ポリエチレングリコール（PEG）含有化粧品によって誘導された抗PEG抗体によるCOVID-19-mRNAワクチン投与時のアナフィラキシー反応誘導現象の検証

徳島大学大学院医歯薬学研究部

石田　竜弘

Polyethylene glycol (PEG) polymers are generally recognized as biologically inert and non-immunogenic. PEG is commonly used in bioconjugation and nano-formulations to improve the circulation half-life of the formulations and increase their stability. In cosmetics, PEG derivatives are also widely used as emulsifiers and skin penetration enhancers. Recently, the "pre-existing" anti-PEG antibodies have been reported in healthy individuals who have never received treatment with PEGylated formulations. In a murine study, topically applied PEG derivatives could efficiently penetrate the stratum corneum and reach the systemic circulation. Daily application of cosmetic PEG derivatives primed the immune system, inducing anti-PEG IgM production. Anti-PEG IgM was detected by Day 14 in mice with normal skin, while it was detected as early as Day 7 in mice with compromised skin. In addition, in mice with pre-induced anti-PEG IgM, topically applied PEG derivatives appeared to bind to the pre-induced anti-PEG IgM, lowering blood levels. Current results indicate that PEG derivatives in cosmetic products may be an important contributor to the source of the "pre-existing" anti-PEG antibodies that have been detected in healthy individuals.

1．緒　言

抗ポリエチレングリコール（PEG）抗体のキャリアにPfizer社およびModerna社製のワクチンを接種した場合、重篤なアレルギー反応が誘導される可能性が示唆されている。申請者らは、免疫原性がなく、香粧品や医薬品の添加剤などとして汎用されているPEGがタンパク製剤やナノ粒子などに修飾された場合、ハプテン効果によって抗PEG抗体が誘導されることを世界で初めて明らかにした[1]。

過去50年にわたり、自然抗体として抗PEG抗体を有するキャリア（正常人）が徐々に増えてきていることも報告[2]されており、これはPEGが用いられてきた歴史と重なる。申請者らも、日本赤十字社から得た200例の献血血液中、37例で抗PEG抗体が存在することを確認している（未発表データ）。分子量が大きいPEGは皮膚や腸管から容易には吸収されないが、香粧品に含まれる比較的低分子量のPEGが日常生活で生じる皮膚のわずかな傷や消化管の潰瘍部位などから体内に入り、抗体を誘導しているものと考えられている。しかしながら、動物レベルでこのことを実証した例はない。また、アメリカFDAも抗PEG抗体誘導の危険性を認識し、PEG修飾タンパク医薬品を開発する際には前臨床試験においてタンパクに対する抗体の誘導だけでなくPEGに対する抗体の誘導の有無も評価するようにrecommendation letterを発出している[3]。このように、PEGに対する抗体の存在は国際的にも注目を集めている。

新型コロナウイルスに対するワクチンが開発され、Pfizer社およびModerna社製のワクチンなどが投与された。Pfizer社ワクチンについて1,782件（100万回接種あたり6.1件）、Moderna社ワクチンについて215件（同2.6件）、武田社ワクチン（ノババックス）について1件（同3.5件）の報告があり、頻度は低いものの、重篤なアレルギー反応が報告されている。発生割合は低いものの、これまでに承認されたワクチンと比べると頻度が高いため、この原因として抗PEG抗体の関与がアメリカFDAで議論されている。これを受けてワクチンに含まれるPEGによる副反応に関する情報の周知が議論されてもいる。あまり知られていないが、Pfizer社およびModerna社製のワクチンのいずれにもmRNAの安定性とタンパクの発現誘導のためにPEG修飾脂質ナノ粒子（PEGylated lipid nanoparticle（PEG-LNP））が添加されている。

香粧品に含まれるPEG derivativesによって誘導された抗PEG抗体が、Pfizer社のCOVID-19ワクチン（コミナティ筋注）に含まれるPEGに反応してアナフィラキシー様反応を誘導しうるか、動物モデルおよびコミナティ筋注を模倣したmRNA含有PEG-LNPを用いて検証した。

Polyethylene glycol (PEG) derivatives in cosmetic products induce anti-PEG IgM production in mice

Tatsuhiro Ishida

Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University

2．方　法

2．1．化粧品による抗PEG抗体誘導評価

市販の化粧品には、物性や目的の異なる多様な種類のPEG、例えば比較的高含量であるが親水性で皮膚透過性が低いとされる分子型PEGや、低含量であるが両親媒性を有し皮膚透過性を亢進させる目的で経皮投与製剤に用いられる界面活性剤型のPEG誘導体が添加されている[4]。PEG含有市販乳液2種類（Polyoxyethylene（14）polyoxypropylene（7）dimethyl ether、polyoxyethylene

(17) polyoxypropylene(4) dimethyl etherを含むAquaLabel Balance Care Lotion(Shiseido Japan Co.) と PEG-11-methyl-ether-dimethicone と PEG-40-hydrogenated-castor-oilを含むBioderma Sébium Lotion(Bioderma Co.))を試料として購入した。これらを毎日剃毛したマウス腹部に塗布することで抗PEG-IgMが誘導されるかELISAで確認した。

2．2．PEG誘導体の皮膚透過性

蛍光標識mPEG（FITC-mPEG、分子量350Da）水溶液20μl（100μg/ml）を剃毛したマウスの腹部に塗布した。塗布後、1, 2, 4, 6, 12, 24時間後に血液を採取し、血中のFITC由来の蛍光強度を測定した。また、24時間後に塗布した部分の皮膚を採取し、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下、皮膚内へのFITC-mPEGの浸透を観察した。

2．3．誘導された抗PEG抗体によるコミナティ筋注模倣mRNA含有PEG-LNP投与によるアナフィラキシー様反応の検証

化粧品（Bioderma Sébium Lotion）の7日間連続塗布（皮膚損傷あり）あるいはモデルPEG修飾リポソームの静脈内投与（投与5日後）によって抗PEG抗体を誘導したマウスを用い、これに調製したmRNA含有PEG-LNPを筋肉内投与した。投与後30分で採血し、PEG-LNP投与による補体活性化の有無について特にC3のフラグメント状況についてWestern blottingによって評価した。

3．結　果

様々な分子量のPEG誘導体を含むAquaLabel Balance Care Lotion（Product A）とBioderma Sébium Lotion（Product B）をそれぞれ毎日マウス腹部に塗布したところ、いずれのローションでも抗PEG IgMの誘導が観察された（Fig. 1A and 1B）。興味深いことに、製品に関わらず、正常な皮膚をもつマウスでは、塗布開始後7日までは抗体の産生は観察されず、2週間後に顕著な誘導が観察され、3週間後には抗体はほぼ消失していた。一方、derma rollerで皮膚に損傷を与えたマウスでは、塗布開始後7日目で既に抗PEG IgMの産生が確認され、2週間後ではほぼ消失していた。また、分子量300のPEG溶液（PEG-300）を塗布したところ、製品の塗布時と同様に、抗PEG IgMの誘導

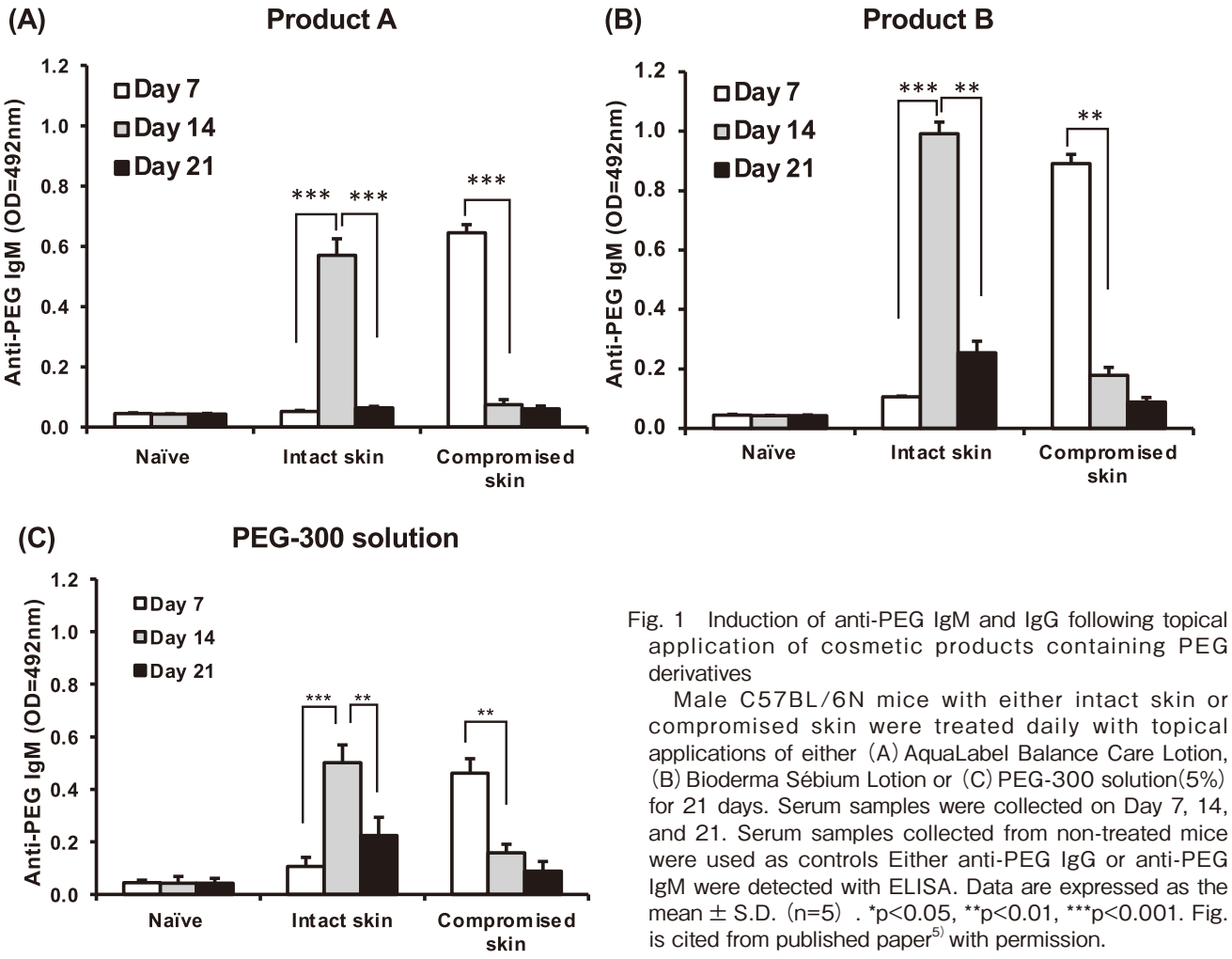

Fig. 1　Induction of anti-PEG IgM and IgG following topical application of cosmetic products containing PEG derivatives

Male C57BL/6N mice with either intact skin or compromised skin were treated daily with topical applications of either (A) AquaLabel Balance Care Lotion, (B) Bioderma Sébium Lotion or (C) PEG-300 solution(5%) for 21 days. Serum samples were collected on Day 7, 14, and 21. Serum samples collected from non-treated mice were used as controls Either anti-PEG IgG or anti-PEG IgM were detected with ELISA. Data are expressed as the mean ± S.D. (n=5) . *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Fig. is cited from published paper[5] with permission.

が観察された（Fig. 1C）。この抗体の誘導は、正常の皮膚をもつマウスでは2週間後に顕著であり、3週間後には抗体はほぼ消失していた。一方、derma rollerで皮膚に損傷を与えたマウスでは、塗布開始後7日目で顕著であり、2週間後にはほぼ消失していた。本検討を通して、抗PEG IgGは検出されなかった。

次いで、高分子のPEGが血中に移行しているかを蛍光標識したmPEG（分子量350）をマウスに塗布し、経時的に血液を採取して評価した（Fig. 2）。正常な皮膚をもつマウスでは、mPEGの血中への移行は緩やかに生じ、およそ12時間かけて増加した後、約90ng/mlに達した後に24時間まで一定であった。一方、derma rollerで損傷を与えた皮膚をもつマウスでは、塗布後2時間で多量のmPEGが血中に移行しており、4時間でピーク（約370ng/ml）に達し、その後漸次減少した。12時間後には正常な皮膚をもつマウスで観察されたのと同様に、約90ng/mlの濃度で24時間まで一定であった。次いで、FITC-mPEG塗布後24時間での皮膚中でのmPEGの分布を蛍光顕微鏡下で観察した（Fig. 3）。正常な皮膚では、FITC由来の強い蛍光が角質層および表皮で観察され、表面からおよそ30.0±5.2μmまで浸透していた。一方、興味深いことに、derma rollerで損傷を与えた皮膚では、FITC由来の蛍光は観察されたものの、正常な皮膚よりその強度は低かった。しかしながら、表面からおよび120.0±10.7μmまで浸透しており、より皮膚中を拡散していることが示唆された。Fig. 2において、損傷皮膚ではmPEGの速やかな吸収が観察されており、損傷皮膚でmPEGがあまり観察されなかったのは、多量のmPEGが速やかに角質層および表皮を通過し、血中に移行したからであると考えられた。以上の結果から、化粧品に含まれるPEG誘導体も、皮膚を透過し、血中に移行することで免疫系を活性化し、抗PEG IgMを誘導している可能性が高いことが示唆された。

補体系は40種類以上のタンパク群からなり、侵入してきた病原体に対する最初の生体防御機構を担っている。これらの病原体に対して補体系タンパクが結合（補体活性化）することでオプソニン化を生じ、マクロファージなどによる貪食作用を受けやすくすることが知られている。さらに、活性化の途中で産生されるC3a、C4b、C5aはアナフィラトキシンと呼ばれ、特にC5aはマスト細胞や好塩基球

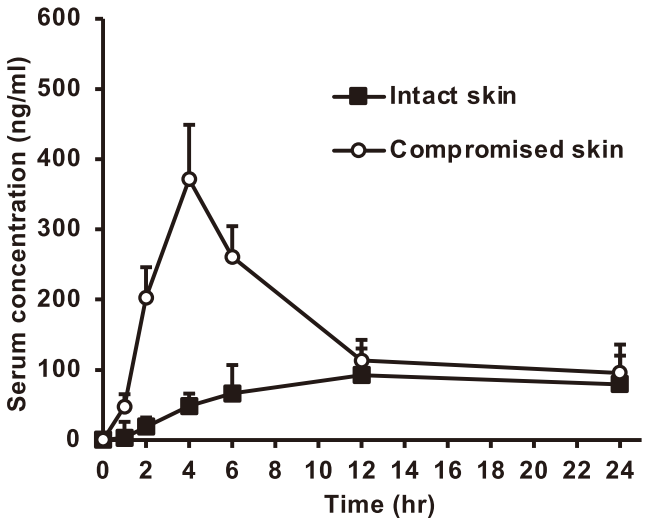

Fig. 2　Rate of percutaneous penetration of mPEG-FITC in mice with either intact skin or compromised skin
C57BL/6N mice were treated topically with mPEG-FITC solution on either intact skin or compromised dorsal skin. Blood samples were collected from the marginal tail vein at 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h after topical applications. The fluorescence intensity in the serum was measured. Data are expressed as mean ± S.D. (n=5). Fig. is cited from published paper[5] with permission.

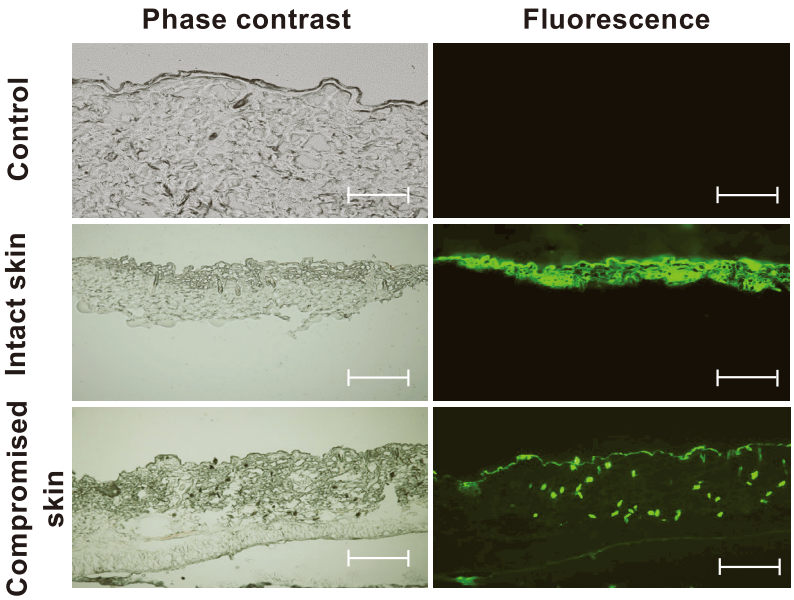

Fig. 3　Percutaneous penetration of mPEG-FITC in mice with either intact skin or compromised skin
C57BL/6N mice were treated topically with mPEG-FITC solution on either intact skin or compromised dorsal skin. At 24 h after the treatment, skin frozen sections were prepared and examined under a fluorescence microscope. A typical picture from skin obtained 4 individual animals in each group is presented. Scale bar indicates 50μm. Fig. is cited from published paper[5] with permission.

からのヒスタミン遊離を促進する。さらに、C5a は単球、好中球、好酸球などの走化性をも亢進することが知られている。COVID-19 mRNA 投与時に、抗PEG IgM を介した補体活性化が起これば、アナフィラキシーが誘導される可能性があることを明確に示すことができる。そこで、化粧品（Bioderma Sébium Lotion）の塗布あるいはモデルPEG修飾リポソームの静脈内投与によって抗PEG抗体を誘導したマウスを用い、これに調製したmRNA含有PEG-LNPを筋肉内投与し、投与後 30 分での血中での補体活性化の有無について評価した（Fig. 4）。抗PEG IgM を保持するマウスにmRNA含有PEG-LNPを筋肉内投与した場合にのみ、補体活性化の指標である補体第三成分（C3）の分解が観察された。この結果から、筋肉内投与後のmRNA含有PEG-LNPの一部が血液循環に移行し、これが異物として補体成分によってオプソニン化される過程でアナフィラトキシンの産生が誘導され、結果としてアナフィラキシーが誘導される可能性が高いことが示唆された。

4．考　察

PEGは香粧品や医薬品の添加剤・修飾剤としても汎用されている。本検討では、化粧品中のPEG誘導体が皮膚を透過し、血中に移行し、抗PEG IgMを誘導することを世界で初めて示した。我々はすでにPEGがタンパク製剤やナノ粒子などに修飾された場合、ハプテン効果によって抗PEG抗体が誘導されることを明らかにし[1]、この場合脾臓辺縁帯B細胞が重要な役割を果たすことを示している[6]。しかし、分子量の比較的小さなPEG誘導体は、速やかに腎臓の子宮体でろ過され、尿中に排泄されると考えられ、脾臓を通過するもののその半減期の短さから脾臓辺縁帯B細胞とは接触しがたいものと考えられる。したがって、今回観察された抗PEG IgMの誘導が、タンパク製剤やナノ粒子などに修飾されたPEGと同じメカニズムで誘導されているかは不明であり、今後より詳細な検討が必要であると考えている。

COVID-19 mRNAワクチンの投与による副反応に関して、添加されているPEGが原因である可能性が取り沙汰されているが直接的な証拠は未だ示されていない。アナフィラキシー誘導における抗PEG抗体の寄与、香粧品によって誘導される抗PEG抗体の寄与に関する情報は皆無であり、アナフィラキシー誘導メカニズムの解明が課題となっている。本検討で、筋肉内投与後のmRNA含有PEG-LNP（mRNAワクチン）の一部が血液循環に筋肉内から漏れ出し、この表面のPEGが抗PEG IgMが結合することで補体系を活性化し、この過程でアナフィラトキシンの産生が誘導され、結果としてアナフィラキシーが誘導されている可能性が高いことが示唆された。実際の症状の発現にはアナフィラトキシンへの感受性における個体差も大きく影響するものと考えられるが、これまで不明であったmRNAワクチン投与時のアレルギー反応誘導機構の一端を明確に示すものであり、大変意義深い成果であると考えている。

従来、化粧品の安全性は、皮膚への刺激性や臓器毒性、発がん性などといった直接的な毒性を指標に評価されており、免疫反応についても、かぶれ、かゆみなどといった、皮膚に直接的に症状が現れるものを中心として評価されてきた。しかしながら、本検討で示されたように、化粧品中のPEG誘導体によって抗PEG IgMが誘導されたという事実は、がんや肝炎などの難治性疾患に対する有効な治療薬であるPEG修飾医薬品の効果減弱につながる可能性が極めて高く、PEG誘導体を含む香粧品の新たな安全性評価

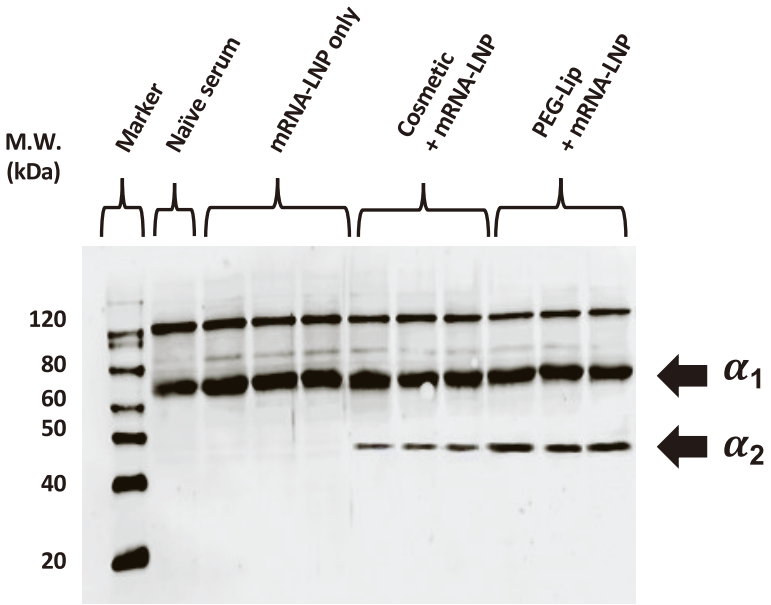

Fig. 4　Complement activation（C3 fragmentation）in pre-induced anti-PEG IgM bearing mice after i.m. administration with COVID-19 mRNA mimicked PEGylated LNP

C57BL/6N mice with compromised dorsal skin were treated topically with Bioderma Sébium Lotion for 7 days. C57BL/6N mice were injected intravenously with PEGylated liposomes（0.001μmol phospholipids/kg）to induce anti-PEG IgM. On Day 7 for topical treatment or Day 5 for i.v. injection, mRNA-PEGylated LNP were i.m .injected. At 30 mins after the injection, sera were collected and Western blotting for detecting C3 fragmentation was carried out. A typical picture is presented.

項目の一つとすべきポイントになるものと考えられる。

一方、未曽有のCOVID-19パンデミックに際して、世界的にPfizer社やModerna社が開発したmRNAワクチンが投与された。このワクチンにはPEGで修飾したLNPがmRNA保護剤として添加されており、この投与によっても抗PEG抗体が誘導されている可能性が高い。これらの“抗PEG抗体を保有する一般人”がこれまで通りにPEG含有化粧品を汎用することで、想定外の皮膚症状が現れる可能性も大いに考えられる。Withあるいはafterコロナにおいて、嗜好品である化粧品を安全・安心に使用および開発する上で、抗PEG抗体との共存が必要になろう。

5．総　括

すでに多くのヒトが抗PEG抗体を保持していることが知られている。本研究からその原因の一つが、嗜好品である香粧品の使用であることが示唆された。抗PEG抗体を保持しているヒトにPEG修飾製剤を投与すれば、抗体がPEG修飾製剤と免疫複合体をつくり、補体系を強力に活性化してC3aやC5aなどのアナフィラトキシンを大量に放出させ、アナフィラキシーを誘導することは想像に難くない。しかしながら、香粧品中のPEG誘導体が皮膚から吸収されたのち、どのように抗PEG抗体を誘導しているのか、そのメカニズムは不明であり、今後その解明が必要である。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

本研究により得られた成果

Ibrahim, M., Shimizu, T., Ando, H., Ishima, Y., Elgarhy, H., Sarhan, H., Hussein, A., Ishida, T., Investigation of anti-PEG antibody response to PEG-containing cosmetic products in mice. *J. Control. Release*, **354**, 260–267(2023).

（引用文献）

1）Ishida, T. *et al.* Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, **112**, 15–25（2006）.
2）Chen, B. *et al.* Measurement of Pre-Existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol in Healthy Individuals. *Anal. Chem*., **88**, 10661–10666（2016）.
3）Parenky, A. *et al.* New FDA draft guidance on immunogenicity. *AAPS J*., **16**, 499–503（2014）.
4）Casiraghi, A. *et al.* The influence of the polar head and the hydrophobic chain on the skin penetration enhancement effect of poly（ethylene glycol）derivatives. *AAPS PharmSciTech*., **13**, 247–253（2012）.
5）Ibrahim, M. *et al.* Investigation of anti-PEG antibody response to PEG-containing cosmetic products in mice. *J. Control. Release*, **354**, 260–267（2023）.
6）Isihda, T. *et al.* Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, **115**, 243–50（2006）.