド・アクロレインを発生することがわかった。ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する経時劣化した化粧品および化粧品原料に化粧品に配合可能な抗酸化剤の効果を調べた結果、100pm以上のイーミックス-Dに抑制効果が認められた。ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する界面活性塗布によって皮膚内にホルムアルデヒド、アクロレインが検出されることがわかった。これらは皮膚内タンパク質、特に寿命の長い基底膜タンパク質と反応して生成したアミノカルボニル化タンパク質がメラニンの生成を促進し、シミの発生に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化粧品に配合されているどのような原料の経年劣化によってホルムアルデヒドやアクロレインが発生するかを調べた報告やそれらの発生を防ぐ方法を示した報告はなかった。本研究では、化粧品やどのような原料の経年劣化によってホルムアルデヒドやアクロレインが発生するかを調べるとともに、それらの発生を防ぐ方法や皮膚に悪影響を及ぼす発生量であるか否かを明らかにすることができた。本研究の成果としては、化粧品に経年劣化で生体に有害なアルデヒドを発生する成分を配合していないことを裏付ける評価方法のひとつとして利用できることを提案する。

研究成果の概要(英文)：It was found that certain surfactants (solubilizers) generate aldehydes and acrolein due to degradation over time. The effect of antioxidants that can be formulated into cosmetics on aged cosmetics and cosmetic ingredients that generate formaldehyde and acrolein was investigated, and the inhibitory effect was observed in e-mix-D at more than 100 pm. Formaldehyde and acrolein were found to be detected in the skin by surfactant applications that generate formaldehyde and acrolein. These aminocarbonylated proteins generated by reaction with proteins in the skin, especially long-lived basement membrane proteins, were thought to promote melanin production and contribute to the development of pigmentation spots.

研究分野：化粧品科学

キーワード：化粧品 アルデヒド カルボニル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本では、化粧品にホルムアルデヒドは使用不可となっている。また、ホルムアルデヒド遊離型防腐剤(製品中で分離してホルムアルデヒドを生成する)のうち2種類(DMDMヒダントイン、イミダゾリジニル尿素)が粘膜に使用されることがない化粧品のうち洗い流すものに0.3%以下配合可能となっている。このように、ホルムアルデヒドに関しては規制されているが、原料の経年劣化によって発生するホルムアルデヒドについては規制されていないのが現状である。また、原料の経年劣化によって発生するアクロレインについては全く検討されていないのが現状である。アクロレインは油の酸化劣化によって生成され[1]、環境毒性が強いばかりではなく、細胞の核にもダメージを与える。

国内外の文献を調査した結果、化粧品からホルムアルデヒドが検出された報告[2,3]はあるが、どのような原料から経年劣化によってホルムアルデヒドやアクロレインが発生するかを調べた報告やそれらの発生を防ぐ方法を示した報告はなかった。

我々は、アルデヒドでタンパク質をアミノカルボニル化させた表皮基底膜上で表皮角化細胞を再構築培養すると、保湿機能と角層のバリア機能が低下することを報告した[4]。基底膜タンパク質のアミノカルボニル化が表皮細胞の角化の乱れにより、肌荒れを引き起こす要因のひとつであることを明らかにした。また、アミノカルボニル化によってコラーゲンが黄色化することが皮膚の黄ぐすみを引き起こす要因のひとつであることも報告されている[5]。アミノカルボニル反応は生体内糖化反応すなわち、グルコースなど還元糖のカルボニル基がタンパク質やアミノ酸のアミノ基と反応し、シッフ塩基(C=N:アルジミンとも呼ばれる)を形成しても生じる。しかしながら、皮膚は化粧品や外用剤などの影響を直接受ける臓器であり、化粧品や外用剤に配合されている原料からホルムアルデヒドやアクロレインが発生すると、タンパク質内のリジンやアルギニン残基を修飾・架橋形成し、タンパク質の立体構造を変え、活性や物性に大きく影響を及ぼす。

高温環境下や直射日光下の保管による経年劣化によって、化粧品配合成分からホルムアルデヒドやアクロレインなどの生体に有害なアルデヒドの発生について文献調査した結果、化粧品および化粧品原料の経年劣化によるホルムアルデヒドやアクロレインの発生について調べた報告はなかった。そこで、ヒマシ油系界面活性剤を50で保管すると、経時でホルムアルデヒドとアクロレインが発生することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、化粧品成分からの生体に有害なホルムアルデヒドなどの飽和アルデヒドやアクロレインなどの不飽和アルデヒドの発生を予測する方法を構築し、これらの発生を防止する素材を探索することである。具体的には、加速試験すなわち50の恒温器に化粧品および化粧品原料を3日、7日、14日保管し、ホルムアルデヒドなどの飽和アルデヒドとアクロレインなどの不飽和アルデヒドの発生量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定する。また、アルデヒドを発生する構造を明らかにし、これらの発生を防止する素材を探索する。さらに、外用した場合の皮膚透過率を推定する。化粧品をはじめ、服飾、服飾雑貨、食品、洗剤などの日用品に経年劣化でアルデヒドを発生する成分が使用されている。使用量・使用頻度を制限することなく、それらを日常自由に使用するものであるため、長期使用による健康被害は決して発生させるはならない。本研究の成果としては、化粧品に経年劣化で生体に有害なアルデヒドを発生する成分を配合していないことを裏付ける評価方法のひとつとして利用できることを提案する。化粧品配合成分の経年劣化で生体に有害なアルデヒドを発生する場合でも、アルデヒドの発生を防止する素材を探索することにより、この防止成分を配合することによって、アルデヒド量を検出限界以下に抑えることができる。

### 3. 研究の方法

(1)加速試験による化粧品および化粧品原料からのホルムアルデヒド、アクロレインの発生量の測定(令和2年6月~令和2年12月)

12種類の異なる界面活性剤・ゲル化剤を使用した化粧品ならびに30種類の界面活性剤・ゲル化剤を、0、25、37、50で14日まで保管し、保管前、3日目、7日目、14日目に100μLずつサンプリングし、保管し2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)溶液10μLを加えて20分間反応後にHPLCで定量した。標品:TO11/IP-6A Aldehyde/Ketone-DNPH Mixを用いた。標品のピークを15ppmとし、各化粧水サンプルのホルムアルデヒドとアクロレイン濃度を算出した。

#### HPLC条件

カラム:CAPCELL PAK C18 4.6mm×250mm 5μm、カラム温度:40、移動相:アセトニトリル(A)/水(B)(60:40)、流量:1mL/min、波長:360nm、注入量:10μL、グラジエント条件:0min 60%A、7min 60%A、20min 100%A

界面活性剤・ゲル化剤は洗い流さない化粧品に配合されているノニオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、シリコン界面活性剤、ゲル化剤を用いた。例としてグリセリン脂肪酸エステル、高級脂肪酸 PEG グリセリル類、シヨ糖脂肪酸エステル、水添ヒマシ油類、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロプレングリコール、ポリソルベート類、アミノ酸系界面活性剤、シリコン系界面活性剤、ヤシ油脂肪酸系界面活性剤、アクリル酸系ゲル化剤など。

(2) 加速試験による化粧品および化粧品原料からのホルムアルデヒド、アクロレインの発生量に対する抗酸化剤の影響 (令和3年1月~令和3年6月)

(1) でホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品および化粧品原料に化粧品に配合可能な抗酸化剤 ( $\delta$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\alpha$ -トコフェロール、ピロ亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシトルエン等) の効果を(1)の試験方法に濃度を変えて添加して、サンプルのホルムアルデヒドとアクロレイン濃度を算出した。

(3) ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料の皮膚内推定濃度の測定 (令和3年7月~令和3年12月)

皮膚内推定濃度は、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料のオクタノール/水分係数 ( $K_o/w$ ) を測定して、Potts & Guy の皮膚透過係数予測式 より皮膚透過係数を求め、購入した切除ヒト皮膚を用いて拡散セルで *in vitro* 皮膚透過速度を測定して Fick の拡散第1法則 より、 $1.5\text{cm}^2$  暴露での皮膚透過量を計算して、その値を皮膚湿重量で割って皮膚内濃度を推定する方法で行った。

Potts & Guy の皮膚透過係数予測式 :  $\log P (\text{cm/s in P}) = -6.3 + 0.71 \times \log K_o/w - 0.0061 \times MW$

Fick の拡散第1法 :  $dQ/dt = PCv$

MW : 分子量, Q : 皮膚透過量 ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ), t : 暴露時間, Cv : 暴露濃度 ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )

なお、脂溶性(または水溶性)の程度を表すオクタノール/水分係数は一般的に透過係数と比例することが知られており、電解質のオクタノール/水分係数 ( $K_o/w$ ) は pH によって変化するため、pH によってイオン性化合物の経皮吸収は異なる。Henderson-Hasselbalch の式より導かれる式③より、イオン性化合物は pH によって経皮吸収されやすい分子型とほとんど経皮吸収されないイオン型の比率が変わるので、水相を化粧品の通常の pH である pH6.2 に調整してオクタノール/水分係数を測定した。

$C_{\text{union}} + C_{\text{ion}} = C_{\text{union}} (1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}})$  ③

$C_{\text{union}}$ : 分子型(非解離型)、 $C_{\text{ion}}$ : イオン型(解離型)

(4) ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料の皮膚透過速度の算出 (令和4年1月~令和4年5月)

ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料を含む化粧水の処方(100g 中グリセリン 4g、1,3-ブタンジオール 6g、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料 0.2g、フェノキシエタノール 0.35g、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料は後述する量、pH6.2 に水酸化カリウム調整、残りは水) を作製した。

フランツ型拡散セル (37 恒温循環水) に切除ヒト皮膚、三次元皮膚モデルを装着し、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料を含む化粧水  $15\mu\text{L}$  を表皮側 ( $1.5\text{cm}^2$ ) に塗布した。レシーバー相をマグネットスターラーで攪拌し、20分毎に2時間まで  $100\mu\text{L}$  ずつサンプリングした。サンプルは  $-30^\circ\text{C}$  で保管し、後日、レシーバー相のホルムアルデヒド、アクロレインの濃度を HPLC で測定した。測定条件は(1)の通りである。また、1g の皮膚をクロロホルム:メタノール (2:1) に一晩浸漬し、脂質を除去後に水分を凍結乾燥機で除き皮膚の乾燥重量を測定した。湿重量から乾燥重量を引いた値を皮膚固形分とし、残りをホルムアルデヒドとアクロレインが溶解する皮膚流動分とした。

(5) 培養ヒト再構成モデル皮膚に対するホルムアルデヒドとアクロレインの影響 (令和4年6月~令和5年3月)

皮膚に対するホルムアルデヒドとアクロレインの影響を培養ヒト再構成モデル皮膚で調べた。化粧品原料の酸化によって生成したホルムアルデヒドやアクロレインなどのアルデヒドと皮膚内タンパク質、特に寿命の長い基底膜タンパク質と反応して生成したアミノカルボニル化タンパク質がメラニンの生成にどのように関与しているかを調べた。

#### 4. 研究成果

加速試験条件で化粧品を保管し、生体に有害なアルデヒド(ホルムアルデヒド、アクロレイン)量を HPLC で測定することを目的として実験を行った。化粧品に配合されている原料(界面活性剤・ゲル化剤)を加速試験条件で保管し、生体に有害なアルデヒド(ホルムアルデヒド、アクロレイン)量を HPLC で測定した結果、ある特定の界面活性剤(可溶化剤)にアルデヒド・アクロレインを発生することがわかった。

次に、その防止方法と皮膚内濃度の測定を行った。ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品および化粧品原料に化粧品に配合可能な抗酸化剤 [イーミックス-D ( $d$ - $\delta$ -トコフェロール 81%以上)、ピロ亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシトルエン、アスコルビン酸] の効果を調

べた。界面活性剤を使用した化粧品ならびに界面活性剤を上記抗酸化剤あり・なしの条件で、50 で 14 日間保管し、保管前、14 日目に 100 $\mu$ L ずつサンプリングし、DNPH 溶液 10 $\mu$ L を加えて 20 分間反応後に HPLC でホルムアルデヒドとアクロレイン濃度を算出した。その結果、100pm 以上のイーミックス-D に抑制効果が認められた。

皮膚内推定濃度は、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する化粧品原料のオクタノール/水分係数(Ko/w) を測定して、Potts & Guy の皮膚透過係数予測式より皮膚透過係数を求め、培養ヒト再構成モデル皮膚およびヒト皮膚を用いて拡散セルで *in vitro* 皮膚透過速度を測定して Fick の拡散第 1 法則より、1.5cm<sup>2</sup> 暴露での皮膚透過量を計算して、その値を皮膚湿重量で割って皮膚内濃度を推定する方法で行った。その結果、ホルムアルデヒド、アクロレインの発生する界面活性塗布によって皮膚内にホルムアルデヒド、アクロレインが検出されることがわかった。

さらに、皮膚に対するホルムアルデヒドやアクロレインの影響を培養ヒト再構成モデル皮膚で調べた。化粧品原料の酸化によって生成したホルムアルデヒドやアクロレインなどのアルデヒドと皮膚内タンパク質、特に寿命の長い基底膜タンパク質と反応して生成したアミノカルボニル化タンパク質がシミの発生にどのような関与しているかを調べた。真皮のアミノカルボニル化は透明感の低下を引き起こし、基底膜のアミノカルボニル化は表皮の角化に影響を与え、角層の保湿・バリア機能を低下させることがわかった。さらに、基底膜のアミノカルボニル化はメラニンの生成を促進し、シミの発生に関与していると考えられた。

#### 参考文献

1. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1998;273(26):16058-16066.
2. 鈴木淳子, 蓑輪佳子, 中村絢. 化粧品から検出されたホルマリン, 防腐剤及び紫外線吸収剤の検査結果 (平成 20 ~ 23 年度), *東京健安研七年报.* 2013;64:61-69.
3. 中村絢, 橋本秀樹, 立川孟, 蓑輪佳子, 中村義昭, 鈴木仁, 守安貴子.
4. 化粧品における配合成分の検査結果 (平成 27 年度) *東京健安研七年报.* 2017;68:91-98.
5. Morimoto H, Gu L, Zeng H, Maeda K. Amino Carbonylation of Epidermal Basement Membrane Inhibits Epidermal Cell Function and Is Suppressed by Methylparaben. *Cosmetics.* 2017;4(4): 38.
6. Ogura Y, Kuwahara T, Akiyama M, et al. Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J Dermatol Sci.* 2011;64(1):45-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------