

ポリエチレングリコール (PEG) 含有化粧品使用による抗 PEG 抗体誘導と PEG 化製剤の薬理効果への影響

徳島大学大学院医歯薬学研究部

石田 竜弘

Polyethylene glycol (PEG) is considered as non-toxic and non-immunogenic material, and surface modification with it can improve the immunogenicity and pharmacokinetics of nanocarriers. However, we recently reported that PEGylated liposome loses their long circulating properties when they are administered twice in same animal with certain interval (accelerated blood clearance (ABC) phenomenon). We elucidated that anti-PEG IgM, secreted in response to the first dose of PEGylated liposome, is responsible for the rapid clearance of the second dose via initiation of complement activation. We further elucidated that such anti-PEG IgM production is caused in nude mice (no T-cells), while it was not caused in SCID mice (no B and T cells) and splenectomized mice (no spleen). These suggest that spleen B cells produce the anti-PEG IgM in a T-cell independent manner. It appears that PEGylated liposome activates the immunity in spleen as T-cell independent antigens do. In addition, we recently reported that nucleic acids such as siRNA and pDNA in SL further enhances anti-PEG IgM production via toll like receptors (TLRs) (TLR 7 for siRNA, TLR9 for pDNA) in their sequence dependent manner. Our studies clearly demonstrate that any PEGylated formulations may display unexpected pharmacokinetic behavior upon repeated injection if such formulation induce anti-PEG IgM production and, as a consequence, may show less therapeutic efficacy or even cause undesirable side-effects. In this study, we paid an attention to PEG in the cosmetics and studied if the PEG induces anti-PEG immunity after sequential addition for 60 days. The result clearly demonstrated that the cosmetic containing PEG induces anti-PEG IgM, not anti-PEG IgG, and accordingly the cosmetic may be a major cause to induce pre-existing anti-PEG IgM observed in sera of healthy volunteers.

1. 緒言

PEG (ポリエチレングリコール) はエチレングリコールが重合した構造からなるポリマーであり、皮膚への刺激性や毒性がほとんど認められないことから化粧品成分として広く使用されている。化粧品における PEG の用途としては界面活性剤、クレンジング剤、乳化剤および保湿剤などがあり、これらに含まれている PEG の一般的な分子量は 200 ~ 10,000 程度である。また、分子量の調節や脂溶性基の導入により、さまざまな物性を持たせることができるため、数百種類以上の誘導体も使用されている。このように PEG には幅広い用途があるため、化粧品成分として汎用されており、我々も日常的に PEG に暴露されている。

一方、PEG は医薬品においても重要な役割を果たしている。PEG を修飾した医薬品は、有効成分がゆるやかに放出され、血中濃度が長時間保たれるという特徴を有するため、血中で分解を受けやすい薬や、抗がん剤など毒性が発現しやすい薬においてよく用いられる。一方、我々は、PEG 修飾リポソームの投与によって PEG に対する抗体 (抗 PEG-IgM) の分泌が誘導されることを明らかにし、これに

よって 2 回目に投与した PEG 修飾リポソームが速やかに血中から排除されることを報告した¹⁾。

これらの抗体はあくまで、PEG を修飾した医薬品の投与によって誘導されたものと考えられていたが、最近の臨床研究から、PEG 修飾医薬品による治療歴のない患者の一部が抗 PEG-IgM を保有していることを明らかとした。実際、東京大学医学部・女性外科・松本医師との共同研究において、これらの患者に卵巣がんの特効薬である Doxil (ドキシソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム) を投与した場合、Doxil の血中濃度の急激な低下が観察され、通常得られる治療効果がほとんど得られないことも明らかとした。

これらの患者が抗 PEG 抗体を保有するに至った原因は明らかではない。前述のように、日常的に使用する化粧品の中に PEG を含むものが多く存在するため、これらの化粧品の日常的な使用により、PEG に対する抗体が誘導されたのではないかと考えた。PEG の皮膚透過性について、分子量 4,000 (PEG-75) 以上の PEG は皮膚から吸収されないが、それよりも小さい分子量の PEG は皮膚から最小限に吸収されることが知られている²⁾。また、傷害された皮膚に対しては PEG の分子量に関係なく、透過性を示すことが明らかとなっている³⁾。また、化粧品に含まれている PEG の毒性について、Bárányi らは PEG や PEG 誘導体はヒトの皮膚に対してはほとんど刺激を与えないが、経表皮水分消失 (TEWL) を増加させ、角質バリア機能を目に見えないレベルで傷害していることを報告しており⁴⁾、透過した PEG が PEG に対する免疫反応を誘導していても何ら不思議ではない。



Immunological response against PEG in cosmetics

Tatsuhiko Ishida

Tokushima University, Institute of Biomedical Sciences

このような仮説を検証するため、PEG 含有化粧品をラットに塗布した際の抗体産生評価ならびに化粧品によって誘導される抗 PEG 抗体による PEG 修飾医薬品の動態変化について検討を行った。

2. 方法

2.1. 実験動物

実験動物として HWY 雌性ラット (体重 150 ~ 250 g) を日本 SLC (静岡、日本) より購入して用いた。実験動物は SPF (specific pathogen free) 環境下で生育させた。また、全ての実験動物は徳島大学動物実験委員会によって承認を受けた上で行った。

2.2. 塗布用化粧品

PEG 含有化粧品として以下の 3 種類を用いた。

- ・化粧品：資生堂 AQUALABEL モイスチャーローション(S)

含有成分：水、DPG、エタノール、グリセリン、PEG-6、PEG-32、PEG/PPG-14/7 ジメチルエーテル、エリスリトール、アセチルヒアルロン酸 Na、ヒアルロン酸 Na、乳酸、塩化 Mg、PCA、アンズ果汁、塩化 Ca、水添レシチン、ポリクオタニウム-51、水溶性コラーゲン、PEG/ポリブチレングリコール-44/15 メチルエーテル水添ダイマージリノレイル、クエン酸 Na、EDTA-2Na、クエン酸、BG、水酸化 Na、トコフェロール、PEG-30 ダイブステロール、水酸化 K、EDTA-3Na、フェノキシエタノール、香料

- ・日焼け止め：資生堂メン UV プロテクター

含有成分：水、シクロメチコン、BG、変性アルコール、メトキシケイヒ酸オクチル、ジメチコン、ポリメチルシロキサン、PEG-9 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン、ジステアルジモニウムヘクトライト、グリセリン、エリスリトール、スクワラン、フルオロ(C9-15) アルコールリン酸、トリメチルシロキシケイ酸、PEG/PPG-14/7 ジメチルエーテル、グルタミン酸 Na、メントール、ポリクオタニウム-51、ワイルドタイムエキス、チオタウリン、イソステアリン酸、(アクリル酸アルキル/ジメチコン) コポリマー、ジステアリン酸 Al、水酸化 Al、PEG-150、EDTA-3Na、DPG、BHT、フェノキシエタノール、香料、酸化亜鉛、酸化チタン

- ・シャンプー：花王 エッセンシャル リッチダメージケア シャンプー

含有成分：水、ラウレス硫酸アンモニウム、エタノール、ラウレス-4 カルボン酸 Na、ラウリルヒドロキシステアリン酸、ジステアリン酸グリコール、ラノリン脂肪酸、リンゴ酸、クエン酸、ヒマワリ種子油、ミリスチルアルコール、ステアリンアルコール、PPG-7、PPG-3 カプリルエーテル、ココミド MEA、グアーヒドロキシプロピルトリモニウムク

ロリド、イソデシルグリセリルエーテル、ポリクオタニウム-10、ポリクオタニウム-52、ラウレス-4、ラウレス-16、ラウレス-23、ラウレス硫酸 Na、ビスセテアリアルアモジメチコン、ステアロキシプロピルジメチルアミン、ジメチコン、水酸化 Na、安息香酸 Na、ベンジルアルコール、フェノキシエタノール、香料

2.3. 上記化粧品の塗布

ガムテープを用いて腹部に 10 回程度テープストリッピングを行い、コットンに適量の PEG 含有化粧品を染み込ませ、腹部に塗布した。この操作を 1 日 1 回行った。

2.4. Anti-PEG antibodies の測定

麻酔下で化粧品処置したラットから血液を採取し、血液を血清分離剤入りチューブ (栄研、東京、日本) に採取した。採取した血液は 30 分間室温で放置した後、3000 rpm (KUBOTA2800) で 20 分間遠心分離し、上清のみを回収した。血清は使用するまで -20℃ で保存した。

ELISA 用 96 ウェルプレート (Costar[®], Corning, NY, USA) を用意し、mPEG2000-DSPE を 50μL 各ウェルに分注し、室温で 1 晩インキュベーションした。Blocking Solution を 350μL 分注し、1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、Wash Solution を用いて 3 回洗浄した。血清をそれぞれを 100μL 分注し 1 時間インキュベーションした。Wash Solution を用いて 5 回洗浄後、Blocking Solution を用いて 5000 倍希釈した二次抗体を 100μL 分注し、1 時間インキュベーションした。Wash Solution を用いて 5 回洗浄後、Enzyme Substrate を 100μL 分注し、5 ~ 30 分インキュベーションした。酵素反応を止めるために Stopping Solution を 100μL 分注した。その後 Microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて吸光度を測定した (λ=492 nm)。Goat anti-Rat IgM Antibody HRP Conjugated, Goat anti-Rat IgG-Fc Fragment Antibody HRP Conjugated を二次抗体として使用した。

2.5. Doxil の血中濃度測定

ラット尾静脈より Doxil を急速投与した。投与 5 日後に、血液を採取した。採取した血液は 30 分間室温で放置した後、20 分間遠心分離し、上清のみを回収した。血清中のドキソルビシン濃度は定法に従って HPLC を用いて測定した。

3. 結果

3.1. PEG 含有化粧品による anti-PEG IgM 産生

まず、PEG 含有化粧品によって anti-PEG IgM が誘導されるか検討を行った。PEG 成分が含まれている化粧品、日焼け止め、シャンプーのいずれかを 1 日 1 回ラットの腹部に塗布し、塗布開始 16、37、60 日後に血清を採取した。採取

した血清中のanti-PEG IgM量をELISAにより評価した。

その結果、化粧水塗布ラットにおいてanti-PEG IgM量の増加が確認された。抗体量は塗布開始37日後にピークとなったが、60日後には抗体量が減少していることが明らかとなった。また、日焼け止めとシャンプーを塗布したラットにおいてはanti-PEG IgMの誘導が確認されなかった。この理由の一つとして、日焼け止めとシャンプーは化粧水に比べて皮膚透過性が低く、表皮樹状細胞であるランゲルハンス細胞にまで到達しなかったために、抗体産生が生じなかった可能性が考えられる。また、IgGの誘導に関しても同様の検討を行った結果、PEG含有化粧品によるanti-PEG IgGの誘導は生じないことが確認された。

3. 2. PEG含有化粧水誘導anti-PEG IgMの抗体力価

続いて、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMの抗体力価の評価を行った。Fig. 1において最もanti-PEG IgM量が多かった化粧水塗布37日後No.4の血清を用い、この血清中のanti-PEG IgMがPL投与によって誘導されるanti-PEG IgMと比較してどの程度の抗体力価を持っているのか検討を行った。

その結果、化粧水塗布によって誘導されたanti-PEG IgMは、PLを 10^{-4} μmol phospholipids/kg 静脈内投与したときに誘導されるanti-PEG IgMと同程度の抗体力価を持つことが確認された(Fig. 2)。

次に、この抗体力価がDoxilをどの程度クリアランスす

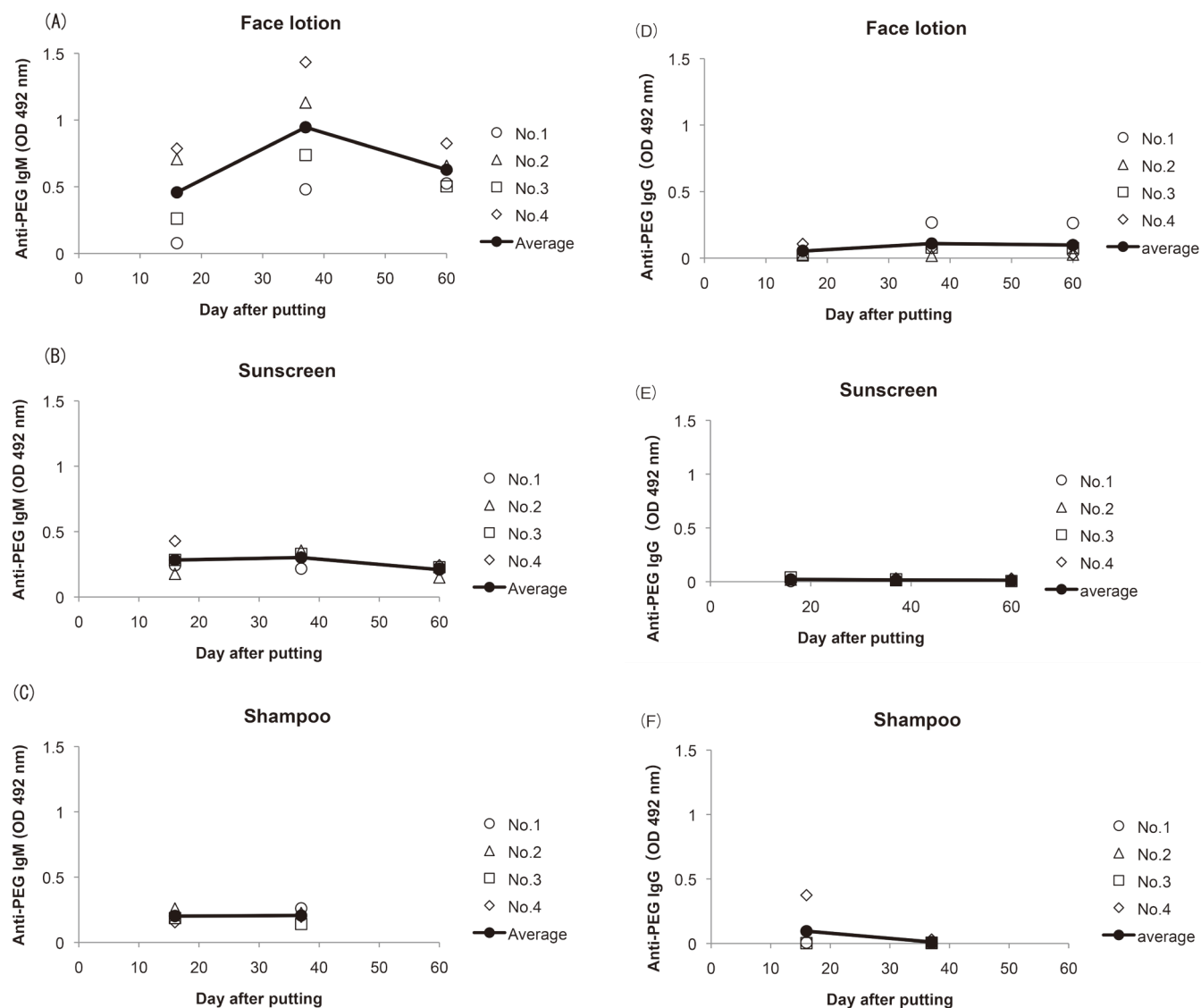


Fig. 1 Anti-PEG IgM and IgG production following putting PEG-including cosmetics on skin.

Face lotion (A, D) or sunscreen (B, E) or shampoo (C, F) including PEG was put on hairless rat's skin every day, respectively. Serum was collected on day 16, 37, 60 after putting. Anti-PEG IgM and IgG were determined using ELISA. Data are presented as absorbance at 492 nm.

るのかを検討するために、PEG 修飾リポソーム (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} μmol phospholipids/kg) 静脈内投与によって anti-PEG IgM が誘導されたラットに Doxil (0.7mg doxorubicin/kg) を静脈内投与し、投与 4 時間後の Doxil の血中濃度を HPLC で測定した。

その結果、化粧水によって誘導された anti-PEG IgM と

同程度の抗体力価を持つ PEG 修飾リポソーム (10^{-4} μmol phospholipids/kg) で誘導された anti-PEG IgM は、PEG 修飾リポソームを投与していない無処置のラットと比較して、Doxil の血中濃度を投与 4 時間後に 50% 程度低下させることが明らかとなった。

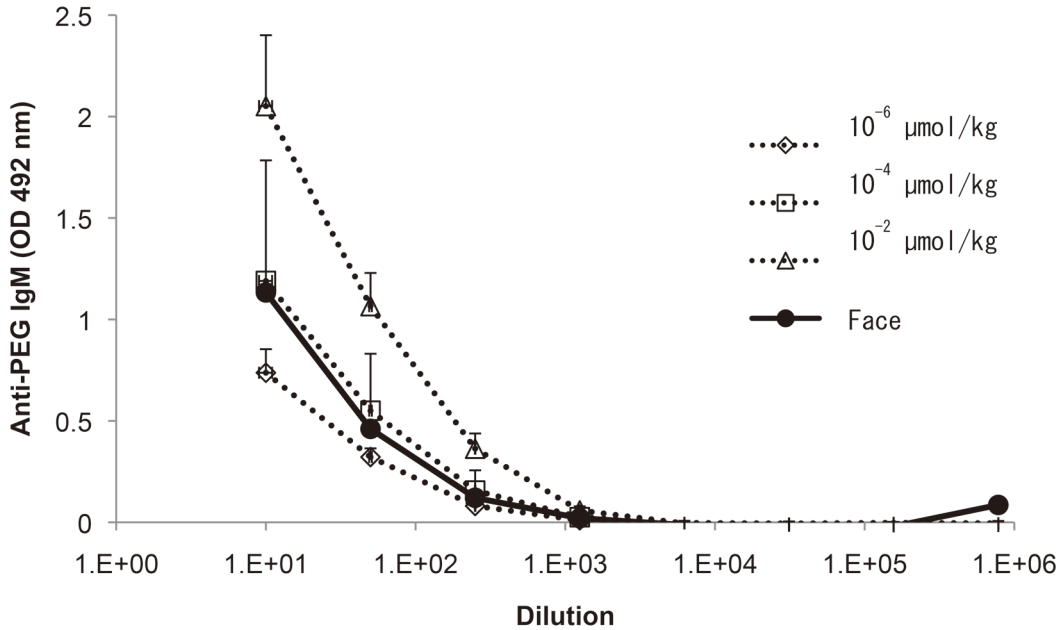


Fig. 2 Titer of anti-PEG IgM induced by putting lotion.

Face lotion was putting on hairless rat's skin every day and serum was collected on day 37 (●), the serum which has highest titer among 4 sera was used as sample. PL was intravenously injected into hairless rat at a dose of 10^{-6} μmol phospholipids/kg (◇), 10^{-4} μmol phospholipids/kg (□), or 10^{-2} μmol phospholipids/kg (△) and serum was collected on day 5 after injection. Each value (PL pretreated) represents the mean \pm S.D. (n=3), Face lotion treated (n=1).

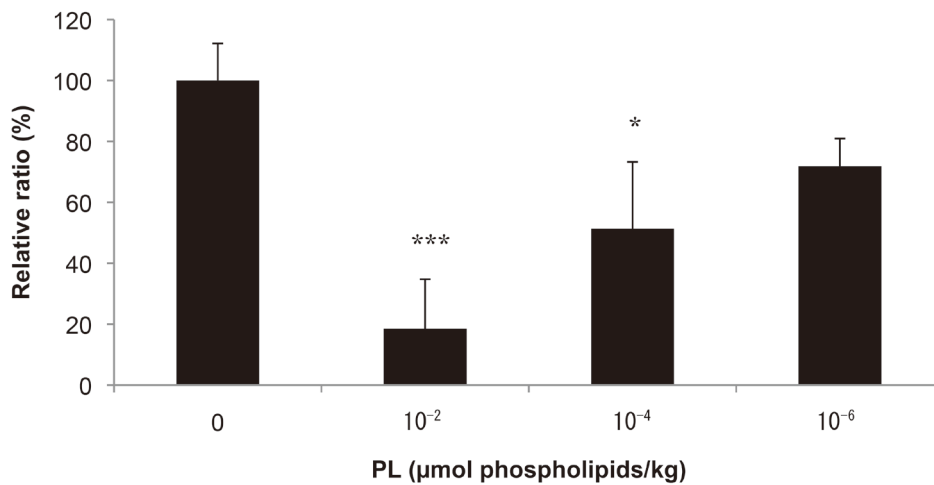


Fig. 3 Blood retention of Doxil in PEGylated liposomes-pretreated rat.

PEGylated liposomes (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} μmol phospholipids/kg) was intravenously injected into hairless rat. Five days later, Doxil (0.7 mg doxorubicin/kg) was intravenously injected into the rat. Serum was collected at 4 hr after injection. Serum concentration of Doxil was determined using HPLC. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and PL pretreated rats. *p < 0.05, ***p < 0.001.

3. 3. PEG含有化粧水誘導anti-PEG IgMの特性評価 (親和性、補体)

Fig. 3において、化粧水塗布によって得られた抗体力価と同程度のanti-PEG IgMをPEG修飾リポソーム投与によって誘導した場合、Doxilの血中からの速やかなクリアランスが確認された。しかし、化粧水塗布によって誘導されたanti-PEG IgMと、PEG修飾リポソーム投与によって誘導されたanti-PEG IgMは性質が異なる可能性が考えられる。Doxilに対してABC現象が発現するには、anti-PEG IgMのDoxilに対する親和性や補体活性化能の有無が重要となる。化粧水で誘導されたanti-PEG IgMの性質を調べるため、これまでとは別に、ヘアレスラットに新たに

PEG含有化粧水を塗布し (Fig. 4)、これによって誘導されたanti-PEG IgMのPEG修飾リポソームへの結合性と補体活性化能の有無を評価した。

これまでの結果と同様に、化粧水の塗布によってanti-PEG IgMの誘導が確認された (Fig. 4)。また血液中にanti-PEG IgMを分泌すると思われるPEG特異的細胞の存在も確認された。さらにPEG修飾リポソームと競合ELISAを行った結果、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMは、PEG修飾リポソームで誘導されたanti-PEG IgMと同様に、PEG修飾リポソームに対しても結合性を示すことが確認された (Fig. 5)。このことから、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMはPEG修飾リポソームを認識する抗体であるこ

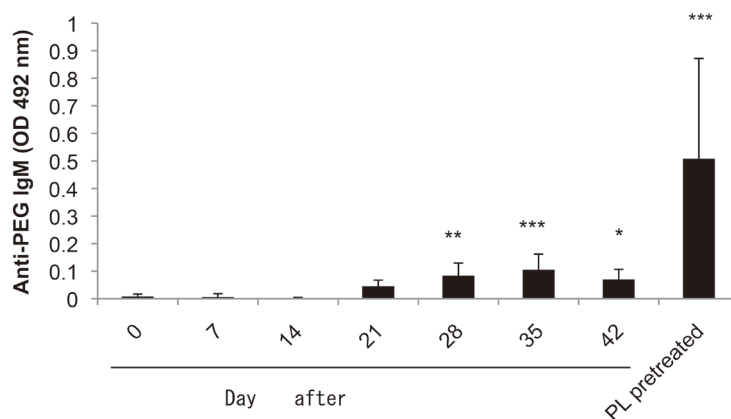


Fig. 4 Anti-PEG IgM production following putting of PEG-including face lotion. Face lotion including PEG was put on hairless rat's skin every day. Serum was collected on day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 after putting. Anti-PEG IgM was determined using ELISA. Serum from PL-pretreated rat (10^{-2} μ mol phospholipids/kg) was used as a positive control. Data are presented as absorbance at 492 nm. Each value represents the mean \pm S.D. (n=7). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and PL pretreated rats. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

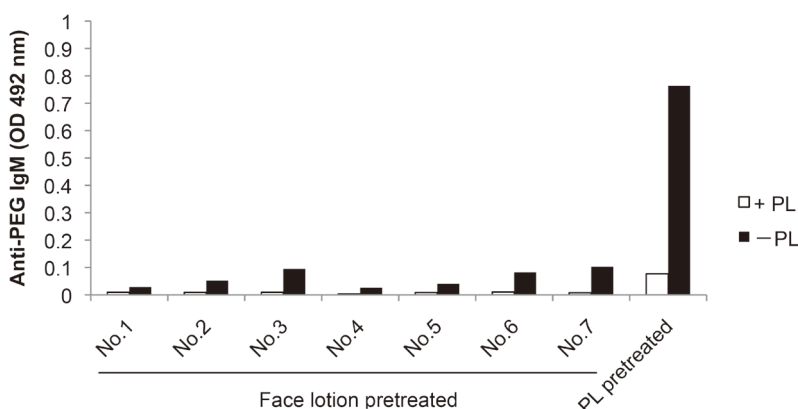


Fig. 5 Affinity of anti-PEG IgM induced by face lotion to PL.

Face lotion was putting on hairless rat's skin every day. Forty two days later, serum was collected. Binding of anti-PEG IgM to PL was determined by competitive ELISA. The binding of anti-PEG IgM in 100-times diluted serum to mPEG₂₀₀₀-DSPE on the plate were determined in the presence of competitor (PL 0.5 μ mol phospholipids/mL). Serum from PEGylated liposome-pretreated rat (10^{-2} μ mol phospholipids/kg) was used as a positive control.

とが明らかになった。続いて、anti-PEG IgMによる補体活性化が生じているか、CH50キットを用いて検討を行った。

本実験では血清中の補体量に比例して抗体依存的な補体の活性化が生じ、EA (感作ヒツジ赤血球)が溶血する。そのため、PLに血清中のanti-PEG IgMが結合して補体を活性化すると、血清中の補体量が減少するためEAの溶血量が減り、溶血率は低下すると考えられる。また、本実験で用いた血清に、補体を消費することが知られているzymosanを添加すると溶血率が低下したことから、いずれの血清も補体が含まれていることを確認している (Fig. 6)。

Fig. 6より、化粧水を塗布したヘアレスラット由来の全

ての血清においてPEG修飾リポソーム添加による溶血率の減少は生じなかった。一方で、PEG修飾リポソームを投与したヘアレスラット由来の血清にPEG修飾リポソームを添加した場合は、溶血率の減少が生じた。このことから、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMによる補体活性化は生じていないことが明らかとなった。補体活性化が生じなかった原因として、①化粧水で誘導されたanti-PEG IgMに補体活性化能がない、②化粧水誘導のanti-PEG IgMは補体活性化能を持つが、抗体価が低いため古典経路を活性化させるのに十分な抗体量が得られていなかった、の2点が考えられる。以前の検討においても、PEG修飾リポソームによって誘導されたanti-PEG IgMがPEG修飾タンパク

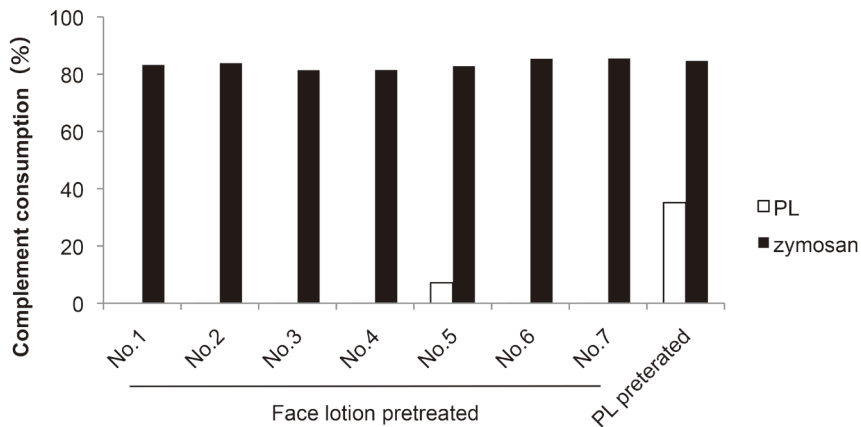


Fig. 6 Complement consumption following incubation of serum with PL.

Face lotion was put on hairless rat's skin every day. Forty two days later, serum was collected. Complement consumption following incubation with either PL or zymosan was measured using CH50 kit. Serum from PL-pretreated rat (10^{-2} μmol phospholipids/kg) was used as a positive control.

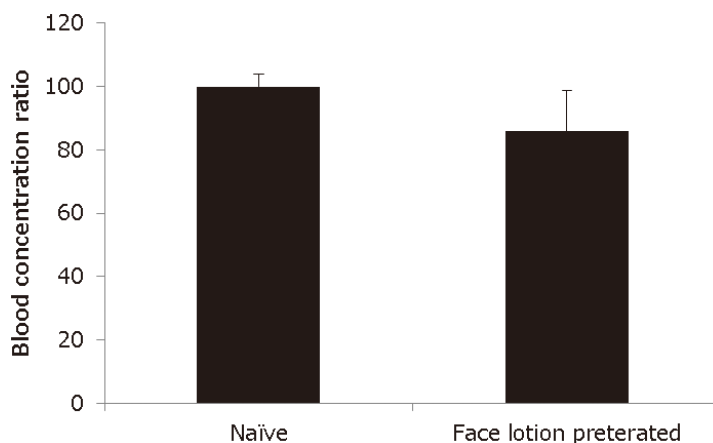


Fig. 7 Blood retention of Doxil in rat treated with face lotion.

Face lotion was put on hairless rat's skin every day. Forty two days later, Doxil (1.5mg/kg) was intravenously injected into the hairless rat. Serum was collected at 4 hr after injection. Serum concentration of Doxil was determined using HPLC. Each value represents the mean \pm S.D. (n=7). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and face lotion pretreated rats. ***p < 0.001.

に結合した後、補体活性化を生じさせないことを明らかにしており、化粧水によって誘導された anti-PEG IgM も同様の現象を引き起こしたと考えられる。

3. 4. PEG 含有化粧水誘導 anti-PEG IgM が Doxil の血中滞留性に与える影響

次いで、化粧水で誘導された anti-PEG IgM によって Doxil のクリアランスが生じるか検討を行った。PEG 含有化粧水塗布 42 日後に Doxil を 1.5 mg doxorubicin/kg 静脈内投与し、その 4 時間後の Doxil 血中濃度を HPLC で測定した。

その結果、Doxil 投与 4 時間後の血中濃度は化粧水塗布ラットと無処置ラットで大きな差はなく、Doxil のクリアランスは生じないことが確認された。Fig. 3 において PEG 修飾リポソームで誘導された anti-PEG IgM によって Doxil のクリアランスが生じたにも関わらず Fig. 7 において大きな血中濃度の低下が確認されなかった原因として、抗体力価が低いことや Fig. 6 において化粧水誘導の anti-PEG IgM による補体活性化が生じなかったことが考えられる。その結果、マクロファージによる取り込みがみられず、血中濃度の劇的な低下が生じなかったと考えられる。

4. 考 察

本研究では、PEG 含有化粧品によって anti-PEG IgM の分泌が生じるか、さらに、この anti-PEG IgM によって Doxil の血中濃度に影響が生じるか検討を行った。本検討の結果から、皮膚に浸透しやすい化粧水によって anti-PEG IgM の分泌が生じ、このピークは塗布開始 35 日前後となることが分かった。PEG 含有化粧水による anti-PEG IgM 分泌量はラットの個体差が大きい結果となったが、最も anti-PEG IgM 分泌量の多かったラットの抗体価は PEG 修飾リポソームの $10^4 \mu\text{mol}$ phospholipids/kg 投与によって誘導される anti-PEG IgM と同程度の抗体力価を持つことが確認され、これは Doxil 投与 4 時間後の血中濃度を 50% 程度低下させる力価を保持していた。また、PEG 含有化粧水誘導の anti-PEG IgM は PEG 修飾リポソームに対して高い親和性を持っていた。しかしながらこの anti-PEG IgM は、補体活性化能はなく、Doxil の動態変化を引き起こす可能性は低いと考えられる。実際に PEG 含有化粧水塗付によって anti-PEG IgM が誘導された状態のラットに

Doxil を投与しても、血中濃度の低下は確認されなかった。

本検討の結果より、PEG 含有化粧水によって anti-PEG IgM が誘導されるが、補体活性化は生じないため、他の PEG 修飾剤の体内動態変化を発現させる可能性は低いことが示唆された。そのため、Doxil のような血中濃度と薬効が相関する薬剤に対しては治療効果に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。その一方で、PEG 化タンパク製剤のような中和抗体の存在を考慮しなければならない薬剤に対してはその薬効を減弱させる可能性も考えられるため、注意が必要である。

5. 総 括

本検討により、PEG を含有する化粧品によって実際に抗 PEG-IgM が誘導されることが明らかとなった。今後、化粧品によって誘導された抗 PEG-IgM による PEG 修飾医薬品の効果減弱が実際に引き起こされるかについて検討を行いたいと考えている。

PEG 修飾医薬品は、血中濃度が長時間維持されるという利点を有しており、がんや肝炎などの疾患の治療薬として重要な位置を占めている。化粧品によって誘導された抗体がこれらの治療薬の効果を減弱してしまうことが証明された場合、これまで化粧品成分として安全と考えられてきた PEG の使用が望ましくないと考えられる。

(引用文献)

- 1) Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *J. Control. Release*, 172, 38-47 (2013)
- 2) Smyth Jr. HF, Some pharmacological properties of polyethylene glycols of high molecular weight ("carbowax" compounds) *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 24, 281-284 (1942)
- 3) Herold DA, Rodeheaver GT, Bellamy WT, Fitton LA, Bruns DE, Edlich RF, Toxicity of topical polyethylene glycol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65, 329-335 (1982)
- 4) Bárány EI, Lindberg M, Lodén M., Unexpected skin barrier influence from non-ionic emulsifiers. *Int. J. Pharmacol.*, 195, 189-195 (2000)