

ロドデノール誘発性脱色素斑症例における一次全国疫学調査結果

日本皮膚科学会 ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会

青山裕美¹ 伊藤明子² 鈴木加余子³ 鈴木民夫⁴ 種村 篤⁵ 錦織千佳子⁶
伊藤雅章⁷ 片山一朗⁸ 杉浦伸一⁹ 松永佳世子¹⁰

要旨

本邦で、4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（ロドデノール）を2%含有する化粧品使用者において、他のメラニン生成抑制物質含有化粧品に比べて高頻度に脱色素斑が発生することが判明し、2013年7月に製造販売業者によって自主回収が発表された。本事例の脱色素斑症例は、2014年6月時点で18,909名と発表されている。日本皮膚科学会は、ロドデノール（RD）誘発性脱色素斑の臨床所見と疫学的な特徴を明らかにするために、RD含有医薬部外品の使用後に生じた脱色素斑を主訴に受診した患者を対象に、2013年7月から9月にかけて全国一次調査を行い、1,338人の調査票を解析した。脱色素斑は96%で製品使用部位に概ね一致していたが、4%では製品使用部位以外にも白斑を認めた。色素脱失部位は顔面（92.9%）、頸部（58.8%）が好発部位であった。色素脱失については、完全か不完全かで3型に分類した。その結果、不完全脱色素斑42%、完全脱色素斑17%、混在28%であった。また、43.8%が炎症を伴うものであった。85%の症例では臨床的に特発性尋常性白斑と区別できないと回答された。本調査によってRD誘発性脱色素斑症例の臨床・疫学的な実態を明らかにした。今後、二次調査で疾患の経過、予後について検討する。

I. はじめに

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（一般名；rhododendrol, 商品名；ロドデノール/Rhododenol（以下RD）,（株）カネボウ化粧品）は本邦で開発され、2008年に化粧品への配合が許可されたメラニン生成抑制剤である。2% RD含有医薬部外品の使用者に脱色素斑等の皮膚障害が多発し、2013年7月より（株）カネボウ化粧品、（株）リサーチ、（株）エキップによる

自主回収が行われている。RD含有医薬部外品の使用者は推定80万人、2014年6月6日時点で発症人数は18,909人（完治、ほぼ回復4,297人を含む）と製造販売業者から発表されている¹⁾ことから、本事例は、当該化粧品使用者の約2%に発生していると推測される。日本皮膚科学会では、RD含有医薬部外品の使用者に生じた脱色素斑の実態を把握し、発症頻度、臨床症状や重症度、予後、病態、診断、治療方法等を早急に明らかにするために「RD含有化粧品の安全性に関する特別委員会」を2013年7月17日に発足した。この特別委員会では、皮膚科医の診察室における患者対応の一助となるように医療者向けの診療の手引きを2013年7月19日に、患者さん向けFAQを2013年8月1日に日本皮膚科学会のホームページに掲載し、順次改訂を加えて最新の情報を公開している²⁾。前者については、学会誌にも掲載している³⁾。また、患者の実態を把握するために2013年7月17日に日本皮膚科学会ホームページに一次調査票を掲載し、調査を行った。本稿では、一次調査票の集計から明らかになったRDによる皮膚障害の臨床、疫学的な特徴に関する点を報告する。

- 1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野准教授、執筆担当者
- 2) 新潟大学医歯学総合病院皮膚科講師
- 3) 刈谷豊田総合病院皮膚科部長
- 4) 山形大学医学部皮膚科学講座教授
- 5) 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学講座講師
- 6) 神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野教授
- 7) 新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻細胞機能講座皮膚科学分野教授、アドバイザー
- 8) 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学講座教授、アドバイザー
- 9) 名古屋大学大学院医学系研究科医療システム管理学寄附講座教授、研究協力者
- 10) 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学教授、委員長

II. 方法

RD誘発性脱色素斑症例を診察した医師は、日本皮膚科学会ホームページ（URL：http://www.dermatol.or.jp）に掲載された一次調査票（医師用と患者用）（表1-1, 1-2）をダウンロードして印刷の上必要事項を記入して、日本皮膚科学会事務局に郵送、ファックスまたは電子メールで送付した。送付された調査票を藤田保健衛生大学皮膚科学で入力し、集計した。

III. 調査期間

2013年7月17日～2013年9月7日に送付された一次調査票を集計の対象とした。

IV. 結果

1. 一次調査票（医師記入用）のまとめ

集計総数：調査期間に送付された一次調査票は1,338例であった。

1) 患者背景（年齢性別分布、職業、既往歴）

年齢性別分布は男性8例、女性1,292例、性別の記載がなく性別不明は38例であった（図1）。年齢は、60歳代をピークに30歳代から70歳代に発症していた。調査票記入時の職業は主婦が最も多く585例（43.7%）、会社員274例（20.5%）、その他の職業373例（27.9%）であった。

フェノール化合物曝露歴があったと回答した例は23例（2%）と少なく、1,051例（89%）ではフェノール化合物への明らかな曝露はなかった（図2）。

既往歴（表2）で頻度が高かったのは、花粉症（36.7%）、蕁麻疹（23.0%）の順であった。

2) 発症年月の推移

発症年月は、患者の申告により記載された年月を解析した。その結果、2008年から発症例をみとめ、徐々に症例数は増加し、2011年に140例、2012年には464例と急増し、自主回収が発表された2013年に発症したという症例が最も多い結果であった。2013年6月までに発症した症例をみると、自主回収発表前に脱色素斑に気付いていた症例は1,064例と発症年月がわかってきた症例の84.4%であり（図3a）、自主回収発表後に脱色素斑に気づいた症例は2013年に発症した症例のうちの29.0%（178/614）であった。また、2011年と2012年に発症した945例の発症月別の症例数では、共に7月と8月の夏季に発症数が多い結果であった（図

3b）。

露光部位に好発し、夏季の発症が多いことより、光線過敏の有無を調査した。設問「光線過敏症（臨床的、患者の自覚的）なし あり 不明から選択記載結果を集計した。光線過敏症が自覚的他覚的に認められた症例は120例（9%）であった（図4）。

3) 色素脱失の型

色素脱失の型（臨床型）については、完全脱色素斑、不完全脱色素斑、両方の混在の3項目から、診察した医師の視診所見により選択記載した結果を集計した。その結果、不完全色素脱失が567例（42%）、完全色素脱失223例（17%）、両者が混在した症例が374例（28%）であった（図5）。

4) 製品使用部位

製品を使用していた部位は、顔面、頸部、手背、前腕、上腕、その他（ ）より複数選択可能として選択した結果を、回答にあった組み合わせごとに集計した。その結果、製品を塗布していた部位は、ほとんどの症例が製品を顔面に使用していた。顔面と頸部に使用していた症例が298例（23%）と顔面のみ275例（21%）よりも多い結果であった。顔面及び頸部に塗布したあと両手にも使用していた症例は214例（17%）であった（図6）。

5) 製品使用部位と発症部位

製品を塗布した部位と色素脱失の部位の一致について、概ね一致、一致していない、から選択記載した結果を集計した。その結果、製品使用部位と脱色素斑の発症部位は1,202例（96%）で概ね一致していたが、4%では製品使用部位以外にも脱色素斑を認めた（図7）。

6) 色素脱失部位とその面積

色素脱失部位とその面積は、顔面、頸部、手背、前腕、上腕の各部位につき、それぞれ領域の0～25%程度、25～50%程度、ほぼ全面の3項目から選択記載した結果を集計した。記載のあった1,248例において、色素脱失部位は顔面1,159例（92.9%）、頸部734例（58.8%）であった。どの部位も25%未満の症例が多い結果であったが、顔、頸部、手背といった使用頻度の高い部位に注目すると、顔面では163例（14%）、頸部では129例（18%）、手背部では55例（13%）にほぼ全面脱色素斑を生じていた（図8）。

7) 色素脱失を生じる前の炎症の有無

色素脱失を生じる前に製品を使用していた部位に紅斑、痒痒、鱗屑などの炎症症状があったか否かについ

表 1-1 一次調査票 (医師記入用)

一次調査票 (医師記入)

施設名: _____

施設住所: 〒 _____ Tel: _____

記入日: 20 ____ 年 ____ 月 ____ 日 記入者: _____

e-mail: _____

患者背景:

患者 ID: _____ 年齢: 満 ____ 歳 性別 ____ 女性 ____ 男性

職歴: 現在の職業: 主婦 会社員 その他 (_____)

これまでにフェノール・フェノール化合物 (注1) への暴露: なし ____ あり ____ 不明 ____

家族歴: 尋常性白斑 なし ____ あり ____、その他の家族歴: なし ____ あり ____ (_____)

既往歴: 尋常性白斑 なし ____ あり ____

花粉症: なし ____ あり ____ (____ 月頃)

蕁麻疹: なし ____ あり ____ (原因物質 _____) アトピー性皮膚炎: なし ____ あり ____

接触皮膚炎: なし ____ あり ____ (原因物質 _____) 喘息: なし ____ あり ____

脱毛症: なし ____ あり ____ 糖尿病: なし ____ あり ____ (I型・II型)

尋常性乾癬: なし ____ あり ____ アジソン病: なし ____ あり ____

癜風: なし ____ あり ____ 膠原病: なし ____ あり ____ (_____)

甲状腺疾患: なし ____ あり ____ (ありの場合病名 _____)

白斑黒皮症を誘発する薬剤 (注2) の服用歴: なし ____ あり ____

これまでの化粧品使用歴

1) ハイドロキノン製品: なし ____ あり ____ (ハイドロキノン濃度: ____ %、期間: ____ 年 ~ ____ 年)

→ ありの場合、皮膚トラブル: なし ____ あり ____

2) ロドデノール以外の美白化粧品: なし ____ あり ____ (商品名: _____ 期間: ____ 年 ~ ____ 年)

→ ありの場合、皮膚トラブル: なし ____ あり ____

3) 染毛剤の使用歴: なし ____ あり ____ (期間: ____ 年前から、頻度: ____ に1回)

→ ありの場合、皮膚トラブル: なし ____ あり ____

4) 育毛剤の使用歴: なし ____ あり ____ (商品名: _____ 期間: ____ 年 ~ ____ 年)

→ ありの場合、皮膚トラブル: なし ____ あり ____

写真

1) 色素脱失部位の臨床写真: なし ____ あり ____

2) 色素脱失部位のダーモスコピー写真: なし ____ あり ____

3) 紅斑など炎症部位の臨床写真: なし ____ あり ____

4) 色素沈着部位の臨床写真: なし ____ あり ____

5) 特別委員会への写真の提供の可否: できる ____ できない ____

* 写真を提供される場合には、患者の同意をお願いします。

では、なし、ありから選択記載した結果を集計した。その結果、色素脱失を生じる前に炎症症状ありと答えた症例が586例(43.8%)、炎症症状の自覚がなかった症例が696例(52%)であった。炎症症状があった症例に

おいては、その炎症部位は製品使用部位と概ね一致していると答えた症例が547例(93%)であった(図9)。

8) 尋常性白斑との鑑別

尋常性白斑との鑑別については、鑑別できる、鑑別

表 1-1 一次調査票 (医師記入用)

□臨床症状

- 1) 発症年月: 20 年 月 (満 歳) (患者申告)
- 2) 色素脱失の型 (臨床的): 完全脱色素斑・不完全脱色素斑・両方の混在
- 3) 色素脱失の部位: 顔面 頸部 手背 前腕 上腕 その他 ()
- 4) 色素脱失の面積: 顔面 領域の 0-25%程度、25-50%程度、ほぼ全面
 頸部 領域の 0-25%程度、25-50%程度、ほぼ全面
 手背 領域の 0-25%程度、25-50%程度、ほぼ全面
 前腕 領域の 0-25%程度、25-50%程度、ほぼ全面
 上腕 領域の 0-25%程度、25-50%程度、ほぼ全面
- 5) 製品を使用していた部位: 顔面 頸部 手背 前腕 上腕 その他 ()
- 6) 製品を使用していた部位に紅斑、掻痒、鱗屑などの炎症症状: なし あり
- 7) 製品を塗布した部位と炎症部位の一致: 概ね一致 一致していない
 一致していないとき: 無塗布部位に炎症症状あり 塗布部辺縁より広範囲な炎症症状
- 8) 製品を塗布した部位と色素脱失の部位の一致: 概ね一致 一致していない
 一致していないとき: 無塗布部位に色素脱失あり 塗布部辺縁より広範囲な色素脱失
- 9) 製品を使用していない部位の色素脱失: なし あり (部位)
- 10) 光線過敏症 (臨床的、患者の自覚的): なし あり 不明
- 11) 尋常性白斑であると診断できる: できる できない 判定不能
- 12) 色素沈着の有無: なし あり
- 13) 色素脱失と色素沈着が混在している (白斑黒皮症の所見): なし あり

□検査

- 1) 血液検査: なし あり (可能なら、抗糖抗体 抗サイログロブリン抗体 抗ペルオキシダーゼ抗体、TSH、FT3、FT4を測定)
- 2) 皮膚生検の有無: なし あり 予定あり (予定時期 月 日)
- 3) パッチテストの有無: なし あり 予定あり (予定時期 月 日)
- 4) MED 測定: なし あり→UVA の MED J/cm² 短縮あり 短縮なし
 UVB の MED mJ/cm² 短縮あり 短縮なし

□治療: なし (=経過観察のみ) あり (薬剤名:)

□経過

- 1) ロドデノール含有製品を使用中止してからの期間: 年 ヶ月
- 2) 貴施設での観察期間: 年 ヶ月
- 3) 色素脱失の状態: 治癒 軽快 不変 増悪

できない 鑑別の可否が判定不能から選択記載した結果を集計した。その結果、尋常性白斑と鑑別できると回答した症例は 181 例 (15%)、鑑別できないと答えた症例は 494 例 (42%)、判定不能と答えた症例は 507 例 (43%) であり、本症と尋常性白斑を臨床的に区別でき

ないと答えた医師は合計 85%であった (図 10)。

9) 色素沈着の有無

色素沈着の有無について、なし ありより選択記載した結果を集計した。その結果、色素沈着ありが 463 例 (38%)、なしが 768 例 (62%) であった (図 11)。

表 1-1 一次調査票 (医師記入用)

注 1 これらの化学物資は接着剤、インキ、ワニス、各種合成樹脂改質剤、香料原料、殺虫剤、殺菌剤、ゴム酸化防止剤、塩化ビニル安定剤原料、界面活性剤などの酸化防止剤、オイル添加剤などに含まれる。

注 2 白斑黒皮症を誘発する薬剤

サイアザイド系利尿薬	ヒドロクロロチアジド、クロロチアジド
他の利尿薬	メチクラム
抗菌薬	テトラサイクリン、フレロキサシン、グリセオフルビン
筋緊張治療薬	アフロクアロン
非ステロイド抗炎症薬	チアプロフェン酸
β 遮断薬	ピンドロール

<送付先>

患者用の一次調査票と共に下記宛、送付ください。

社団法人 日本皮膚科学会 学会事業チーム 田中宛

E-Mail : gakkai@dermatol.or.jp

FAX : 03-3812-6790

〒113-0033 東京都文京区本郷 4-1-4

10) 白斑黒皮症の所見

色素脱失と色素沈着が混在している（白斑黒皮症の所見）か否かについて、混在なし 混在ありより選択記載した結果を集計した。その結果、色素脱失と色素沈着が混在し白斑黒皮症の所見があると答えた症例が

356 例（30%）であった（図 12）。

2. 一次調査票（患者記入用）のまとめ

1) 使用開始から脱色素斑発症までの期間

一次調査票（医師記入）に発症年月が記載しており、

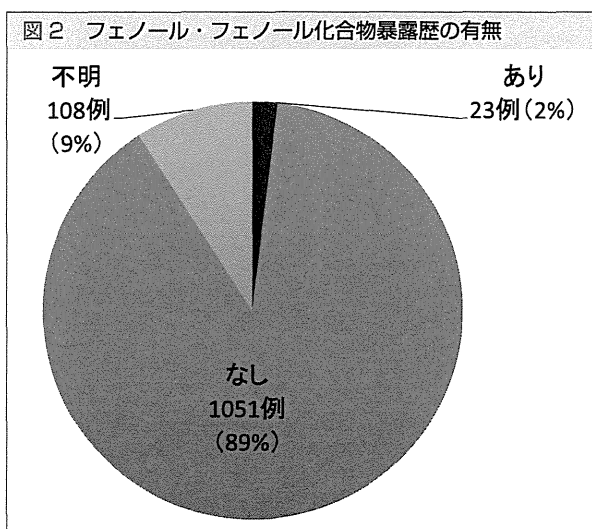
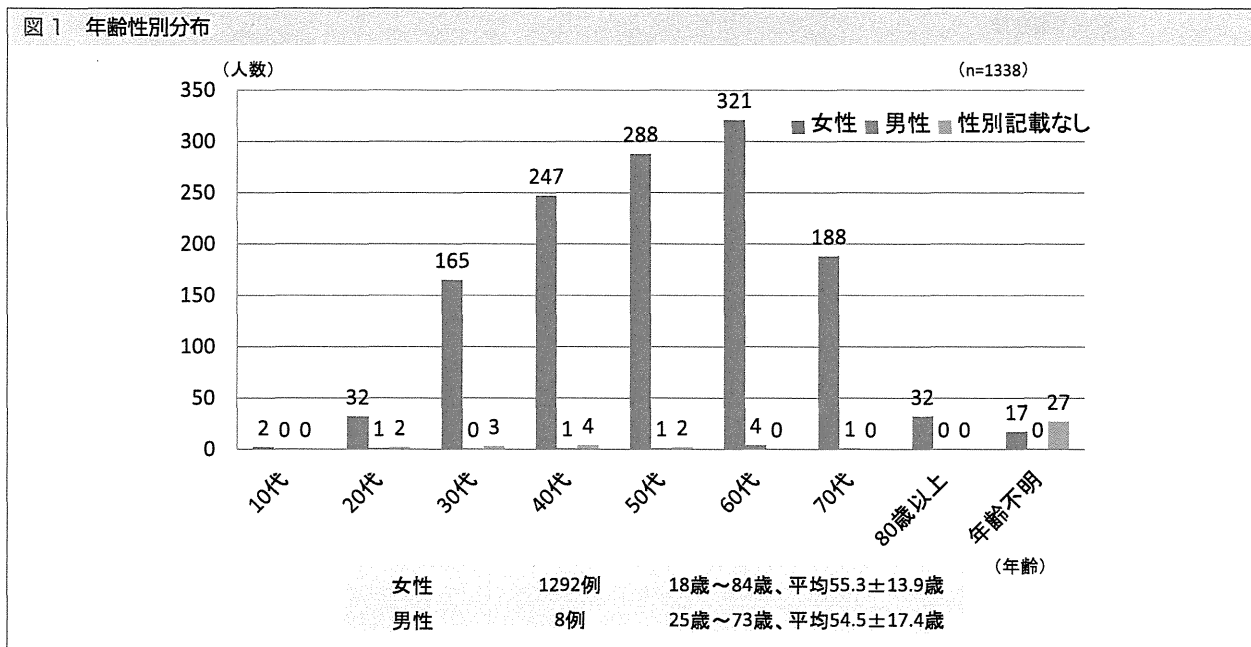
表 1-2 一次調査票（患者記入用）

一次調査票（患者記入）		* 使用した製品にのみ記入してください				
販売名	商品名	使用開始	使用終了	使用回数	使用回数	使用部位
カネボウ	suisai ホワイトニングエッセンス	suisai ホワイトニングエッセンス	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウ ホワイトニング エッセンスS	アクアリーフ MCT ホワイトニングエッセンス	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス IC ホワイトエマルジョンI	インプレス IC ホワイトエマルジョンI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス IC ホワイトエマルジョンII	インプレス IC ホワイトエマルジョンII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス ローションb	インプレス グランミュラローション	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス IC WTマスク	インプレス IC ホワイトフィットマスク3D	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス IC WTローションc	インプレス IC ホワイトローションI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	インプレス IC WTローションe	インプレス IC ホワイトローションII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウ CNローションI	トワニー センチュリー ザ・ローションI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウ CNローションII	トワニー センチュリー ザ・ローションII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト ローションI	トワニー エスティチュードホワイト ローションI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト ローションII	トワニー エスティチュードホワイト ローションII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト ローションIII	トワニー エスティチュードホワイト ローションIII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト UVプロテクトセラム	トワニー エスティチュードホワイト UVプロテクトセラム	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト マスク	トワニー エスティチュードホワイト クリアタイムマスク	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	トワニー エスティチュードホワイト ヴェイムミスト	トワニー エスティチュードホワイト ロセラム限定セット 12S	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウB ホワイトニングローションm	ブランシール スベリア ホワイトディープクリアコンディショナーII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウB ホワイトニングローションr	ブランシール スベリア ホワイトディープクリアコンディショナーIII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	カネボウB ホワイトニングローション	ブランシール スベリア ホワイトディープクリアコンディショナーI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	リサージ	カネボウB ホワイトニングミルクm	ブランシール スベリア ホワイトディープミルクコンディショナーII	年 月	年 月	1日 回
カネボウB ホワイトニングミルク		ブランシール スベリア ホワイトディープミルクコンディショナーI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングクリームG		ブランシール スベリア ホワイトディープナイトコンディショナーI(ジェル)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングクリームC		ブランシール スベリア ホワイトディープナイトコンディショナーII(クリーム)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングクリーム		ブランシール スベリア ホワイトディープナイトコンディショナーI	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングクリームm		ブランシール スベリア ホワイトディープナイトコンディショナーII	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングUVエッセンス		ブランシール スベリア ホワイトディープUVタイププロテクター	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
カネボウB ホワイトニングマスク		ブランシール スベリア ホワイトディープマスク	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (N)		リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (N)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (OD)		リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (OD)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (D)	リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (D)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕	
リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (O)α	リサージ ホワイト スキンメインテナイザー (O)	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕	
リサージ ホワイト ホワイトニングリペアクリーム	リサージ ホワイト ホワイトニングリペアクリーム	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕	
リサージ ポーテ サークュリッドα	リサージ ポーテ サークュリッドα	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕	
エキップ	RMK スキンチューナー プライティングライト	RMK スキンチューナー プライティングライト	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	RMK スキンチューナー プライティングモイスト	RMK スキンチューナー プライティングモイスト	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	RMK インテンシブ プライティング エッセンス	RMK インテンシブ プライティング エッセンス	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	SUQQU ホワイトニング ローション	SUQQU ホワイトニング ローション	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
	SUQQU ホワイトニング バリア エマルジョン	SUQQU ホワイトニング バリア エマルジョン	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕
SUQQU ホワイトニングリペア エッセンス	SUQQU ホワイトニングリペア エッセンス	年 月	年 月	1日 回	顔・首・手・上腕	

かつ一次調査票（患者記入）に使用した当該製品の名称とその使用開始年月が明確に記載されていたものを対象とし、361例を集計した。

その結果、1カ月ごとの症例数は2カ月使用25例、

3カ月使用24例、5カ月使用25例が多い結果であり、使用から発症までの期間の50%タイル値は10カ月であった（図13）。



2) 使用した製品の種類別症例数

一次調査票（患者記入）に使用した当該製品の名称が明確に記載されていたものを対象とし、798例を集計した。その結果、化粧水を使用していた症例は705例（88%）と最も多く、乳液444例、クリーム242例、サンスクリーン乳液142例、美容液マスク105例、美容液63例（重複あり）の順であった（図14）。ただし、それぞれの製品の販売個数を把握することはできないため、それぞれの製品における発症率をこの結果から判断することは困難であった。

3) 使用した製品個数別症例数

一次調査票（患者記入）に使用した当該製品の名称が明確に記載されていたものを対象とし、798例を集計した。使用していた当該化粧品の数を集計したところ、1種類のみ使用が271例（34%）、2種類使用が264例（33%）と2/3の症例は1種類または2種類の製品を使用した症例であった（図15）。ただし、それぞれの製品の販売個数を把握することはできないため、種類数と発症率との関連をこの結果から判断することは困難であった。

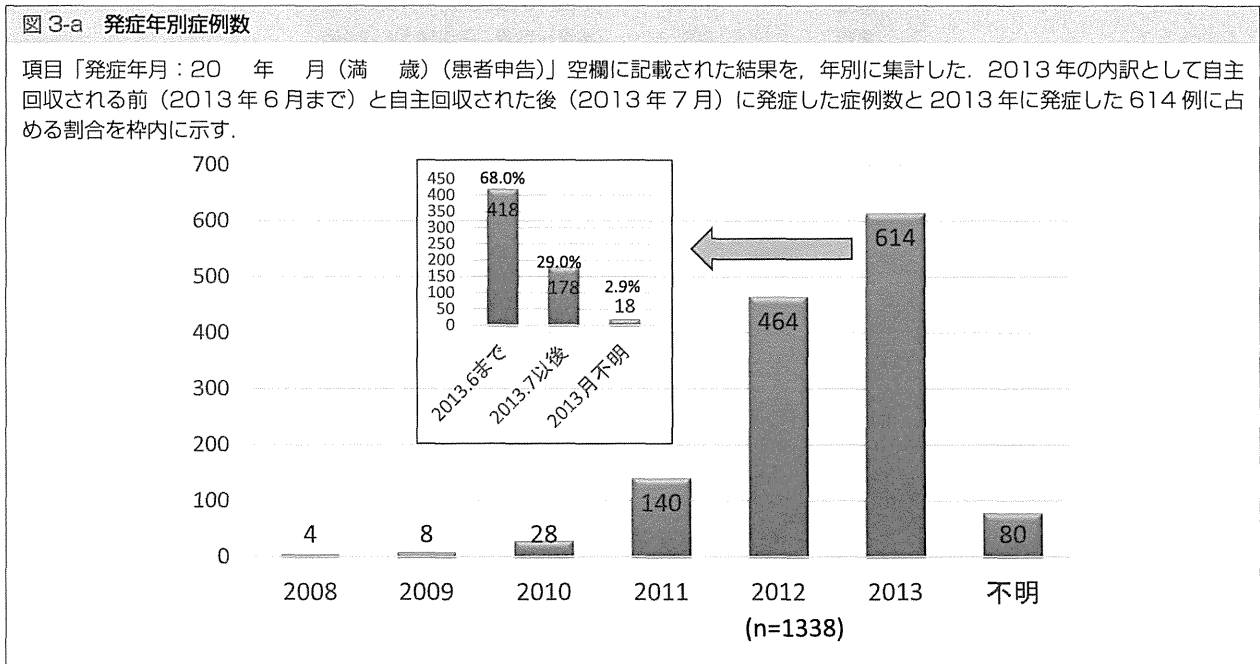
V. 考察

近年日本を中心としたアジア各国の化粧品市場では、加齢により生じる老人性色素斑や肝斑などの色素性皮膚病変に対してハイドロキノン⁴⁾、アルブチン、コウジ酸、マグノリグナンなどのメラニン産生抑制作用のある化学物質を含む化粧品が幅広い年齢層の女性をターゲットに販売され、使用者が年々増加している。RDは、そのような状況の中で日本で開発製造されたメラニン生成抑制作用を有する化学物質であり、2008年9月にRDを2%含有した医薬部外品美容液が販売開始された。

販売開始後から当該製品を塗布した部位に脱色素斑が生じて医療機関を受診した患者はいたが、その多くは非典型的な臨床像をとる尋常性白斑症例として診断治療されていた。製造販売業者は販売開始2年後より

表2 既往歴

	あり	なし	総数	有病率 (あり/総数)	不明	合計
尋常性白斑	35	1,196	1,231	2.8	107	1,338
花粉症	456	788	1,244	36.7	94	1,338
蕁麻疹	298	999	1,297	23.0	41	1,338
アトピー性皮膚炎	84	1,184	1,268	6.6	70	1,338
接触皮膚炎	216	1,078	1,294	16.7	44	1,338
喘息	79	1,208	1,287	6.1	51	1,338
脱毛症	103	1,206	1,309	7.9	29	1,338
糖尿病	33	1,256	1,289	2.6	49	1,338
尋常性乾癬	4	1,300	1,304	0.3	34	1,338
アジソン病	1	1,283	1,284	0.1	54	1,338
癲癇	4	1,295	1,299	0.3	39	1,338
膠原病	20	1,269	1,289	1.6	49	1,338
甲状腺疾患	115	1,180	1,295	8.9	43	1,338
白斑を誘発する薬剤の服用	10	1,166	1,176	0.9	162	1,338



RD2%含有製品の種類を増やし、RD2%含有製品の使用者及び消費量が増えるに従い、このような非典型的尋常性白斑で医療機関を受診する患者が増加した。

2013年5月に当該化粧品使用部位に一致して白斑を生じている患者が多いことに気づいた皮膚科医が製造販売業者に対して、当該化粧品によって脱色素斑が生じている可能性を報告したことで、初めてRD誘発性脱色素斑が認識された。2013年7月4日の(株)カネボウ化粧品の自主回収をきっかけにRD含有化粧品使用者のうち脱色素斑を自覚する症例が自主的に製造販売業者に申し出をし、また製造販売業者からの自主回収と症状の有無の問い合わせにより皮膚科を受診する

こととなった。

前述したように、一次調査票での「尋常性白斑との鑑別」において、臨床的に鑑別できないとの回答が合計85%であった(図10)ことから判るようにRD誘発性脱色素斑の臨床像は、特発性尋常性白斑と区別する事は容易ではない。また、これまでに化粧品や医薬部外品含有される化学物質ではハイドロキノン以外のメラニン生成抑制物質によって脱色素斑が生じたという報告はなく、我々医師が美白化粧品によって脱色素斑が生じていると考え、原因が判明するまでに長期間を要し、その結果19,073人(製造販売業者の調査による(2014年7月31日時点))の患者が発生した。

図3-b 発症月別症例数

2011年から2013年の月別発症例数は、7月、8月で増加していた。

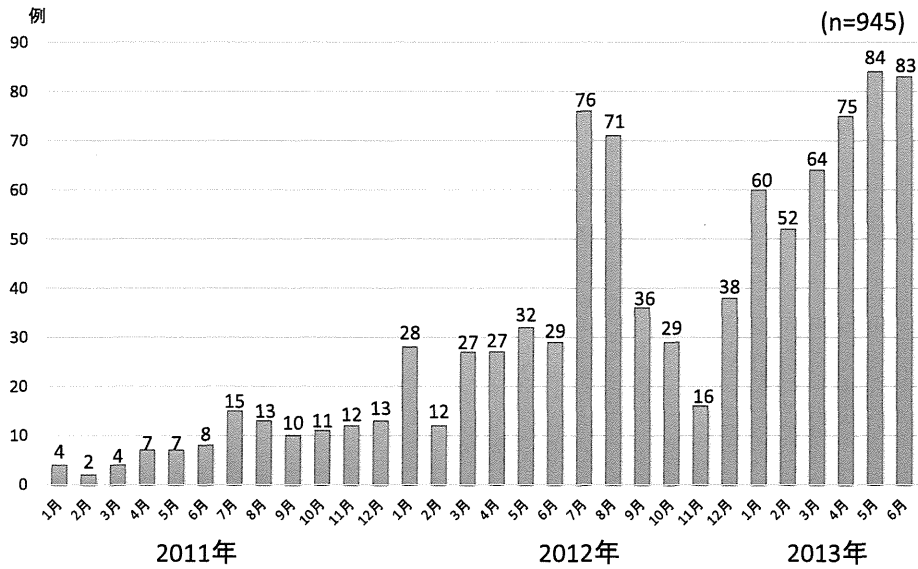


図4 光線過敏症（臨床的，患者の自覚的）の有無

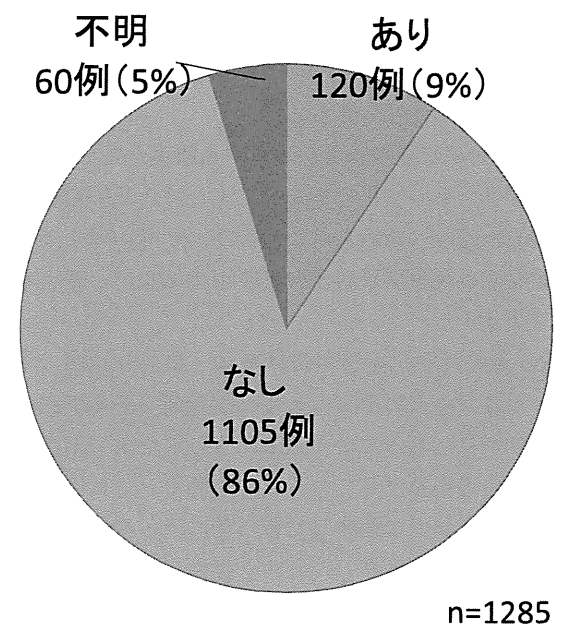
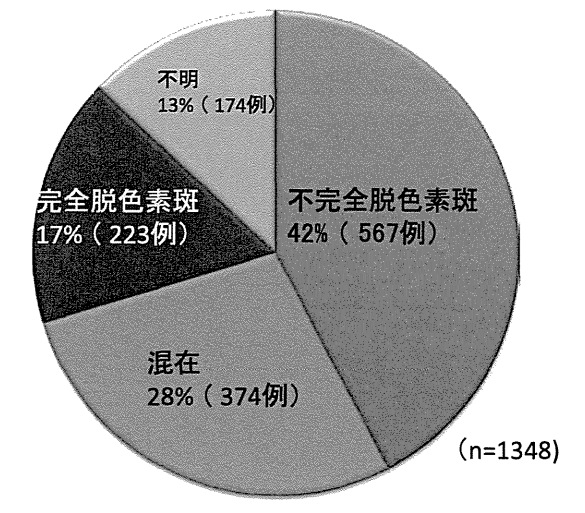


図5 色素脱失の型

診察医師の視診所見により色素脱失を分類したところ、不完全色素脱失が567例（42%）、完全色素脱失223例（17%）、両者が混在した症例が374例（28%）であった。



RD誘発性脱色素斑とは、4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（一般名：rhododendrol，商品名：ロドデノール/Rhododenol）というメラニン生成抑制作用を有する化学物質を含んだ化粧品を繰り返し、塗布したことにより生じる脱色素斑である。このように、化学物質によって生じる脱色素斑をchemical leukodermaといい、工場などで職業として化学物質を取り扱う人に多く発生することから職業性白斑とも呼ばれ

る。これまでに報告された色素脱失を来す化学物質は、フェノール、カテコール化合物⁵⁾が多い。

当該化粧品の使用者は約80万人と推定され、その発症率は約2%である。RD誘発性脱色素斑症例は、99%以上が女性であり、化学薬品の暴露歴や暴露環境にない主婦、会社員を中心に、年齢は、60歳代をピークに30歳代から70歳代に発症している。この理由として、メラニン産生抑制作用のある化粧品の購買層を反映し

図6 製品使用部位

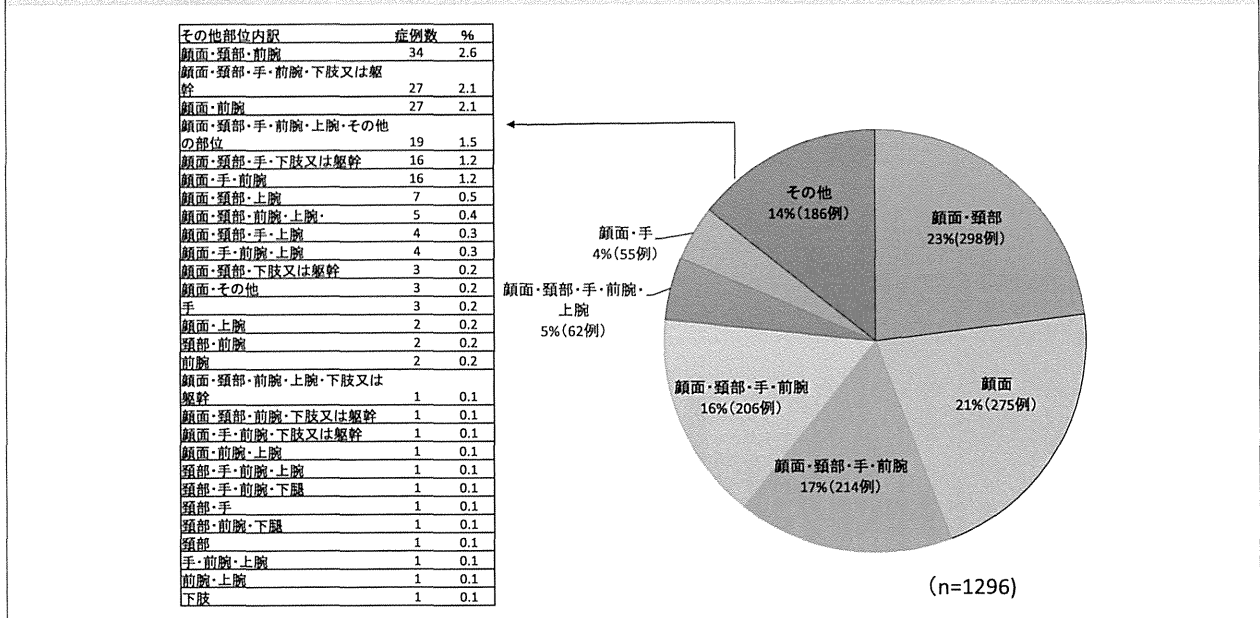
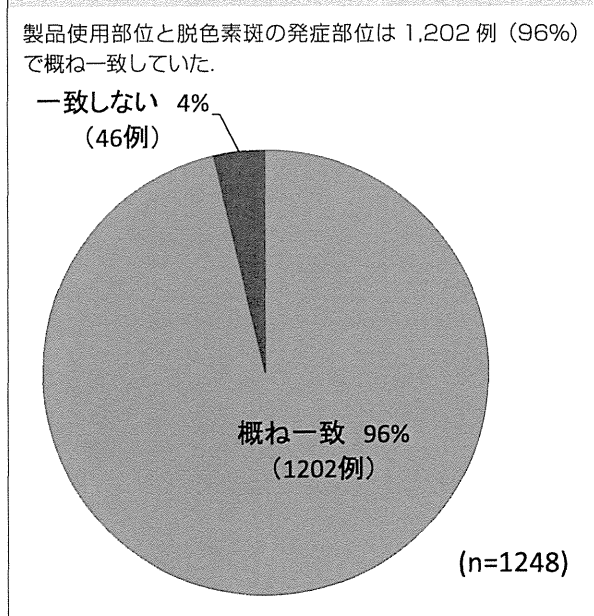


図7 製品使用部位と色素脱失部位の一致率



ている可能性, RD に対するメラノサイトの細胞障害の感受性が増加により高くなる可能性, またはメラノサイトの再生や機能回復力が加齢により低下する可能性などが挙げられる。7月から8月に本症発症に気づく件数が多かったのは, 春先から化粧品の使用量が増えることや, 周囲の健全皮膚が日焼けをすることにより脱色素斑の症状が明瞭になって気づいた可能性が挙げられる。また, RD のメラノサイト障害機序のひとつに, チロシナーゼの基質となり, RD の誘導体がメ

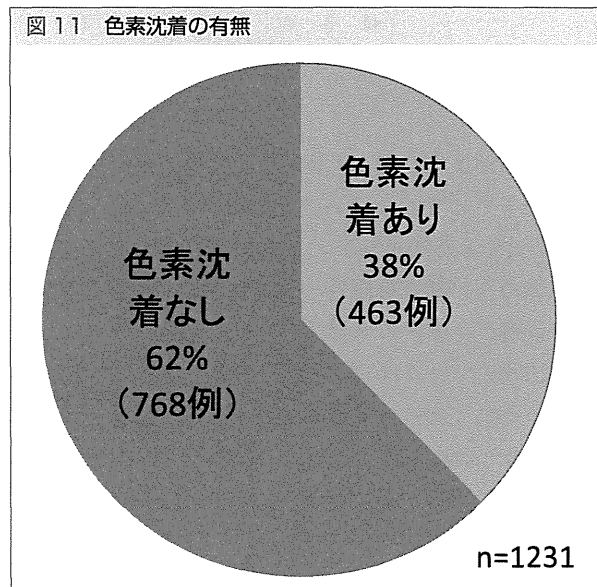
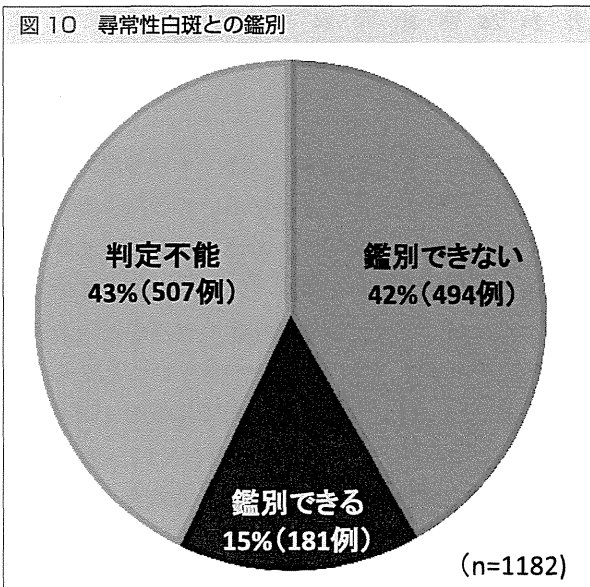
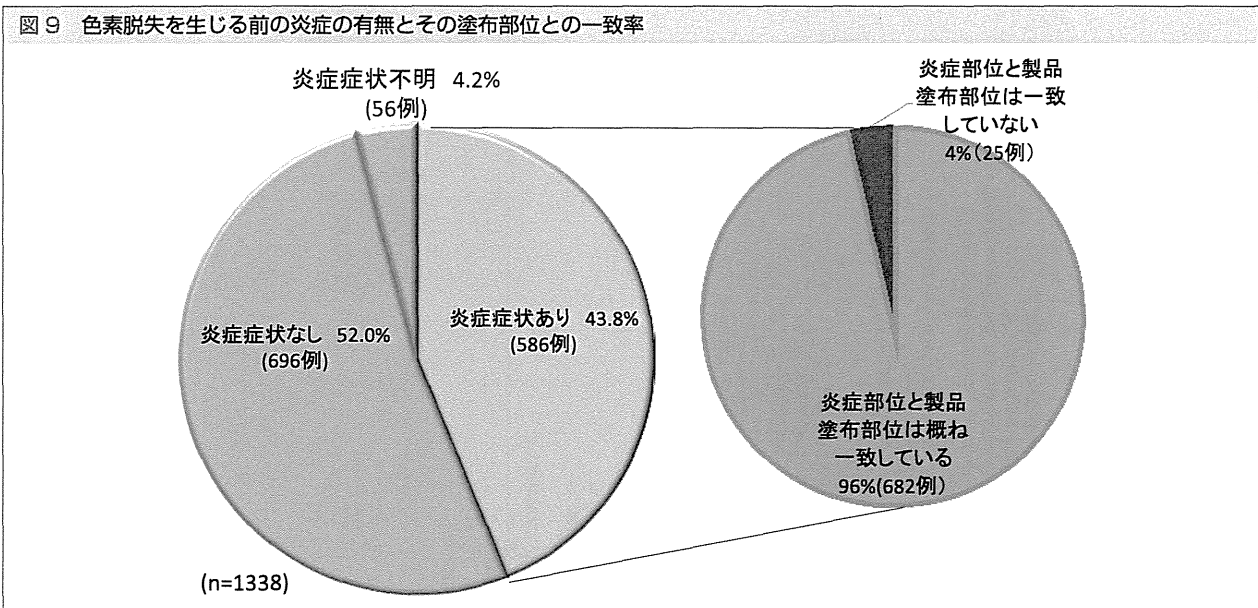
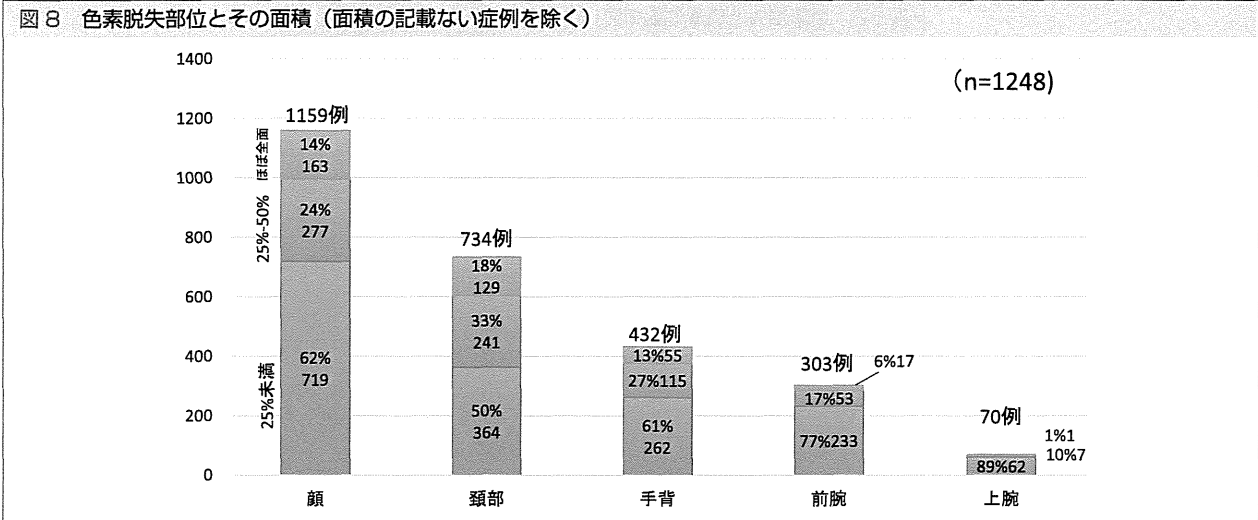
ラノソーム内でメラノサイト障害作用を持つことが解明された⁶⁾。夏季にチロシナーゼ活性が高まることにより RD のメラノサイト障害性が亢進し, 脱色素斑発生を誘導した可能性もある。

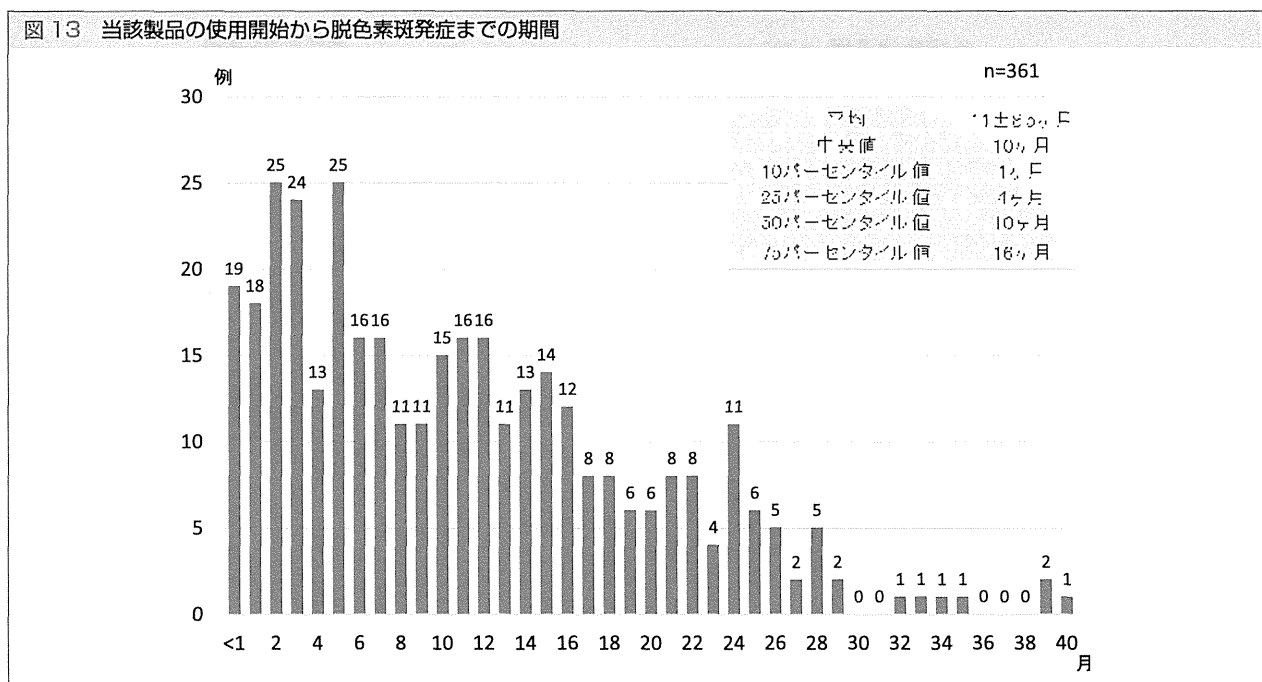
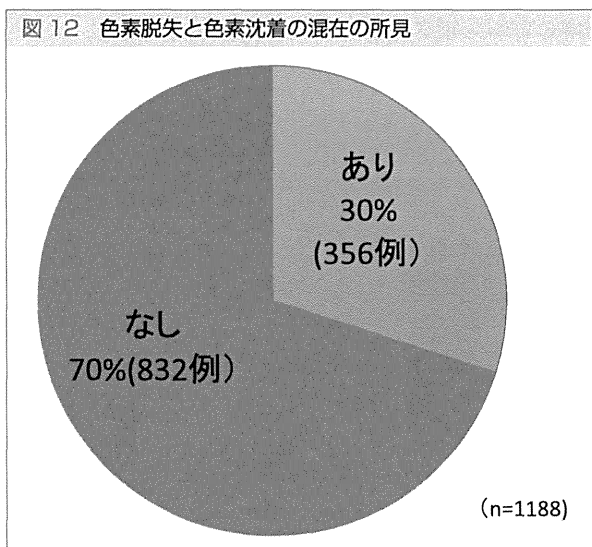
また, 発症時期の多さから光線過敏症が疑われたが, 一次調査からの結果でもあったように, 光線過敏症が自覚的他覚的に認められた症例は 120 例 (9%) で, 光線過敏症は脱色素斑形成の主要因ではないと考えられた (図 4)。

RD 誘発性脱色素斑の臨床像は, 頸部と顔面, 特にフェースラインにそってまだらな濃淡のある不完全脱色素斑が見られることである。さらに手背や指間, 前腕に脱色素斑を生じていることが多く, これは製品を手にとって顔面に塗布した後に手に残った製品を手背や指間, 前腕に塗布したためと推測した。

色素脱失の性状はごく軽微な不完全脱色素斑から, 境界明瞭な完全脱色素斑を来す症例もある。多くの症例で製品を顔面と頸部に外用しており, 中には手背に塗布していた例も少なからずあった。製品の使用部位と脱色素斑の発症部位はおおむね一致しており, 化粧品に含まれる RD と脱色素斑の関連性が強く示唆される要因の 1 つである。

一次調査の結果, 43.8% が脱色素斑発症前に紅斑や痒痒などの炎症症状を自覚していたと回答した (図 9)。炎症症状の自覚があった症例の約 20% (2014 年 4 月 30 日現在) では, 2% RD ワセリン基剤のパッチテ





ストに陽性反応を呈し、RDによるアレルギー性接触皮膚炎を生じていた。一方で炎症症状があっても2% RDワセリン基剤パッチテスト陰性症例や、さらに炎症症状のない群にも陽性率は低いものの2% RDワセリン基剤パッチテスト陽性例をみとめた。

既往歴については、花粉症、蕁麻疹の有病率が高かったが、それぞれの一般有病率が花粉症(29.8%)⁷⁾と蕁麻疹(12~25%)^{8)~10)}であることから明らかな有意差はなかった。RD脱色素斑の発症に関連性が疑われる疾患として、甲状腺疾患(8.9%)、脱毛症(7.9%)、尋常性白斑(2.8%)がある。脱毛症の既往は7.9%であり、

円形脱毛症の一般有病率1%~2%¹¹⁾よりも高い結果であったが、今回の一次調査票においては円形脱毛症のみではなく、広く「脱毛症」の既往を聞いており、産後脱毛の既往を有する患者も「あり」と答えていたため、本症における脱毛症の既往歴の有病率と円形脱毛症の一般有病率を一概には比較できないことから、円形脱毛の既往については3次調査で具体的に調査しなおす必要がある。尋常性白斑については一般有病率0.4%^{12)~14)}や皮膚疾患患者の中に占める割合(1.68%)¹⁵⁾よりも高い結果であったが、この意義についても今後検討する必要がある。甲状腺疾患は、確定診断病名を

図 14 使用した製品の種類別症例数 (重複あり)

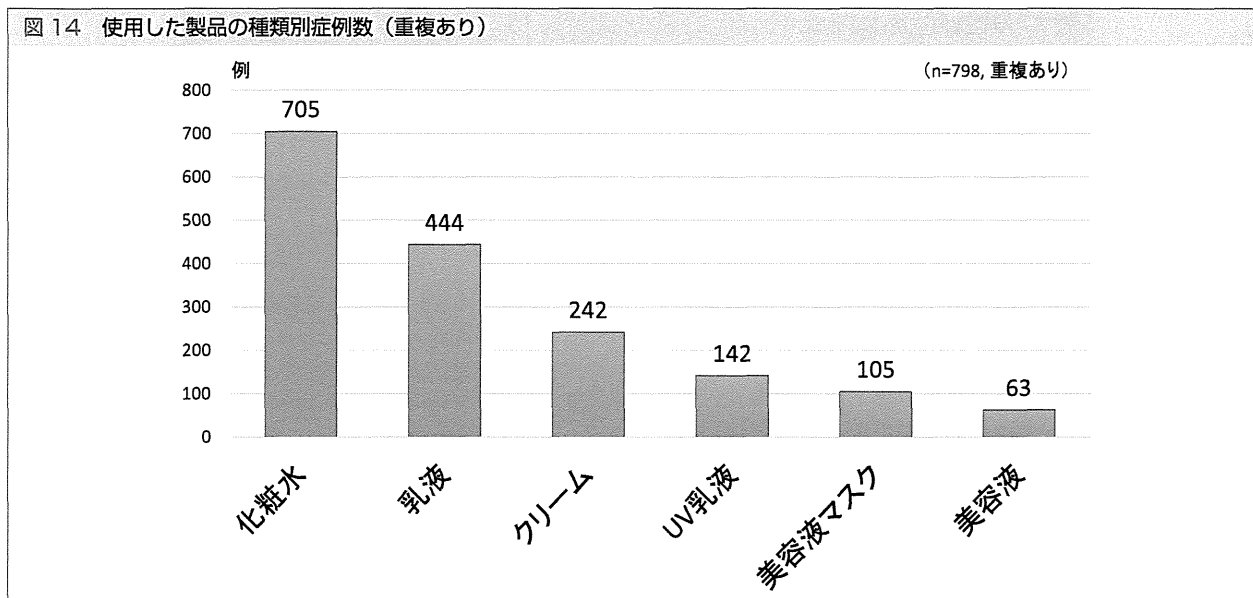
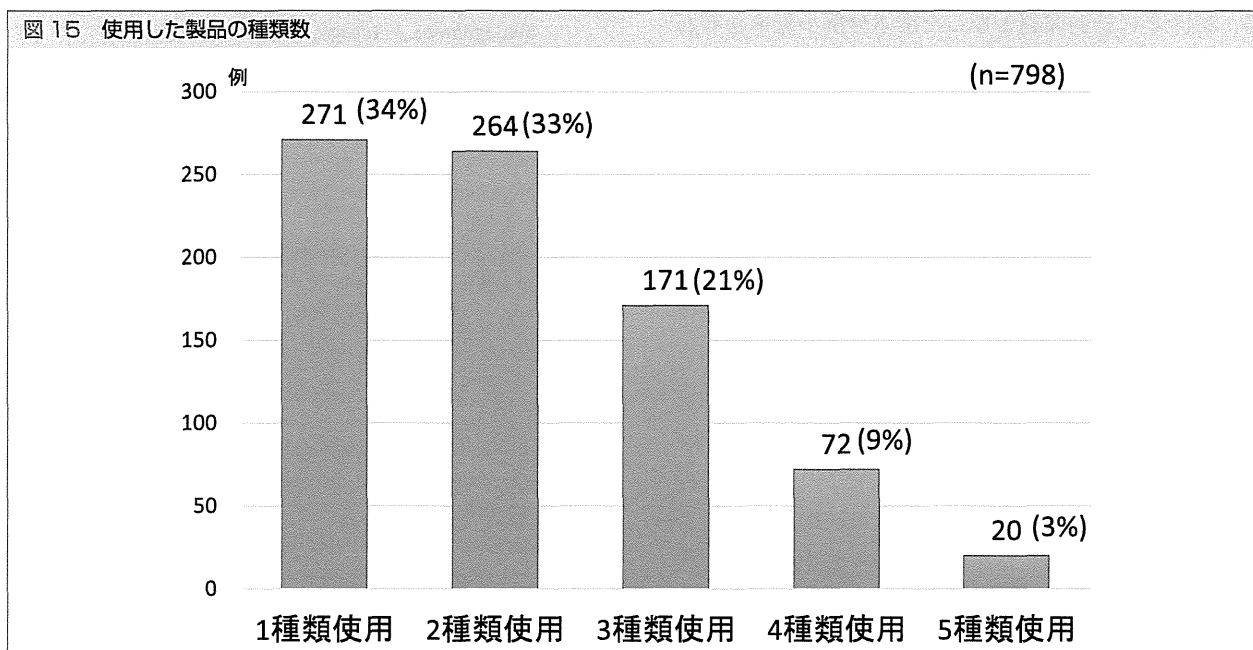


図 15 使用した製品の種類数



対象に有病率が報告されており¹⁶⁾¹⁷⁾, 甲状腺疾患としての一般有病率が不明で, 本症の有病率との比較が困難であった。

一方, 甲状腺自己抗体については, 特別委員会委員及び有志の施設 (大阪大学, 大阪市立大学, 岡山大学, 近畿大学, 神戸大学, 新潟大学, 藤田保健衛生大学, 富山大学, 山梨大学, 山形大学) の皮膚科において, 本症患者の甲状腺自己抗体を測定した結果, 表3のように抗甲状腺抗体陽性率は20.6%, 抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体陽性率は15.9%であったが, 本症患者と age matching した成人女性に同様の測定をした結果,

その陽性率は変わりなく, 本症患者に有意に高い陽性率ではないと判断した (表3)。

今回の調査では予後については, 項目「経過 色素脱失の状態: 治癒 軽快 不変 増悪」から選択記載が行われたが, 治癒や軽快の判定に用いる明確な基準がなく, 一次調査票では治療や経過の評価は困難であった。また, 完全脱色素斑と不完全脱色素斑の割合が明記されていないため, 判定が医師により若干ずれが生じている可能性はある。このことから, 2014年1月に行った二次調査では, 一次調査終了後に本特別委員会で作成した診断基準による診断と, 脱色素斑

表3 甲状腺自己抗体陽性率

	総検査数	陽性者数	陽性率	健常人女性陽性率*
抗サイログロブリン抗体	335	69	20.6%	18%
抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体	270	43	15.9%	16%

*健常人女性陽性率は大阪大学で本症患者と age matching した成人女性 100 人を対象に測定したデータである。

重症度判定スコアを用いた脱色素斑の評価及び一次調査終了後の治療及び経過について調査を行った。二次調査票の集計結果は別稿で報告する予定である。

現在、本邦においては、医師が患者の皮膚症状について化粧品との因果関係を疑ったとしても、医師一人一人の情報を収集するシステムがなく、個々の医師が皮膚疾患と原因物質の関連性を証明することは難しいため、結果として多数の障害事例が発生してから医師や製造販売業者がその因果関係を認識することとなる。2011年に社会問題となった加水分解小麦末含有石鹼による小麦アレルギー事例も同様の事例であった。このような健康被害をいち早く察知するための全国的なシステムが必要と考えられる。2014年6月に「医薬品・医療機器等安全性情報報告制度」の報告様式の変更が厚生労働省医薬食品局より通達 (http://www.info.pmda.go.jp/iyaku/file/h260612_001.pdf) され、これまでは化粧品及び医薬部外品も医薬品の副作用報告と同一の書類で報告する様式であったものを化粧品及び医薬部外品については「化粧品・医薬部外品安全性情報報告書」(http://www.info.pmda.go.jp/info/file/report_kb.pdf) で報告することに変更された。個々の医師が患者の皮膚病変が化粧品または医薬部外品によるものであると診断した場合に、個々の症例をこの報告書に記載して厚生労働省に報告することにより、多数の障害事例が生じる前に対応できるようになると思われる。

文献

- 1) 株式会社カネボウ化粧品ホームページ <http://www.kanebo-cosmetics.jp/information/>
- 2) ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会報告 <http://www.dermatol.or.jp/news/news.html?id=189>
- 3) 日本皮膚科学会 ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会：ロドデノール誘発性脱色素斑医療者（皮膚科医）向けの診療の手引き，日皮会誌，2014；124：285-303.
- 4) Arndt KA, Fitzpatrick TB: Topical use of hydroquinone as a depigmenting agent. *JAMA* 1965; 194: 965-967.
- 5) 早川律子，杉浦真理子：化学物質による色素脱失，玉置

邦彦：最新皮膚科学大系第8巻色素異常症，東京，中山書店：2002，198-200.

- 6) Sasaki M, Kondo M, Sato K et al: Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism: *Pigment cell Meranoma Res.* 2014, Doi: 10.1111/pcmr.12269, 2014
- 7) 馬場廣太郎，中江公裕：鼻アレルギーの全国疫学調査2008（1998年との比較）—耳鼻咽喉科医とその家族を対象として—。 *Progress in Medicine*, 2008; 28: 145-156.
- 8) SHELDON JM, MATHEWS KP, LOVELL RG: The vexing urticaria problem: present concepts of etiology and management. *J Allergy*, 1954; 25: 525-560.
- 9) Swinney B: The atopic factor in urticaria. *South Med J*, 1941; 34: 855-858.
- 10) Krishnaswamy G, Youngberg G: Acute and chronic urticaria. Challenges and considerations for primary care physicians. *Postgrad Med*, 2001; 109: 107-108, 111-114, 119-123.
- 11) 伊藤雅章：円形脱毛症，勝岡憲生，宮地良樹，滝川雅浩：皮膚科診療プラクティス8. 毛と爪のオフィスダーマトロジー，東京，文光堂：1999，25-29.
- 12) Spritz RA: The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*, 2006; 41: 3-10.
- 13) Spritz RA: The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Res*, 2007; 20: 271-278.
- 14) Spritz RA: The genetics of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmun*, 2008; 10: 244-257.
- 15) 日本皮膚科学会学術委員会：本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査。 *日本皮膚科学会雑誌*，2009; 119: 1795-1809.
- 16) Narita T, Oiso N, Fukai K, Kabashima K, Kawada A, Suzuki T: Generalized vitiligo and associated autoimmune diseases in Japanese patients and their families. *Allergology International*, 2011; 60: 505-508.
- 17) Maruchi N, et al: Epidemiological studies on hyperthyroidism. *Endocrinol Jpn*, 1969; 16: 665.

The First Epidemiological Report of Rhododenol-induced Leukoderma in Japan Based on a Nationwide Survey

The Special Committee on the Safety of Cosmetics Containing Rhododenol in the Japanese Dermatological Association

Yumi Aoyama¹, Akiko Ito², Kayoko Suzuki³, Tamio Suzuki⁴, Atsushi Tanemura⁵,
Chikako Nishigori⁶, Masaaki Ito⁷, Ichiro Katayama⁸, Shinichi Sugiura⁹, Kayoko Matsunaga¹⁰

Depigmentation developed in a large number of people in Japan who had used cosmetics containing 2% of 4-(4-hydroxyphenyl)-2 butanol (Rhododenol). The total number of patients is estimated to be at least 18,909 in June 2014. To clarify the clinical and epidemiological features of Rhododenol-induced leukoderma in Japan, a nation wide survey was performed from July 17, 2013 to September 7, 2013. The clinical data of 1,338 cases were analyzed. Hypopigmented spots were observed on the sites of application of Rhododenol in 96% of the cases. The face (92.9%) and the neck (58.8%) were frequently involved sites. The most common pattern was of incompletely depigmented spots (42%). The completely depigmented spot type and the mixed type comprised 17% and 28%, respectively. Inflammation was observed in 43.8% of the cases. Most of the cases (85%) were clinically indistinguishable from idiopathic vitiligo. A second investigation in the future would further deepen our understanding about the course and the prognosis of this disease.

(Jpn J Dermatol 124: 2095-2109, 2014)

Key words: Rhododenol, leukoderma, cosmetics, skin lightening agent

- 1) Dermatology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Science
- 2) Department of Dermatology, Niigata University Medical and Dental Hospital
- 3) Department of Dermatology, Kariya Toyota General Hospital
- 4) Department of Dermatology, Yamagata University Faculty of Medicine
- 5) Department of Dermatology, Course of Integrated Medicine Graduate School of Medicine, Osaka University
- 6) Division of Dermatology, Department of Internal Related Graduate School of Medicine, Kobe University
- 7) Department of Dermatology, Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science
- 8) Department of Dermatology, Course of Integrated Medicine Graduate School of Medicine, Osaka University
- 9) Department of Health Administration, Nagoya University Graduate School of Medicine
- 10) Department of Dermatology, Fujita Health University School of Medicine, Chair



Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold

Shinya Kasamatsu^a, Akira Hachiya^{a,*}, Shun Nakamura^b, Yuka Yasuda^b, Taketoshi Fujimori^a, Kei Takano^a, Shigeru Moriwaki^a, Tadashi Hase^a, Tamio Suzuki^c, Kayoko Matsunaga^d

^a Biological Science Laboratories, Kao Corporation, Haga 321-3497, Tochigi, Japan

^b Analytical Science Laboratories, Kao Corporation, Haga 321-3497, Tochigi, Japan

^c Department of Dermatology, Yamagata University Faculty of Medicine, 2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata 990-9585, Japan

^d Department of Dermatology, Fujita Health University School of Medicine, 1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake 470-1192, Aichi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2014

Received in revised form 3 June 2014

Accepted 3 July 2014

Keywords:

Depigmentation
White blotching
Rhododendrol
Hydroxyl-rhododendrol
Melanocyte
Tyrosinase

ABSTRACT

Background: Tyrosinase, the rate-limiting enzyme required for melanin production, has been targeted to develop active brightening/lightening materials for skin products. Unexpected depigmentation of the skin characterized with the diverse symptoms was reported in some subjects who used a tyrosinase-competitive inhibiting quasi-drug, rhododendrol.

Objective: To investigate the mechanism underlying the depigmentation caused by rhododendrol-containing cosmetics, this study was performed.

Methods: The mechanism above was examined using more than dozen of melanocytes derived from donors of different ethnic backgrounds. The RNAi technology was utilized to confirm the effect of tyrosinase to induce the cytotoxicity of rhododendrol and liquid chromatography-tandem mass spectrometry was introduced to detect rhododendrol and its metabolites in the presence of tyrosinase. **Results:** Melanocyte damage was related to tyrosinase activity at a certain threshold. Treatment with a tyrosinase-specific siRNA was shown to dramatically rescue the rhododendrol-induced melanocyte impairment. Hydroxyl-rhododendrol was detected only in melanocytes with higher tyrosinase activity. When an equivalent amount of hydroxyl-rhododendrol was administered, cell viability was almost equally suppressed even in melanocytes with lower tyrosinase activity.

Conclusion: The generation of a tyrosinase-catalyzed hydroxyl-metabolite is one of the causes for the diminishment of the melanocyte viability by rhododendrol.

© 2014 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The wide variation of skin color associated with ethnic skin diversity is predominantly determined by the amount and types of epidermal melanin produced in melanosomes, unique lysosome-related organelles derived from the endosomal compartment in melanocytes [1]. In the process of melanin biosynthesis, tyrosine is used as a precursor that is catalyzed by a series of melanogenic enzymes, including tyrosinase, dopachrome tautomerase and

tyrosinase-related protein-1 (Tyrp1), mutations of which cause hypopigmentation or diluted color of the skin [2–4]. Following the maturation of pigmented melanosomes, which are regulated by various membrane trafficking factors, they are translocated through the dendrites of melanocytes [5] and are then transferred to neighboring keratinocytes [6] in the course of skin color development. After their transfer to keratinocytes, melanosomes are distributed above the nuclei to form supranuclear melanin caps that protect keratinocytes from the harmful effects of ultraviolet (UV) exposure, which can produce DNA damage and free radicals [7–9]. Related to this melanin function, it has been shown that human skin color is one of the characteristics evolutionarily and geographically acquired to protect the skin from UV irradiation [10,11].

Abbreviations: LC–MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; NHEM, normal human epidermal melanocyte; ROS, reactive oxygen species; Tyrp1, tyrosinase-related protein-1; UV, ultraviolet.

* Corresponding author. Tel.: +81 285 68 7490; fax: +81 285 68 7360.

E-mail address: hachiya.akira@kao.co.jp (A. Hachiya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.07.001>

0923-1811/© 2014 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Many studies have proposed detailed mechanisms that underlie ultraviolet B (UVB)-induced pigmentation, where three major steps in the epidermis, melanocyte proliferation, the synthesis and activation of tyrosinase and melanosome transfer to keratinocytes, have been reported to be activated [12,13]. Apart from findings about keratinocyte-derived paracrine cytokines in collaboration with their corresponding receptors in melanocytes [14–25], tyrosinase has been vigorously targeted to develop active brightening materials to satisfy the desires of many people who believe fair/bright skin to be ideal, since many laboratories have demonstrated that the activity of this rate-limiting enzyme correlates closely with melanin content, resulting in its critical contribution to cutaneous pigmentation [26]. At least in humans, tyrosinase activity has been suggested to be regulated largely at the post-translational level [27]. Following this trend, rhododendrol (Fig. 1), whose chemical name is 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol, was uniquely developed and its use as an active quasi-drug ingredient was approved in 2008. It is also known to be a natural ingredient present in many plants, such as the Nikko maple tree. Rhododendrol was demonstrated to compete with tyrosine for hydroxylation by tyrosinase and to interfere with melanin synthesis as do derivatives of phenols and catechols [28,29], resulting in the effective prevention of melanin biosynthesis and decreasing the appearance of pigmented spots and freckles on the skin.

In 2013, depigmentation (also called white blotching), characterized in particular with one or more blotches which can overlap, occurred on the skin of some consumers who used rhododendrol-containing brightening cosmetics. This sort of depigmentation was thought to be possibly categorized to a chemical leukoderma accompanied by an acquired hypopigmentation induced by repetitive exposure to specific chemicals. Partial depigmentation was reported to appear on the neck, the hands and the face at the application sites of the affected products, with or without inflammation, in advance of the manifestation of white blotching. Some consumers who used a rhododendrol-containing product continue to suffer from such symptoms, despite the fact that those symptoms have been reported to disappear or begin to improve after ceasing to use the products in many cases. These observations are consistent with the condition of chemical leukoderma, which is distinct from contact/occupational vitiligo characterized by the extension of depigmentation from the initial site of chemical contact and the subsequent development into progressive and generalized vitiligo [30]. It has been suggested that the loss of cutaneous pigmentation can result not only in susceptible skin [31,32] but also in psychological and social problems of self-esteem and personal interactions [33].

The aim of this study was to understand how rhododendrol causes depigmentation or white blotching of the skin. It has been reported that the largest class of chemicals known to trigger contact/occupational vitiligo includes aromatic or aliphatic derivatives of phenols and catechols [30], such as phenolic antiox-

idants and phenolic germicidal detergents [34] contained in rubber [35] and industrial oils [36]. Many other chemicals also have the capacity to induce comparable depigmentation represented by sulfhydryls, mercurials, arsenic, etc. This investigation of the mechanism underlying the rhododendrol-induced depigmentation was initiated considering limited reports on its plausible mechanisms although the etiology of vitiligo itself remains poorly understood [37]. Based on our observation of the rhododendrol-induced damage of melanocytes with a certain threshold of tyrosinase activity, we hypothesize that a tyrosinase-catalyzed metabolite from rhododendrol is one of the causes of melanocyte impairment and we validated that mechanism using several analytical approaches including mass spectrometry analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Normal human epidermal melanocytes (NHMs) were obtained from Kurabo Co. (Osaka, Japan). Rhododendrol was supplied by Kanebo Cosmetics Co. (Tokyo, Japan) and hydroxyl-rhododendrol was synthesized as detailed below. AlamarBlue was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The specific siRNA directed against human *tyrosinase* and the control siRNA were provided by Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra (600 MHz) were obtained using CD_3OD on a Bruker AVANCE III instrument. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–ESI–MS) analysis was performed using a Bruker Esquire 3000 Plus connected with an Agilent Series 1100 HPLC system. Other chemicals were of reagent grade.

2.2. Synthesis of hydroxyl-rhododendrol (4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol)

To a solution of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone (1.01 g, 5.19 mmol) in ethanol (10 ml), sodium borohydride (100 mg, 2.65 mmol) was added and stirred at room temperature for 1 h. Following the addition of water (20 ml), the mixture was extracted 3 times with diethyl ether (10 ml each) and the combined organic extract was dried with Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to give the crude product (0.84 g) of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanol. Subsequently, a solution of the crude product (0.49 g) in tetrahydrofuran (35 ml) was cooled in an ice bath and aluminum chloride (1.1 g, 8.3 mmol) and pyridine (2.7 ml) were added. The mixture was then heated and refluxed for 14 h. After the mixture was cooled in an ice bath, it was quenched by the addition of 20% hydrogen chloride (30 ml) and then extracted 3 times with chloroform (30 ml each). The combined organic extract was washed with water (10 ml) and saline (10 ml). The organic layer was dried over MgSO_4 and evaporated to dryness, and the residue was then purified by silica

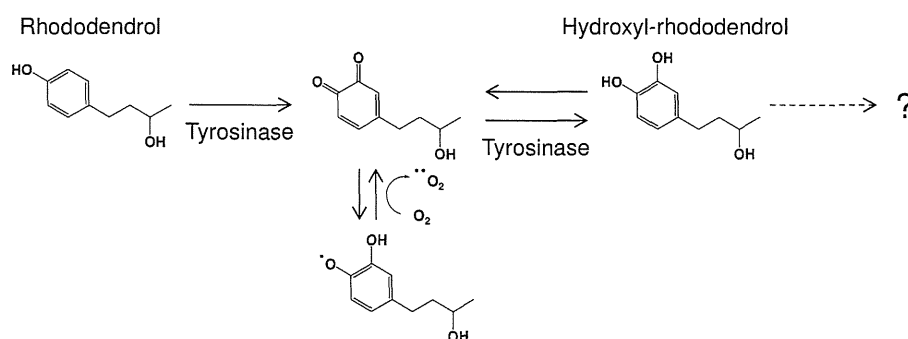


Fig. 1. Rhododendrol is catalyzed by tyrosinase to produce hydroxyl-rhododendrol in equilibrium with its related quinone form. The reactions catalyzed by tyrosinase that originate from rhododendrol are shown.

gel column chromatography (methanol-chloroform, 3:97 v/v) to afford 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (0.31 g, 54%) as a colorless solid. Analysis of the product gave the following characteristics:

$^1\text{H-NMR}$ δ 1.21 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.62–1.76 (m, 2H), 2.48–2.55 (m, 1H), 2.58–2.64 (m, 1H), 3.72–3.76 (m, 1H), 6.54 (dd, $J = 1.9$, 7.9 Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ 23.52, 32.49, 42.33, 67.93, 116.21, 116.46, 120.54, 135.21, 144.14, 146.08.

ESI-MS $m/z = 181$ [M – H] $^-$.

2.3. Cell culture

NHEMs from 6 lightly pigmented neonatal foreskins, from 3 moderately pigmented neonatal foreskins and from 4 darkly pigmented neonatal foreskins were maintained as described elsewhere [30]. Briefly, NHEMs were maintained in Medium 254 (Life Technologies) supplemented with 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 5 $\mu\text{g/ml}$ transferrin, 3 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor, 0.18 $\mu\text{g/ml}$ hydrocortisone, 3 $\mu\text{g/ml}$

heparin, 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 0.2% (v/v) bovine pituitary extract (BPE), and 0.5% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Kurabo) at 37 °C in an atmosphere of 5% (v/v) CO_2 .

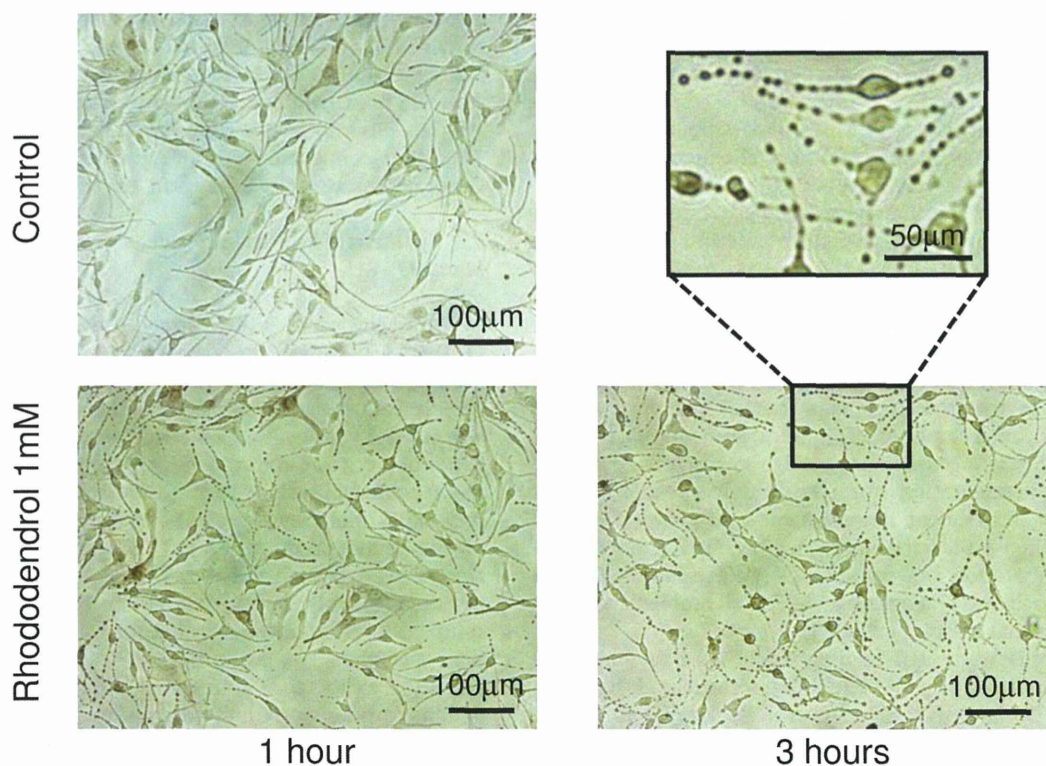
2.4. Transfection with siRNAs

NHEMs were transfected with total of 25 nM siRNA specific to tyrosinase and/or a nonspecific control siRNA using TransIT-TKO transfection reagent (Mirus Bio, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Following incubation for 48 h, cells were treated with each reagent and incubated according to each experimental design.

2.5. Western blotting analysis

NHEMs seeded in 12-well plates at a density of 1.3×10^5 were treated with siRNA for 48 h, followed by solubilization with cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride

A



B

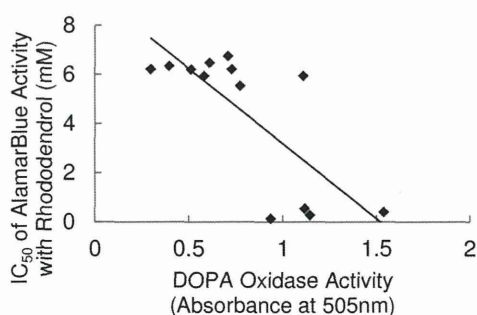


Fig. 2. Rhododendrol specifically damages melanocytes according to their level of tyrosinase activity. Melanocytes with higher tyrosinase activity immediately show lower cell viability within 1 h after exposure to 1 mM rhododendrol accompanied by the phenomenon of apoptosis characterized with membrane blebbing (A). Scatter plots demonstrate the negative correlation between tolerance to rhododendrol and level of tyrosinase activity assessed by DOPA oxidase activity (B).

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Five μg protein in each sample were separated using 4–15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and were then transferred to Sequi-Blot PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories). The membranes were incubated with a monoclonal mouse anti-Tyrosinase-specific antibody (Clone: T311, Life Technologies) or with a monoclonal mouse anti- β -actin-specific antibody (Clone: AC-15, Sigma-Aldrich) followed by incubation with secondary mouse IgG antibodies (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK). Subsequent visualization of bound antibodies was performed using Enhanced ChemiLuminescence Prime (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Densities of the detected bands were analyzed using ATTO Densitograph (ATTO Co., Tokyo, Japan).

2.6. Measurement of DOPA oxidase activity

DOPA oxidase activity was measured as described elsewhere [38]. Briefly, 2.0×10^4 NHEMs (no treatment) or 1.2×10^4 NHEMs treated with siRNA in 96-well plates were washed twice with PBS and then mixed with 20 μl Buffer A (0.1 M Tris-HCl, pH 7.2, 1% NP-40 and 0.01% SDS) and with 20 μl Buffer B (100 mM sodium phosphate, pH 7.1) and 4% *N,N'*-dimethylformamide). After incubation at 4 °C for 2 h, 80 μl of Buffer B, 60 μl of 20.7 mM MBTH and 40 μl of 5 mM L-DOPA were added to each well. After reaction for 30 min at 37 °C, the absorbance at 505 nm of each well

was measured with a Gen 5 Micro Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)

2.7. Measurement of cell viability

In the presence of various concentrations of rhododendrol or hydroxyl-rhododendrol, 1.0×10^4 NHEMs (no treatment) or 1.2×10^4 NHEMs treated with siRNA were cultured in melanocyte culture medium without PMA in 96-well plates for 24–96 h. Subsequently, the culture medium was changed to fresh medium supplied with 10% AlamarBlue. After incubation for another 2 h, the fluorescence (Excitation: 544 nm/Emission: 590 nm) of each well was measured using a Wallac 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

2.8. Treatment of rhododendrol with mushroom-derived tyrosinase

Rhododendrol was treated with mushroom-derived tyrosinase to investigate how it was converted by the action of tyrosinase *in vitro*. Rhododendrol (500 μg) and 2 or 4 units of tyrosinase were placed into a test tube together with 1 ml 100 mmol/l Tris-HCl solution, pH 6.8. The mixture was incubated at 37 °C for 0 to 120 min in a constant temperature bath. The reaction was stopped by adding 10 μl formic acid and then tyrosinase was completely removed from the solution by ultrafiltration at 4800 rpm for 20 min. The filtrate was injected

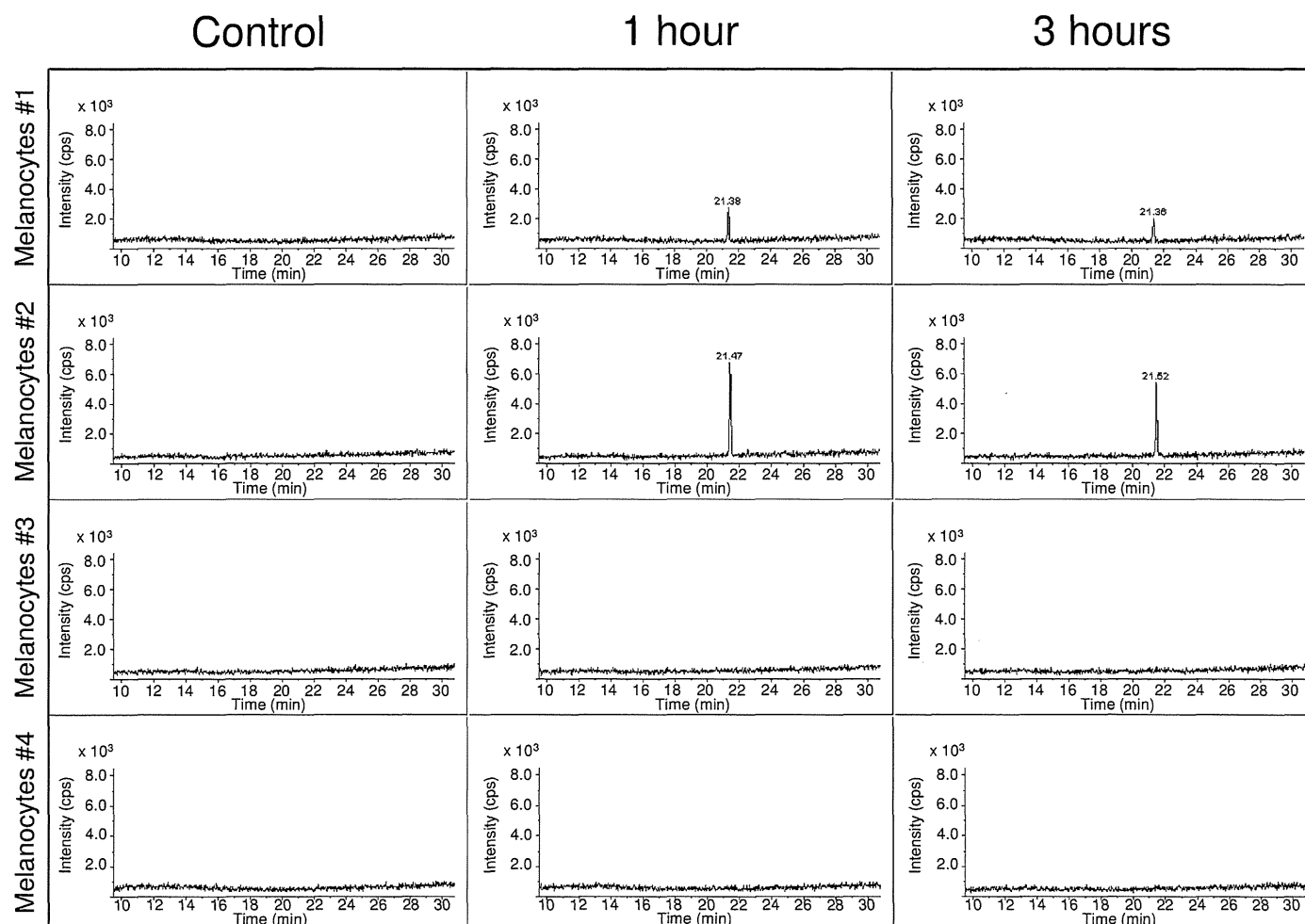


Fig. 3. Hydroxyl-rhododendrol is detected only in melanocytes with higher tyrosinase activity. LC-MS/MS detects hydroxyl-rhododendrol with a retention time of around 21 min only in melanocytes with higher tyrosinase activity after the addition of 1 mM rhododendrol. Melanocyte lines no. 1 and 2 have higher tyrosinase activity while melanocyte lines no. 3 and 4 have lower activity. Vertical and horizontal axes of LC-MS/MS chromatograms describe peak intensity (cps) and retention time (min).

into a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

2.9. Detection of rhododendrol and its metabolites using LC-MS/MS

Several concentrations of rhododendrol incubated with 2×10^6 NMEMs treated with tyrosinase-specific siRNA were extracted in 500 μ l 1% formic acid in water using a homogenizer system (MS-100R, TOMY, Japan) at 5000 rpm for 10 min with zirconia beads and were kept at 4 °C. They were then centrifuged at 4500 rpm for 6 min and the residues were treated again as described above after the collection of supernatants. The resulting supernatants were combined with the previously collected ones and then were evaporated under N₂ gas. The dried extracts were dissolved in 500 μ l 1% formic acid in water and then stored at 4 °C prior to the LC-MS/MS analysis using an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a 4000 QTRAP (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) with an electrospray ionization (ESI) source. Samples from the reactions with mushroom tyrosinase described above were also analyzed by LC-MS/MS. Separation was achieved on a Unison UK-C18 column with a 3 μ m particle size, 2.1 mm in inner diameter and 150 mm in length (Imtakt, Kyoto, Japan). The solvent mobile phases consisted of: (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile. The eluent at a flow rate of 200 μ l/min was controlled as follows; 2% solvent B from 0 to 5 min, 2–40% solvent B for 5 to 25 min, 98% solvent B for 25.1 to 35 min, and 2% solvent B for 35.1 to 50 min. The conditions of positive ion ESI-MS/MS were prepared as follows; ion spray voltage: 5000 V, ion source heater temperature: 600 °C, ion source gas (N₂) for nebulizing: 50 psi, ion source gas for drying solvent: 80 psi, curtain gas (N₂): 30 psi, collision gas (N₂): 3×10^{-5} Torr, declustering potentials: 36 V and 46 V for rhododendrol and hydroxyl-rhododendrol, respectively, and collision energies: 17 V and 15 V for rhododendrol and hydroxyl-rhododendrol, respectively. The analyses were performed in the selected ion monitoring (SRM) mode and the selected MS transitions were m/z 149 \rightarrow 107 and m/z 165 \rightarrow 123 for rhododendrol and hydroxyl-rhododendrol, respectively. The LC-MS/MS system was controlled and the data were collected by Analyst software (ver. 1.4, AB SCIEX).

2.10. Statistics

The level of significance of differences was analyzed by Student's *t*-test. Differences in mean or raw values among treatment groups are considered significant when $P < 0.05$.

Table 1

Summary of cell viabilities and tolerance to rhododendrol and to hydroxyl-rhododendrol among melanocytes with different tyrosinase activities.

Cells	DOPA oxidase activity (absorbance at 505 nM)	IC ₅₀ of AlamarBlue activity with rhododendrol (mM)	IC ₅₀ of AlamarBlue activity with hydroxyl-rhododendrol (μ M)
Melanocytes no. 1	1.54 \pm 0.06	0.19	20
Melanocytes no. 2	1.15 \pm 0.05	0.24	20
Melanocytes no. 3	0.40 \pm 0.02	over 8.0	70
Melanocytes no. 4	0.61 \pm 0.02	7.2	58

3. Results

3.1. NHEMs with tyrosinase activity exceeding a certain threshold are specifically sensitive to rhododendrol cytotoxicity

In order to consider the fact that not all consumers and not all treated areas of the skin developed white blotching, several types of NHEMs derived from donors of different ethnic backgrounds were used to investigate their tolerance to rhododendrol. Surprisingly, NHEMs investigated were clearly divided into two groups according to their tolerance/sensitivity to rhododendrol and their tolerance was dependent on their level of tyrosinase activity. When NHEMs with higher tyrosinase activity were exposed to 1 mM rhododendrol, they began to undergo apoptosis, characterized by membrane blebbing, within 1 h (Fig. 2A). A correlation analysis between the IC₅₀ values of melanocyte viability tolerance to rhododendrol and tyrosinase (DOPA oxidase) activity demonstrated that their tolerance to rhododendrol was significantly correlated with tyrosinase activity and that melanocytes with higher tyrosinase activity exceeding a certain threshold were specifically damaged by rhododendrol immediately (Table 1, Fig. 2B).

3.2. NHEMs with higher tyrosinase activity produce a dramatically toxic hydroxyl-metabolite within 1 h in a tyrosinase activity-dependent manner.

Following the observation of specific melanocyte damage caused by rhododendrol that was dependent on a threshold of tyrosinase activity, the possible involvement of an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS) and/or oxidative stress was investigated since the intracellular generation of ROS and semiquinone free radicals have been reported to play a role in the onset of vitiligo in patients exposed to vitiligo-inducing compounds containing phenol skeletal structures [30,39,40]. In addition to the lack of detection of ROS generation after the

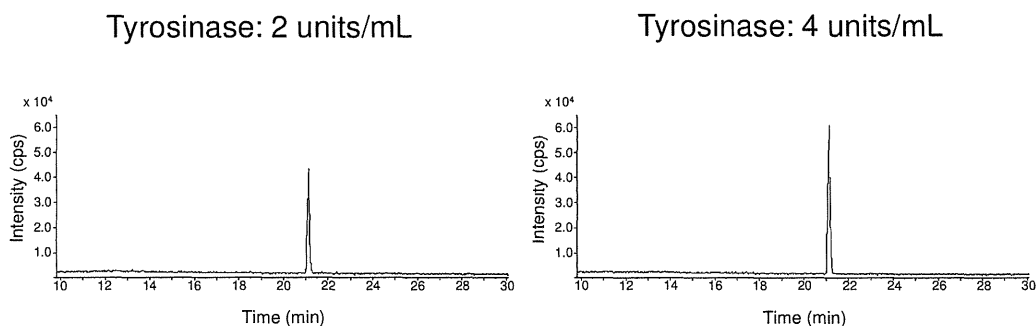


Fig. 4. Mushroom-derived tyrosinase catalyzes the conversion of rhododendrol to hydroxy-rhododendrol in a dose-dependent manner. A mixture of rhododendrol and mushroom-derived tyrosinase was incubated at 37 °C for 15 min and was then injected into the LC-MS/MS. LC-MS/MS demonstrates the peaks of hydroxyl-rhododendrol with a retention time of around 21 min in a tyrosinase-dependent manner.