

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700796

研究課題名(和文)化粧品中のホルムアルデヒド遊離型防腐剤による接触皮膚炎発症の原因解明に関する研究

研究課題名(英文) Study of the responsible compounds for contact dermatitis caused by the formaldehyde releasers in cosmetics

研究代表者

土井 崇広 (Takahiro, Doi)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：90516767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：化粧品に配合されるホルムアルデヒド遊離型防腐剤について定量分析法を開発した。また構築した手法をもとに、化粧品中で生じているホルムアルデヒド遊離型防腐剤由来の、未知分解物を同定した。イミダゾリジニル尿素、及びジアゾリジニル尿素の2種類の防腐剤からは共通の2種類の化合物が生じており、両化合物間の交差反応性に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have developed the method to determine formaldehyde-releasers in cosmetics. Using the developed method, we identified unknown compounds derived from formaldehyde-releasers in cosmetics. Two common decomposition products were found from cosmetics containing imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea. These common decomposition compounds were possible causative agent of cross-reaction between imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：化粧品 防腐剤 皮膚感受性 ジアゾリジニル尿素 イミダゾリジニル尿素 DMDMヒダントイン

1. 研究開始当初の背景

ホルムアルデヒド(FA)遊離型防腐剤は、化粧品に対して欧米ではパラベン類について高い頻度で配合される防腐剤である。アメリカでは全体の約20%に使用されており、その中でもDMDMヒダントイン(DMDMH)・イミダゾリジニル尿素(IU)・ジアゾリジニル尿素(DU)が使用頻度の上位を占めている。

一方でFA遊離型防腐剤はアレルギー性接触皮膚炎の原因となることが分かっており、全症例のうち10%以上で原因となっているとする報告も見られる。従来、FAが接触皮膚炎の主たる原因だと考えられてきたが、パッチテストでFAには反応しないなど、FAの作用だけでは説明できない事例も報告されている。FA遊離型防腐剤はFAを遊離して、自身も他の構造の分解物を生じると考えられることから、FA以外の分解物が発症に関与している可能性が疑われた。しかし、FAを遊離して生じるとされるFA以外の分解物については、これまで殆ど研究されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、ホルムアルデヒド(FA)遊離型防腐剤が原因となる接触皮膚炎の活性本体を明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

1) イミダゾリジニル尿素分解物の同定

1 試薬

LC/MS用アセトニトリル、HPLC用テトラヒドロフラン、試薬特級酢酸、アラントイン、アンモニア水、および酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)より入手した。IU、DUはSigma製のものをを用いた。(4-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (HU)、(3,4-bishydroxymethyl)-2,5-dioxo-imidazolidine-4-yl)-urea (3,4-BHU)はそれぞれDUを0.2 mol/Lのアンモニア水溶液に溶解して3%および0.1%に調製した溶液から精製した。DUアンモニア水溶液をそれぞれ2時間室温で混和して分解させ、凍結乾燥したものを、20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液(pH 4.0)で再溶解して20%溶液とした。得られた溶液をアセトニトリルで10倍に希釈し、フィルターを通過後、HPLCで分取精製を行った。カラムにはCOSMOSIL HILICカラム(10 mm×250 mm、粒径5 μm、ナカライテスク)を用い、移動相はアセトニトリル/水(9:1)のアイソクラティック条件で、流速は4.0 ml/分、PDA検出器は波長210 nmに設定した。サンプル注入量は250 μl、カラム温度は30℃で分離を行った。回収した分画を凍結乾燥してHU、3,4-BHUを得た。

2. 装置およびクロマトグラフ条件

HPLCはフォトダイオードアレイ(PDA)検出器を接続したLC-10AD(島津製作所)を

用いた。分離にはCOSMOSIL HILICカラム(4.6 mm×250 mm、粒径5 μm、ナカライテスク)を用いた。移動相はアセトニトリル/水(9:1)のアイソクラティック条件で、流速は1.0 ml/分、PDA検出器は210~370 nmの範囲を測定し、定量には波長210 nmにおけるクロマトグラムを用いた。サンプル注入量は50 μl、カラム温度は30℃で分析を行った。LC-ESI-MSはProminence UFLC高速液体クロマトグラフィシステム(島津製作所)にLCMS-2020四重極型質量分析装置(島津製作所)を接続したものをを用いた。分離にはCOSMOSIL HILICカラム(2.0 mm×150 mm、粒径5 μm、ナカライテスク)を用いた。移動相はアセトニトリル/10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液(95:5)のアイソクラティック条件で、流速は0.2 ml/分、サンプル注入量は10 μlであった。カラム温度は30℃で分析を行った。質量分析装置のパラメータは以下の通りであった。

イオンソース温度 350℃、脱溶媒部温度 250℃、キャピラリー電圧 5.0 kV、Q-array DC電圧 35 V、脱溶媒部電圧 35 V、脱溶媒ガス流量 900 L/時間。スキャンモード分析ではm/z 100~m/z 350の範囲を測定し、SIMモードではm/z 157、187、217、247を測定した。LC/MSはすべてネガティブモードで行った。

3. 化合物精製と¹H-NMR

化合物BはアラントインとFAを、1:1.2のモル比で0.1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液中で反応させた溶液から精製した。上の混合液を2時間60℃でインキュベートしたのち凍結乾燥し、20 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液(pH 4.0)で溶解して20%とした。得られた溶液をアセトニトリルで10倍に希釈し、フィルターを通過後、HPLCで分取精製を行った。カラムにはCOSMOSIL HILICカラム(10 mm×250 mm、粒径5 μm、ナカライテスク)を用い、移動相はアセトニトリル/水(9:1)のアイソクラティック条件で、流速は4.0 ml/分、PDA検出器は波長210 nmに設定した。サンプル注入量は500 μl、カラム温度は30℃で分離を行った。回収した分画は凍結乾燥し¹H-NMRでの分析に用いた。

¹H-NMRは日立化成テクノサービスで分析を行った。使用した装置はAV400M(Bruker biospin)で重水素化ジメチルスルホキシドを溶媒に用い、観測周波数は400.13 MHzで測定した。

4 試料溶液の調製

化粧品、緩衝液の調製は以下の通りであった。0.1 g(または0.1 ml)の試料を15 mlポリプロピレンチューブ(Falcon)にとり、0.15 mlの0.02 mol/l酢酸アンモニウム溶液(pH 4.0)と2.25 mlの超純水を加えて激しく混和した。その混液を10分間室温で、毎分約3000回転で遠心分離した。上清を0.45 μmポリエーテルスルホンフィルターでろ過し、

HPLC 分析試料溶液とした。

ワセリンを基材とする試料については、試料溶液の調製に変法を用いた。ワセリン基材試料を 0.1 g をとり、300 μ L のテトラヒドロフランを用いて溶解させた後、700 μ L の 20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.0) を加えた。その混液を 10 分間室温で、毎分約 3000 回転で遠心分離した。水層を新しい 15 mL ポリプロピレンチューブにとり、アセトニトリルで 10 倍に希釈して HPLC 分析試料溶液とした。

2) DMDM ヒダントインの分析法開発

1 試薬・試液等

LC/MS 用メタノール、LC/MS 用ギ酸、特級塩酸、1-メチロール-5,5-ジメチルヒダントイン (1-MDMH) および 5,5-ジメチルヒダントイン (DMH) については和光純薬工業社製のものを用了。DMDMH は AK Scientific 社より入手した。3-メチロール-5,5-ジメチルヒダントイン (3-MDMH) については、0.2% DMDMH メタノール溶液を 55 で水浴中加熱後、0.1% HCl 水溶液を加えて減圧濃縮し、凍結乾燥して得た。

2 標準液の調製

標準原液は、4 種類の DM ヒダントイン類 (DMDMH, 1-MDMH, 3-MDMH, DMH) 10 mg をとり、それぞれ 0.1 mol/L 塩酸溶液で 10 mL として調製した。混合標準溶液は、各 100 mg をとり、0.1 mol/L 塩酸溶液で 10 mL として調製した。

3 分析装置および分析条件

分析には、島津製作所製、フォトダイオードアレイ検出器つき高速液体クロマトグラフシステム (LC-10A シリーズ) を用いた。

HPLC による分離は 40 で行い、化学物質評価研究機構製の ODS カラムである L-column ODS カラム (粒子径 5 μ m、4.6 mm I.D. \times 150 mm) を用い、アイソクラティック条件下で分析した。移動相は 0.1% ギ酸水溶液とメタノールを 97:3 で混合した液を用い、流速は 1.0 mL/分とした。サンプル注入量は 50 μ L で、210 nm から 370 nm までのスペクトルを採取して化合物の同定確認を行い、定量波長には 220 nm を用いた。

4 試料溶液の調製

化粧品試料 0.5 g (または 1.0 g) を 0.1 mol/L 塩酸溶液で 10 倍 (1.0 g の場合には 20 倍) 容量とした。この混合溶液を毎分 3000 回転で 10 分間、室温で遠心分離し、その上清を 0.45 μ m のポリエーテルスルホン酸フィルター (大日本精機社製) でろ過し、HPLC 用試料溶液とした。

5 添加回収試験用化粧品試料

添加回収試験用化粧品試料 (0.1% または 0.05%) は、1.0% の混合標準溶液を DM ヒダ

ントイン類が配合されていない市販化粧品試料を用いて 10 倍または 20 倍に希釈して調製した。低濃度試料は、0.1% 試料を化粧品で希釈し調製した。

6 バリデーション

分析法のバリデーションは、International Conference on Harmonization (ICH) のガイドラインに従った。

4. 研究成果

1) イミダゾリジニル尿素分解物の同定

IU 水溶液、含有化粧品、パッチテスト試料中には、少なくとも IU 由来の化合物が 7 種類以上存在することを明らかにした。LC-MS による分析の結果は、化粧品中で IU は主にアラントイン、HU あるいは 3,4-BHU に分解することを示している。また 7 種類の IU 由来化合物のうち 4 種類の化合物は、DU 水溶液中の化合物と同一の化合物であることを明らかにした。HU と 3,4-BHU は共に、IU / DU 配合化粧品の主要な分解物であった。それゆえ、HU と 3,4-BHU は DU、IU の両防腐剤間の交差反応性に大きな役割を果たしていることが示唆された。

ヒトパッチテストによる研究では、他の FA 遊離型防腐剤に比較して IU / DU 間で高い交差反応性を示すこと、共通のアレルゲンが存在することが報告されている。一方、2006 年の Lehman らの報告では、HU が IU / DU に共通した構成成分であることが示されていた。HU は IU と DU の交差反応原因物質の、魅力的な候補化合物と考えられたが、HU は当時の報告では構成する成分のうち、IU で 10%、DU で 40% しか含まれず、その他の化合物の構造は明らかにされていなかった。

HPLC および LC/MS では、IU 水溶液がパッチテスト試料と同様の 7 種の IU 由来化合物より構成されていることが示された。LC/MS の結果は、これらの構成成分がアラントインおよび 1~3 分子 FA が付加した化合物であることが示唆された。水溶液やワセリンパッチテスト試料中の IU はほとんどが HU、3,4-BHU および 3-HU として存在していた。

これらの化合物の質量スペクトルの特徴として、アラントインおよび HU という FA として遊離しうるヒドロキシメチル基を持たない化合物を除いては、ネガティブモード ESI 質量スペクトルで FA ユニットが脱離したイオンが確認された点が挙げられる。7 種の構成化合物は、そのフラグメンテーションのパターンから 2 群に分類された。3 種類の化合物は、質量スペクトル中に m/z 157 にイオンが確認され、残り 4 種の分解物では、m/z 157 のイオンはほとんど認められなかった。これらの違いは、同定された化合物の骨格から推測することができる。イミダゾリジン環を構成する炭素原子に直接結合した水素原子があるかどうか、つまり化合物がアラントイン骨格を持つか、HU 骨格を持つかに関係している。

配合化粧品中で IU に何が起きているのかを調査するために、IU を緩衝液で溶解した溶液を 25 で長期間保存し、構成化合物の経時的变化を追跡した。HU 骨格とアラントイン骨格の構成比率は、pH4.0、6.5 の緩衝液中では 30 日間で変化が見られなかったが、pH9.0 では HU 骨格の化合物が増加していた。pH9.0 の条件下では、遊離された FA がアラントイン骨格の化合物と反応し、HU 骨格を形成しているものと考えられた。IU の構成成分は、水溶液やワセリンパッチテスト試料と、化粧品中では異なっていた。最も大きな差は、アラントイン骨格化合物と HU 骨格化合物の比率であった。水溶液やパッチテスト試料では IU 由来化合物はおおむね等量の HU およびアラントイン骨格化合物として存在していたが、化粧品中では配合された IU のほとんどが HU 骨格の化合物として存在していた。HU 骨格化合物のみで構成される DU は、アラントインに FA を水酸化ナトリウム塩基性条件下で反応させて合成すると報告されている。塩基性の緩衝液や化粧品中でも、同様の反応が起こっているのかもしれない。その結果として、化粧品に配合された IU は主に HU や 3,4-BHU によって構成されていたと考えられる。

2) DMDM ヒダントインの分析法開発

試薬として入手できなかった 3-MDM ヒダントインについて、DMDMH から選択的に分解させる手法を確立した。化粧品試料の塩酸抽出液を遠心分離後フィルターを通過したものを HPLC 分析溶液とし、0.1%ギ酸：メタノール=97:3 を移動相として用いることで、ODS カラムによる DMDMH とその 3 種の分解物の同時定量分析を可能とした。

4 種類の DM ヒダントイン類化合物について、標準混合溶液を用いて検量線を作成し、直線性の評価を行った。すべての化合物について、3~1000 mg/L の範囲において良好な直線性を示し、相関係数はすべての濃度範囲において、また対象化合物について 0.992 を上回っていた。

真度および精度は市販化粧品（化粧水、コンディショナー、ボディソープ）を用いた添加回収試験により評価した。3 濃度において 3 回試験を実施したところ、コンディショナーではすべての対象化合物で、89%~109%と良好な回収率であった。化粧水 2（500 mg/L 添加）では、3-MDMH と DMH の回収率が大きく 100%を上回っており、一方 1-MDMH と DMDMH の回収率は 100%を割り込んでいた。ボディソープではより顕著であり、低濃度の添加試料では 1-MDMH と DMDMH が全く検出されなかった。4 化合物の平均回収率は概ね一定であったことから、試料調製時または試験中に 1-MDMH と DMDMH が分解し、それぞれ DMH および 3-MDMH を生じている可能性が考えられた。市販化粧品に約 20%の 0.1

mol/L HCl 溶液を混合したものをを用いて、添加回収試験を実施したところこの傾向は確認されなくなった。従って、1-MDMH と DMDMH から DMH、3-MDMH への分解は、試験実施中ではなく、添加回収用試料の調製時に進行していたと考えられた。

DMDMH は塩基性および中性条件下で分解が進行しやすいため、製造時に化粧品に配合された DMDMH を、直接そのものを分析することで定量するのは困難である。しかし、本研究のように生じるすべての分解物を定量・合算することで、DMDMH の配合量を算出することが可能となった。

5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1) T. Doi, A. Takeda, A. Asada, and K. Kajimura: Characterization of the decomposition of compounds derived from imidazolidinyl urea in cosmetics and patch test materials, *Contact Dermatitis*, **67**, 284-292(2012).

2) A. Asada, T. Doi, A. Takeda, and K. Kajimura: Quantification of 1,3-dimethylol-5,5-dimethylhydantoin and its decomposition products in cosmetics by high-performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal*, **67-68**, 163-168 (2012).

3) A. Aoyama, T. Doi, T. Tagami, and K. Kajimura: Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr Sci*, (in press)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 浅田安紀子、土井崇広、青山愛倫、武田章弘、田上貴臣、梶村計志
化粧品中の 1,3-ジメチロール-5,5-ジメチルヒダントインとその分解物の定量について
日本薬学会第 133 年会(2013)横浜

2) 青山愛倫、浅田安紀子、土井崇広、田上貴臣、梶村計志、沢辺善之
化粧品中の防腐剤一斉分析法について

第 50 回全国衛生化学技術協議会年会(2013)
富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

化粧品中のホルムアルデヒド遊離型防腐剤
とホルムアルデヒドによるアレルギー性接
触皮膚炎について
[http://www.iph.pref.osaka.jp/merumaga/b
ack/106-2.html](http://www.iph.pref.osaka.jp/merumaga/back/106-2.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者
()

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：