

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) 医薬部外品及び化粧品に配合される成分によるアレルギー発症の防止に関する研究
(英語) Research on prevention of allergy caused by ingredients contained in
quasi-drugs and cosmetics

研究開発実施期間：平成30年4月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 安達 玲子
(英語) Reiko Adachi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長
(英語) Section chief, Division of Biochemistry, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

医薬部外品・化粧品等の原料としてタンパク質由来成分が多く用いられている。わが国では、加水分解コムギ末を含有する洗顔石けんの使用者がコムギタンパク質により経皮的・経粘膜的に感作されてコムギに対する食物アレルギーを発症するという事例が多く報告され、重大な社会問題となった。一方、コムギ以外のアレルゲンタンパク質性成分が原因と考えられるアレルギー発症事例も少数ながら報告されており、このような事例についても、原因究明及び防止のための検討を実施することが必要である。そこで本研究では、医薬部外品・化粧品に配合されるタンパク質性成分によるアレルギー発症に関する臨床的知見の集積、アレルゲン性の評価、タンパク質の皮膚移行及びその影響因子、分子量に関する解析並びに試験法の構築、及び、医薬部外品原料規格に関する提案等を目的として、下記4項目に関する検討を行った。

(1) 研究開発項目1の成果：医薬部外品等のタンパク質性成分の抗原性等に関する解析

医薬部外品等に含有されるタンパク質性成分の経皮感作性に関する動物モデルを用いた検討を行った。雌性BALB/cマウスを用い(1群5匹)、背面片側を剃毛して、抗原の3日間連続貼付/4日間休止というサイクルを4週繰り返して、経皮感作を行った。その後血清中の抗原特異的IgE及びIgG1抗体をELISA法により測定した。感作終了翌日に抗原を腹腔内投与してアナフィラキシー反応を惹起し、体温低下、アナフィラキシー症状スコアリング、血清中ヒスタミン濃度の測定を行った。また試験系の改良として、経皮感作後の複数回の抗原経口投与によりアレルギー症状を誘導する実験系について検討し、アレルゲンタンパク質を用いて経皮感作後に経口惹起が可能であることを確認した。

先行研究班(平成27-29年度医薬品等規制調和・評価研究事業「医薬部外品及び化粧品配合成分の安全性確保のための規格等に関する研究」)では、わが国の食品表示制度における特定原材料等(表示対象アレルゲン)である卵、乳、大豆等の加水分解タンパク質検体を業界団体より入手して上記実験系を用いて検討し、顕著な経皮感作性は見られないことを報告した。本研究班では、研究開発項目3において症例が報告されたオート麦・トウモロコシ(石鹼に含有、各1例)、及び魚由来コラーゲン(化粧品に含有、3例)に関して経皮感作性を検討した。その結果、オート麦及びトウモロコシタンパク質では経皮感作性が認められた。一方魚由来コラーゲン/加水分解コラーゲン9検体(患者試験陽性検体を含む)に関しては、1検体で若干のアレルギー症状が検出されたが顕著な経皮感作性は確認されなかった。本実験系を用いたこれまでの検討では、加水分解コムギや特定原材料等高いアレルゲン性を有するタンパク質は顕著な経皮感作性を示すこと、分解に伴って経皮感作性が低下すること等が示されている。コラーゲンに関する検討結果に関しては、コラーゲンの本来のアレルゲン性や、溶液状検体の場合に実験系に適用できる用量が低くなること、数年間の継続的使用で感作された症例の状況を動物試験で再現することが難しい等の要因が考えられた。今後より幅広く対応可能な試験系への改良が必要である。

タンパク質による経皮感作時の共存物質の効果を検討するため、化粧品等に汎用されるアルコール類がアレルゲンタンパク質による経皮感作に与える影響について解析した。その結果、経皮感作をやや抑制する傾向が見られた物質もあった。

(2) タンパク質の皮膚移行及びその影響因子に関する物理化学的解析

タンパク質のような高分子は通常、角層を透過しないため、感作は成立しないと考えられる。これまでの検討で、皮膚の状態や共存する界面活性剤によりタンパク質の皮膚内に移行する可能性が高まることを見出した。本研究では、タンパク質自身の性質による皮膚移行性の変化から感作実験の条件設定に役立つ因子を界面化学の視点から抽出するとともに、共存物質として化粧品に汎用される成分の影響、また、皮膚の状態を変化させる外用剤との関係を検討し、皮膚移行の観点から安全性を検討した。

タンパク質溶液の表面張力は、卵白アルブミン(OVA)溶液では濃度の上昇とともに表面張力の低下が見られ、水の表面張力72 mN/mに比べ、10%溶液では55 mN/mと明らかな低下をもたらした。加水分解小麦タンパクやグルパール溶液は、不溶物があるため、濃度の特定はできなかったが、上澄の表面張力はいずれも45 mN/m程度

であり、また、皮膚との接触角が 65 度程度となり、水の約 90 度に比べ濡れやすくなることが示された。

より皮膚移行性を高め、感作試験が感度よく行われる条件設定のため、試料溶液と皮膚との親和性の測定方法について検討した。皮膚の表面自由エネルギー測定から求めた極性成分と分散成分を用いて、接触角の等値線であるウェティングエンベロープを作成した。水系に化粧品等に汎用されるプロピレングリコールなどのアルコール類を添加すると皮膚との親和性が高まることを明らかにした。アルコール類 50%含む蛍光標識卵白アルブミン(FITC-OVA) 溶液を健常 Yucatan micropig 皮膚へ適用したところ、開放系では水溶液と大きな違いはなかったが、閉塞系では角層への移行が増大する傾向が見られた。

保湿クリームのような半固形製剤について表面自由エネルギーの測定方法を確立した。また、皮膚適用時の皮膚表面自由エネルギーを測定したところ、クリーム剤では極性成分が増大し、水溶液との親和性増大が予測された。健常皮膚において、ワセリン塗布後に FITC-OVA 溶液を適用するのでは無塗布と差が見られなかったが、W/O クリーム塗布では角層への OVA の移行が観察され、O/W クリームの場合は、角層のみでなく表皮への OVA の移行がしばしば観察された。角層への浸透は皮膚表面自由エネルギーの極性成分増大により OVA 溶液が拡張濡れを示すためと考えられる。損傷皮膚にワセリンまたはクリームを適用後、OVA 溶液を適用したところ、脱脂皮膚においては健常皮膚と同様、クリーム塗布後で皮膚移行が高まる傾向が見られた。擦過皮膚において、無塗布ではすべての擦過部分に OVA の蛍光が観察されるが、ワセリンや W/O クリームでは、OVA が観察されない擦過部も見られた。

以上の結果から、適用する製剤が皮膚との親和性が高くなるような成分を含む場合、皮膚の親水性が高くなるなど、表面自由エネルギーが大きくなる場合のいずれにおいても皮膚と製剤の親和性が高くなり、OVA の皮膚移行が高まることが明らかとなった。また、製剤と皮膚の表面自由エネルギーから、皮膚移行性について予測できる可能性が示された。角層深部にまでタンパクが移行すれば、ランゲルハンス細胞による取り込みによる感作の可能性が示唆される。

(3) 医薬部外品等のタンパク質性成分によるアレルギー発症に関する臨床的情報収集及び解析

医薬部外品等のタンパク質性成分によるアレルギー発症に関する臨床的情報の収集のため、疫学アンケート調査、一般社団法人 SSCI-Net (理事長：松永) の登録症例の確認、臨床研究データベース MINERVA (研究代表：松永) 登録症例の確認を行い、該当症例を抽出した。その結果、複数例が確認されたものとして、最頻はコチニール色素 (9 例) で、コラーゲンが確認された。また、クラゲ刺傷と関連のない納豆 (PGA ; ポリγグルタミン酸) アレルギーが複数確認され、医薬部外品や化粧品中の PGA による感作の可能性が疑われた。また、卵アレルギー患者で卵由来タンパク質成分を含む化粧品で重篤なアレルギー症状が誘発された例もあった。

収集された症例のうち、通院中であった症例については、調製した抗原試薬によるプリックテスト (SPT)、血清を用いた抗原解析を行った。コチニールアレルギーにおいてはカルミンの SPT が有用であり、製品の SPT が陰性であってもカルミンで陽性となる例があった。様々な抗原試薬を調製し、SPT における診断の有用性は確認できたものの、至適条件設定には症例数が足りないと思われた。ただし、低濃度から慎重に SPT を施行することで、安全な検査は可能と思われた。抗原解析の結果、医薬部外品等のタンパク質成分による経皮感作食物アレルギーと一般の食物アレルギーの鑑別が可能な抗原として、脱アミド化 LMW-グルテニンなどが確認されたものの、通常診療における鑑別診断につながる基準の作成は困難であった。医薬部外品等が食物アレルギーの発症に関連する可能性を常に疑って診療にあたるのが最も重要であり、そのための情報提供として、整理された情報を講座 HP 上に掲載した (<http://fujita-hu.ac.jp/~allergy/useful>)。

茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの発症に、LMW-グルテニンの脱アミド化物が関連したことを患者血清、および動物モデルで確認できた。この知見は、加水分解コムギ原料の安全性評価の指標となる可能性がある。

(4) 医薬部外品等のタンパク質性成分の分子量分布等の解析及び試験法の開発

近年、医薬部外品や化粧品には食物由来タンパク質性成分が広く用いられている。過去に加水分解コムギ成分による健康被害事例があったが、これ以外のタンパク質性成分に対しても少数であるが、アレルギーの発症事例

が報告されている。医薬部外品原料規格の各成分の基準規格は、安全性の観点で設定されているものが少なく、同様のアレルギーの発生を防止するためには、成分の分子特性を解析して、規格等に反映させることが必要である。そこで本研究は、医薬部外品等に使われる、食物等と共通するタンパク質性成分についてプロファイル解析するとともに、それら成分の諸外国の規制基準を調査した。動物を用いた経皮感作性試験の結果等と比較し、各成分に対して新たな感作を防止するための規格試験法の提案が必要か示すこととした。

諸外国における化粧品配合成分のアレルゲン性に関する基準・規格及びその試験法について調査した。調査対象は、特定原材料として卵、乳、小麦、ピーナッツ、また特定原材料に準ずるものとして大豆由来の成分とした。欧州で基準が設定されている成分で、今回対象となった成分はピーナッツ油と加水分解コムギタンパク質の2成分のみであった。ピーナッツ油は製品中の含有濃度、加水分解コムギタンパク質はペプチドの平均分子量が規定されていた。米国 CIR が評価を行った食品由来成分は多数抽出された。例えば、加水分解コムギタンパク質等は「ペプチドの平均分子量を 3500Da 以下に制限するように配合すると、安全である。」と評価するように、成分の製品や使用方法を制限もしくは禁止することはせず、その製造会社にその対応を委ねていた。国内外の化粧品原料メーカーの一部は原料について、平均分子量もしくは成分中タンパク質濃度を規定している成分もあったが、その規格確認のための分析法等は得られなかった。

卵、乳、大豆、シルク及びコメ由来の各種タンパク質の加水分解物成分の分子プロファイルを解析した。市販検査キットを用いてタンパク質濃度を測定した結果、固体試料はその重量の 70~80% がタンパク質であるが、液体試料は検査キットの検出下限以下のタンパク質濃度しか含まれないものもあった。各試料のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 像は NIST タンパク標準品と比較すると明瞭なバンドはほとんどなく、低分子量側にスミアな状態になっていた。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) での測定には、「加水分解コムギ末」の試験で用いたものよりも低分子量側の分布を測定対象とするカラムの方が良いことがわかった。加水分解卵殻膜と一部成分については 1 万以上の高分子量タンパク質が多かったが、その他成分はそれ以下の分子量の成分がほとんどで、重量平均分子量も数千であった。

LC-MS/MS 及び食物アレルゲン検査キットを用いた試験を実施し、エピトープ (抗原性を有するペプチドの最小単位) 等が含まれるかどうか調査した。乳、卵、大豆加水分解物にエピトープの残存を確認した。しかし、これら試料は、先行研究班における動物を用いた経皮感作性試験ではいずれも抗原特異的な IgE 抗体の産生が認められなかった。また、各試料において、高分子量分子の分布割合とエピトープの残存量との間に関係性は認められなかった。コムギグルテンを酸、アルカリ、酵素分解したものは処理時間が長くなるとアレルゲンが経時的に減少したが、アルカリまたは酵素による分解物では 24 時間後にも高濃度のアレルゲンが残存していた。この傾向は、SDS-PAGE 及び分子量分布試験での変化と類似していたが、感作性試験とは必ずしも相関しなかった。

以上、今回の試料について、感作誘導防止の観点で分子量分布試験等の新規規格基準の設定は必要ないと考えた。

<総括>

これら 4 項目に関する研究により、医薬部外品・化粧品等の成分による健康被害防止のために有用であり、かつ社会的・行政的に必要とされている多くの実際的な知見を得ることができた。医薬部外品等のタンパク質性成分による経皮感作事例に関しては、研究開発項目 3 において実態を概ね把握することができ、現時点で速やかに対応すべきものはないと思われた。しかし少数ではあるが報告が続いており、今後も継続的に情報収集し実態把握に努めるべきと考える。また研究開発項目 4 では、卵、乳、大豆等の加水分解タンパク質の分子量に関する解析を行った。多くの検体では分子量 1 万以下の成分がほとんどであり、重量平均分子量も数千であったこと、また動物試験では顕著な経皮感作性は認められなかったことから、これらの試料について感作誘導防止の観点での分子量分布試験等の新規規格基準の設定は必要ないと考えられた。

Quasi-drugs and cosmetics contain several ingredients derived from various proteins used as raw materials. Therefore, to prevent the development of food allergies caused by these proteins and ensure the safety of quasi-drugs and cosmetics, we conducted the following investigations.

- (1) We investigated the transdermal sensitizing potentials of several types of proteins, such as oat and corn (contained in soap, 1 case each) and fish-derived collagen (contained in cosmetics, 3 cases), in an animal model system. Transdermal sensitization was observed for oat and corn proteins. On the other hand, samples of fish-derived collagen/hydrolyzed collagen showed no significant percutaneous sensitization, although a slight allergic symptom was detected in one sample. In order to examine the effect of coexisting substances on transdermal sensitization by proteins, we analyzed the effect of polyalcohols often used in cosmetics on transdermal sensitization by allergenic proteins. Some alcohols showed a tendency to slightly inhibit transdermal sensitization.
- (2) Skin penetration of proteins was studied from the viewpoint of interface science. Solutions of proteins, such as ovalbumin (OVA) or Glupal decreased their surface tensions and contact angles with the skin. Addition of polyalcohols, such as propylene glycol, often used in cosmetics, also decrease the surface tension and slightly enhanced skin penetration of OVA in closed condition. The use of moisture cream increased the skin surface energy in polar component. The penetration of OVA increased after application of cream, especially in the case of O/W cream. The penetration of OVA in the skin is increased when the affinity of the skin and dosage forms is high, and it can predict with surface energy of the skin and dosage forms.
- (3) We confirmed the registered cases and extracted the relevant cases from an epidemiological questionnaire survey, SSCI-Net and clinical research database MINERVA for collecting clinical information on the onset of allergies due to protein components such as quasi-drugs. As a result, cochineal pigment was most frequent cause as 9 cases were confirmed. In antigen analysis, deaminated LMW-glutenin was confirmed as an antigen that can distinguish between percutaneous sensitized food allergies due to protein components such as non-pharmaceutical products and general food allergies. It is most important to always suspect that quasi-drugs may be related to the onset of food allergies and to provide medical care.
- (4) The molecular weight distribution profiles of the hydrolyzed ingredients of various proteins derived from eggs, milk, soybeans, silk and rice were analyzed. Size exclusion chromatography (SEC) analysis indicated that eggshell membranes and some ingredients tested had a high molecular weight protein of 10,000 or more, but most of the other ingredients had the weight-average molecular weight of several thousand. None of these ingredients were reported a remarkable reaction in the skin sensitization test using animals. Therefore, it is considered unnecessary for the ingredients tested in this study to set new regulatory standards such as molecular weight distribution from the point of preventing sensitization.

Through these investigations, we were able to obtain many practical findings that are useful for the prevention of food allergies caused by ingredients in quasi-drugs and cosmetics. With regard to cases of dermal sensitization by protein components of quasi-drugs, we were able to ascertain the actual situation in research theme 3, and there seemed to be no need to take immediate action at present. From the results of research theme 4, it is considered unnecessary to set new regulatory standards such as molecular weight distribution to prevent sensitization. However, a small number of food allergy cases caused by ingredients in quasi-drugs and cosmetics continue to be reported, therefore we should continuously collect information and try to understand the actual situation of this type of food allergy.