

令和元年6月6日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19254

研究課題名(和文)ホルムアルデヒド遊離型防腐剤が示す抗菌・皮膚感作活性化化合物の解明

研究課題名(英文)Elucidation of antibacterial and sensitizing components derived from formaldehyde releasers

研究代表者

土井 崇広(Doi, Takahiro)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主幹研究員

研究者番号：90516767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内で使用が認められている、イミダゾリジニルウレア(IU)・DMDMヒダントインおよびその分解物について、ペプチド結合性試験(DPRA)による皮膚感作性評価を行った。いずれもホルムアルデヒドを遊離する化合物のみが陽性であったが、その強度と想定される遊離ホルムアルデヒド量とは必ずしも相関せず、ホルムアルデヒドの関与しない皮膚感作の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルムアルデヒド遊離型防腐剤が示す皮膚感作性は、ホルムアルデヒドのみに由来するのではなく他の分解物によっても引き起こされる可能性があることが疑われた。ホルムアルデヒド遊離型防腐剤は欧米では使用頻度の高い防腐剤でありながら、その分解挙動・分解物の活性については殆ど調べられていなかった。本研究の結果は、当該防腐剤群による皮膚感作の一因について新たな可能性を示したものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Direct Peptide Reaction Assay (DPRA) was performed to evaluate skin sensitization of imidazolidinyl urea (IU), DMDM hydantoin and its degradation products. Only compounds capable of releasing formaldehyde were positive in all cases, but their strengths were not necessarily correlated with the amount of free formaldehyde assumed. The result suggested the presence of skin sensitization by formaldehyde releasers in which formaldehyde is not involved.

研究分野：化粧品化学

キーワード：ホルムアルデヒド遊離型防腐剤 イミダゾリジニルウレア DMDMヒダントイン 分解挙動 皮膚感作性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

白斑被害やアレルギーなど、近年化粧品を原因とする皮膚障害が大きな社会問題となっている。ホルムアルデヒド(FA)遊離型防腐剤は、化粧品に対して米国では全体の約20%に使用されるなど、欧米ではパラベン類の次に高頻度で配合される防腐剤である。一方で、FA遊離型防腐剤は接触皮膚炎の原因としても知られ、接触皮膚炎全症例のうち10%以上で原因となっているとする報告もみられる。防腐剤そのものを用いてその有効性(抗菌性)や毒性(皮膚感作性)の評価が行われているが、評価系中でFA遊離型防腐剤はFAを遊離して分解すると考えられるため、各防腐剤の活性が防腐剤そのもの、分解により生じたFA、分解により生じたFA以外の化合物のいずれによるものなのか現状では解明されていない。

### 2. 研究の目的

ホルムアルデヒド(FA)遊離型防腐剤は、その幅広い抗菌活性から化粧品に防腐剤として使用されるが、一方で副作用として皮膚感作性を示すことが知られている。FA遊離型防腐剤は容易に分解するため、抗菌活性・皮膚感作性の要因が防腐剤自身なのかFAその他分解物なのか分かっていない。本研究は、未知分解物を同定し、化粧品中でFA遊離型防腐剤が活性を示す原因物質を解明することを目的として実施した。

### 3. 研究の方法

イミダゾリジニルウレアを構成する化合物について

#### 1) 試薬・試液

ホルムアルデヒド、アラントイン、水酸化ナトリウム、LC/MS用アセトニトリルは和光純薬工業(株)より入手した。Imidurea(USP標準品)およびimidurea(2次標準、traceable to USP)はSigma Aldrichより入手した。その他のイミダゾリジニルウレアについては海外試薬メーカー6社(A, B, C, D, E, F)から入手した。水はMilipore社製Milli-Q Advantage(機器分析タイプ)で調製した超純水を用いた。

#### 2) 分析用サンプルの調製

各試薬メーカーのイミダゾリジニルウレア約50mgをとり、0.1%ギ酸水溶液で5mLとして1%溶液を調製した。1%溶液15μLをマイクロバイアルにとり、1350μLのアセトニトリルを加えて100ppmイミダゾリジニルウレア溶液を調製した。

合成品は生成物250μLをとり、0.1%ギ酸水溶液で5mLとした。その溶液15μLをとり、アセトニトリル1350μLを加えたものを分析用溶液として用いた。

#### 3) 分析条件

LC-PDA: Prominence HPLC (島津製作所製)

移動相: アセトニトリル/水(90:10)

カラム: Cosmosil-HILIC (ナカライテイスク製、250mm×4.6mm、5.0μm)

カラム温度: 40

注入量: 50μL

流量: 1mL/min

測定波長: 210nm

#### 4) イミダゾリジニルウレアの合成

イミダゾリジニルウレアの合成は特許情報を参考にCondition A、Condition Bの2条件で実施した。

##### Condition A

1.58g Allantoin(約10mmol)をナスフラスコにとり、37%ホルムアルデヒド水溶液1.22g(約15mmol)、800μLの1mol/L水酸化ナトリウム水溶液、2.85mLの超純水を加え、90で2時間加熱還流した。

##### Condition B

1.58g Allantoin(約10mmol)をナスフラスコにとり、37%ホルムアルデヒド水溶液1.22g(約15mmol)、2.85mLの超純水を加え、90で2時間加熱還流した。

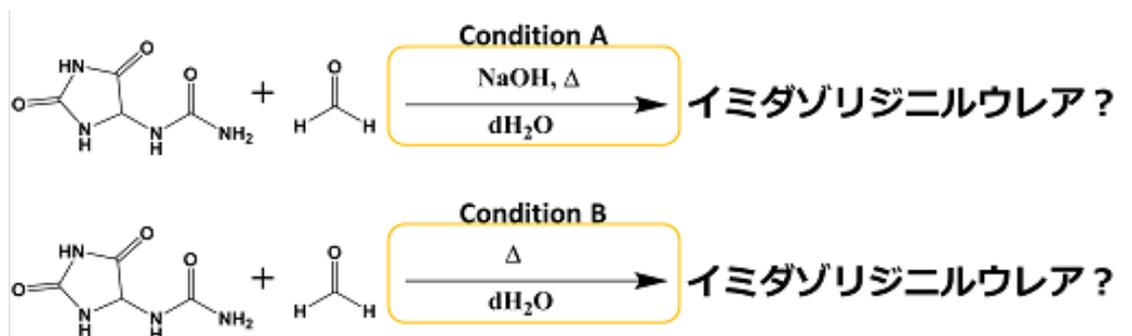


図1. 検証したイミダゾリジニルウレア合成法

ホルムアルデヒド遊離型防腐剤および分解物の DPRA (Direct Peptide Reaction Assay, ペプチド結合性試験) による皮膚感作性評価

DPRAについては一部条件を除いて、皮膚感作性試験評価報告書 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) : ペプチド結合性試験(JaCVAM皮膚感作性試験資料編纂委員会)、2015にしたがって実施した。

### 1) 試薬・試液

システイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) およびリジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH) についてはスクラム社製のものを用いた (純度 >95%)。イミダゾリジニルウレアについては、Sigma Aldrich 製 imidurea (2 次標準, traceable to USP) を、DMDM ヒダントインは AK scientific 製のものを、その他試薬は、富士フイルム和光純薬製のものを用いた。水は Milipore 社製 Milli-Q Advantage (機器分析タイプ) で調製した超純水を用いた。

### 2) ペプチド溶液および各種試料溶液の調製

システイン含有ペプチドはリン酸緩衝液 (pH7.5) で 0.667 mM にリジン含有ペプチドは酢酸アンモニウム緩衝液 (pH10.2) に 0.667 mM になるように調製した。陽性対照にはシナムアルデヒドをアセトニトリルで 100 mM に調製した溶液を用いた。被検物質はそれぞれ溶解性を調べ、アセトニトリルまたはジメチルスルホキシド/アセトニトリル (1:1) を用いて 100 mM に調製した。被検物質および陽性対照はシステイン含有ペプチドと 10 : 1、リジン含有ペプチドと 50 : 1 になるように混合し、室温で 24 時間放置したものを HPLC により分析を行った。

### 3) 分析条件

HPLC-PDA: e2695 HPLC (Waters 製)

移動相 : (A) 0.1% トリフルオロ酢酸水

(B) 0.085% トリフルオロ酢酸アセトニトリル

時間 (分)	A%	B%
0	90	10
10	75	25
11	10	90
13	10	90
13.5	90	10

カラム : L-column ODS (化学物質評価研究機構製、100 mm × 2.1 mm、3.0 μm)

カラム温度 : 30

注入量 : 50 μL

流量 : 0.35 mL/min

測定波長 : 220 nm

### 4. 研究成果

イミダゾリジニルウレアを構成する化合物について

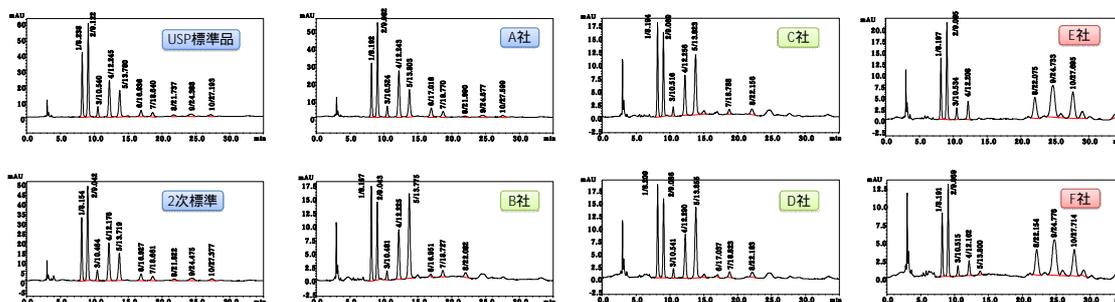


図 2. 各メーカー試薬の測定結果

6 社から購入した試薬を分析したところ、E 社・F 社試薬については USP 標準品や 2 次標準と HPLC のピークパターンが大きく異なっていた。B・C・D 社試薬は、類似したピークパターンを示したものの、USP 標準品や 2 次標準と比較してピーク面積値が大幅に低い傾向が確認された。2 次標準および A 社試薬は、ピークのサイズも含めて USP 標準品とほぼ類似したピークパターンであった。

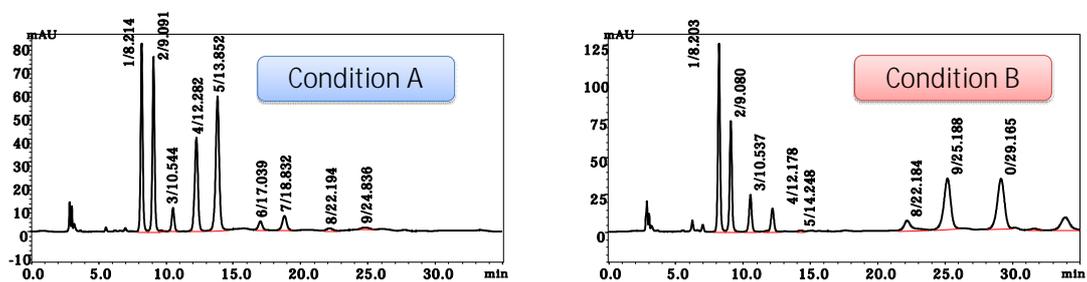


図3. 合成したイミダゾリジニルウレアの測定結果

A, Bの2条件でHPLCのピークパターンは大きく異なっていた。USP標準品、2次標準、A~D社の試薬は、条件Aで合成した場合のピークパターンと良く一致していた。E, Fの両社から購入したイミダゾリジニルウレアは条件Bで合成した場合のピークパターンと同様であった。

2次標準はLC-MSやIR, NMR等を用いて特定のロットのUSP標準品との一致が確認されており、今回の分析結果もピーク面積比を含めてほぼ同等であった。各試薬はUSP同様窒素含量により規格が設定されていたが、HPLCで分析したところピークパターンまたは各ピークのピーク面積値が多様であったことから、品質管理上はHPLCによる分析が有用であると考えられた。

ホルムアルデヒド遊離型防腐剤および分解物のDPRA (Direct Peptide Reaction Assay, ペプチド結合性試験) による皮膚感作性評価

日本国内で使用が認められている、イミダゾリジニルウレア (IU)・DMDMヒダントインおよびその分解物について、ペプチド結合性試験 (DPRA) による皮膚感作性評価を行った。IU、DMDMヒダントインおよび1-MDMヒダントインについてはシステイン含有ペプチド、リジン含有ペプチドともにペプチドピークの減少が認められ、感作性は陽性と判定された。ホルムアルデヒドはリジン含有ペプチドではペプチド以外のピークと重なりが認められたため、システイン含有ペプチドのみの予測モデルを用い、陽性と判定された。これまでに試験を実施した分解物のうち、アラントイン、DMヒダントインはいずれのペプチドでもピークの減少は認められず、DPRAの判定は陰性であった。ホルムアルデヒドを遊離する分解物は陽性、ホルムアルデヒドを遊離しない分解物は陰性の判定を示したが、各反応系で生成すると想定される推定ホルムアルデヒド量とペプチドピークの減少割合には必ずしも相関が見られず、ホルムアルデヒドの寄与によらない皮膚感作の存在が示唆された。本研究で得られた結果を元に、さらに詳細な検討を行うことでホルムアルデヒド遊離型防腐剤による皮膚感作性の原因物質を特定することが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

化粧品に使われるホルムアルデヒド遊離型防腐剤

著者名/発表者名 **土井崇広**

雑誌名 都薬雑誌 巻 : 38 ページ : 12-16

〔学会発表〕(計3件)

固相分解抽出法を用いた化粧品中の防腐剤イミダゾリジニルウレア定量法開発について

著者名/発表者名 **土井崇広**、清田恭平、浅田安紀子、武田章弘、田上貴臣、沢辺善之

学会等名 日本薬学会第138年会(2018)

発表場所 石川

化粧品中のホルムアルデヒド遊離型防腐剤イミダゾリジニルウレア定量法開発について

著者名/発表者名 **土井崇広**、沢辺善之

学会等名 第54回全国衛生化学技術協議会年会(2017)

発表場所 奈良

イミダゾリジニルウレアを構成する化合物について

著者名/発表者名 **土井崇広**、浅田安紀子、沢辺善之

学会等名 日本薬学会第137年会(2017)

発表場所 仙台

〔その他〕

ホームページ等

大阪健康安全基盤研究所 HP

化粧品に配合される防腐剤「イミダゾリジニルウレア」について

<http://www.iph.osaka.jp/s013/040/030/010/20180108110000.html>