

(Web 掲載判については、下記報告書中の写真は掲載容量がオーバーするため除いております(研究代表者))

報告書

ロドデノール配合化粧品の使用による 白斑様症状の病態形成メカニズムに関する研究

株式会社カネボウ化粧品

目次

1. 目的

2. 検討内容

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討

2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2-1 表皮細胞への障害性及び炎症性サイトカイン等の分泌誘導能の検討

2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価

2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性

2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認

2-3-2 活性酸素の関与の検討

2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討

3. まとめ

4. 引用文献

1. 目的

ロドデノール配合化粧品の使用による白斑様症状について、動物モデルおよび培養色素細胞を用いた非臨床試験を実施することにより病態形成メカニズムについて検討を行う。

2. 検討内容

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討

材料および方法

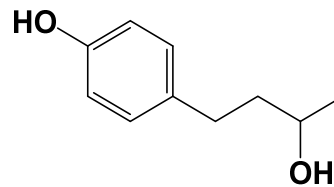
[被験物質]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式：C₁₀H₁₄O₂、分子量：166.22

Lot.002002

純度：100%



化学構造

[被験動物]

褐色モルモット (Kw1:A-1、東京実験株式会社) 雌、5 匹

[試験方法]

・累積塗布

背部被毛を毛刈り、剃毛し、2cm x 2cm の区画を背骨を挟んで対になるように 6 箇所確保した。このうち 2 対、4 箇所 (a)、a')、c)、c')) には塗布開始 5 日前に UV-B 照射を 0.75 Joule/cm² 行った。このうち 1 対 (a)、a')) を試料塗布部とした (図 1 参照)。塗布は、K166 30% 液 (溶媒：50% エタノール液)、20 μL を 1 日に 3 回 (9:00、13:00、17:00) 塗布した。

塗布期間中に肉眼判定において色素脱失 (++ : 高度な白色化を認める、下記皮膚色の判定方法参照) が確認された場合は、色素脱失反応の可逆性を観察するため、個体毎に塗布 30 日 (個体 No.1)、40 日 (個体 No.2)、50 日 (個体 No.5)、60 日 (個体 No.4) または 97 日 (個体 No.3) で継時的に塗布を休止することとした。また、塗布休止期間は、肉眼判定を継続し、色素脱失が認められなくなり (- : 皮膚に変化を認めない)、且つ同動物の UV-B 非照射部皮膚と肉眼判定において差が認められなくなるまでとした。

・皮膚色の判定方法

1日1回 (毎朝) 塗布前に以下の判定基準に従って皮膚白色化と皮膚刺激反応について皮膚判定を行った。塗布開始翌日 (Day 2) より、皮膚の白色化および刺激性反応の有無を以下の基準に基づいて肉眼判定を行った。

< 皮膚の白色化¹⁾ >

- : 皮膚に変化を認めない
- ± : 軽度の白色化を認める
- + : 中程度の白色化を認める
- ++ : 高度な白色化を認める

< 皮膚刺激 >

- : 反応は認められない
- ± : かすかな紅斑

- + : 明瞭な紅斑
- ++ : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 痂皮、壊死

・皮膚色の測定：L*値

試験開始前（Day 0）から回復までの週1回以上、試料塗布部位、UV-B照射無処置部位、UV-B非照射部位について、色彩色差計（CR-300、MINOLTA、測定条件：C光源、2°視野）を用いて皮膚色L*a*b*表色系（CIE 1976）のL*値（明-暗）を測定した。色彩色差計の測定項目の条件設定は、L*a*b*測定値を3回測定した値の平均値が表示されるように設定した。

・皮膚標本の作製および観察方法

褐色モルモットの皮膚採取は、試験前（UV-B照射部）、色素脱失形成時（試料塗布部位、UV-B照射無処置部位及びUVB非照射部位）、回復時（試料塗布部位、UVB照射無処置部位及びUVB非照射部位）に吸入麻酔剤（フォーレン吸入麻酔液、アボットジャパン株）にて麻酔後、直径5mmの皮膚トレパン（デルマパンチ、ニプロ医工株）で行った。DOPA陽性メラノサイト数の計測用として表皮剥離標本を、組織学的検査用としてパラフィン包埋標本を作製した。

表皮剥離標本

採取した皮膚は、2N-NaBrで37℃、2時間処理後に表皮を剥離し、DOPA染色（0.1% L-DOPA / PBS、37℃、2時間）を行った。その後10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定、脱水、封入して表皮剥離標本を作製した。標本は光学顕微鏡を用いて観察し、全視野のDOPA陽性メラノサイト数を計測後、1mm²当たりのメラノサイト数を算出した。

パラフィン包埋標本

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後、定法に従ってパラフィン包埋し、組織切片を作製した。組織学的観察用としてヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を、メラノサイト観察用としてS-100免疫染色を、メラニン顆粒観察用としてフォンタナ・マッソン染色（FM染色、核染：ケルンエヒトロート）を施し、光学顕微鏡を用いて観察した。

結果

[皮膚色の肉眼判定]

褐色モルモットのK166塗布部位において、Day 9よりごく軽度の皮膚の白色化が4例にみられ、Day 21には高度な白色化が全例となった。塗布終了後も白色化が続いたが、徐々に回復し、Day 75~141に変化なしとなった（表1参照）。刺激性反応はみられなかった。代表例として動物番号2番の写真を示した（写真1（Day0）、写真2（Day41）、写真3（Day78））。

[皮膚色のL*値]

褐色モルモット皮膚色の皮膚明度（L値）については、塗布14日頃よりUV照射無処置部に比べ有意にL値が上昇した。塗布28日目には、UV照射無処置部、UV非照射無処置部（地肌部）に比べて有意にL値が高くなった。塗布部のL値は、28日目以降、試験試料の塗布を休止するまで高値のまま推移した（図2参照）。

[DOPA 陽性メラノサイト数]

褐色モルモットのDOPA 陽性メラノサイト数を表2 に示した。

メラノサイト数の平均値は、試験前は84.1 個/mm² 個であったが、K166 30%塗布部位において色素脱失形成期で1.3 個/mm² に減少したが、回復期では22.5 個/mm² となった。無処置部位では色素脱失形成期、回復期の順に33.0、25.9 個/mm²、非照射部位では同様に12.8、14.9 個/mm² であった。

[HE 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において軽度の表皮の肥厚が全例、ごく軽度～軽度の表皮および毛包上皮の変性が各1 例にみられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期でごく軽度が2 例、変化なしが3 例であったが、回復期では軽度が全例となった。無処置および非照射部位においても、軽度の表皮の肥厚が色素脱失形成期の無処置部位に1 例、ごく軽度の表皮および毛包上皮の変性が色素脱失形成期の無処置部位に3 例、回復期の非照射部位に1 例みられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期、回復期ともにごく軽度～軽度が全例にみられた（写真4参照）。

[Fontana-Masson 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において、メラニン顆粒は表皮基底層でごく軽度～中等度、有棘層および角層でごく軽度～軽度、毛包部では変化なし～軽度であった。回復期において、表皮基底層で中等度、有棘層、角層および毛包部では軽度であった。無処置および非照射部位では色素脱失形成期、回復期ともに、表皮基底層で軽度～中等度、有棘層、角層および毛包部で変化なし～中等度であった（写真5参照）。

[S-100 免疫染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位において、基底層のメラノサイト数は、色素脱失形成期で0～9、回復期で4～18であった。毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。無処置部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で4～10、回復期で7～16、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。非照射部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で3～5、回復期で3～17、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった（写真6参照）。

考察

本試験では、メラニン色素を有する褐色モルモットを用いて、K166を累積塗布した場合の色素脱失形成及び塗布を休止した場合の回復過程について評価検討を行った。K166 30%溶液の累積塗布を1日3回、20日以上にわたって継続して行った。試料濃度としては30%液を塗布し続けたが、紅斑や浮腫などの皮膚刺激性は発現せず、皮膚色が抜けていくような白色化が徐々に進行し、肉眼観察においても容易に区別出来る色素脱失が形成された。

この色素脱失形成部の皮膚組織では、色素細胞である表皮基底部のメラノサイト、Dopa陽性メラノサイト及び表皮全体のメラニン顆粒の減少が認められた。K166の塗布を休止すると、肉眼観察及び機器測定においても白色化の度合いが弱まり、個体差はあるものの1～2か月ほどかけて、試験開始時の測定値を示すまでに回復した。組織学的には、色素脱失形成時に減少あるいは消失していた色素細胞が回復時には非塗布部とほぼ同等数確認出来た。この色素細胞の再生には、周囲の毛包バルジに存在する色素幹細胞が大きく関与していると考えられ^{2) 3)}、色素幹細胞からメラノサイト前駆体であるメラノプラストに分化成長し、皮膚基底層に移動しながらさらに分化しメラノサイトになり補完されるのではと考えられた。

図1. 累積塗布方法(褐色モルモット)

塗布部位: 1区画(2 cm×2 cm)の6区画

- a) 試料塗布部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- a)' 試料塗布部位(回復性観察部位)
- b) UV非照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- b)' UV非照射部位(回復性観察部位)
- c) UV照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- c)' UV照射部位(回復性観察部位)

表1. 褐色モルモットのK166塗布部の白色化スコアの推移

動物番号	軽度の白色化(±)を示すまでの日数 ¹⁾	高度白色化(++)を示すまでの日数 ²⁾	白色化症状が消失した日数 ³⁾
No.1	9日	21日	82日
No.2	9日	17日	75日
No.3	9日	17日	141日
No.4	11日	21日	91日
No.5	9日	21日	91日

- 1) 塗布を開始してから軽度白色化(±)を示すまでの日数
- 2) 塗布を開始してから高度白色化(++)を示すまでの日数
- 3) 試験開始から、地肌色に回復するまでの日数

表 2 K166 30%群におけるDOPA陽性メラノサイト数

動物 番号	DOPA陽性メラノサイト数 / mm ²									
	試験開始前	白斑形成期					回復期			
	(Day 0)	stage	塗布部位	無処置	非照射	非照射 (尾部)	stage	塗布部位	無処置	非照射
1	74.8	Day31	0.3	50.5	3.5	ND	Day91	18.3	22.7	15.2
2	99.4	Day41	0.7	49.4	13.6	ND	Day78	31.2	13.2	23.8
3	115.5	Day98	0.1	19.6	7.4	16.1	Day141	45.2	57.6	7.1
4	45.7	Day61	2.5	27.0	22.0	ND	Day98	4.2	18.1	11.5
5	85.2	Day51	3.2	18.4	17.4	ND	Day98	13.4	17.9	16.7
mean±S.D.	84.1 ± 26.4		1.3 ± 1.4	33.0 ± 15.9	12.8 ± 7.4	-		22.5 ± 16.0	25.9 ± 18.0	14.9 ± 6.2

写真 1 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 0 (' 13.07.10)

(A) 塗布部位L : 白色化(-)、皮膚刺激(-)

(B) 塗布部位R : 白色化(-)、皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 2 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 41 (' 13.08.20)

(A) 塗布部位L : 白色化(++)、皮膚刺激(-)

(B) 塗布部位R : 白色化(++)、皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 3 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 78 (' 13.09.26)

(A) 塗布部位L : 白色化(ND)、 皮膚刺激(ND)

(B) 塗布部位R : 白色化(-)、 皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 4-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 4-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 4-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 5-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 6-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

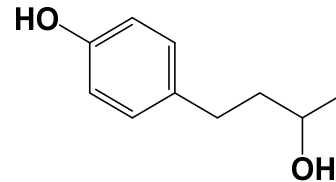
2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価

材料及び方法

[被験物質]

ロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166)は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式： $C_{10}H_{14}O_2$ 、分子量：166.22
Lot.002002
純度：100%



化学構造

[皮膚感作性評価]

・GPMT (Guinea pig Maximization Test) ⁴⁾

1) 動物種および群構成

褐色モルモット (KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

感作試料

- a：FCA と生理食塩液の等量 v/v 乳化物
- b：K166 の 0.8 w/w%液 (溶媒：生理食塩液)
- c：K166 の 1.6 w/w%液 (溶媒：生理食塩液) と FCA の等量 (v/v) 乳化物
- d：生理食塩液
- e：K166 の 50 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)
- f：50%エタノール水

惹起試料

- g：K166 の 50、30、10、5、3、1 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)

3) 感作方法

皮内感作

投与部位は除毛した頸部背側皮膚 (約 4×6 cm) とした。0 日目 (感作開始日) に、感作群は投与試料 a、b、c の順に、対照群には投与試料 a、d、a の順に左右 2 ヶ所 (但し、投与試料 a と b、a と d の投与間隔を縮める) にそれぞれ 0.1 mL 皮内投与した。

接触感作

投与部位は、除毛した皮内投与部位とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。8 日目に感作群は投与試料 e、対照群は投与試料 f を 2×4 cm のリント布 (西尾衛生材料株) に 0.2 mL 含浸させ、無浸透性絆創膏 (ブレンダーーム：3M 社) 及び粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス 3 号：アルケア株) を用いて 48 時間閉塞貼付を行った。なお、閉塞貼付 24 時間前に 10%ドデシル硫酸ナトリウムのワセリン混合物約 0.5 g を皮内投与部位に開放塗布し、8 日目にエタノールを用いて除去後に閉塞貼付を行った。

4) 惹起方法

投与部位は、除毛した側腹部皮膚とした。除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。感作開始 21 日目に投与試料 g を 1.5×1.5 cm のリント布に 0.1 mL ずつ含浸させ、無浸透性絆創膏を用いて 24 時間閉塞貼付を行った。密着性を良くするために無浸透性絆創膏の外側を更に粘着性スポンジ絆創膏（マイクロフォーム：3M 社）と粘着性伸縮包帯（シルキーテックス 5 号）で固定した。なお、反応の差を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

5) 判定方法

惹起貼付除去 3、24 及び 48 時間後に下記の Draize 法の基準で判定した。

< 紅斑・痂皮形成 >

- 0：紅斑なし
- 1：ごく軽度の紅斑（かすかに認められる程度）
- 2：明らかな紅斑
- 3：中等度から強い紅斑
- 4：深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成（傷害は深部に及ぶ）

< 浮腫形成 >

- 0：浮腫なし
- 1：ごく軽度の浮腫（かすかに認められる程度）
- 2：軽度の浮腫（周囲と明らかに区分可能）
- 3：中等度の浮腫（1 mm 程盛り上がっている）
- 4：強い浮腫（1 mm 以上盛り上がり、周囲にも広がる）

・ CCET (Cumulative contact enhancement Test)⁵⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット（KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹）

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

感作試料

感作群： K166 の 50 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

対照群： 50%エタノール水

21 日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5、3、1、0.5 及び 0.3 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

3) 感作方法

投与部位

除毛した後背部皮膚とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

投与方法

< 感作開始日 (0 日目) 及び感作 2 日目 >

各感作試料を 2×4 cm のリント布に 0.2 mL ずつ含浸させ、無浸透性絆創膏及び粘着性伸縮絆創膏を用いて下図の CP の位置に 24 時間の閉塞貼付を行った。

< 感作 7 日目 >

下図の X の位置に FCA を 0.1 mL ずつ皮内投与し、感作開始日と同様の処置を行った。

< 感作 9 日目 >

感作開始日と同様の処置を行った。

投与部位	CP	X
感作群	K166 の 50% w/w 液	FCA
対照群	50%エタノール水	FCA

CCET 感作方法

4) 惹起方法

投与部位は除毛した側腹部皮膚とした。除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。初回惹起は感作開始 21 日目に開放塗布で行った。感作群及び対照群に惹起試料をそれぞれ 2 cm² 当たり 0.01 mL ずつ開放塗布した。なお、反応の差を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

5) 判定方法

惹起時の皮膚反応の判定は、塗布 24、48 及び 72 時間後に下記の基準で行った。

< 惹起 (開放塗布) の判定基準 >

- (評点 0): 反応は認められない
- ± (評点 1): かすかな紅斑
- + (評点 2): 明瞭な紅斑
- ++ (評点 3): 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ (評点 4): 痂皮、壊死

・ LLNA (Local Lymph Node Assay) ⁶⁾

1) 動物種および群構成

CBA/J マウス、雌、日本チャールス・リバー株式会社、各溶媒 16 匹

内訳: 1 群 (濃度) 4 匹 × 3 濃度 = 12 匹、溶媒対照群 4 匹

2) 試料の調整

溶媒

A00 (Acetone:Olive oil = 4:1)、MEK (Methyl ethyl ketone)、PG (Propylene glycol)、DMSO (Dimethyl sulfoxide)、70%エタノール水溶液

³H-methyl thymidine

³H-methyl thymidine (Moravek 社製、1mCi/ml) を分取し、PBS を加えて 80 µCi/mL に希釈調製した。

3) 感作方法

毎日一定の時刻、1 日 1 回、3 日間連続、計 3 回、動物の両耳介に、マイクロピペッターを用いて、それぞれ

25 μ L ずつ塗布した。

4) ^3H -methyl thymidine の投与、測定

投与及び回収方法

最終感作の 3 日後に注射針と注射筒(テルモ株式会社)を用いて 0.25 mL/匹を尾静脈内投与した。 ^3H -methyl thymidine 投与の 5 時間後に頸椎脱臼により安楽死させた後、耳介リンパ節 (Auricular lymph node) を採取した。周囲組織を丁寧に取り除き、個体ごとに PBS に浸した。

^3H -methyl thymidine 取り込み量の測定

リンパ節はステンレスメッシュ (#200) を用いて物理的に破碎し、PBS 内で懸濁した後、PBS で 2 度洗浄。続いて 5% Trichloroacetic acid (TCA) を 1 mL 加えて 4 分で 18 時間沈殿させた。ペレットを 1 mL の TCA に再懸濁させ、10 mL のシンチレーションカクテル(Ecolume™, MP Biomedicals) に加えて液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3110TR, PerkinElmer 社製) を用いて取り込み量 (DPM / mouse) の測定を行った。

5) 結果の評価

溶媒対照群について各個体の ^3H -methyl thymidine 取り込み量 (DPM / mouse) の平均値を算出する。次いで、実験に供した各個体の取り込み量 (DPM / mouse) を溶媒対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index, SI) を算出した後、被験物質群及び陽性対照群の平均値及び標準誤差を算出し、SI 値が 3 以上を示した場合、陽性と判断した。

$$\text{SI 値} = \frac{\text{各個体の取り込み量 (DPM / mouse)}}{\text{溶媒対照群の取り込み量の平均値 (DPM / mouse)}}$$

[光感作性評価]

・ AS-AA (Adjuvant-Strip-AA) ⁷⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット (KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 8 匹、対照群 4 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用事調製した。

感作試料

感作群：被験物質の 50% 液 (溶媒：50% エタノール水)

対照群：50% エタノール水

21日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5 w/w% 液 (溶媒：50% エタノール水)

3) 光源

主波長UVA (波長310 ~ 400 nm : ピーク350 nm、東芝蛍光ランプFL20S BLB)

4) 感作方法

投与部位は頸部背側2×4cm の区画とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

0 日目（感作開始日）

フロイントの完全アジュバントと注射用水を1：1 の割合で乳化させたものを投与部位の4隅に0.1 mL ずつ皮内投与した後、セロハン粘着テープでStripping を3 回払い、感作試料をそれぞれ0.1 mL ずつ開放塗布した。乾燥後に、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定し、6 本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm 下に厚さ3 mm のガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm 上の高さから照射エネルギー量が10.2 J/cm² となるように照射した。

1～4 日目

0 日目の皮内投与を除く操作を行った。

5) 惹起方法

投与部位は背部全体とし、正中線を軸にして左側に照射部、右側に非照射部を設けた。投与部位は除毛した側腹部皮膚とし、除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。21 日目に惹起試料をそれぞれ0.02 mL ずつ投与部位に滴下し、テフロン棒で背部左側と背部右側が対称になるように15 mm×15 mm 大に塗り広げ、乾燥後に動物の背部右側を粘着性弾力包帯および伸縮ネット包帯を用いてアルミホイルで被覆し、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定した。6 本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm 下に厚さ3 mm のガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm 上の高さから照射エネルギー量が10.2 J/cm² となるように照射した。なお、試料の投与部位による反応を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

6) 判定方法

皮膚反応の判定は、塗布24、48 および72 時間後に下記の基準で行った。

- : 0 : 反応は認められない
- ± : 1 : かすかな紅斑
- + : 2 : 明瞭な紅斑
- ++ : 3 : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 4 : 痂皮、壊死

・光感作性試験（Harber）⁸⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット（KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹）

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用事調製した。

感作試料

感作群：被験物質の50%液（溶媒：50%エタノール水）

対照群：50%エタノール水

27日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

3) 光源

A：主波長UV-B（波長275～380 nm ピーク315 nm、東芝蛍光ランプFL20S・E）

B：主波長UV-A（波長310～400 nm ピーク350 nm、東芝蛍光ランプFL20S BLB）

4) 感作方法

投与部位は頸部背側2×4cmの区画とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

0日目（感作開始日）および3、6日目に行った。感作試料をそれぞれ0.1 mL ずつ開放塗布した。乾燥後に、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定し、光源Aを6本並列に装着し、投与部位の25 cm上の高さから照射エネルギー量が1J/cm²となるように照射後、光源Bを6本並列に装着し、さらに、その1 cm下に厚さ3 mmのガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm上の高さから照射エネルギー量が30 J/cm²となるように照射した。

5) 惹起方法

投与部位は背部全体とし、正中線を軸にして左側に照射部、右側に非照射部を設けた。投与部位は除毛した側腹部皮膚とし、除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。27日目に惹起試料をそれぞれ0.05 mL ずつ投与部位に滴下し、テフロン棒で背部左側と背部右側が対称になるように15 mm×15 mm大に塗り広げ、乾燥後に動物の背部右側を粘着性弾力包帯および伸縮ネット包帯を用いてアルミホイルで被覆し、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定した。光源Bを6本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm下に厚さ3 mmのガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm上の高さから照射エネルギー量が9 J/cm²となるように照射した。なお、試料の投与部位による反応を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

6) 判定方法

皮膚反応の判定は、塗布24、48 および72 時間後に下記の基準で行った。

- : 0 : 反応は認められない
- ± : 1 : かすかな紅斑
- + : 2 : 明瞭な紅斑
- ++ : 3 : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 4 : 痂皮、壊死

結果

[皮膚感作性試験]

・ GPMT の結果

皮膚反応の総括表を表1に、写真を写真1、2、3、4に示した。

感作群および対照群ともに、いずれの試料においても皮膚反応はみられず、皮膚感作性は陰性と判断した。

・ CCET の結果

皮膚反応の総括表を表2に、写真を写真5、6、7、8に示した。

1) K166 : 50%液

感作群において、塗布48時間後から±が2例にみられ、塗布72時間後には±が3例となった。平均評点は塗布24、48、72時間後の順に0、0.2、0.3であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0であった。

2) K166 : 30%液

感作群において、塗布48 時間後から±が2 例にみられ、塗布72 時間後には±が3 例となった。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.2、0.3 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

3) K166 : 10%液

感作群において、塗布48 時間後から±が2 例にみられ、塗布72 時間後には±が3 例となった。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.2、0.3 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

4) K166 : 5%液

感作群において、塗布48 時間後から±が1 例にみられ、塗布72 時間後においても皮膚反応は残存した。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.1、0.1 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

5) K166 : 3%液、1%液、0.5%液、0.3%液では、感作群および対照群ともに、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0であった。

以上のように、対照群において皮膚反応は全く認められなかったが、感作群にのみ疑わしい皮膚反応が認められた。

・ LLNA の結果

AOO、MEK 溶媒においては最高適用濃度の 50%で「25%を超える耳介厚の増加」、「5%を超える体重の減少」は認められなかったことから 50%、25%、10%の濃度で試験を実施した。また PG においては最高適用濃度の 50%で「5%を超える体重の減少」が認められたことから何かしらの全身性影響が懸念されたため 25%、10%、5%で試験を実施した。一方 70%エタノール水溶媒においても最高適用濃度の 50%で「5%を超える体重の減少」が認められたが、既に終了していたその他の試験結果から 50%での実施で問題ないと考え、50%、25%、10%の濃度で試験を実施した。その結果、いずれの溶媒においても濃度と相関した SI 値の上昇傾向は認められず、SI 値は 3 以上にならないので陰性と判断した (図 1 参照)。

[光感作性試験]

・ AS-AA の結果

皮膚反応の総括表を表 3 に、写真を写真 9、10 に示した。

感作群および対照群ともに、照射および非照射に関わらず、いずれの投与試料においても皮膚反応はみられず、光感作性は認められなかった。

・ Harber の結果

皮膚反応の総括表を表 4 に、写真を写真 11、12 に示した。

1) K166 : 50%液

(1) 照射部

感作群で惹起48hr後にのみに±が1 例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群で惹起48hr後にのみに±が1 例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

2) K166 : 30%液

(1) 照射部

感作群で♂が1例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群で♂が1例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

3) K166 : 10%液

(1) 照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

4) K166 : 5%液

(1) 照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった

以上のように、光照射に特異的な反応はみられず、光感作性は陰性と判断した。

考察

[皮膚感作性評価]

GPMTでは以前の薬事申請時の報告通り、今回も陰性の結果となり再現性が得られた。また今回行ったCCETにおいては、感作群にのみ疑わしい皮膚反応が認められた。CCETは、24時間閉鎖貼付を繰り返す(4回)感作方法であり、連続して貼付することが検出感度を上げた可能性が考えられた。

[光感作性評価]

感作時にUV-A照射を行うAS-AAでは、感作群、対照群ともに皮膚反応は全く見られなかった。一方、感作時にUV-A、UV-Bを併用照射を行うHarberでは、感作群において50%液、30%液でそれぞれ1例のみの皮膚反応が見られた。しかしながら、この反応は照射、非照射に関わらず反応を示し、また、惹起48時間後のみの反応であり、反応の増強や継続がみられなかったことから光感作性は陰性と判断した。また、UV-A、UV-B波長の違いによって光感作性に対する影響は大きくないと考えられた。

表1 GPMTにおける試験結果（総括表）

有効分： 100.0%

評価方法： GPMT（褐色ELFト）

皮内感作： 0.8% （溶媒：生理食塩水）

経皮感作： 50% （溶媒：50%EtOH水）

SDS処理あり

反応例数： 2（1）紅斑/浮腫

惹起試料			有効分濃度（溶媒）	（貼付）除去3hr後		（貼付）除去24hr後		（貼付）除去48hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 21 （閉鎖貼付）	感作試料		50%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			30%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			10%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			5%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			3%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			1%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）

～ ：溶液

表2 CCETにおける皮膚感作性試験結果（総括表）

感作試料：K166
Lot.002002

有効分：100%

評価方法：CCET（褐色モルモット）

経皮感作：50%（対照群：50%エタノール）

反応例数：+（±）

	番号	惹起試料	有効分濃度（溶媒）		塗布24時間後		塗布48時間後		塗布72時間後	
					感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 21 (塗布)	感作試料	K166 Lot.002002	50%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			30%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			10%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			5%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
			3%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			1%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			0.5%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			0.3%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

初回惹起試料：全て溶解

表3 AS-AAにおける光感作性試験結果（総括表）

感作試料： K166
 Lot.002002
 有効分： 有姿100%
 評価方法： AS-AA法
 群構成と経皮感作濃度： 感作群： 50%適用、感作時光照射
 対照群： 50%エタノール溶液適用、感作時光照射

< 光感作性試験 >

反応例数： + (±)

	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4
初回惹起		K166	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Day 21		Lot.002002	30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(塗布)			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	非照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4
初回惹起		K166	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Day 21		Lot.002002	30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(塗布)			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

溶液

照射エネルギー量 = 10.2 J/cm²

表4 Harberにおける光感作性試験結果（総括表）

感作試料： K166
 Lot.002002
 有効分： 有姿100%
 評価方法： Harber法
 群構成と経皮感作濃度： 感作群： 50%適用、感作時光照射
 対照群： 50%エタノール溶液適用、感作時光照射

< 光感作性試験 >

反応例数： + (±)

	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 27 (塗布)		K166 Lot.002002	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	非照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 27 (塗布)		K166 Lot.002002	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

感作時の照射エネルギー量：UV-A = 30 J/cm²、UV-B = 1 J/cm²

溶液

惹起時の照射エネルギー量：UV-A = 9 J/cm²

写真1 (50 % : 0/0) (30 % : 0/0) (10 % : 0/0)

感作群(21日目) 動物番号1 除去24hr. 左側腹部(' 13.09.26)

写真2 (1 % : 0/0) (3 % : 0/0) (5 % : 0/0)

感作群(21日目) 動物番号1 除去24hr. 右側腹部(' 13.09.26)

写真3 (50 % : 0/0) (30 % : 0/0) (10 % : 0/0)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 除去 24hr. 左側腹部 (' 13.09.26)

写真4 (1 % : 0/0) (3 % : 0/0) (5 % : 0/0)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 除去 24hr. 右側腹部 (' 13.09.26)

写真5 (K166 0.3% : -)() ()
() () (K166 50 % : ±)
感作群 (21 日目) 動物番号 6 塗布 48hr. 左側腹部 (' 13.08.08)

写真6 (K166 5% : ±)(K166 10% : ±)(K166 30% : ±)
(K166 0.5% : -)(K166 1% : -)(K166 3 % : -)
感作群 (21 日目) 動物番号 6 塗布 48hr. 右側腹部 (' 13.08.08)

写真7 (K166 50% : -)(K166 30% : -)(K166 10% : -)
(K166 5% : -)(K166 3% : -)(K166 1% : -)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 塗布 48hr. 左側腹部 (' 13.08.08)

写真8 () (K166 0.3% : -)(K166 0.5% : -)
() () ()
对照群 (21 日目) 動物番号 11 塗布 48hr. 右側腹部 (' 13.08.08)

写真 9 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
感作群 動物番号 1 塗布 48 時間後 (' 13.08.14)

写真 10 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
対照群 動物番号 9 塗布 48 時間後 (' 13.08.14)

写真 11 非照射 (10% : -) (5% : -) (50% : ±) (30 % : ±)
照 射 (10% : -) (5% : -) (50% : ±) (30 % : ±)
感作群 動物番号 3 塗布 48 時間後 (' 13.10.09)

写真 12 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
対照群 動物番号 11 塗布 48 時間後 (' 13.10.09)

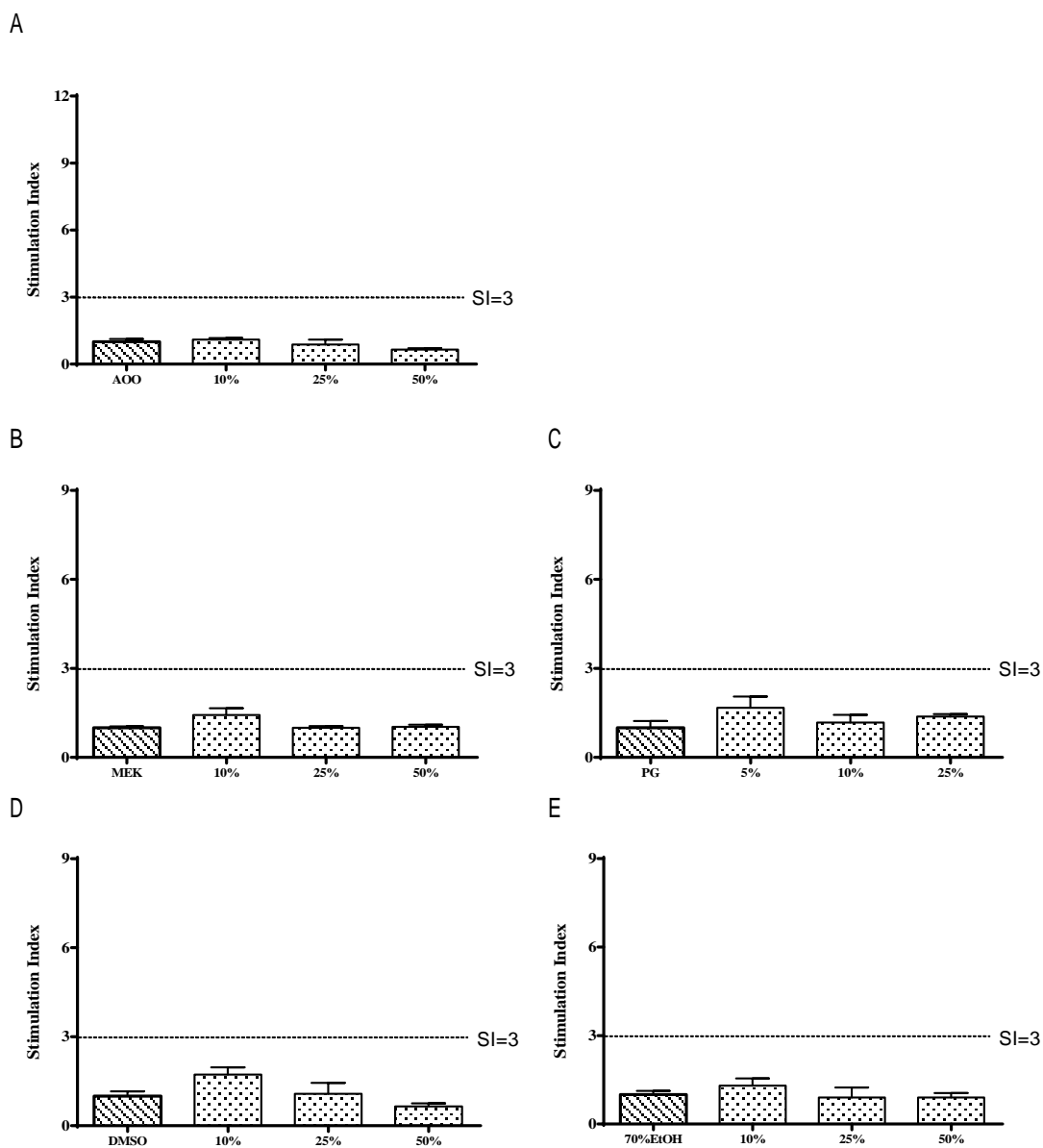


図 1. LLNA における各種溶媒での K166 濃度と SI 値の関係

横軸を K166 の濃度、縦軸を SI 値で示した。感作性陽性判断基準である SI=3 をバーで示した。溶媒は A : AOO、B : MEK、C : PG、D : DMSO、E : 70%エタノール水。

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2-1 表皮細胞への障害性及び炎症性サイトカイン等の分泌誘導能の検討

材料及び方法

[試薬]

新生児由来正常ヒト表皮角化細胞(KK-4009: lot.927477、クラボウ)を評価に用いた。表皮角化細胞は EpiLife® Medium with 60 µM Calcium(M-EPI-500-CA、Thermo Fisher Scientific)に Human Keratinocyte Growth Supplement (S-001-5、Thermo Fisher Scientific)を添加した培地で培養した。

被験物質として医薬部外品原料として流通されているロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称: K166)を用いた。また、比較対照として Monobenzyl ether of hydroquinone (MBEH、Sigma)、ハイドロキノン(HQ、Sigma)、L-アスコルビン酸 2-グルコシド(AAG2、Sigma)を用いた。

培養上清中のサイトカイン量の定量は、Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA Kit(DLA50、R&D Systems)、Human IL-1ra/IL-1F3 Quantikine ELISA Kit(DRA00B、R&D Systems)、Human IL-6 Quantikine ELISA Kit(D6050、R&D Systems)、Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit(DTA00C、R&D Systems)を用いておこなった。また、細胞障害性の評価には Cell Counting Kit-8(同仁化学)を用いた。

[K166の炎症性サイトカイン分泌誘導能の評価]

1×10^4 個の表皮角化細胞を 24 穴プレートに播種し、添加剤入り EpiLife®培地で 24 時間培養(37℃、5%CO₂)した。その後、培地を添加剤不含の EpiLife®培地に交換し、被験物質を種々の終濃度になるように添加して 24 時間培養した。コントロールは被験物質の溶媒である 50%EtOH とした。培養終了後、培地を回収し、各種 ELISA Kit を用いて培養上清中のサイトカイン量をマニュアルにしたがい測定した。

[K166の細胞障害性の評価]

上記の培地回収後の細胞に添加剤不含の EpiLife®培地を添加し、さらに Cell Counting Kit-8 溶液を添加して CO₂ インキュベーター内で 1 時間反応をおこなった。その後、マイクロプレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定した。細胞障害性は、溶媒コントロール添加時の吸光度に対する被験物質添加時の吸光度の割合(Cell Viability、%)として算出した。

結果及び考察

[細胞障害性]

表皮角化細胞に対する K166 の細胞障害性評価の結果を図 1 に示した。K166 は、終濃度 50 µM 以下では 1.3 倍程度の細胞増殖促進効果が認められたが、それ以上の濃度(~1mM)では特に影響は認められなかった。この結果から、K166 の表皮角化細胞に対する細胞障害性は、終濃度 1mM 以下の範囲では認められないものと推察された。

[炎症性サイトカイン分泌誘導能]

表皮角化細胞に対する K166 の炎症性サイトカイン分泌誘導能評価の結果を図 2~5 に示した。K166 は IL-6 の産生・分泌を終濃度 1mM で約 10 倍誘導した(図 2)。IL-1 については、いずれの濃度でもやや増加傾向が認められたが有意なものではなかった(図 3)。IL-1RA は終濃度 500 µM 以上で分泌が抑制される結果であった(図 4)。TNF-α に関しては、いずれの被験物質においてもキットの検出限界以下の値となった(図 5)。これらの結果から、K166 は高濃度(終濃度 500 µM 以上)で表皮角化細胞に対して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。しかし、これらの誘導作用は比較対照として用いたその他の物質に比して小さいものであり、実質

的には影響の少ないものと考えられた。

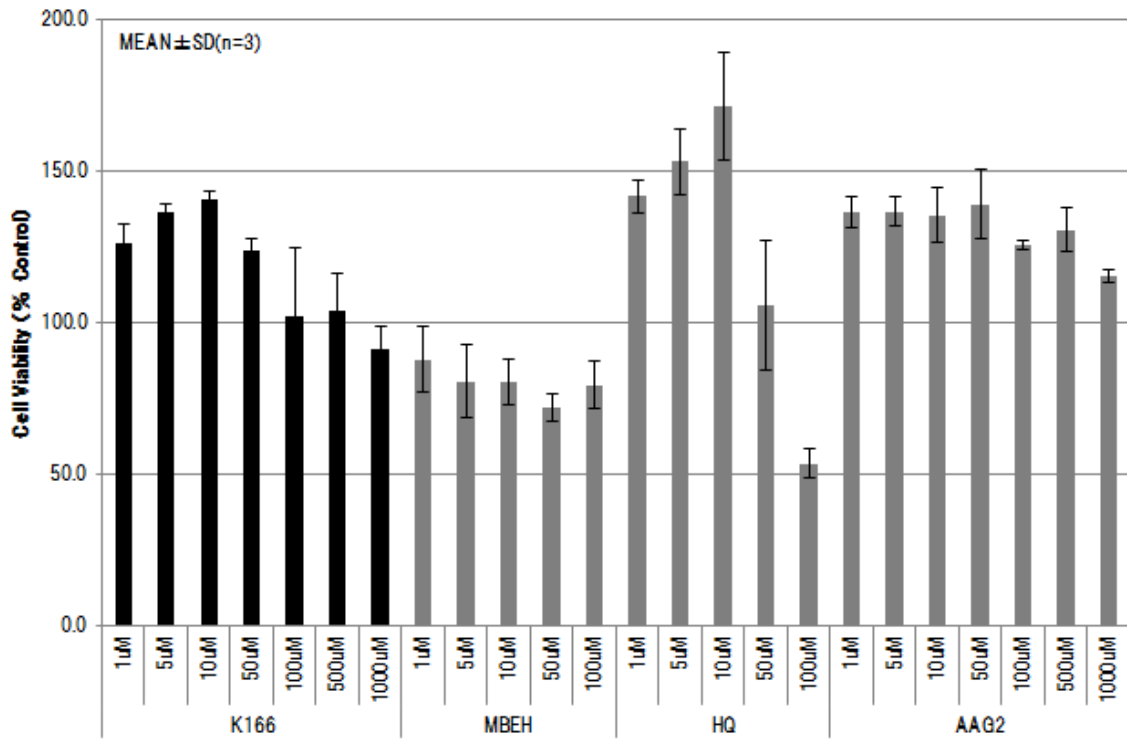


図 1. K166 の細胞障害性の評価

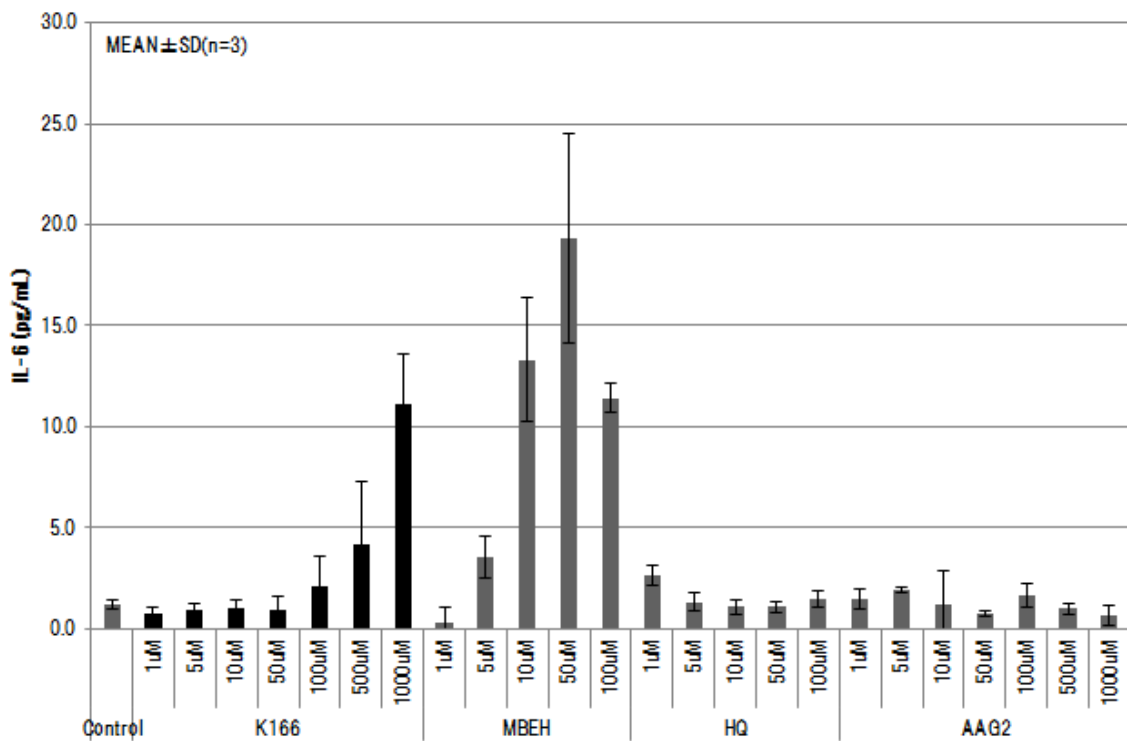


図 2. K166 の表皮角化細胞に対する IL-6 分泌誘導能の評価

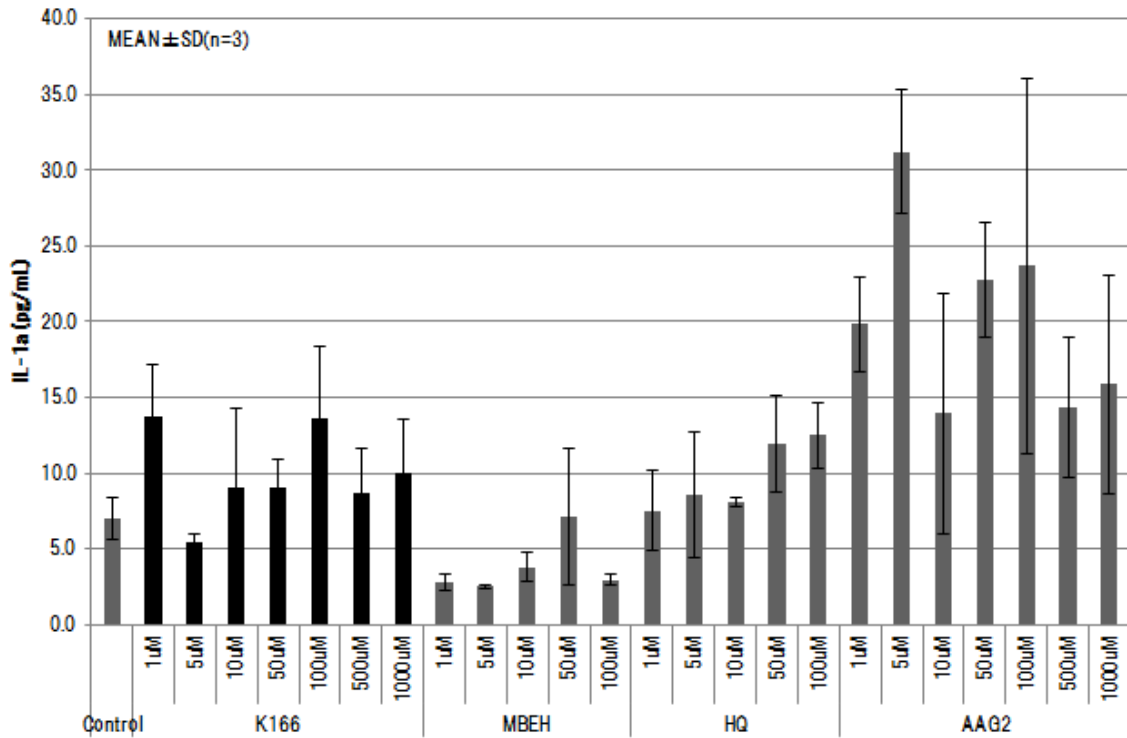


図 3. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1 分泌誘導能の評価

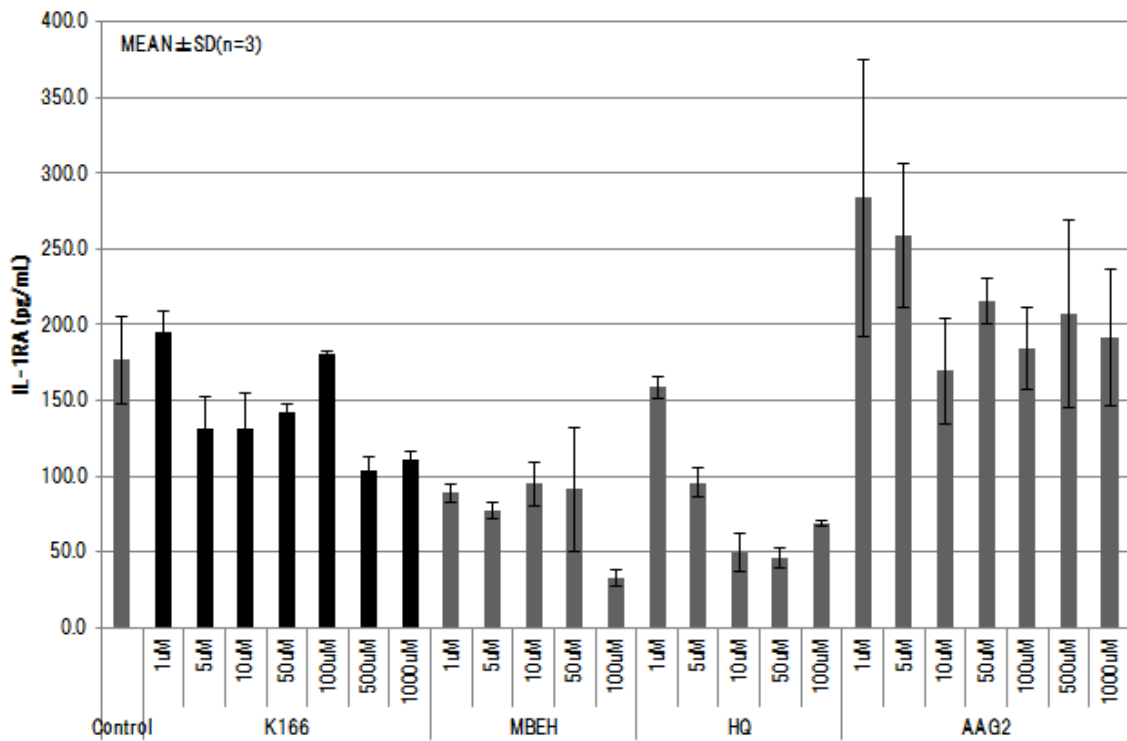


図 4. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1RA 分泌誘導能の評価

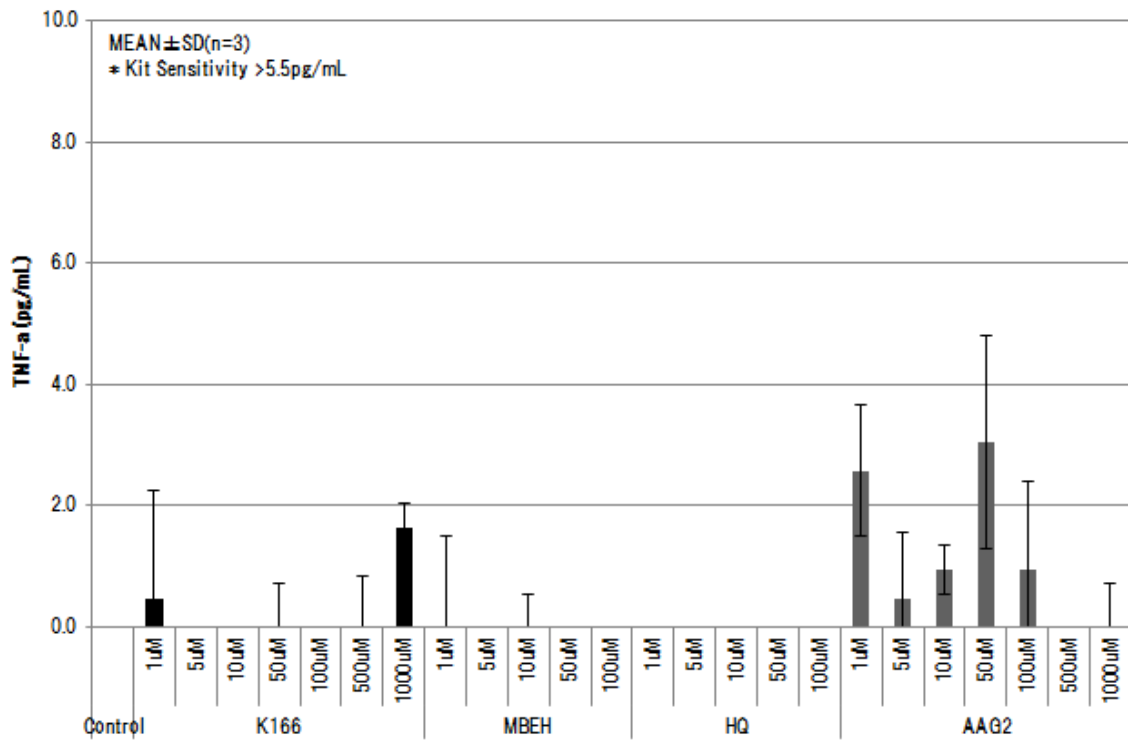


図 5. K166 の表皮角化細胞に対する TNF-α 分泌誘導能の評価

2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価

2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)製を用いた。Stealth RNAi™ siRNA、およびトランスフェクション試薬 Lipofectamine RNAiMAX は、Life Technologies (USA) 製を用いた。

[細胞培養]

PTUを用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数、タンパク量、および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイトを播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日から 1 日間 siRNA による前処理をし、3 日後 K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

[細胞障害性測定]

細胞障害性は細胞増殖測定用試薬アラマブルー (Alamar Bioscience, Inc 製) を用いて測定した。アラマブルーを培地の 10 分の 1 量加え、37 °C にて 1 時間反応させた。反応後の溶液を蛍光プレートリーダーにて測定した。

[タンパク量測定]

細胞を HEPES 緩衝液で洗い、10 % トリクロロ酢酸 (TCA)、エタノール・エーテル 1:1 (体積比) で処理後、1 N NaOH/10%ジメチルスルホキシド中で 60 °C、15 分溶解させた。細胞溶解物のタンパク量を Coomassie Plus Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. 製) にて測定した。

[細胞内チロシナーゼ活性測定]

培養メラノサイトにおけるチロシナーゼ (Tyrosine hydroxylase) 活性は Oikawa の方法によって測定した⁹⁾。培養終了 24 時間前に培地に 1 μCi [³H]-チロシンを加えた。培地 500 μl に活性炭溶液を等量加えボルテックス後、遠心分離した。上清 750 μl を 500 μl の活性炭溶液に加えボルテックス後、遠心分離した。上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

結果及び考察

[PTU を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

チロシナーゼ活性を阻害する PTU を添加することにより、K166 による細胞障害に与える影響をみた。PTU 10 μM, 30 μM, 100 μM の処理により、濃度依存的に K166 による細胞障害を低減させた (図 1)。また PTU 10 μM, 30 μM, 100 μM の単独処理において細胞数への影響は与えない一方、濃度依存的にチロシナーゼ活性は阻害した (図 2)。

PTU 処理による K166 の細胞障害の低減はチロシナーゼ活性の阻害に伴う可能性が示された。

[RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性に依存的であることを明らかにするため、RNA 干渉によりチロシナーゼ遺伝子発現を抑制する実験により確かめた。Negative control siRNA 処理でみられた K166 の濃度依存的な細胞障害がチロシナーゼ siRNA 処理によりチロシナーゼ活性を抑制させることにより (図 3) K166 による細胞障害が低減された (図 4)。RNA 干渉を用いた実験において K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性依存的であることが確認できた。

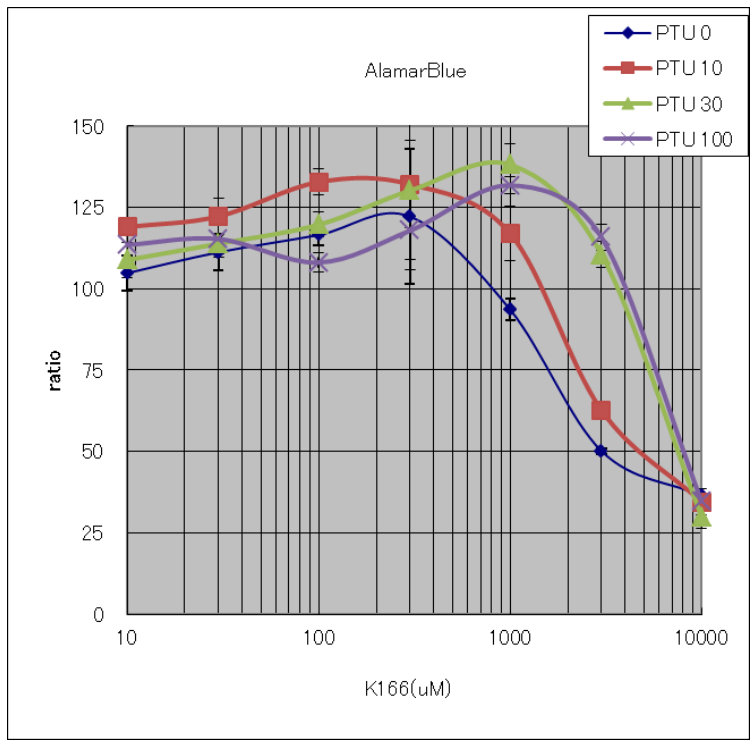


図 1 K166 の細胞障害に対する PTU の影響

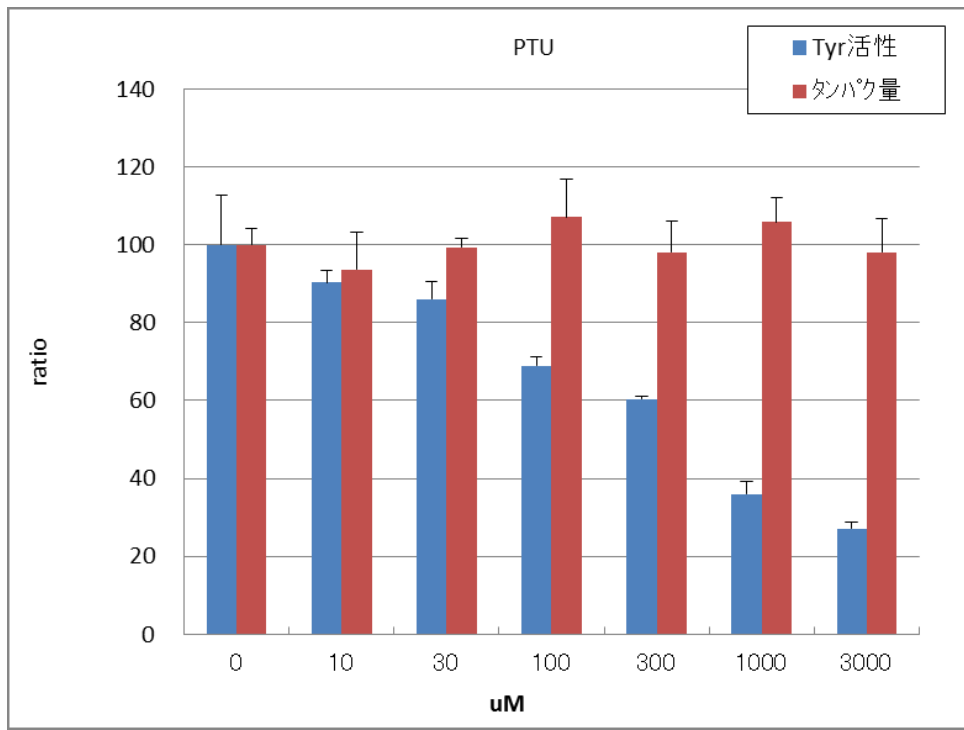


図 2 PTU のチロシナーゼ活性と細胞数への影響

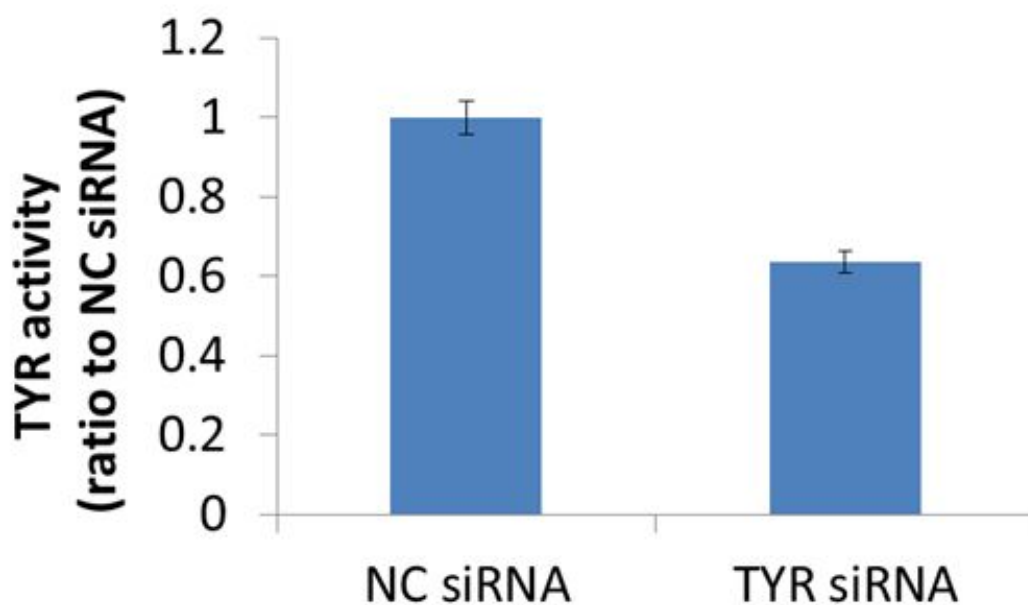


図3 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の確認

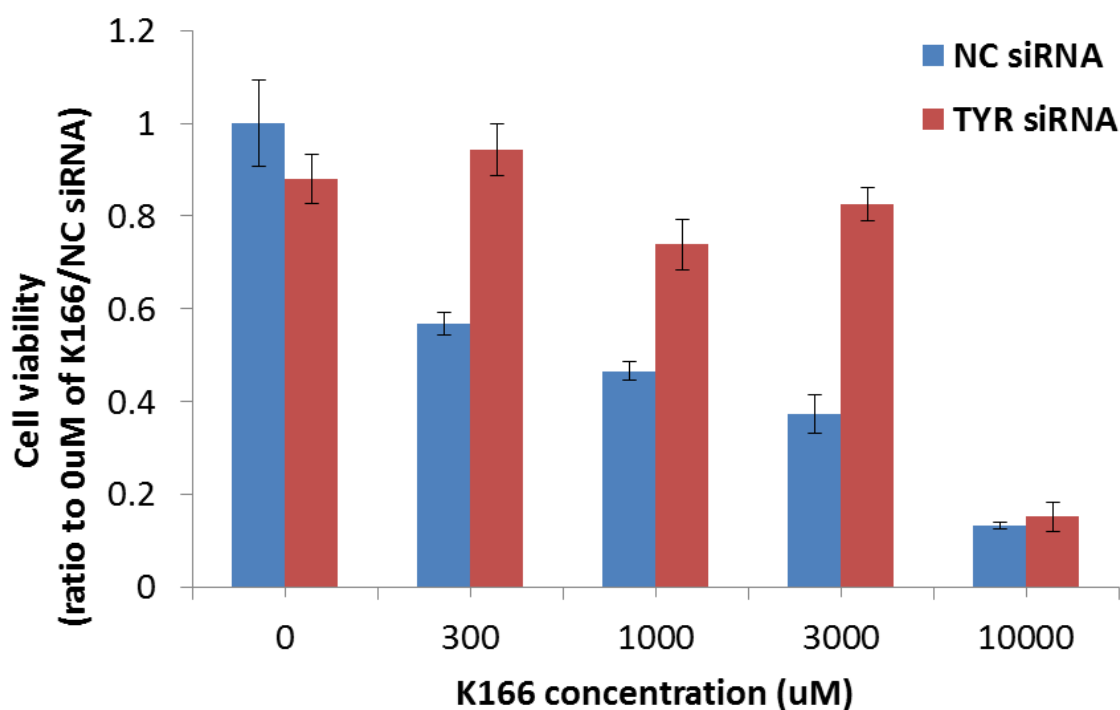


図4 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の K166 チロシナーゼの細胞障害への影響

2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞 (メラノサイト) は、クラボウより購入、あるいは、花王株式会社グループ内の研究所にて、定法に従って包皮より分離後、培養したものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies) に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS) (クラボウ) を添加した培地中で 37℃、5% CO₂ の環境下で定法に従って培養した。

[チロシナーゼ (DOPA oxidase) 活性の計測]

メラノサイトを定法に従ってトリプシンを添加して剥がした後、顕微鏡下で細胞数をカウントし、 2×10^4 個の細胞を 1.5 mL チューブに回収した。遠心し、上清を除いた後、Phosphate Buffers Saline (PBS) で 2 度洗浄してから、再び遠心により上清を除いた細胞を準備した。あるいは、96-well plate に 1.2×10^4 個/well のメラノサイトを播種し、siRNA を添加して 2 日後の細胞について培地を除いた後、PBS で 2 度洗浄してから、再び上清を除いた細胞を準備した。それらに抽出 Buffer (0.1 M Tris-HCL (pH:7.2)、1% NP-40、0.01% SDS) を 20 μ L、Assay Buffer (4% ジメチルホルムアミド、100 mM Sodium phosphate-buffered (pH:7.1)) を 20 μ L 添加し、4℃ にて 2 時間かけて細胞を可溶化し、DOPA oxidase 活性の測定を行った。その DOPA oxidase 活性測定は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン ヒドラゾン (MBTH) 法を基本とした次に示す方法で行った。すなわち、可溶化した細胞溶液の各 well に、上記 Assay Buffer を 80 μ L、20.7 mM MBTH 溶液を 60 μ L、基質として 5 mM L-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) 溶液を 40 μ L 加え、37℃ にて 30~60 分間反応させた後に、505 nm の測定波長で吸光度を測定した。

[K166 の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) を除いた培地 (PMA (-) 培地) を用いて播種し、翌日に PMA (-) 培地に希釈して K166 を添加した。4 日後、Alamar blue 活性を計測した。

[Alamar blue 活性の計測]

K166 を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA(-) 培地で希釈した 10% Alamar blue 溶液 (Bio-Rad) を 100 μ L/well 添加し、CO₂ インキュベーターにて 37℃ でインキュベートした。90 分後に蛍光プレートリーダーにて励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

[チロシナーゼの発現抑制]

96-well plate にメラノサイト (D6C0595) を 1.2×10^4 個/well の密度で、PMA (-) 培地を用いて播種し、翌日に siRNA 導入試薬である TransIT-TKO (Mirus Bio) を用いて添付のプロトコールに従って、25 nM の Tyrosinase 特異的 siRNA (Life Technologies) あるいは非特異的 (Control) siRNA (Life Technologies) を添加した。2 日後に DOPA oxidase 活性を計測、あるいは新たな PMA (-) 培地に希釈した K166 を添加し、その翌日に Alamar blue 活性を計測した。

結果及び考察

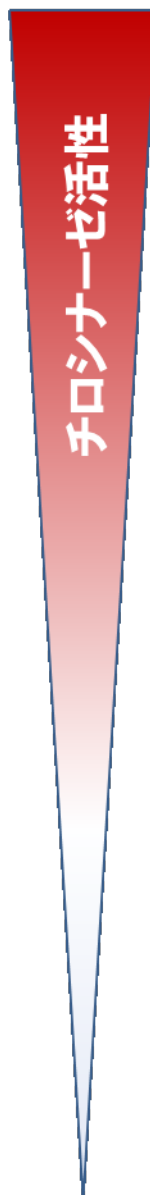
今回の実験で用いた 13 ラインのメラノサイトについて、チロシナーゼ活性の多様性を確認するため、それぞれ 1.5mL チューブに同じ細胞数のメラノサイトを準備し、DOPA oxidase 活性の計測を行った。その結果、メラノサイトのラインによってチロシナーゼ活性はさまざまであることが示された(図 1)。そこで、多様なチロシナーゼ活性を有するメラノサイトにおいて、K166 に対する細胞毒性が異なるかを明らかにするため、これら 13 ラインのメラノサイトにさまざまな濃度で K166 を添加した後、4 日後に alamar blue 活性を計測し、細胞毒性を評価した。K166 無添加の Control と比較して、alamar blue 活性の値が 50%低下する K166 の濃度(IC_{50} 値)を算出し、その結果を表 1 に示した。この結果を基に、図 1 で示した各メラノサイトの DOPA oxidase 活性(チロシナーゼ活性)と K166 添加による alamar blue 活性の IC_{50} 値の相関性を示したグラフを図 2 に示した。このグラフより、K166 によるメラノサイトへの細胞毒性とチロシナーゼ活性との関連性が示唆されると共に、K166 に対する毒性感受性が 2 群に分かれる可能性もまた示唆された。

次に、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性がチロシナーゼ活性に依存している可能性を明確にするため、チロシナーゼ活性が高く、また K166 に対する細胞毒性が高い D6C0595 細胞を用いて、RNA 干渉によりチロシナーゼの遺伝子発現を抑制した際の K166 に対する細胞毒性の変化を検討した。細胞を播種した翌日に siRNA を添加し、さらに 2 日後に DOPA oxidase 活性を計測したところ、Control siRNA を添加した細胞と比較して、チロシナーゼ siRNA を添加した細胞で同活性が約 50%程度に低下していることを確認した(図 3)。また、これらの細胞にさまざまな濃度で K166 を添加し、その翌日 alamar blue 活性を計測した結果を図 4 に示した。チロシナーゼの発現抑制により、K166 に対する細胞毒性は顕著に低下し、K166 添加による alamar blue 活性の IC_{50} 値は、Control siRNA 及びチロシナーゼ siRNA 添加細胞においてそれぞれ 0.052mM 及び 5.9mM であった。すなわち添加濃度で 100 倍以上の顕著な差が認められた。

これらの結果より、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性はチロシナーゼ活性に強く依存することが明らかとなった。

表1 K166添加によるalamar blue活性IC50値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。細胞のDOPA oxidase活性(チロシナーゼ活性)が高い順にその値を示している。



	alamar blue 活性IC ₅₀ 値 (mM)
D 6C0595	0.405
D 5C0126	0.27
D D3C0782	0.54
L 5C0247	5.94
D AA4	0.135
M 5C0570	5.535
L CA4	6.21
L LMC P7	6.75
M 4C0760	6.48
L CA3	5.94
M 4C0465	6.21
L LC1C1022	6.345
L 1C1018	6.21

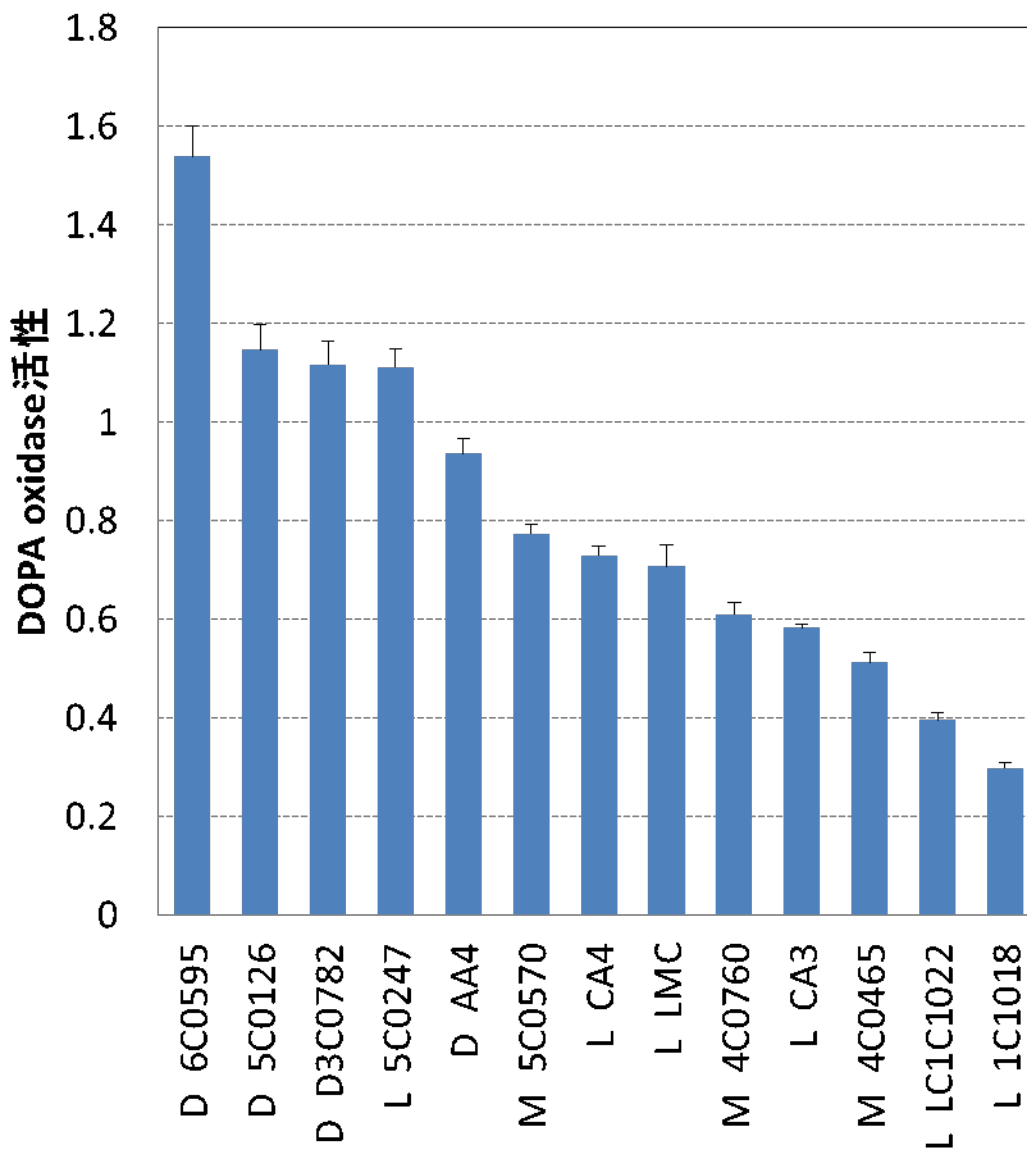


図 1 使用した 13 ラインのメラノサイトにおける DOPA oxidase 活性

細胞ライン名の前に記載の D、M、L はそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。

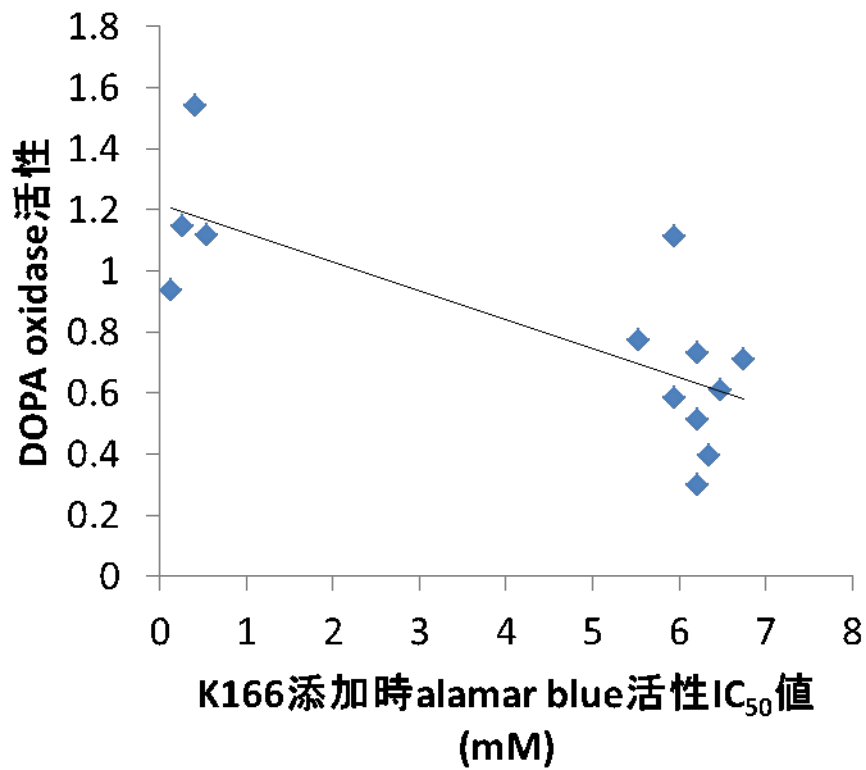


図 2 DOPA oxidase 活性と K166 添加時の alamar blue 活性 IC₅₀ 値との相関

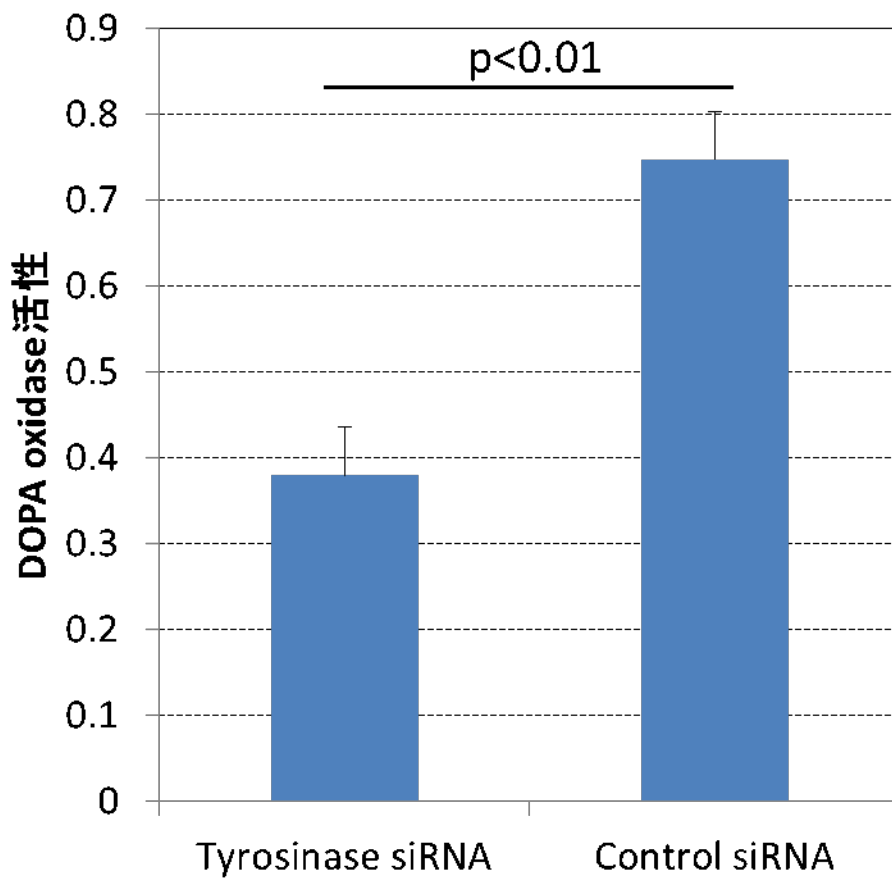


図 3 Tyrosinase 発現抑制時の DOPA oxidase 活性

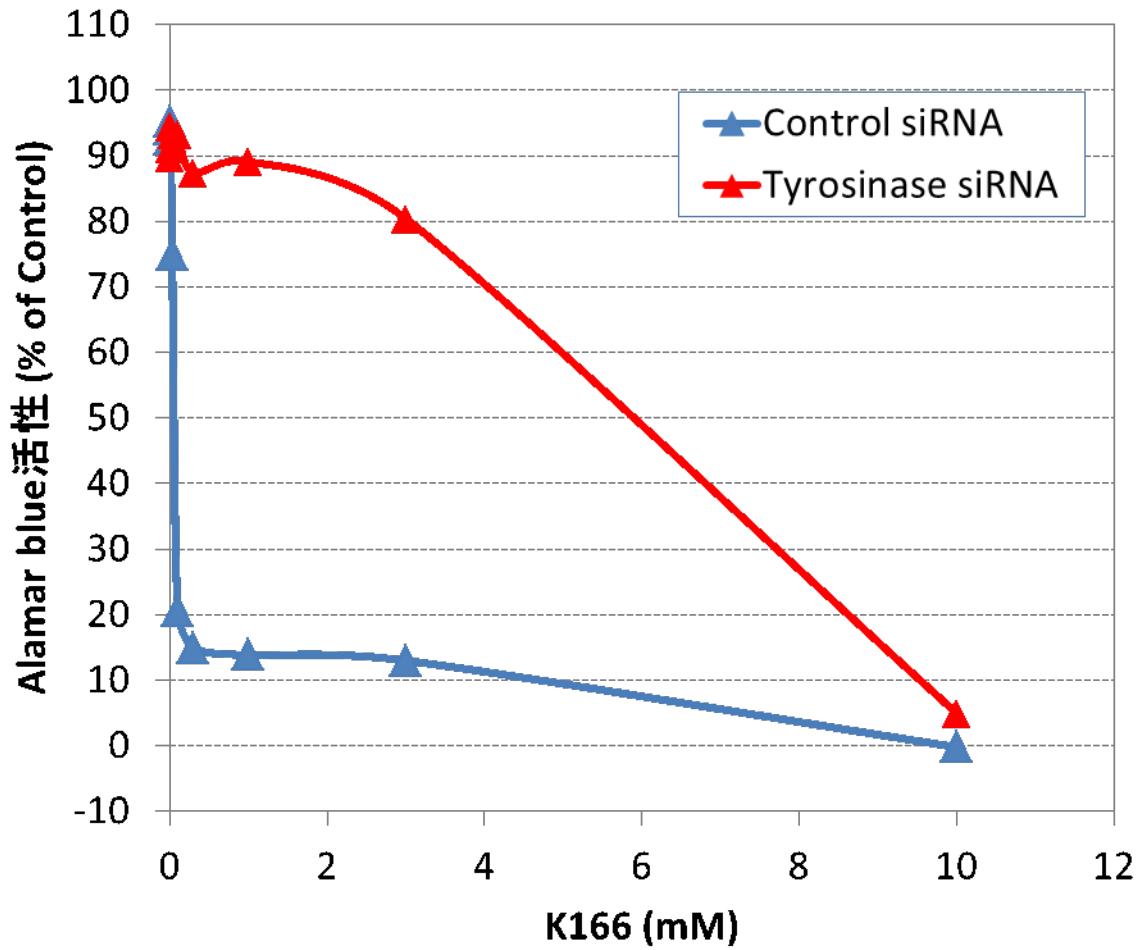


図4 Tyrosinase発現抑制時のK166添加による細胞毒性の変化

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166)は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞(メラノサイト)はクラボウより購入したのものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies)に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS)(クラボウ)を添加した培地中で 37℃、5% CO₂の環境下で定法に従って培養した。

[K166 及び K166-0H の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA)を除いた培地(PMA(-)培地)を用いて播種し、翌日に PMA(-)培地に希釈して K166 または K166-0H を添加した。4 日後、amar blue 活性を計測した。

[Amar blue 活性の計測]

化合物を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA(-)培地で希釈した 10% amar blue 溶液(Bio-Rad)を 100 μ L/well 添加し、CO₂インキュベーターにて 37℃でインキュベートした。90 分後、蛍光プレートリーダーにて、励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

結果及び考察

K166 とチロシナーゼによる K166 の代謝物であると想定される K166-0H についてメラノサイトにおける細胞毒性を比較した。チロシナーゼ活性が比較的 low、K166 に対する細胞毒性が低い 2 ライン(L LC1C1022、M 4C0760)のメラノサイトを用い、さまざまな濃度で K166 及び K166-0H を添加した後、4 日後に amar blue 活性を計測し、それぞれの IC₅₀ 値を算出した(表 1)。いずれの細胞においても、K166 と比較して K166-0H を添加した場合に顕著な IC₅₀ 値の低下が認められた。このことから、K166 がチロシナーゼによって代謝され K166-0H が産生されることで、顕著にメラノサイトに対する細胞毒性が上昇することが示唆された。

表1 K166及びOH-K166添加によるAlamar blue活性IC₅₀値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示す。また、<0.1は0.1未満であることを示す。

	Alamar blue活性 IC ₅₀ 値	
	K166 (mM)	OH-K166 (mM)
L LC1C1022	6.6	0.19
M 4C0760	7.3	<0.1

2-3-2 活性酸素の関与の検討

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[材料及び方法]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。ヒト由来メラノサイトで生じる活性酸素種 (ROS) の検出には、Total ROS/Superoxide Detection kit (ENZ-51010: Enzo) を使用した。メラノサイトは 3.6×10^4 個ずつ 1% HMGS および ROS/Superoxide Detection Mix B (ENZ-51010: Enzo) を混合した modified-MCDB153HAA 培地中に播種した。培養には 15mL チューブを使用した。各チューブに K166 (30, 100, 300, 1000 μM) を添加し、5% CO₂ 下、37 下で 3 時間培養した。無添加の陰性対照群、ピオシアニン (100, 500 μM) 添加の陽性対照群も準備した。

0.1% BSA-PBS で 2 回洗浄した細胞を、フローサイトメトリー (BD FACSCalibur(TM): Becton, Dickinson and Company, CA) を用いた蛍光の測定に供した (Ex=488nm, Em=520nm)。

[結果及び考察]

ヒト由来メラノサイトを K166 処理することで生じる ROS について、フローサイトメトリーによる検出を試みた。結果を図 1 に示す。ROS 誘導試薬であるピオシアニンを添加した条件 (陽性対照) では、メラノサイトからは濃度依存的な ROS の発生が検出された。薬剤を添加しない条件 (陰性対照) では、ROS は検出されなかった。これらの結果から本実験系が成立していると判断した。K166 を添加した条件では、メラノサイトからは ROS の発生は検出されなかった。

本実験の K166 の添加濃度域において、細胞障害性の誘導を確認していることから、K166 によって誘導される細胞障害性には、ROS の関与が小さいと考えられたが、検出感度以下の ROS 寄与の可能性は除外できない。

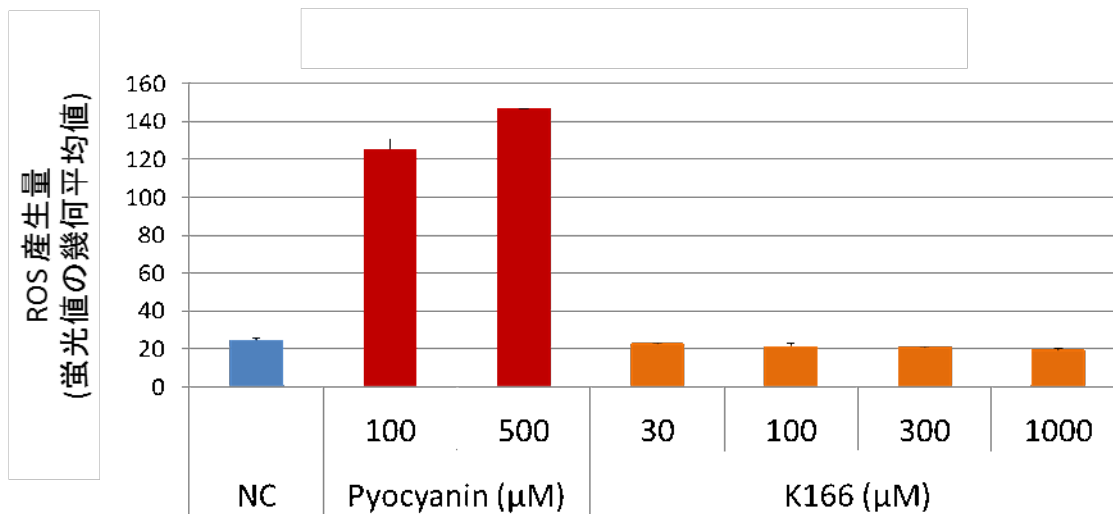


図1. K166 および K166-OH 添加培養メラノサイトにおける ROS の検出

メラノサイトは K166 または K166-OH 存在下で 3 時間培養した。細胞から発生する ROS の検出には Total ROS/Superoxide Detection kit を使用し、フローサイトメトリーで検出された細胞 10,000 個分の蛍光値の幾何平均値 (Geo-mean) を算出した。NC, 無添加陰性対照, PC, ピオシアニン添加陽性対照

2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (USA)から購入した。

[細胞培養]

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト (Kurabo, Japan) 播種し、翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166、および対照試薬を培地に添加した。K166 の添加の 3、および 6 時間後に回収した細胞溶解液を、それぞれタンパク質発現解析、および遺伝子発現解析に供した。

[タンパク質発現解析]

ウェスタンブロットにより、常法に従って行った。用いた抗体は、抗 p-eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) 抗体、抗 eIF2 抗体 (いずれも Cell Signaling Technology, USA) とし、いずれも 5000 倍に希釈して使用した。

[遺伝子発現解析]

Real-time PCR により、常法に従って行った。TaqMan[®] Gene Expression Assays (GAPDH, Hs99999905_m1; IL-8, Hs00174103_m1; Life Technologies, USA) をプローブとして用いた。

結果及び考察

色素脱失を誘導する MBEH、4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) が、酸化ストレスを介して、メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導し、その下流で Interleukin-6、および 8 の発現が促進される¹⁴⁾。今回、K166 が同様のメカニズムで色素脱失を生じる可能性があることを確認できた。

[eIF2 タンパク質のリン酸化の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 1 にウェスタンブロットにより検出した、リン酸化 eIF2 の発現を示す。eIF2 のリン酸化は、0.3 mM、および 1 mM の K166 処理により、濃度依存的に増加した。この結果から、K166 が培養メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導していることが示された。小胞体内カルシウムを流出させることにより小胞体ストレスを誘導する Thapsigargin (TG)、および Toosi らの報告¹³⁾において小胞体ストレスを誘導することが示された Monobenzylether of hydroquinone (MBEH) によっても eIF2 のリン酸化は誘導された。また、この eIF2 のリン酸化誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。MBEH、および 0.3 mM、1 mM の K166 による eIF2 のリン酸化は、PTU の前処理により抑制された。このことから、K166 による小胞体ストレスの誘導は、チロシナーゼ活性に依存していることが示された。チロシナーゼ非依存的に TG によって誘導された eIF2 のリン酸化は、PTU 処理により抑制されなかった。

小胞体ストレス応答において、eIF2 のリン酸化は、翻訳の停止により、小胞体のフォールディング機能負荷を軽減する他、転写因子 ATF4 の発現を介して、細胞の生死を左右する遺伝子発現を誘導することが知られている¹⁴⁾。従って、K166 によって誘導される小胞体ストレス応答と、メラノサイト細胞障害性との間に密接な関連があることが推察される。

[IL-8 mRNA 発現の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 2 にリアルタイム PCR による IL-8 遺伝子発現解析の結果を示す。K166 は、3 mM 添加時に無添加対照と比較して 35 倍となるのを最大として、処理濃度依存的に IL-8 mRNA 発現を亢進した。10 mM の K166 による発現の亢進が、3 mM と比べて小さかったのは、強い細胞毒性のためであると考えられる。Toosi らの報告において、IL-8 の遺伝子発現は、小胞体ストレス応答の主なエフェクターの一つである転写因子 XBP1 により制御され、MBEH により誘導されることが示されている¹³⁾。この結果は、上記の eIF2 のリン酸化に関する結果と合わせ、K166 が小胞体ストレスを誘導していることを強く示している。上記の発現誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。0.1 mM から 1 mM の K166 による発現誘導は、0.1 mM の PTU 前処理により抑制された。このことから、K166 により誘導される小胞体ストレス下流の応答もチロシナーゼ活性に依存していることが示された。3 mM 以上の K166 による発現は、PTU により抑制されなかったことから、チロシナーゼ活性に依存せずに誘導されたものであると考えられる。

以上は、in vivo において、K166 が局所的な免疫環境を変化させ、病態発現に関与する可能性を示す結果であると考えられる。

上記の結果から、K166 は、チロシナーゼに代謝されることにより小胞体ストレスを誘導し、メラノサイト特異的な細胞障害性に関与していることが示された。

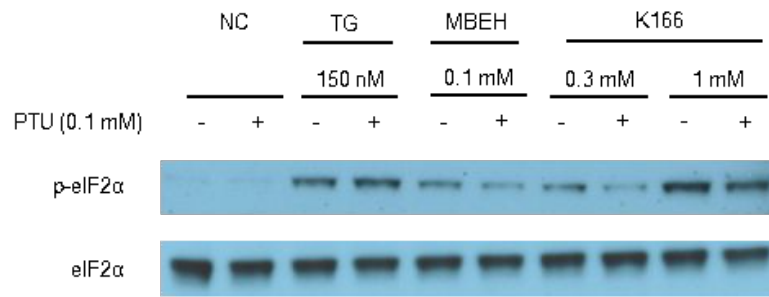


図1. K166によるeIF2 α タンパク質のリン酸化誘導

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

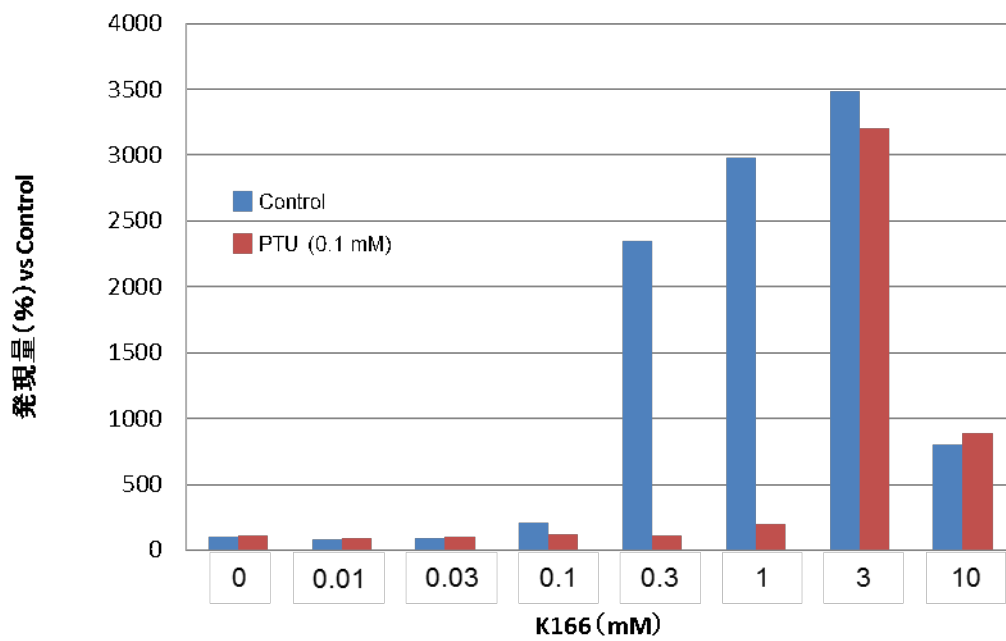


図2. K166によるIL-8遺伝子発現誘導

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 μ 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 巻__
- 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 MEDICINE 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 巻 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.