

## 医薬品添加物に含まれる食物アレルゲンタンパク質に関する研究

酒井信夫, 安達玲子<sup>#</sup>, 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 奥田晴宏, 手島玲子

### Studies on the food allergenic proteins contained in pharmaceutical excipients

Shinobu Sakai, Reiko Adachi<sup>#</sup>, Tamaki Miyazaki, Yukio Aso, Haruhiro Okuda and Reiko Teshima

Most drugs contain pharmaceutical excipients. These are pharmacologically inactive substances used as vehicles for the active ingredients of a medication. Some of these pharmaceutical excipients are produced from allergenic foods (e.g., milk, egg, peanut, soybean, and sesame) and removing proteins completely from such excipients is difficult. Therefore, if individuals with food allergy consume drugs containing allergenic food-derived excipients, eliminating the risk of developing specific allergic symptoms induced by them may not be possible.

We determined the levels of proteins in pharmaceutical excipients and ethical drugs (inhalants and injections) by spectrophotometric analyses. The level of protein in the pharmaceutical excipient lactose in each sample was approximately 1 mg/g. In the case of oils from soybeans, peanuts, and sesame in pharmaceutical excipients, proteins were detected in the range 7-9  $\mu\text{g/g}$  sample. We also determined levels of allergenic proteins in pharmaceutical excipients and ethical drugs using commercial enzyme-linked immunosorbent assay systems. The milk proteins in lactose were detected in the range 1.39-13.07  $\mu\text{g/g}$ .

The results of this study suggest that physicians, patients with food allergies, pharmacists, and healthcare providers must pay attention to presence of potential impurities those may cause allergic symptoms in pharmaceutical products.

Keywords: Food allergy, Pharmaceutical excipient, Lactose

#### 緒言

医薬品, 化粧品, 医薬部外品には, 様々な添加物が含有されているが, それらの中には食物アレルギーの原因となる牛乳や鶏卵, 落花生, 大豆, ゴマなど食品に由来するものも存在する. 非タンパク質性の添加物の場合でも, その製造工程においてタンパク質を完全に除去することは難しい. そのため, このような添加物を含有する医薬品を当該食品に対するアレルギー患者が使用した際に, アナフィラキシーなどの重篤な症状も含め, 様々なアレルギー反応が惹起された症例が報告されている<sup>1-4)</sup>.

他方, 食物アレルギーを起こすことが知られている食

品を原料とする医薬品添加物に含まれるアレルゲンタンパク質に関しては, その実態を定量的・定性的に調査した報告はない. また, 近年我が国では, 後発医薬品の普及が進められ, その使用量が増大しているが, 医薬品の主成分ではない添加物については, 種類や含有量に関して先発医薬品と後発医薬品との間に違いが生じる場合も考えられる. 食物アレルギー原因食品に由来する添加物に関してこのような違いが生じる場合, 特に添加物の含有量が多い場合には, 食物アレルギー患者にとっては特に注意が必要となる.

本研究では, 医療用医薬品のうち, 含有成分が比較的ダイレクトに体内に吸収されやすい「吸入剤」及び「注射剤」を対象として, これらの医薬品に使用されている添加物, 及び実際の医薬品を対象としてアレルギー原因食品に由来するタンパク質含有量に関する検討を行った.

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Reiko Adachi: Division of Novel Foods and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 242, Fax: +81-3-3700-7438; E-mail: akasaka@nihs.go.jp

実験方法

1. 試料

医薬品添加物7種（無水乳糖1種，乳糖水和物2種，ダイズ油1種，ラッカセイ油1種，精製卵黄レシチン1種，ゴマ油1種），及び参考試料として食品の添加物・原材料3種（大豆レシチン2種，乳糖水和物1種）を入手した。また，実際の医療用医薬品として，吸入剤4種（長時間作用型ノイラミニダーゼ阻害剤1種，吸入ステロイド喘息治療薬2種，抗インフルエンザウイルス剤1種），注射剤10種（プロスタグランジンE1製剤2種，静注用脂肪乳剤2種，抗悪性腫瘍剤2種，止血機構賦活ビタミン1種，持続性黄体ホルモン製剤2種，重金属解毒剤1種）を入手した。これらの試料リストをTable 1及び2に示す。Table 2のD5とD6，D7とD8，D9とD10，D12とD13はそれぞれ同種の製剤の先発薬と後発薬のペアとなっている。

Table 1 The list of pharmaceutical excipient sample

Pharmaceutical excipients		
M1	Lactose, anhydrous	(powder)
M2	Lactose hydrate	(powder)
M3	Lactose hydrate	(powder)
M4	Soybean oil	(oil)
M5	Peanut oil	(oil)
M6	Egg yolk lecithin	(lyophilized lipid)
M7	Sesame oil	(oil)
Food additives		
F1	Soybean lecithin	(oil)
F2	Soybean lecithin	(powder)
F3	Lactose hydrate	(powder)

Table 2 The list of ethical drug sample

	Pharmaceutical excipients	Contents	Dosage and administration
Inhalants			
D1	Lactose hydrate		100 mg (powder)/2 containers/time
D2	Lactose hydrate		100 mg (powder)/4 blisters/day
D3	Lactose hydrate		100 mg (powder)/4 blisters/day
D4	Lactose hydrate		100 mg (powder)/4 blisters/day
Injections			
D5*	Soybean oil	200 mg/2 mL (ampule)	1-2 mL/once/day
	Egg yolk lecithin	36 mg/2 mL (ampule)	(intravenous injection with infusion fluid)
D6#	Soybean oil	200 mg/2 mL (ampule)	1-2 mL/once/ day
	Egg yolk lecithin	36 mg/2 mL (ampule)	(intravenous injection with infusion fluid)
D7*	Egg yolk lecithin	6 g/500 mL	200-500 mL/once/day (intravenous injection)
D8#	Egg yolk lecithin	3 g/250 mL	250 mL/once/day (intravenous injection)
D9*	Lactose hydrate	500 mg (vial)	100 mg/once/ day (intravenous injection)
D10#	Lactose hydrate	500 mg (vial)	100 mg/once/ day (intravenous injection)
D11	Sesame oil	4 mg/2 mL (ampule)	2-4 mL/once/day (intravenous injection)
	Soybean lecithin	16 mg/2 mL (ampule)	
D12*	Sesame oil	proper dose	1 mL/once/week (intramuscular injection)
D13#	Sesame oil	proper dose	1 mL/once/ week (intramuscular injection)
D14	Peanut oil	proper dose	1-2 mL/four times/first day (intramuscular injection)

\* Brand-name drugs, # Generic drugs.  
D7 and D8 contain soybean oil as an active ingredient.

2. 装置

紫外可視分光光度計はThermo Scientific社製 Multiskan FC及びGEヘルスケア社製 Ultrospec 6300 proを用いた。

高速液体クロマトグラフは，島津製作所製LC-10<sub>vp</sub>システムを用い，以下の条件によって分析を行った。

HPLC条件

カラム：Shodex KW402.5-4F（昭和電工（株），4.6 mm i.d. x 200 mm，粒径 3 μm）

カラム温度：30℃

移動相：0.3M 塩化ナトリウムを含む50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）

流速：0.3 mL/min

検出器：紫外可視吸光度検出器 280 nm

3. 試験操作

試料中のタンパク質の定量は，吸光度法による総タンパク質の定量，及び食物アレルギー原因食品由来のタンパク質を定量するELISA法の2種類の方法を用いて行った。また，無水乳糖及び乳糖水和物に関しては，日本薬局方に設定されるタンパク質性の不純物量を規制する試験法「たん白質及び光吸収物質」<sup>5)</sup>に準じ，それらの純度を確認した。

3.1 医薬品添加物及び医療用医薬品中の総タンパク質の定量（吸光度法）

吸光度法においては，試料からのタンパク質の抽出方

法は、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」<sup>6)</sup>の別添4「標準品規格」に示される「卵検知用標準液」及び「牛乳検知用標準液」に共通する標準品原液調製方法に従った。乳糖及び乳糖含有医薬品試料中の総タンパク質の定量には、抽出液として0.5% SDS及び2% 2-メルカプトエタノールを含有するPBS (pH 7.4) を用い、2-D Quant Kit (GEヘルスケア社)を用いて定量した。油脂(精油及びレシチン)及び油脂含有医薬品試料中の総タンパク質の定量には、抽出液としてPBS (pH 7.4)を用い、Coomassie Protein Assay Kit (Bradford法)(Thermo Scientific社)を用いて定量した。

### 3.2 医薬品添加物及び医療用医薬品中のアレルギー原因食品由来タンパク質の定量 (ELISA法)

ELISA法による牛乳、卵、及び大豆のタンパク質の定量には、市販ELISAキットである、FASTKITエライザ Ver. II卵/牛乳/大豆(日本ハム(株))、及びアレルギーアイELISA牛乳(プリマハム(株))を用いた。

### 3.3 医薬品添加物及び医療用医薬品中の牛乳アレルギータンパク質の定性的検出

定性的検出には、牛乳中の主要アレルギータンパク質を標的とするウェスタンブロットキットである、FASPEK牛乳ウェスタンブロットキット $\beta$ -ラクトグロブリン/カゼイン((株)森永生科学研究所)を用いた。一次抗体(ウサギ抗 $\beta$ -ラクトグロブリン抗体及びウサギ抗カゼイン抗体)は、キットの調製方法に従いブロッキング溶液で100倍希釈とした。二次抗体にはHRP標識抗ウサギIgG抗体(GEヘルスケア社)を10,000倍希釈で用

い、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GEヘルスケア社)を基質として化学発光により検出を行った。

## 結果

### 1. 医薬品添加物及び医療用医薬品中の総タンパク質の定量 (吸光度法)

医薬品添加物及び医療用医薬品に含まれる総タンパク質量を吸光度法により定量した結果をTable 3及びTable 4に示す。Table 4に示すD5とD6, D7とD8, D9とD10, D12とD13はそれぞれ同種の製剤の先発薬と後発薬のペアとなっている。

医薬品添加物の乳糖(M1~M3)については、総タンパク質含有量は1 mg/g程度であった。無水乳糖(M1)では、乳糖水和物(M2及びM3)と比較してタンパク質含有量が低い傾向が見られた。参考試料である食品用の乳糖(F3)では、医薬品添加物である乳糖水和物と同程度のタンパク質が検出された。

ダイズ油(M4)、ラッカセイ油(M5)、及びゴマ油(M7)のタンパク質量はそれぞれ、8.7  $\mu$ g/g, 8.8  $\mu$ g/g, 7.1  $\mu$ g/gであった。精製卵黄レシチン(M6)、及び参考試料である食品添加物の大豆レシチン(F1及びF2)については、試料の着色あるいは抽出液の白濁等のため、吸光度法による定量は不可能であった。

医療用医薬品のうち、添加物として乳糖水和物が含まれる吸入剤(D1~D4)では、タンパク質含有量は1 mg/g程度であり、添加物である乳糖そのものと同程度であった。注射剤D9及びD10については、製剤中に含まれる化合物が吸光度法試薬中の銅イオンとキレートを形成したためと思われるが、吸光度測定が妨害された

Table 3 Determination of proteins in pharmaceutical excipient samples

	Spectrophotometric methods		ELISA methods			
	2-D Quant kit ( $\mu$ g/g)	Bradford kit ( $\mu$ g/g)	Milk kit <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/g)	Milk kit <sup>2)</sup> ( $\mu$ g/g)	Egg kit <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/g)	Soybean kit <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/g)
<b>Pharmaceutical excipients</b>						
M1 Lactose, anhydrous	835 $\pm$ 386		1.39	1.80		
M2 Lactose hydrate	1207 $\pm$ 122		3.12	7.54		
M3 Lactose hydrate	1122 $\pm$ 103		7.16	13.07		
M4 Soybean oil		8.7 $\pm$ 7.0				<0.31
M5 Peanut oil		8.8 $\pm$ 2.3				
M6 Egg yolk lecithin		ND <sup>†</sup>			<0.31	
M7 Sesame oil		7.1 $\pm$ 1.4				
<b>Food additives</b>						
F1 Soybean lecithin		ND <sup>†</sup>				0.92
F2 Soybean lecithin		ND <sup>†</sup>				8.45
F3 Lactose hydrate	1213 $\pm$ 100		0.53	0.56		

Extraction buffers; 2-D Quant kit: PBS (pH 7.4) containing 0.5% (w/v) SDS and 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, Bradford kit: PBS (pH 7.4), each ELISA kits: 120 mM Tris HCl (pH 7.4) containing 0.1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.5% (w/v) SDS, and 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Limit of quantification; 2-D Quant kit: 125  $\mu$ g/g sample, Bradford kit: 3.13  $\mu$ g/g sample, each ELISA kit: 0.31  $\mu$ g/g sample. <sup>1)</sup> FASTKIT ELISA ver II (Nippon Meat Packers Inc.), <sup>2)</sup> Allergen Eye (Prima Meat Packers Ltd.). <sup>†</sup> ND: Not determined because of matrix interferences.

**Table 4** Results of the determination of protein in ethical drug sample

Pharmaceutical excipients	Spectrophotometric methods		ELISA methods			
	2-D Quant kit (μg/g)	Bradford kit (μg/g)	Milk kit <sup>1)</sup> (μg/g)	Milk kit <sup>2)</sup> (μg/g)	Egg kit <sup>1)</sup> (μg/g)	Soybean kit <sup>1)</sup> (μg/g)
<b>Inhalants</b>						
D1 Lactose hydrate	924		2.07	7.13		
D2 Lactose hydrate	1436		4.12	10.90		
D3 Lactose hydrate	1031		0.64	1.03		
D4 Lactose hydrate	1547		2.29	5.20		
<b>Injections</b>						
D5* Soybean oil		ND <sup>†</sup>			<0.31	<0.31
Egg yolk lecithin						
D6# Soybean oil		ND <sup>†</sup>			<0.31	<0.31
Egg yolk lecithin						
D7* Egg yolk lecithin		ND <sup>†</sup>			<0.31	<0.31
D8# Egg yolk lecithin		ND <sup>†</sup>			<0.31	<0.31
D9* Lactose hydrate	ND <sup>†</sup>		<0.31	<0.31		
D10# Lactose hydrate	ND <sup>†</sup>		1.85	7.40		
D11 Sesame oil		ND <sup>†</sup>				<0.31
Soybean lecithin						
D12* Sesame oil		1.89				
D13# Sesame oil		0.55				
D14 Peanut oil		ND <sup>†</sup>				

Extraction buffers; 2-D Quant kit: PBS (pH 7.4) containing 0.5% (w/v) SDS and 2% (v/v) β-mercaptoethanol, Bradford kit: PBS (pH 7.4), each ELISA kit: 120 mM Tris HCl (pH 7.4) containing 0.1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.5% (w/v) SDS, and 2% (v/v) β-mercaptoethanol. Limit of quantification; 2-D Quant kit: 125 μg/g sample, Bradford kit: 3.13 μg/g sample, each ELISA kit: 0.31 μg/g sample. <sup>1)</sup>FASTKIT ELISA ver II (Nippon Meat Packers Inc.), <sup>2)</sup>Allergen Eye (Prima Meat Packers Ltd.). <sup>†</sup> ND; Not determined because of matrix interferences. \* Brand-name drugs, # Generic drugs. D7 and D8 contain soybean oil as an active ingredient.

め、含有タンパク質を検出することができなかった。同様に、添加物として精製卵黄レシチン、精製ダイズレシチン、ダイズ油、ラッカセイ油が含まれる注射剤 (D5 ~ D8, D11, D14の6種) は製剤が白濁しており、吸光度測定が妨害されたため含有タンパク質を検出することができなかった。ゴマ油が含まれる注射剤 (D12及びD13) についてはタンパク質が検出され、その値はそれぞれ1.89 μg/g, 0.55 μg/gであった。

## 2. 医薬品添加物及び医療用医薬品中のアレルギー原因食品由来タンパク質の定量 (ELISA法)

医薬品添加物及び医療用医薬品に含まれるアレルギー原因食品由来のタンパク質の定量結果をTable 3及びTable 4に示す。

医薬品添加物の無水乳糖及び乳糖水和物 (M1 ~ M3) に含まれる牛乳タンパク質量については、牛乳中のタンパク質全体を抗原として調製した抗体を使用したキット (FASTKITエライザVer. II) を用いた場合には1.39 ~ 7.16 μg/g、牛乳中の主たるアレルギーであるβ-ラクトグロブリンに対する特異的抗体を使用したキット (アレルギーアイELISA) を用いた場合には1.80 ~ 13.07 μg/gという結果であった。他方、ダイズ油 (M4) 及び精製卵黄レシチン (M6) については、それぞれ大豆タンパク質、卵タンパク質は検出されなかった。

医療用医薬品の吸入剤 (D1 ~ D4) に含まれる牛乳タ

ンパク質量は、FASTKITエライザVer. IIを用いた場合には0.64 ~ 4.12 μg/g、アレルギーアイELISAを用いた場合には1.03 ~ 10.90 μg/gという結果であった。また、注射剤 (D10) においても、牛乳タンパク質が検出された (FASTKITエライザVer. IIを用いた場合には1.85 μg/g、アレルギーアイELISAを用いた場合には7.40 μg/g)。他方、精製卵黄レシチン、精製ダイズレシチン、ダイズ油が添加物として使用されている医療用医薬品 (D5 ~ D8, D11の5種。D7, D8は有効成分がダイズ油である) については、それぞれ卵タンパク質、大豆タンパク質は検出されなかった。

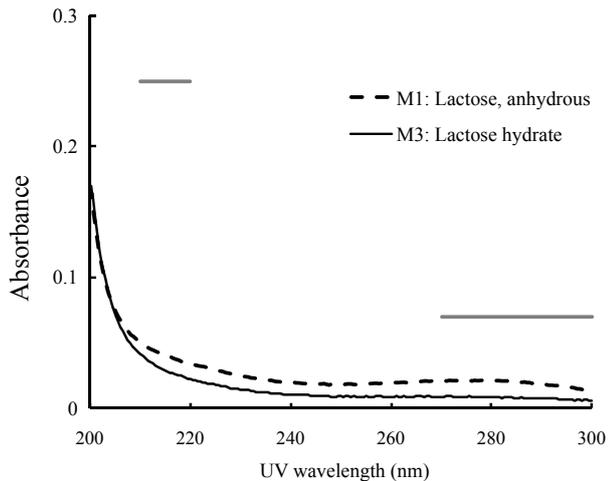
## 3. 乳糖水和物及び無水乳糖中のタンパク質性の不純物

日本薬局方において無水乳糖、乳糖水和物中のタンパク質性の不純物量を規制する試験法として、以下に示す「タンパク質及び光吸収物質」<sup>5)</sup> が設定されている。

### 「タンパク質及び光吸収物質」

本品1.0gをとり、水を加えて溶かし100 mLとし試料溶液とする。試料溶液につき水を対照とし、紫外可視吸光度測定法<2.24>により試験を行うとき、波長210 ~ 220nmにおける吸光度は0.25以下、270 ~ 300nmにおける吸光度は0.07以下である。

本試験法に従い、医薬品の製造に使用される無水乳糖



**Fig. 1** Ultraviolet absorption spectra of lactose  
Dashed line, M1: lactose, anhydrous; solid line, M3: lactose hydrate. Gray bars indicate the value of specification.

**Table 5** Spectrophotometric data of lactose as a pharmaceutical excipient

	Maximum absorption ( $\lambda_{max}$ )	
	210–220 nm (Specification*: $\leq 0.25$ )	270–300 nm (Specification*: $\leq 0.07$ )
M1 Lactose, anhydrous	0.05	0.02
M2 Lactose hydrate	0.05	0.02
M3 Lactose hydrate	0.04	0.01

\*Specifications are designated by the Japanese Pharmacopoeia<sup>5)</sup>.

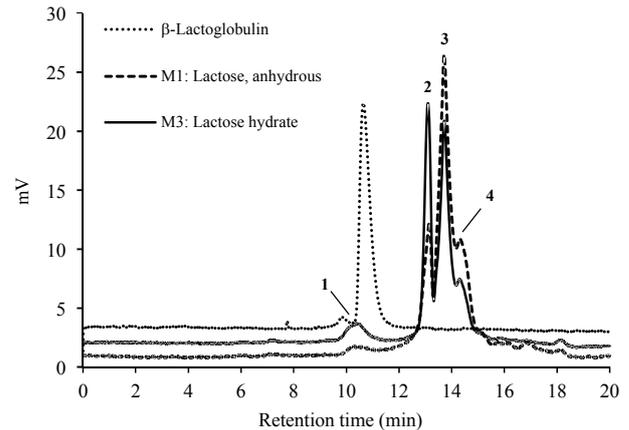
**Table 6** Estimation of the molecular weight of proteins in the lactose hydrate

Peak number	Retention time (min)	Molecular weight (kDa)
1	10.3	37.8
2	13.1	5.0
3	13.7	3.2
4	14.3	2.1

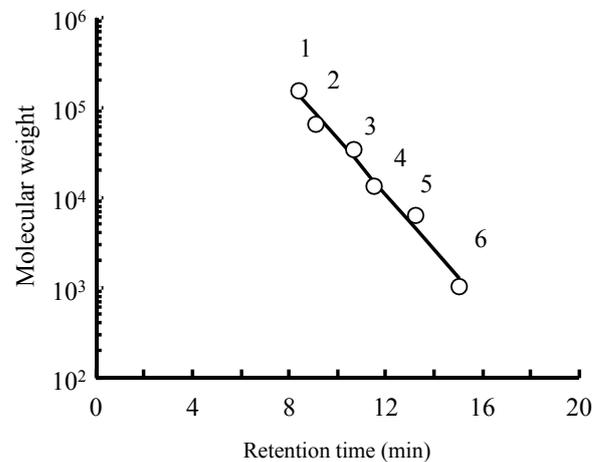
(M1), 乳糖水和物 (M2及びM3) について試験を行った。Fig. 1に200～300 nmの吸収スペクトルの実測値を示す。スペクトルはなめらかであり、タンパク質等の夾雑物に由来すると考えられる吸収は見られなかった。

Table 5に波長210～220nmおよび270～300 nmにおける無水乳糖 (M1), 乳糖水和物 (M2及びM3) の吸光度の測定結果を示す。何れの試料においても規格値 (210～220nm; 0.25以下, 及び270～300 nm; 0.07以下) と比較して十分小さい値であった。

次に、サイズ排除クロマトグラフィーにより、紫外領域に吸収を示す物質の実体について検討を行った。Fig. 2には無水乳糖及び乳糖水和物のクロマトグラムを示す。



**Fig. 2** HPLC chromatograms of lactose and  $\beta$ -lactoglobulin  
Dashed line, M1: lactose, anhydrous; solid line, M3: lactose hydrate; dotted line,  $\beta$ -lactoglobulin.



**Fig. 3** Relationship between molecular weight and the retention time of standard proteins on size-exclusion chromatography  
1,  $\gamma$ -Globulin (molecular weight: 158,000); 2, bovine serum albumin (67,000); 3,  $\beta$ -lactoglobulin (35,000); 4, ribonuclease A (13,700); 5, aprotinin (6,500); and 6, angiotensin II (1046).

す。保持時間10.3分, 13.1分, 13.7分, 及び14.3分にピークが見られた。

サイズ排除クロマトグラフィーは分子サイズが大きい試料から溶出され、分子量の対数と保持時間の間にはFig. 3にみられるように直線関係が成り立つ。

上述のキャリブレーションカーブに基づいて推定された乳糖水和物中の不純物の分子量をTable 6に示す。

無水乳糖及び乳糖水和物の主ピークであるピーク2及びピーク3 (保持時間13.1分及び13.7分) の推定分子量はそれぞれ5,000, 3,200であった。従って、紫外領域に吸収を示す物質は牛乳中のタンパク質の分解によって生じたペプチドがメインであると考えられた。分子量37,800 (ピーク1; 保持時間10.3分) の不純物は、乳清タンパク

質に含まれるβ-ラクトグロブリン（非還元条件下（二量体）の分子量35,000；保持時間10.7分）とは溶出時間が一致しないことから、牛乳アレルギーの主要なアレルギータンパク質の一つとして考えられるβ-ラクトグロブリンが含まれる可能性は低いものと考えられた。

#### 4. 医薬品添加物及び医療用医薬品中の牛乳アレルギータンパク質の定性的検出

前述のとおり、医薬品添加物である乳糖、及び添加物として乳糖を含有する医療用医薬品について牛乳由来のタンパク質の定量を行った結果、数μg/g程度の牛乳タンパク質が検出された。そこで、これらの試料に関してはウェスタンブロッティングを行い、それらに含まれるタンパク質の同定を試みた。結果をFig. 4に示す。

SDS-PAGE後にCoomassie Brilliant Blue染色を試みたところ、タンパク質量が少ないためと考えられるが、全く染色されなかった。次に、泳動タンパク質をPVDF膜に転写した後、牛乳の主要なタンパク質であり、かつアレルギータンパク質でもあるβ-ラクトグロブリン及びカゼインを特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれの試料についても、β-ラクトグロブリン（還元条件下（単量体）の分子量：18,400）及びカゼイン（還元条件下の見かけの分子量：33,000-35,000）と検出位置が一致する明瞭なバンドは検出されなかった。しかし、広範囲の分子量領域にわたって複数のタンパク質のバンドが確認された。さらに、これらバンドの化学発光による検出強度とELISA法による定量結果との間には、ある程度の相関性が認められた。

#### 考 察

##### 1. 医薬品添加物及び医療用医薬品中の総タンパク質の定量（吸光度法）

吸光度法を用いた場合、乳糖については、医薬品添加物及び医療用医薬品の両方ともに、1 mg/g程度のタンパク質が検出された。日本薬局方<sup>5)</sup>では、無水乳糖及び乳糖水和物について、純度試験（4）たん白質及び光吸収物質の項に、1%水溶液を調製し吸光度を測定した際に、「波長210～220 nmにおける吸光度は0.25以下、270～300 nmにおける吸光度は0.07以下である」と規定されている。一般的にタンパク質溶液について280 nmにおける吸光度よりタンパク質濃度を算出する場合、1 mg/mL溶液の吸光度を1.0として概算することから、上記の吸光度0.07はタンパク質濃度としては0.07 mg/mLに相当する。これが1%水溶液中の濃度であることを考慮すると、医薬品添加物としての乳糖中のタンパク質含有量の規格値としては7 mg/g以下と換算される。本研究において医薬品添加物の紫外吸収を確認したところ、無水乳糖（M1）の270～300 nmにおける実際の吸光度は0.02、乳糖水和物（M2及びM3）の吸光度は0.02及び0.01であった。これらの吸光度が全てタンパク質に由来すると仮定した場合、タンパク質含有量としてはそれぞれ2 mg/g、1 mg/gに相当する。これは本研究における総タンパク質定量結果と同程度の値であり、合理的な結果であると考えられる。また、アレルギー物質を含む食品の表示制度に関する「アレルギー物質を含む食品に関する表示Q&A（消費者庁食品表示課）」<sup>7)</sup>のH-8では、乳糖について、「一般に市場に流通している精製が高度な乳糖についても、蛋白質が0.3%程度残存することが判明しました。」と記載されている。本研究において定量した医薬品添加物中の乳糖含有量は0.1%（w/w）程度であった。上記の食品用乳糖の「0.3%」という値と比較した場合、医薬

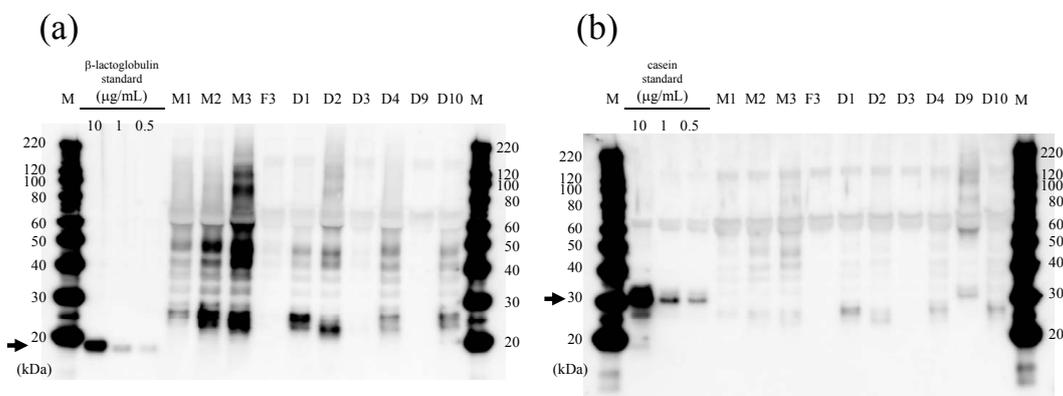


Fig. 4 Western blot analyses of residual proteins in lactose as pharmaceutical excipients and ethical drugs containing lactose hydrate  
(a) β-lactoglobulin, and (b) casein. The arrows indicate the specific band of β-lactoglobulin and casein, respectively.

品添加物としての乳糖の精製度は、より高いことが示唆された。

## 2. 医薬品添加物及び医療用医薬品中のアレルギー原因食品由来タンパク質の定量 (ELISA法)

加工食品中のアレルギー原因食品由来タンパク質の定量法として市販されているELISAキットを用いて、医薬品添加物及び医療用医薬品中のアレルギー原因食品由来タンパク質の定量を行った。その結果、乳糖と乳糖を含有する医薬品については、吸光度法による総タンパク質定量結果が1 mg/g程度であったのに対し、ELISA法の定量結果は数 $\mu\text{g/g}$ 程度であり、両定量結果の間に大きな乖離が認められた。この原因としては、吸光度法において得られた吸光度にタンパク質以外の化合物に由来する吸光度が含まれている可能性、乳糖の製造工程においてタンパク質の分解が起こり、その分解物がELISAキットの抗体と反応しない可能性等が考えられた（医薬品の場合は、他の添加物にタンパク質がコンタミネーションしている可能性も挙げられるが、試料D1-D4の吸入剤では、乳糖以外の添加物は添加されていないため、混入しているタンパク質は全て乳糖由来と考えられる）。今後、本研究で用いた生化学的分析に加えて、日本薬局方記載の窒素定量法等の物理化学的分析を行うことが望ましいであろう。

また、添加物である乳糖 (M1-M3)、及び乳糖を添加物として含有する医薬品 (D1-D4) について、タンパク質の定量結果はほぼ同程度であった。これは、前述のとおり、D1-D4の医薬品には乳糖以外の添加物は添加されておらず、吸入剤粉末のほとんどを賦形剤である乳糖が占めるためと考えられる。

医薬品試料D9とD10は、同種の製剤の先発薬と後発薬のペアであるが、ELISA法の定量結果に関して、D9では検出限界 (0.31  $\mu\text{g/g}$ ) 以下であったのに対し、D10では1.85  $\mu\text{g/g}$ 及び7.40  $\mu\text{g/g}$ であり、両者の定量結果に大きな差異が見られた。両医薬品の添付文書によれば、乳糖水和物の添加量は全く同じであることから、この定量値の差は、使用している乳糖水和物の製造元あるいは製造法の違いによるのではないかと考えられた。添付文書によれば、両製剤の用法・用量は全く同じであり、このような製剤が牛乳アレルギー患者に投与された場合、先発薬と後発薬でアレルギー症状誘発性に差が生じる可能性が予想される。

## 3. 乳糖水和物及び無水乳糖中のタンパク質性の不純物

医薬品の製造用として国内で流通する無水乳糖、乳糖水和物の試料中のタンパク質性不純物は日本薬局方の規格に適合することが示された。また、規格値に比べ十分

小さな値であるが、紫外領域に吸収が示された。サイズ排除クロマトグラフィーの結果より、メインのピークの分子量が3,000-5,000程度であったことから、紫外領域の吸収はタンパク質が分解したペプチドによるものと考えられた。また、低分子量の不純物の他に、量的には非常に少ないが、分子量37,800の不純物が確認された。このピークは、溶出時間が異なるために乳清タンパク質に含まれる $\beta$ -ラクトグロブリンではないことが示唆されたが、今後、本不純物について、本法のサイズ排除クロマトグラフィーとは分離モードが異なるカラムを用いて検討を行い、確認を行う必要があると考えられた。

## 4. 医薬品添加物及び医療用医薬品中の牛乳アレルギータンパク質の定性的検出

乳糖及び乳糖が添加されている医療用医薬品について、含有されるタンパク質を同定するため、ウェスタンブロットングを行ったところ、対象とした $\beta$ -ラクトグロブリン及びカゼインのバンドは検出されなかった。しかし、広範囲の分子量領域にわたって、それぞれの抗体に対して反応性を示す複数のバンドが検出された。この結果から、本研究で試料として用いた乳糖及び乳糖添加医薬品には、牛乳由来の何らかのタンパク質が混入していると考えられた。また、それぞれの試料のタンパク質検出強度とELISA法によるタンパク質定量結果との間にある程度の相関性が認められたことから、ウェスタンブロットングにより検出されたタンパク質がELISAキットの抗体と反応していたことが示唆された。

牛乳の主要タンパク質かつ主要アレルギーであるカゼイン及び $\beta$ -ラクトグロブリンが明瞭に検出されることはなかったが、それ以外のタンパク質が医薬品添加物の乳糖に混入している可能性が示されたことから、牛乳アレルギー患者への投与はやはり慎重に行われるべきであると考えられた。

## まとめ

医薬品添加物及び医療用医薬品を対象として、吸光度法及びELISA法による混入タンパク質の定量を行った。吸光度法では、医薬品添加物としての乳糖においては、1 mg/g程度の定量結果が得られた。ダイズ油、ラッカセイ油、及びゴマ油においては7-9  $\mu\text{g/g}$ 程度の定量結果が得られた。乳糖が添加された医療用医薬品については、吸入剤において1 mg/g程度の定量結果が得られた。他方、ELISA法では、乳糖及び乳糖添加医薬品において、数 $\mu\text{g/g}$ 程度の牛乳タンパク質が検出された。また、ウェスタンブロットングの結果より、牛乳の主要アレルギーであるカゼイン及び $\beta$ -ラクトグロブリン以外の牛乳タンパク質が混入している可能性が示唆された。

以上の研究結果より、食物アレルギー原因食品に由来する添加物を含む医薬品の使用においては、食物アレルギーによる健康危害が生じないように十分に配慮する必要があると考えられた。

#### 引用文献

- 1) Murphy, A., Campbell, D. E., Baines, D. and Mehr, S.: *Anesth. Analg.*, **113**, 140-144 (2011)
- 2) Artesani, M. C., Donnanno, S., Cavagni, G., Calzone, L. and D'Urbano, L.: *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **101**, 105 (2008)
- 3) Eda, A., Sugai, K., Shioya, H., Fujitsuka, A., Ito, S., Iwata, T. and Funabiki, T.: *Allergol. Int.*, **58**, 137-139 (2009)
- 4) Nowak-Wegrzyn, A., Shapiro, G. G., Beyer, K., Bardina, L. and Sampson, H. A.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**, 558-560 (2004)
- 5) 第十六改正日本薬局方：乳糖水和物，純度試験（4）たん白質及び光吸収物質，pp.1014
- 6) アレルギー物質を含む食品の検査方法について（消費者庁次長通知 消食表第286号：平成22年9月10日）
- 7) アレルギー物質を含む食品に関する表示Q&A（消費者庁食品表示課，<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin12.pdf>）