

図1. K166によるeIF2 α タンパク質のリン酸化誘導

NC, Negative control; TG, Thapsigargin; MBEH, Monobenzyl ether of hydroquinone; PTU, Phenylthiourea

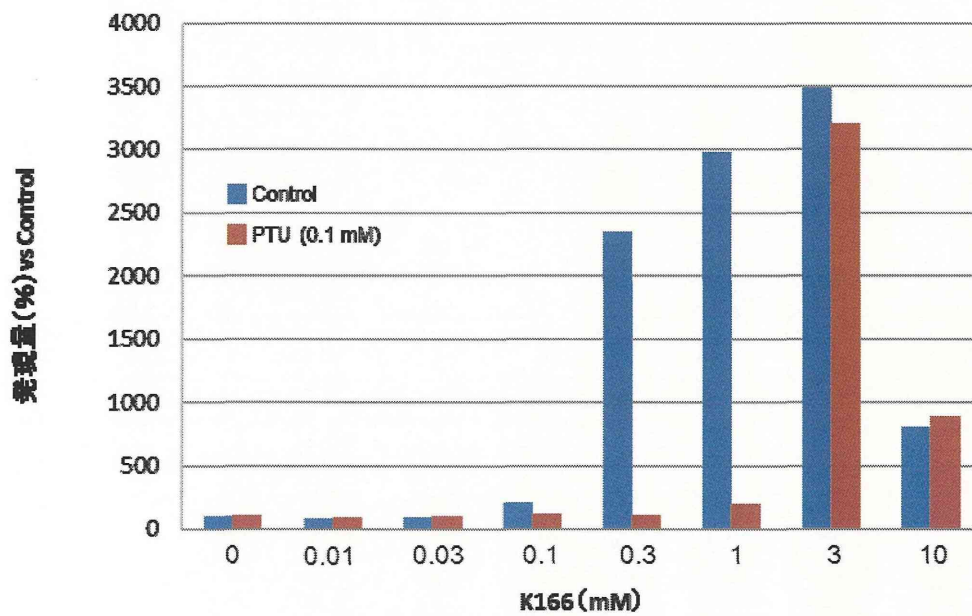


図2. K166によるIL-8遺伝子発現誘導

IL-8の発現量は、内部標準遺伝子GAPDHの発現で除した値で示した。
PTU, Phenylthiourea

3. まとめ

動物モデルおよび培養色素細胞を用いた非臨床試験の結果、ロドデノールによる白斑様症状の形成に関して以下のことが示された。

- ・モルモットに対するロドデノール 30%液の継続塗布により、皮膚明度が上昇、色素脱失部では表皮基底層のメラノサイト、メラニン顆粒ともに減少の傾向を示したが、塗布を休止するとこれらは回復し、地肌の色素が戻った。したがって K166 の累積塗布により生じた色素脱失は、可逆的な反応であると考えられた。

- ・ロドデノールの皮膚感作性については GPMT および LLNA において認められなかったものの、CCETにおいて疑わしい皮膚反応が認められた。光感作性については AS-AA および Harber においていずれも認められなかった。

- ・ロドデノールの表皮角化細胞に対する細胞障害性は 1mM 以下の範囲では認められず、500・M 以上で炎症性サイトカイン分泌誘導をもたらす可能性が示唆されたが、その作用は小さいものであった。

- ・メラノサイトを用いた添加試験において、チロシナーゼの活性または発現を低下させることでロドデノールの細胞障害性は緩和されることから、ロドデノールはチロシナーゼの活性依存的に細胞障害性を誘導することが示された。

- ・さまざまなチロシナーゼ活性を有するメラノサイトを用いた検討において、チロシナーゼ活性に依存してロドデノールに対する細胞障害性は 2 群に分かれ、同一ラインのメラノサイトにおいても、ロドデノールに対する細胞毒性はチロシナーゼ活性に大きく依存した。これらの結果はロドデノールによる障害の耐性にチロシナーゼ活性の個人差が係る可能性がある。

- ・チロシナーゼによるロドデノールの代謝物は構造上 ROS を発生すると考えられるが、障害を与える濃度のロドデノールをメラノサイトに添加しても細胞内で ROS の発生は検出されず、ロドデノールは ROS を介さずに細胞障害性を発揮する可能性が示唆された。

- ・ロドデノールは、メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導し、さらにはその誘導がチロシナーゼ活性依存的であることを見出した。

以上より、ロドデノールはチロシナーゼにより代謝され水酸化ロドデノールとなその過程もしくはそれ以降の代謝プロセスにおいて誘導される小胞体ストレスを介してメラノサイトに障害を与えることでその消失を促し、限られた個体に可逆的な白斑様の症状を誘導する可能性がある。

4. 引用文献

- 1) 田山邦昭, フェニルヒドロキノンの脱色素作用およびそのメラノサイト傷害の発現機序に関する実験病理学的研究. 埼玉医科大学雑誌 2002; 第 29 卷__
- 2) Wei Chin Chou, Makoto Takeo, Piul Rabbani, Hai Hu, Wendy Lee, Young Rock Chung, John Carucci, Paul Overbeek, Mayumi Ito., 2013. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mclr signaling. NATURE MADICINE 19, 7, 924-929.
- 3) Emi K Nishimura., 2011. Melanocyte stem cells : a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. 24; 401-410.
- 4) Magnusson, B.; Kligman, A.M.: The identification of contact allergens by animal assay, The Guinea Pig Maximization Test method, J. invest. Derm. 52: 268-276, (1969).
- 5) Tsuchiya S. et al. (1982) Studies on contact hypersensitivity in the guinea pig. Contact Dermatitis : 8, 246-255
- 6) Organization for Economic Corporation and Development (OECD, 2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, TG-429 (Adopted: 22nd July 2010)
- 7) 佐藤悦久, 勝村芳雄, 市川秀之, 小林敏明, 中嶋啓介: モルモットによる光接触感作性試験法 (Adjuvant-Strip法), 西日皮膚, 42 卷 5 号, 1980
- 8) L. C. Harber, S. E. Torgovnic and R. L. Baer: Contact Photosensitivity Patterns to Halogenated Salicylanilides In Man and Guinea Pigs, Arch Derm. 96, 1967
- 9) Oikawa A, Nakayasu M, Nohara M, Tchen TT. Fate of L-[3,5-3H]tyrosine in cell-free extracts and tissue cultures of melanoma cells: a new assay method for tyrosinase in living cells. Arch. Biochem. Biophys. 1972;148:548-557.
- 10) M. Seiji, et al., The Reciprocal Relationship between Melanization and Tyrosinase Activity in Melanosome (Melanin Granules), J. Biochem., 1961, 49, p.700-706.
- 11) S. Naish, et al., Initial Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Oxidation Product of 4-Hydroxy anisole is 4-Methoxy-Ortho-Benzoquinone. Pigment Cell Res., 1988, 1, p.379-381.
- 12) P. Manini, et al., A Reactive ortho-Quinone Generated By Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of Skin Depigmenting Agent Monobenzone: Self Coupling and Thiol Conjugation Reactions and Possible Implications for Melanocyte Toxicity. Chem. Res. Toxicol., 2009, 22, p.1398-1405. 3) P. Manini, et al., A Reactive

ortho-Quinone Generated By Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of Skin Depigmenting Agent Monobenzone: Self Coupling and Thiol Conjugation Reactions and Possible Implications for Melanocyte Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22, p.1398-1405.

13) Toosi, S., S. J. Orlow, and P. Manga, Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *J Invest Dermatol*, 2012. 132(11): p. 2601-9.

14) Ron D. and P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8: p. 519-29.

原因究明に関する調査研究

II. ロドデノールの細胞毒性に関する研究

研究協力者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究要旨:

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(ロドデノール)を配合した美白化粧品の使用者に白斑が生じる事例が多数発生し、大きな問題になった。我々はロドデノールが皮膚のメラノサイトやケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび製造原料である 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン)が各種細胞に与える影響を調べた。また、これら化合物の細胞内酵素による化学変化についても検討した。キラルカラムおよび ODS カラムを装着した HPLC により、製品に配合されていたロドデノールは光学異性体混合物であり、*R:S* 存在比はほぼ 1:1 であること、ロドデノール中のラズベリーケトン、製品へのラズベリーケトンの混入はごくわずかであることがわかった。ロドデノールの水酸化体はヒトメラノサイトおよびヒトケラチノサイト(HaCaT 細胞)のいずれに対してもロドデノールおよびラズベリーケトンに比べて強い細胞毒性が認められた。ロドデノールおよびラズベリーケトンを添加した細胞の培養上清中にはそれぞれの水酸化体が検出された。またこれらの化合物はチロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代謝されることを確認した。以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等により水酸化体に代謝され、これらがメラノサイトの細胞死に強く関与することが示唆された。

A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売するロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール, HPBoI, 図 1)を配合した薬用化粧品は、医薬部外品として、平成 18 年 7 月に申請され、薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ、平成 20 年 1 月に「メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ等」の効能効果で承認されたものである。4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン, HPBoNe, 図 1)から合成されて製品に配合される。使用後に白斑(肌がまだらに白くなった状態)になったとの報告が寄せられ、平成 25 年 7 月 4 日から製造販売業者が自主回収を実施した。その後 1 万 7 千人以上の被害者が確認されていることから、原因究明が急務となっている。

本研究では、ロドデノールが皮膚のメラノサイトや

ケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび合成原料であり白斑の原因となるとの報告(Fukuda *et al.*, *J. Occup. Health*, **40**, 118 (1998))のあるラズベリーケトンが各種細胞に与える影響を調べる。また、これら化合物の細胞内酵素による化学変化についても検討する。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

ロドデノール, 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(DHPBoI), 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(DHPBoNe)はカネボウより提供頂いた。ラズベリーケトンは和光純薬工業より購入した。HPLC および LC/MS 分析では、メタノールに溶解して使用した。細胞への曝露実験では、500 mg/ml となるように DMSO で溶解したものを、使用時まで 4℃で保存し

た.

ロドデノールを配合した医薬部外品はカネボウより提供いただいた。

マッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入した。50 mmol/L KPB (pH6.5) で 10,000U/mL になるよう希釈して使用した。

2. 細胞および培地

ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) は、東北大学農学研究科仲川清隆准教授よりご提供頂いた。培地は DMEM (Sigma-Aldrich 社) に 10% FBS (Gibco), 抗菌剤 (Gibco, Cat. No. ;15240-062) を添加した培地を用いた。1×10⁶ cells/75 cm² Flask の細胞密度で播種し、約 3~4 日毎に継代した。

ヒト正常メラノサイトは、クラボウより購入した African American の新生児包皮表皮由来 (Cat No. KM-4009, No.01392) を用いた。細胞は抗菌剤ゲンタマイシン・アンフォテリシン B (クラボウ) を添加した推奨培地 (DermaLife M, クラボウ) に培地で培養した。

3. 医薬部外品製品中からの抽出

試料 0.4 g に 15 mL のメタノールを加え、5 分間の超音波処理を 2 回施し、20 mL に定容した。これを 0.2 μm のフィルターでろ過して HPLC または LC/MS に供した。

4. キラルカラムを用いた HPLC

装置は 1100 システム (Agilent 社) を用いた。HPLC 条件は以下のとおり。

カラム: Chiral CD-Ph (2.0 mm i.d. × 250 mm; particle size, 5 μm; Shiseido), カラム温度: 40 °C, 移動相: 25% acetonitrile, 流量: 0.2 mL/min, 検出: 280 nm.

5. 逆相カラムを用いた HPLC および LC/MS

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters 社) を用いた。HPLC および MS 条件は以下のとおり。

カラム: ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d. ×

100 mm; particle size, 1.7 μm; Waters 社), カラム温度: 40 °C, 移動相: 40% メタノール, 0.02% TFA, 流量: 0.2 mL/min, イオン化: ESI positive, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 120 °C, 脱溶媒温度: 350 °C, 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, コーンガス流量: 50 L/hr, 検出: SCAN mode (*m/z* 50–600).

6. 試験物質の細胞への曝露

HaCaT 細胞は 1.0 × 10⁵ cells/ml, ヒトメラノサイトは 1.2 × 10⁵ cells/ml となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴プレートに 100 μl/well 播種して約 24 時間前培養した。試験物質の DMSO 溶液を培地で 100 倍に希釈して検液を調製した。各 well から上清を取り除き、検液 100 μl/well を加え (DMSO 最終濃度は 1.0%), CO₂ インキュベータ内でさらに約 24 時間培養した。

ヒトメラノサイトに対する DHPBol および DHPBone の曝露実験では、2.4 × 10⁵ cells/ml の細胞懸濁液 50 μl/well を 24 時間前培養し、培養上清を取り除かずに 50 μl/well の検液を加えた。検液は、最終曝露濃度の 500 倍濃度の試験物質の DMSO 溶液を培地で 250 倍に希釈して調製した (DMSO 最終濃度は、0.2%)。

細胞に同濃度の DMSO を曝露した well をポジティブコントロール、無細胞の DMSO を曝露した well をネガティブコントロールとした。

7. 細胞毒性試験

細胞毒性は、ATP 量を測定する CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて測定した。各 well の細胞培養液に等量 (100 μl) のキット付属の Reagent を加え、120 秒間振盪後、10 分間室温で静置した。各 well の 1 秒間の蛍光強度 (RLU, relative light units) をプレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices 社) で測定した。ポジティブコントロールの蛍光強度の平均を 100 % として、各サンプルの生存率を換算した。また、ネガティブコントロールの蛍光強度の平均をバックグラウンドとした。

8. 培養上清の LC/MS 分析

細胞培養後 3well 分の培養上清をまとめ、遠心分離を行って上清を得た。適宜培地で希釈して LC/MS

分析に供した。

9. チロシナーゼ反応

ロドデノール、ラズベリーケトン、DHPBol または DHPBone を試験物質とし、以下の条件で行った。

50 mmol/L KPB (pH6.5)に終濃度 0.33 mmol/L となるよう試験物質を加え、酸素ガスを 1 分間バブリングした。終濃度 30 U/mL となるようマッシュルームチロシナーゼを加え、25°C で一定時間インキュベートした。

C. 研究結果

1. ロドデノールの光学異性体存在比

ロドデノールは 2 位に不斉炭素を持ち、鏡像異性体 (*R* 体と *S* 体) が存在しうる (図 2)。そこで、両異性体の原料中および製品中の存在比を検討した。キラルカラムを装着した HPLC により分離したところ、図 3 に示すように分離した。ピーク面積から *R* 体と *S* 体の存在比がほぼ 1:1 であることが判明した (表 1)。

2. ロドデノールの純度

ロドデノールの合成原料であるラズベリーケトンの残留が考えられるため、原料のメタノール溶液と製品のメタノール抽出液を逆相 HPLC で分析した。図 4 に示すように、ラズベリーケトンのピークはロドデノールと比較してごく小さく、絶対検量線法により定量したところ、表 2 に示すように、ロドデノールに対する重量比は 0.04% 以下であった。製品に配合されるロドデノールの純度は非常に高いことが示された。また、製品へのロドデノール配合量は約 2% であることが確認された。

3. ロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性および化学変化

ロドデノールはチロシンを酸化して DOPA に変換するチロシナーゼの阻害剤として開発されたものであるが、図 5 に示したように、自らがチロシナーゼの作用により水酸化体 DHPBol に変換される可能性が考えられた。ラズベリーケトンも同様に DHPBone に酸化される可能性がある。そして、こ

の水酸化体が表皮中のメラノサイトやケラチノサイトの細胞死を引き起こした可能性がある。

そこで、ロドデノール、ラズベリーケトンおよび両者の水酸化体をヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) と正常ヒトメラノサイトに適用し、細胞の生存率および培養上清中の化合物の分析を行った。

図 6 に示すようにいずれの化合物も HaCaT 細胞に対し濃度依存的な毒性を示した。LC₅₀ はロドデノール: 12.7 mmol/L, ラズベリーケトン: 10.5 mmol/L, DHPBol: 0.52 mmol/L, DHPBone: 0.39 mmol/L であり、水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。一方、2 位の官能基の違いは細胞毒性に大きな影響は与えていないが、ケトンの方がわずかに毒性が強い傾向にあった。

メラノサイトとしてはチロシナーゼ活性が高いと考えられる African American の新生児包皮表皮由来のものを用いた。図 7 に示すようにいずれの化合物も濃度依存的な毒性を示した。LC₅₀ はロドデノール: 16.5 mmol/L, ラズベリーケトン: 15.5 mmol/L, DHPBol: 0.072 mmol/L, DHPBone: 0.049 mmol/L であった。水酸化体は HaCaT に対してよりも低い濃度で毒性を示した。また、HaCaT の場合と同様に水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。

ロドデノールまたはラズベリーケトン を 2.5 mmol/L の濃度で 24 時間適用したメラノサイトの培養上清を LC/MS により分析した。クロマトグラム上のピークの同定は PDA で得られた波長スペクトルと MS で得られたマススペクトルにより行った。図 8 に示した PDA クロマトグラムで、ロドデノールを適用した培養上清中に DHPBol が検出され、ラズベリーケトンを適用した培養上清中に DHPBone が検出された。これらは培地のみの場合には検出されず、ロドデノールとラズベリーケトンが細胞内に取り込まれてチロシナーゼなどの酵素により水酸化体に代謝されることが示唆された。また、ロドデノールを適用した培養上清中にラズベリーケトンが、ラズベリーケトンを適用した培養上清中にロドデノールが、培地のみの場合よりも多く検出され、水酸化体の生成以外の代謝も起きていることが示唆された。

4. チロシナーゼによる酸化

ロドデノールがチロシナーゼの基質となるかどうか試験管内反応によって検討した。ロドデノールまたはラズベリーケトンを経由してマッシュルーム由来チロシナーゼと 25℃でインキュベートし、0, 5, 10, 15, 20 分後の反応液を LC/MS で分析した。0 分と 10 分の比較を図 9 に示す。ロドデノールを用いた反応液には DHPBol が検出され、チロシナーゼによってチロシンと同様の酸化反応の基質となることが確認された。ラズベリーケトンからも同様の酸化反応を経て DHPBone が生成した。また、ロドデノールの反応液にはピーク A, B および E が、ラズベリーケトンの反応液にはピーク C および D が検出された。

DHPBol と DHPBone についても同様にチロシナーゼとともにインキュベートし、生成物を分析した。DHPBol からはピーク A, B および E が、DHPBone からはピーク C および D が検出され(図 10)、これらの未同定化合物はロドデノールおよびラズベリーケトンの反応液においてもそれぞれ DHPBol と DHPBone を経て生成していることが示された。

D. 考察

被害が確認されている患者の症状は、白斑のみのケース、周辺に黒ずみが出たケース、紅斑を生じたケース、メラノサイトの減少が確認されたケースとそうでないケース、使用後に改善したケースと変化が見られないケースなど様々で、原因は一様でない可能性が高い。しかしながら、メラノサイトが減少するケースが特に重篤と考えられるため、表皮を形成する細胞に対する傷害性に着目し、細胞死のきっかけとなる事象や細胞死に至るまでのメカニズム解明を目的に研究を行った。

また、申請時に動物における白斑非形成の確認および高濃度配合製剤をヒトが長期使用した時の白斑や色素脱失非形成の確認が行われていたが、市販製品による白斑形成を予測できなかった。発症率が低いためである。発症した人と発症しない人の差がどこにあったのか、という点も興味を持たれる。

カネボウより供与された製造原料のロドデノール、異なる 5 製品中のロドデノールとも、鏡像異性体の存在比はすべて約 1:1 であった。R 体と S 体が細胞に与える各種の影響に差があるかどうかの情報はまだないが、発症の有無が使用製品中のロット間で鏡像異性体存在比の差があることにより生じた可能性は低いと思われる。

主に香料として用いられるラズベリーケトンは、製造従事者に白斑が生じたケースの原因と考えられている。ロドデノールの合成原料であり、その混入が疑われたが、製造原料のロドデノール、製品中のロドデノールとも、ラズベリーケトンの残留はごくわずかであり、白斑を生じるほどの曝露があったとは考えにくい。

HaCaT 細胞およびメラノサイトにおいても、ロドデノールやラズベリーケトンに比べ、それぞれの水酸化体ははるかに低い LC₅₀ 値を示した。ロドデノールおよびラズベリーケトンはいったん水酸化体に変換されてから毒性を示すと推測できる。ただし、チロシナーゼ活性を有するメラノサイトとメラニン合成を行わない HaCaT 細胞の間でロドデノールやラズベリーケトンの細胞毒性に差がなかったことは、この推測と矛盾するように思われる。一方で水酸化体の毒性は HaCaT 細胞よりもメラノサイトで強く表れたため、細胞毒性の本体は水酸化体がさらにチロシナーゼによる化学変化を受けた化合物であると推測することもできるが、さらなる検討が必要である。

入手が容易でチロシナーゼ阻害剤の探索研究でもよく使用されるマッシュルーム由来チロシナーゼを用いて、ロドデノール、ラズベリーケトンおよびそれぞれの水酸化体が本酵素の基質として働くかどうか検討した。その結果、ロドデノールおよびラズベリーケトンからそれぞれの水酸化体 DHPBol および DHPBone が生成し、本来の基質とは側鎖部分の構造が異なるこれらの化合物も基質として認識され、酸化反応を受けることが示された。さらに、水酸化体もチロシナーゼにより化学変化を受けることも示された。メラニン生合成において、チロシナーゼは DOPA を dopaquinone に酸化する反応を触媒し、さらに後の段階にも関与していることが知られている。

今後、生成物の構造決定もしくは推定を行う予定である。

E. 結論

キラルカラムを装着した HPLC により、製品に配合されたロドデノールは光学異性体混合物であり、*R:S* 存在比はほぼ 1:1 であることが示された。

ODS カラムを装着した HPLC により、製品に使用されていた、ロドデノール中のラズベリーケトン、製品へのラズベリーケトンの混入はごくわずかであることがわかった。

ロドデノールおよびラズベリーケトンの水酸化体はメラノサイトおよび HaCaT 細胞のいずれに対してもロドデノールおよびラズベリーケトンに比べて強い細胞毒性が認められた。ロドデノールおよびラズベリーケトンを添加した細胞の培養上清中にはそれぞれの水酸化体が検出された。

ロドデノールおよびラズベリーケトンはマッシュルーム由来チロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代謝されることを確認した。また、水酸化体がチロシナーゼによりさらに化学変化を受けることが示された。

以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等により水酸化体に代謝され、これらがメラノサイトの細胞

死に強く関わることを示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

秋山卓美, 清水久美子, 藤巻日出夫, 内野正, 五十嵐良明: Rhododendrol および raspberry ketone の細胞毒性発現機構. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

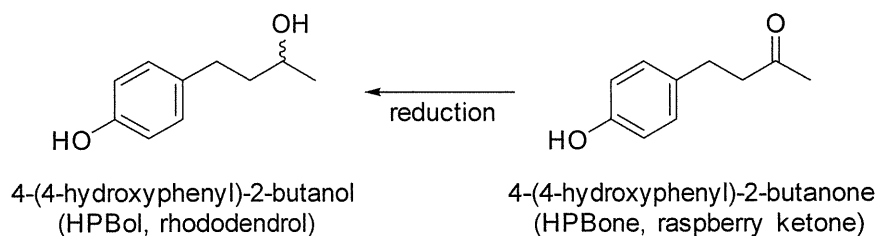


図 1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

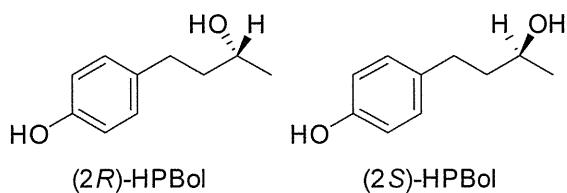


図 2. ロドデノールの光学異性体.

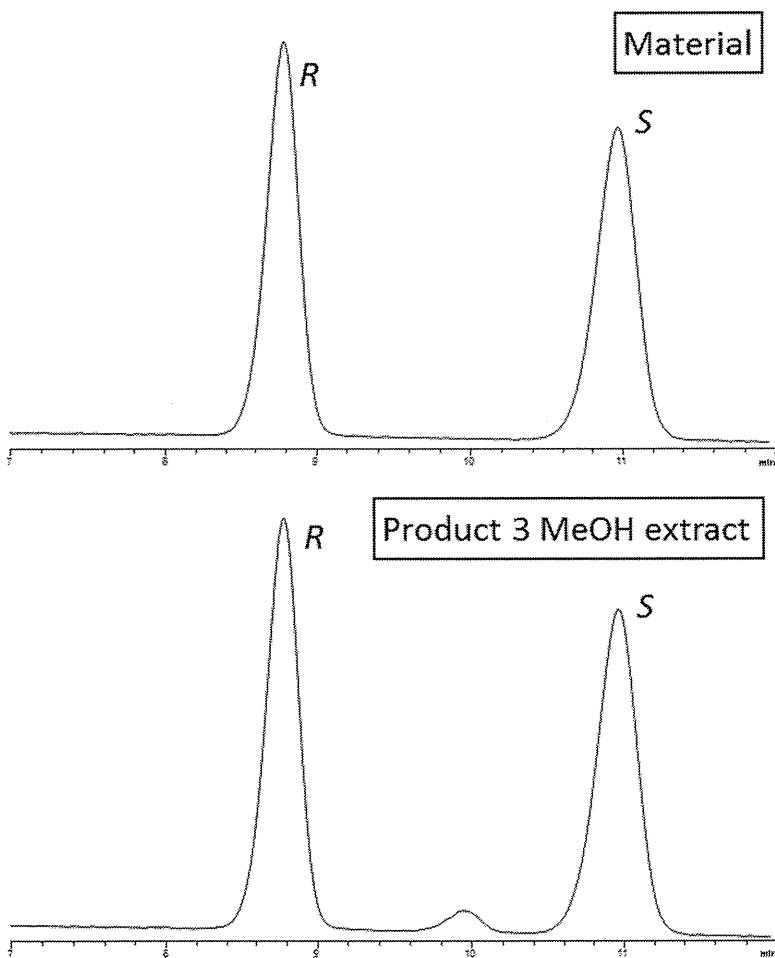


図 3. 原料および製品に含まれるロドデノールのキラルカラムによる分析. 上段:原料. 下段:製品.

表 1. 原料および製品に含まれるロドデノール

試料	R 体	S 体
原料	49.8%	50.2%
製品 1	50.0%	50.0%
製品 2	50.0%	50.0%
製品 3	50.2%	49.8%
製品 4	50.0%	50.0%
製品 5	50.0%	50.0%

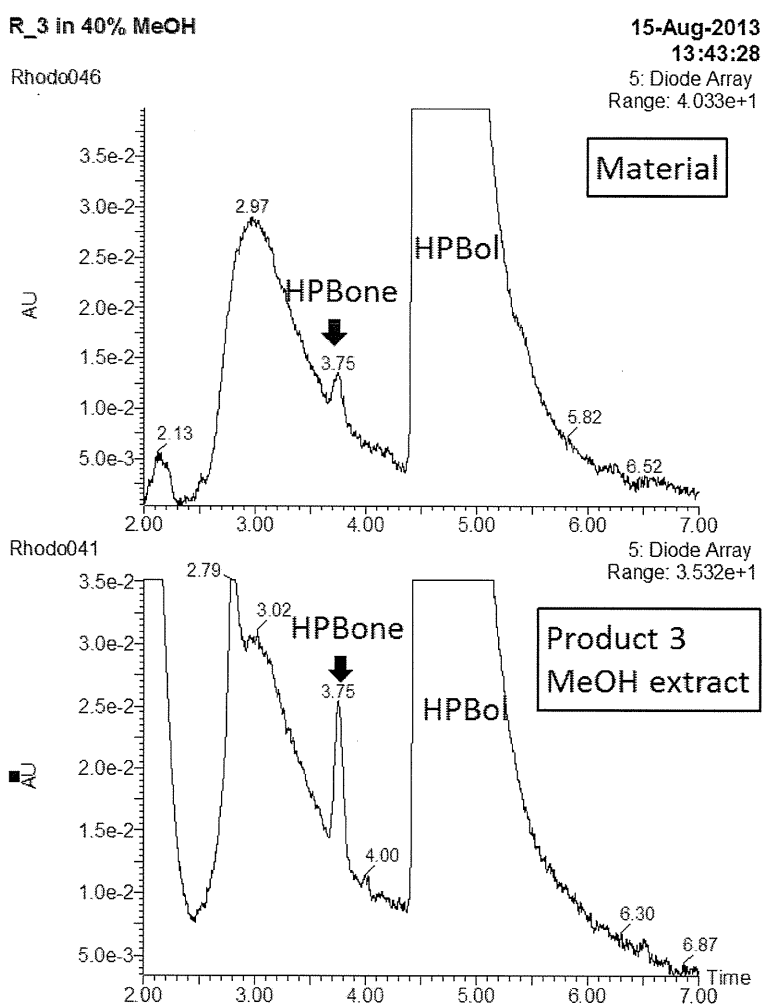


図 4. 原料および製品に含まれるロドデノールとラズベリーケトン.

表 2. 製品中ロドデノール含量とロドデノールに対するラズベリーケトンの重量比.

試料	製品中 HPBol 含量	HPBol 中 HPBone 含量
原料	—	0.008%
製品 1	1.9%	0.018%
製品 2	2.1%	0.011%
製品 3	2.2%	0.027%
製品 4	2.1%	0.027%
製品 5	1.9%	0.031%

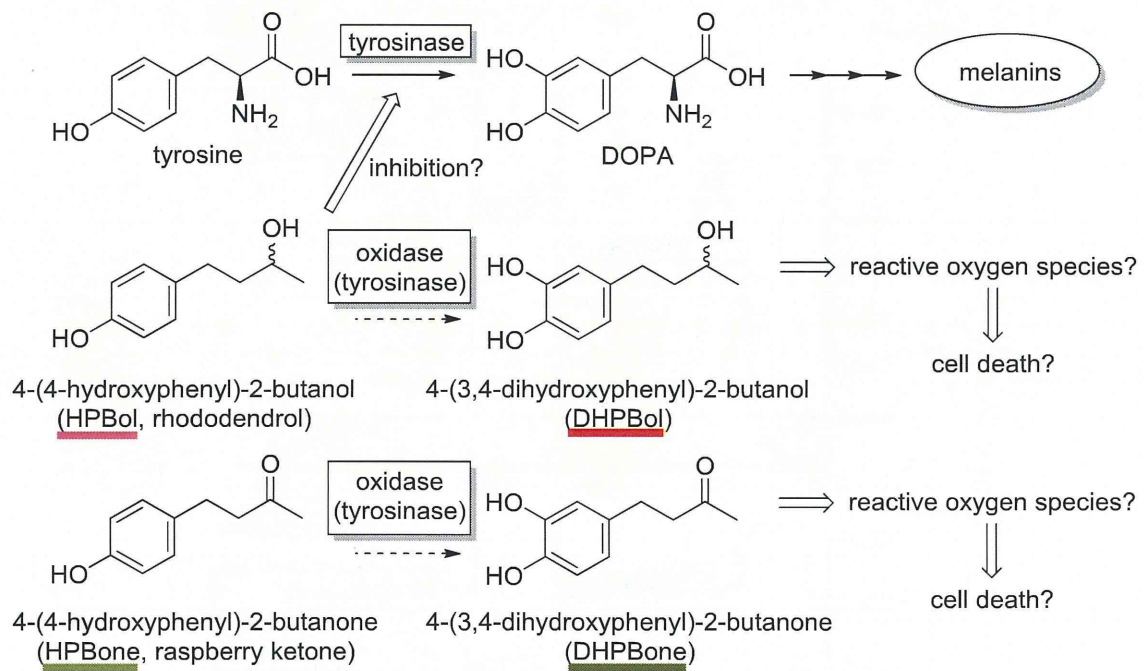


図 5. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

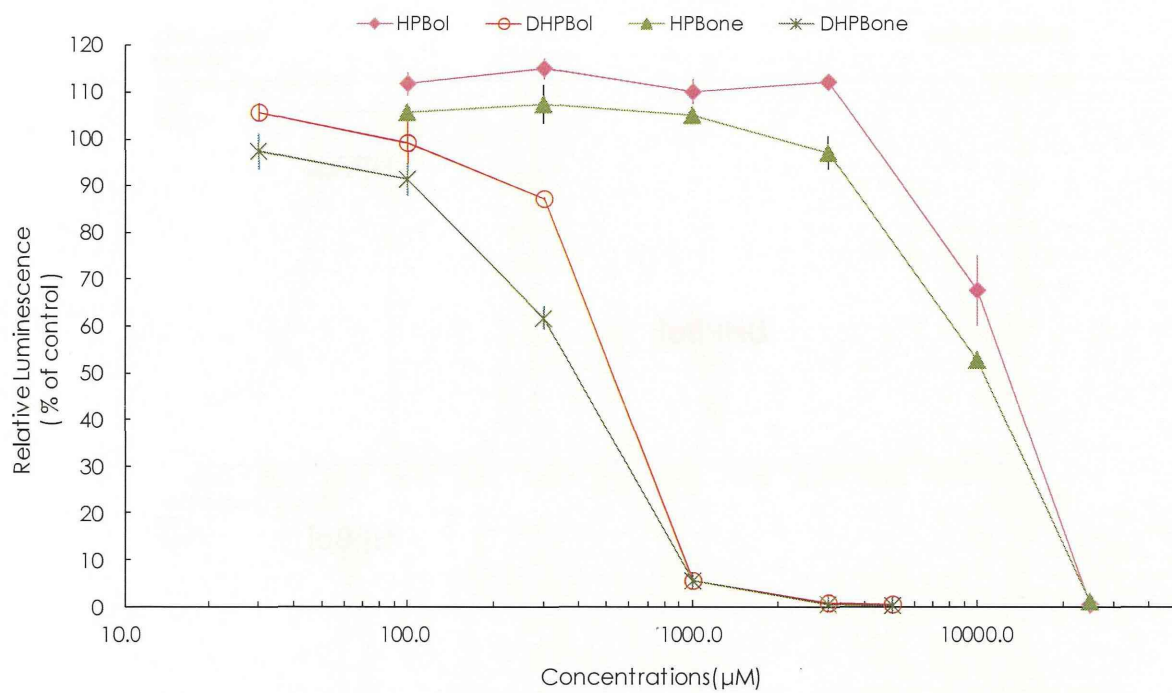


図 6. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した HaCaT 細胞の生存率.

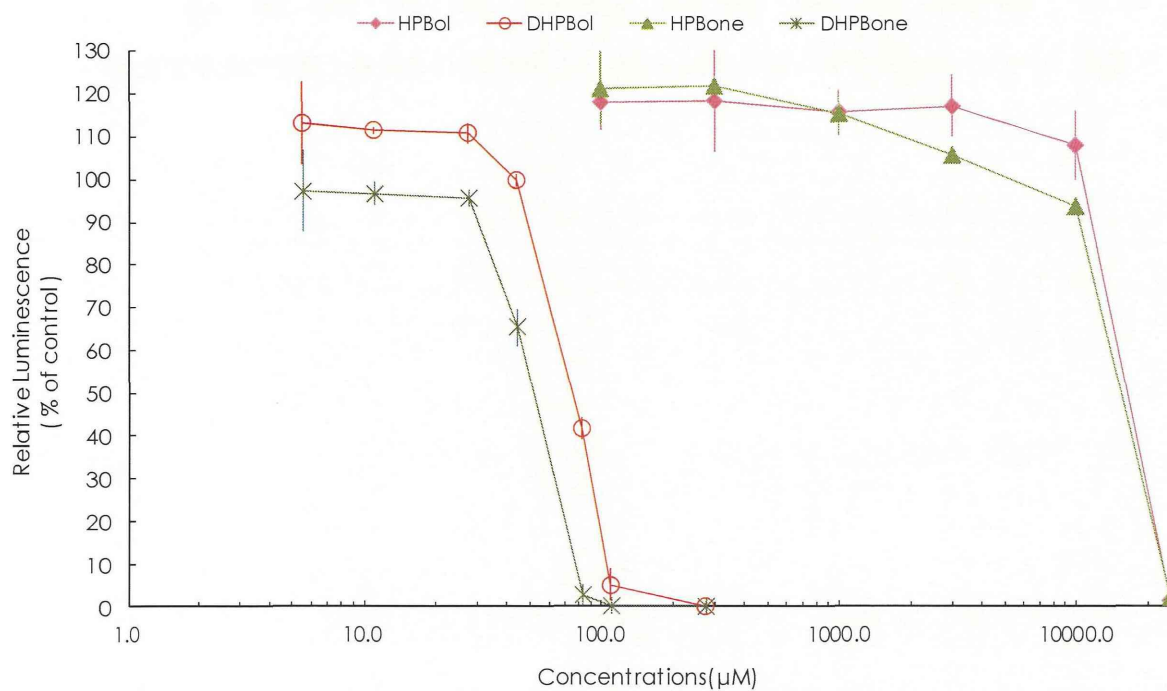


図 7. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用したメラノサイトの生存率.

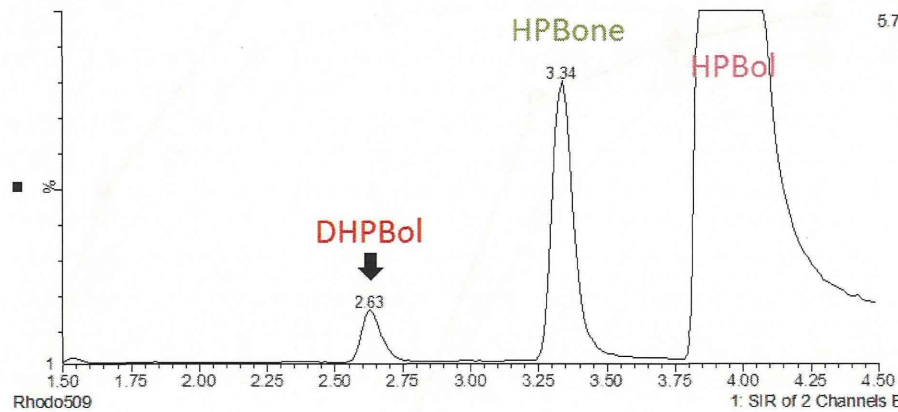
Cell+OL 131128

28-Nov-2013

16:32:02

Rhodo508

1: SIR of 2 Channels ES+
TIC
5.77e6



Rhodo509

1: SIR of 2 Channels ES+
TIC
1.15e7

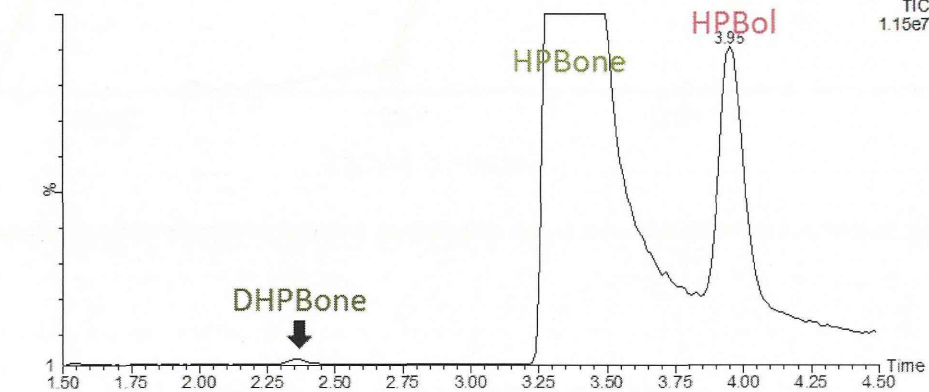


図 8. ロドデノールおよびラズベリーケトンを適用したメラノサイトの培養上清中の化学変化体.

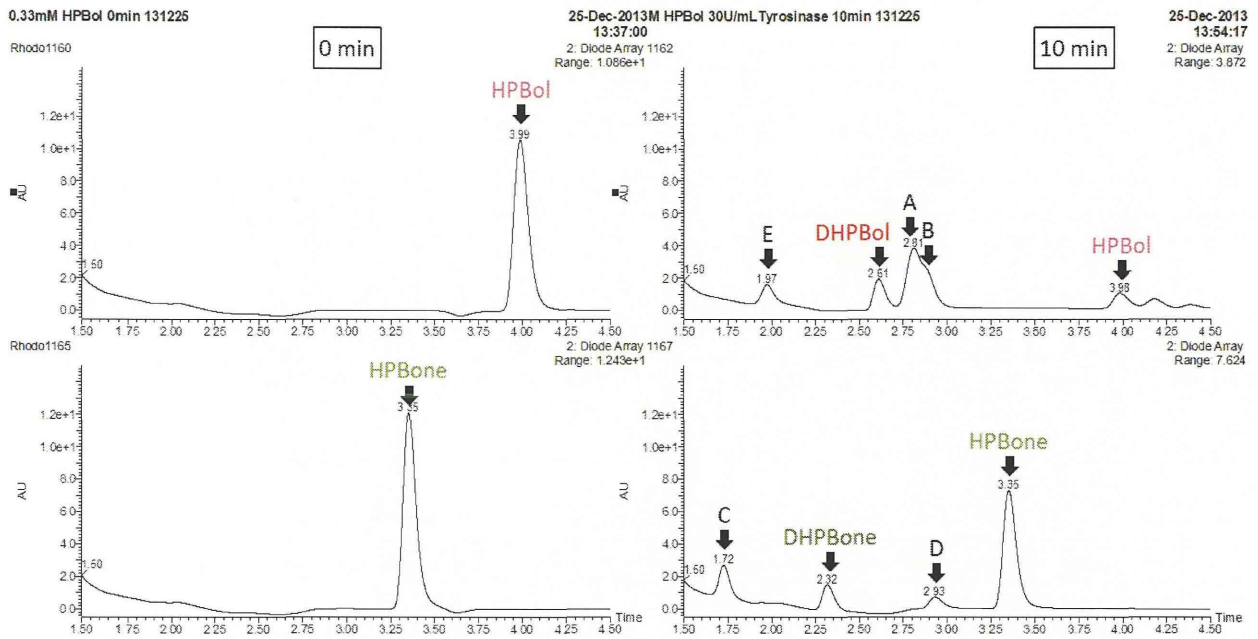


図 9. ロドデノールおよびラズベリーケトンのマッシュルームチロシナーゼとの反応産物。

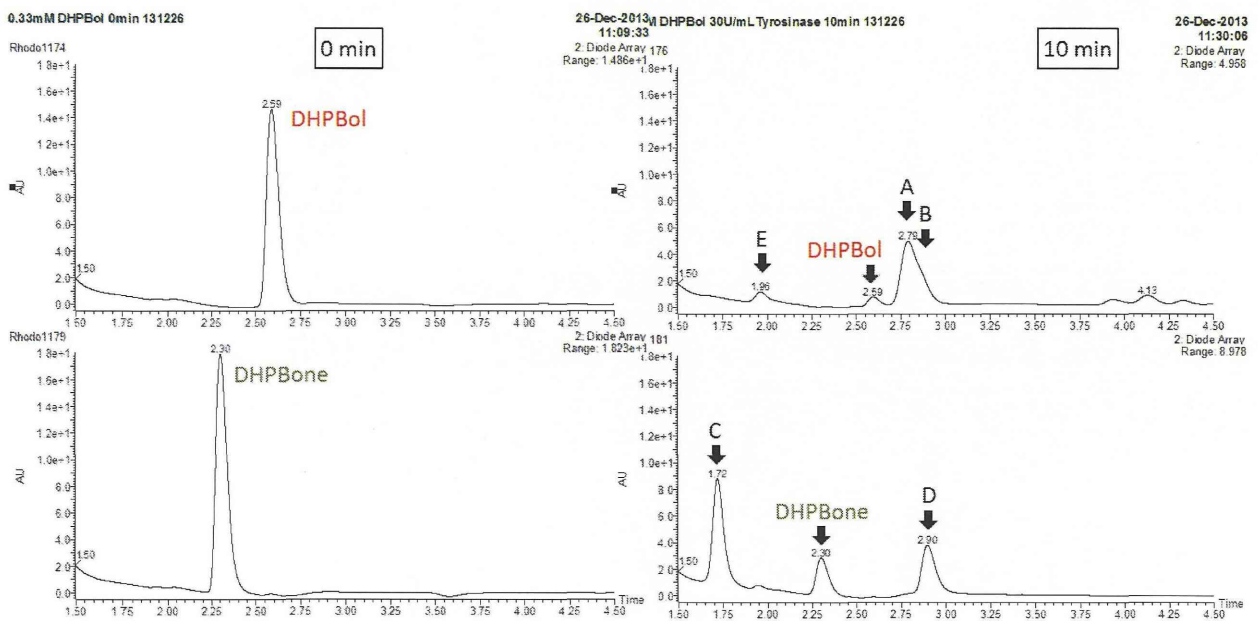


図 10. DHPBol および DHPBone のマッシュルームチロシナーゼとの反応産物。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」
分担研究報告書（平成 25 年度）

再発防止に関する研究

研究分担者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長
協力研究者 飯島正文 昭和大学 名誉教授
川島 眞 東京女子医科大学皮膚科 教授
杉林堅次 城西大学薬学部薬粧品動態制御学教室 教授
小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所薬理部室長
小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室主任研究官

カネボウ化粧品等が製造販売した 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（ロドデノール）を配合した薬用化粧品の使用者において、製品との関連性が疑われる白斑（肌がまだらに白くなった状態）の症例が確認され、製品の自主回収が行われた。本研究では、薬用化粧品による白斑等の健康被害の再発防止の観点から、医薬部外品の承認審査、製造販売後安全対策における今後の対処方針について検討を行い、新有効成分含有医薬部外品の安全性評価に係る臨床試験の拡充、製造販売後調査手法の工夫、副作用報告制度及び GVP の強化、製品の使用上の注意の改訂による適正使用に係る情報提供などは、医薬部外品の副作用による健康被害拡大の再発防止に有益な方策であるとの結論を得た。

A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売した 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（ロドデノール）を配合した薬用化粧品の使用者において、製品との関連性が疑われる白斑症例の報告があり、カネボウ化粧品は、昨年 7 月 4 日から製品の自主回収を行っている。カネボウ化粧品によると、本年 3 月末までに、1 万 8 千人以上から白斑様症状の申し出があり、約 70 万個の製品を回収したとしている。本品は、薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ、平成 20 年 1 月に医薬部外品として「メラニ

ンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ」等の効能効果で承認されたものである。

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑問題については、日本皮膚科学会において、診断方法、治療方法の確立を目的として、病態解明が進められており、本研究の原因究明に関する分担研究班においても、ロドデノールによる白斑の発症機序の解明に向けた検討が行われている。

本研究班では、これらの結果等も踏まえ、再発防止の観点から、医薬部外品の承認審査及び製造販売後における安全性に関するデータの収集・解析手法のあり方について

調査、検討することを目的とする。

B. 研究方法

ロドデノール配合薬用化粧品の承認申請時にカネボウ化粧品から提出された資料や、医薬部外品の開発から承認審査、製造販売後までの各段階における安全性確保のための現行の枠組み、具体的には、承認申請時に求められる非臨床試験、臨床試験の種類及び方法（症例数、期間等含む）、製造販売後調査の方法、副作用報告制度、製造販売後の安全管理の基準、適正使用に関する注意喚起の方法等を調査し、今後の医薬部外品の安全性等に関する情報収集及び解析の手法、企業から国への副作用報告制度及び使用上の注意表示のあり方について検討した。

C. 研究結果及びD. 考察

ロドデノールによる白斑の発症原因の究明に向けた分担研究は現在進行中であることから、本年度は現行の承認審査・製造販売後における安全性確保の方策について整理し、医薬部外品・化粧品の副作用による健康被害の再発防止のために非臨床、臨床及び製造販売後のそれぞれの段階における対応方策を検討した。

1. 非臨床試験

新有効成分含有薬用化粧品の承認申請時に求めている非臨床試験と、実際にロドデノール配合薬用化粧品の申請パッケージに含まれていた非臨床試験及びその内容について調査した。現在、承認申請時に求めている非臨床試験項目に追加の試験を要求しても、ロドデノールによる白斑の発症を予期できたかどうか結論は出ていない。非臨床試験項目の追加の必要性について引き続き

議論することとした。

2. 臨床試験

新有効成分含有薬用化粧品の承認申請時には、臨床試験として、ヒトパッチ試験及び効能・効果に関するヒト使用成績試験の実施を求めている。これに加え、ヒトにおける長期使用時の安全性を確認することを目的に、医療用医薬品の外用剤に準じた長期安全性試験を実施してはどうかとの意見があった。長期安全性試験は、皮膚科専門医の管理下で臨床試験を構築・実施すべきであるとの意見があった。必要な症例数と試験期間については、引き続き検討することとした。

また、ロドデノール配合薬用化粧品をシリーズアイテムとして、すなわち化粧水、乳液、クリームと複数重ねて使用した場合に、白斑の発症率が高い傾向があるとの報告がある。同一有効成分を含む複数アイテムを重ね塗りする可能性を考慮し、新規有効成分配合薬用化粧品の開発段階における臨床試験の用量設定も重要なポイントになるのではないかと意見があった。

3. 製造販売後調査

医薬部外品・化粧品のうち、特にリスクの高い新有効成分含有医薬部外品については、開発段階で把握できなかった副作用の把握等を目的として、承認後一定期間の間に一定症例数の製造販売後調査を実施し、安全性に関する情報を収集するよう製造販売業者に求めている。

現状、医薬部外品の製造販売後調査は、必ずしも承認条件とされており、調査の実施方法も通知等で明確にされていないが、一般用医薬品の製造販売後調査の実施要領として示されている「新一般用

医薬品の市販後調査の実施について（昭和63年12月26日付け薬安第154号厚生省薬務局安全課長通知）」に準じて、調査が実施されている。

当該通知では、販売店を対象にモニター店を設定し一定の例数を目標に使用者アンケートを実施して副作用の発現頻度を調査する特別調査と、販売店からのいわゆる自発報告により副作用の情報を収集する一般調査を実施することとされている。ロドデノール配合薬用化粧品については、承認後2年間で約1200例の製造販売後調査が実施されたが、調査の中で白斑の症例は確認できなかった。

研究班の議論の中では、対面販売が行われている販売店等のルートを利用した、きめ細かな情報収集を行うべきである、製造販売後調査にも皮膚科専門医が関与すべきである等の意見が出された。これらの意見を踏まえ、医薬部外品の製造販売後調査の実施方法についてガイドライン等を作成すべきとされた。

4. 副作用報告

今回のロドデノールによる白斑は、承認審査及び製造販売後調査の段階では把握されていなかった副作用であり、その後の製造販売業者による副作用情報の収集体制の不備及び情報入手後の国への報告等の対応の遅れが被害拡大の一因であると指摘されている。

薬事法では、医薬品等の副作用の情報を迅速に把握し必要な安全対策を取ることにより、健康被害の拡大を防ぐことを目的として、医薬品等の製造販売業者に、自社製品による副作用等の国への報告を義務付けている。

医薬品、医療機器等の場合、死亡、障害等入院相当以上の重篤な副作用症例の情報を把握した場合、個別に国に報告することが義務付けられているが、医薬部外品・化粧品の場合、学術論文や学会報告等の研究報告のみが報告対象とされていた。

平成23年には、加水分解コムギ末を含有する薬用石鹸の使用者で、アナフィラキシーを発現した事例が報告されたことを受け、医療関係者から医薬部外品又は化粧品による健康被害の情報を入手した場合には、報告書類を社内においてとりまとめ、研究報告として報告するよう通知されたが、法令上は、依然、個別症例の報告義務はないままであった。

研究班は、医薬部外品・化粧品について副作用報告制度の強化が必要であると考え、医薬品等と同様に個別症例の報告を求めるとともに、その範囲については、医薬品等の報告対象である重篤な副作用症例に加え、白斑のような副作用を想定し「治療に要する期間が30日以上症例」についても報告対象に含めるべきであると考えた。

5. 製造販売後の安全管理の基準（GVP）

今回のロドデノール配合薬用化粧品による副作用の把握が遅れ健康被害が拡大した一因として、製品の安全性に関する情報が、カネボウ化粧品の社内で一元的に扱われていなかったことが指摘されている。

「医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令（GVP省令）」において、こうした製品の安全性に関する情報の収集、検討及びその結果に基づく必要な措置の立案、実施が義務付けられており、製造販売業の許可要件とされているが、医薬部外品・化粧品の製造