

原因究明に関する調査研究

I. ロドデノールおよび類似化学物質によるメラノサイト傷害に関する調査研究

研究分担者 最上(西巻)知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究要旨

ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序について、チロシナーゼによる代謝と毒性増強に着目し、文献調査ならびに検証を行った。ロドデノールは培養メラノサイトに対しチロシナーゼ活性に依存する毒性を発揮すること、白斑誘導性の類似化合物と同様に、ロドデノールはチロシナーゼにより反応性の高いオルトキノン体へと代謝され、グルタチオン等の SH 基と反応するとともにタンパクを修飾することが報告されている。加えて本研究班では、アスコルビン酸の添加によりオルトキノン体の生成を防ぐと細胞毒性が低減される結果を得ており、オルトキノン体が細胞毒性に関与することが間接的に示唆された。一方、メラノサイトやメラノーマ細胞のロドデノール感受性は細胞により大きく異なっており、毒性発現機序の解明と新規美白剤の安全性評価には、適切な細胞試験系の構築が必要と考えられる。

A. 研究目的

ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序について、チロシナーゼによる代謝と、チロシナーゼ活性に依存した毒性発現が報告されている。白斑発症との関連について、白斑誘導性 4-置換フェノール類の文献調査を行った。また、メラノーマ細胞を用いて毒性発現について検証した。

B. 研究方法

ロドデノールや白斑誘導性の類似化合物によるメラノサイト選択的毒性とその機序について、文献調査を行った。マウスやヒトのメラノーマ細胞、正常ヒトメラノサイト等を用い、毒性発現とチロシナーゼの関与を検討した。

ヒトメラノーマ細胞 HMV-II、マウス B16 melanoma, B16melanoma 4A5 細胞は、理化学研究所 BRC セルバンクより入手した。細胞は播種 24 時間後に薬物処理を行い、48 時間後に ATP 含量を測定し、細胞生存率を決定した。細胞内 ATP 含量は CellTiter-Glo

Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)を用い、化学発光の増加により測定した。

チロシナーゼの阻害には、フェニルチオウレア (PTU)を 100 μ M 添加した。あるいはチロシナーゼを特異的 siRNA (StealthTM Select RNAi, Invitrogen, #1~#3)を用いてノックダウンした。ノックダウン効率は、細胞より総 RNA を抽出し、チロシナーゼ mRNA をリアルタイム PCR で測定し、判定した。

C. 研究結果

1. ロドデノールならびに白斑誘導性 4-置換フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化

パラ位に脂肪族/芳香族側鎖を持つフェノール/カテコール類は、ヒトや実験動物で白斑を誘導する代表的な化学物質として分類され (Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004)、職業的白斑を起こす 4-tert ブチルフェノール(4-TBP)やヒドロキノンモノベンジルエーテル (MBEH)、抗メラノーマ薬候補 4S-システアミルフェノール (4S-CAP) や

その誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4-SCAP は、メラノーマ細胞や皮膚のメラノサイトに選択的毒性を發揮することが報告されている(表 1)。これらは抗メラノーマ薬候補として研究が進められ、黒色マウスに、4-SCAP は 3 週、NPr-4-SCAP は 10 日皮下注射すると、毛包メラノサイトの消失と毛色の脱色が生じることが報告されている(Ito & Jimbow 1987; Tandon et al, 1998)。また、黒色モルモットに 5%4-SCAP エマルジョンを4週間塗布すると皮膚メラノサイトの減少が観察されている(Ito et al, 1987)。

ロドデノールの代謝に関しては、昨年度カネボウ化粧品より提供された非臨床試験に関する報告書に引き続き、同グループより(Sasaki et al, 2014)、ならびに別グループより(Ito et al, 2014)、それぞれ論文が刊行された。ロドデノールはこれらの白斑誘導性 4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼにより代謝されてオルトキノン体に活性化され、システインやグルタチオンなどの SH 化合物に付加反応すること(図 1)(Ito et al, 2014a)、オルトキノンへの代謝活性化はヒトチロシナーゼを用いても効率的に進行し(Ito et al, 2014b)、タンパクを修飾することが報告されている(Ito et al, 2015)。4SCAP やその誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4-SCAP もオルトキノン体に代謝されて SH 基に付加する(Hasegawa et al, 1997; Ito S et al, 2012)。生成するオルトキノン体は活性酸素種 ROS 産生を介して毒性発現に関わる可能性が推定されている(Ito et al, 2014a)。

オルトキノン体は極めて不安定であるが、本研究班において協力研究者秋山は、アスコルビン酸共存下でチロシナーゼ反応を行うとロドデノールカテコール体まで還元されること、アスコルビン酸添加でオルトキノン体への酸化を防ぐと、細胞毒性が減弱することを見いだした(分担研究報告書 II)。

2. ロドデノールならびに白斑誘導性 4-置換フェノール類によるメラノサイト傷害—チロシナーゼによる代謝の役割

ロドデノールは、メラノサイトやメラノーマ細胞に対してチロシナーゼ活性に依存する毒性を示すことが報告され(表 1)、「チロシナーゼによる細胞毒性の増

強」がメラノサイト選択的傷害性を介して白斑発症と強く関わる可能性が推定される。抗メラノーマ作用を示す 4-SCAP やその誘導体 NAc-4-SCAP や NPr-4-SCAP は、メラニン生合成の活発なメラノーマ細胞に、より強い毒性を示す(Prezioso et al, 1992; Yamada et al, 1991; Ishii-Osai et al, 2012)。最も強力な毒性を示す 4-SCAP ではチロシナーゼ依存性が認められず、毒性発現には monoamine oxidase による代謝や選択的取り込みが重要と考えられていた(Ito S et al, 1990)。一方、前述したように 4-SCAP の皮下注射で C57BL マウスの毛包メラノサイトは減少するが、チロシナーゼ活性を欠くアルビノマウスのメラノサイトやケラチノサイトは影響されず、in vivo ではメラノサイト毒性の発現にチロシナーゼが必要であることが示唆されている(Ito & Jimbow, 1987)。4-SCAP の殺傷作用は catalase 添加で抑制され(Yamada et al, 1989)、NPr-4-SCAP の毒性は ROS 産生を伴うことから(Ishii-Osai et al, 2012)、酸化ストレスを介する機序が示唆される。

一方、4-TBP や MBEH については、チロシナーゼ依存性は認められていない(表 1)。ヒトメラノサイトは細胞ロットによりロドデノール感受性に大きな差があることが報告されている(Kasamatsu et al, 2014)。

本研究班で検証を試みたが、高感受性メラノサイトは入手できなかった。そこでメラノーマ細胞の利用を検討したが、ヒト HMV-II、マウス B16 メラノーマ、B16 4A5 細胞の感受性は高くは無く(図 2)、HMV-II ではチロシナーゼ依存性は阻害剤・siRNA ノックダウンのどちらによっても認められなかった(図 3)。したがって、適切な細胞系を用いての化合物間の比較検討が必要と考えられる。

4-TBP や MBEH では、メラノサイトへの直接作用に加えて、免疫応答の誘導も白斑形成に寄与すると考えられている。MBEH 塗布部では細胞傷害性 T 細胞の浸潤(Becher and Sharama, 2011)、ランゲルハンス細胞の浸潤(Hariharan et al, 2011)、MBEH 暴露メラノーマ細胞による T 細胞応答の活性化が in vitro で示されており(van den Boorn et al, 2011)、メラノサ

イトが特異的に攻撃される自己免疫応答が示唆されている。また、メラノーマ細胞を移植したマウスを NPr-4-SCAP で治療すると、メラノーマを再移植しても増殖が抑制された。増殖抑制は細胞傷害性 T 細胞を介しており、また同時に尋常性白斑様の脱色素が生じたことから、メラノーマ/メラノサイトへの自己免疫誘導が支持されている (Ishii-Osai *et al*, 2012)。

ロドデノールの場合も 4-TBP や MBEH と同様にチロシナーゼ代謝によりタンパク結合能を獲得しており、ハプテン抗原形成の可能性が示された (Ito *et al*, 2015)。また、4-TBP や MBEH と同様に免疫増強につながる小胞体ストレス応答誘導が報告されている (Sasaki *et al*, 2014) (表 1)。

D. 考察

1. チロシナーゼによる代謝活性化の役割

ロドデノール、ならびに職業的白斑を起こす 4-TBP や MBEH、抗メラノーマ薬候補 4-SCAP 誘導体などの 4- (アルキル/アリル) 置換フェノール類は、チロシンに類似した構造を有し、チロシンと同様にチロシナーゼにより代謝されてオルトキノン体を生じることが報告されている (表 1)。生成するオルトキノン体は、活性酸素種 ROS の産生に関わり、グルタチオンとの反応等による細胞内レドックスバランスの変化、タンパク修飾により、直接または間接的に毒性発現に関わる可能性が示唆されている。本研究班では実際に、アスコルビン酸の共存下ではロドデノールカテコール体の毒性が減弱する知見を得ている (分担研究報告書 II)。アスコルビン酸はオルトキノン体をカテコール体に還元していることから、細胞毒性はオルトキノン体が引き起こしていることが間接的に示唆された。またアスコルビン酸添加法は、オルトキノン体のように化学的に不安定な代謝酸化物の細胞活性への寄与を調べるためには有用な方法と考えられた。

2. メラノサイト傷害と免疫誘導の可能性

活性代謝物オルトキノン体の生成は、細胞毒性の

直接の増強、あるいは免疫応答を介して、白斑発症に強く関わる事が推定される。そのメカニズムの解明には、感受性が高く、入手の容易な細胞系が必要となる。ヒトメラノサイトはロット間の差 (個人差) が大きいことから、その代替かつ安定に供給される細胞として、メラノーマ細胞が注目される。今後、ロドデノールや 4-置換フェノール類に対する感受性、チロシナーゼによる代謝活性化等の能力を比較検討し、適切な細胞系を選択する必要がある。白斑発症に強く関連する因子を明らかにし、その評価系が確立できれば、チロシナーゼによる代謝活性化測定法の確立とともに、美白剤の安全性評価法の策定に貢献できると考えられる。

4-TBP や MBEH、NPr-4SCAP はメラノサイトへの直接作用に加えて、免疫応答の誘導も白斑形成に寄与することが知られている。ロドデノールは動物の皮膚感作性試験では概ね陰性と報告されたが、チロシナーゼ代謝によりタンパクとの結合能を獲得することが報告され (Ito *et al*, 2015)、ハプテン抗原形成の可能性が示された。傷害メラノサイトに対する自己免疫を含め、ロドデノールによる免疫誘導について、今後の解明が必要と考えられる。

E. 結論

ロドデノールのメラノサイトへの毒性はチロシナーゼ活性に依存し、白斑誘導性の 4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼにより代謝されて SH 付加反応性のオルトキノン体に転換されることが毒性の要因と推定されていた。本研究班では、アスコルビン酸の添加によりオルトキノン体の生成を防ぐと細胞毒性が低減される知見を得た。一方、メラノサイトの感受性には細胞間で大きな差が見られた。

[引用文献]

- Cummings MP, Nordlund JJ. *Am J of Contact Dermatitis* 1995; 6: 122-7
Becker JC, Schrama D. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1185-7.

- Boissy RE, Manga P. *Pigment Cell Res.* 2004 ; 17: 208-14
- Hariharan V, Toole T, Klarquist J, Mosenson J, Longley BJ, Le Poole IC. *Melanoma Res* 2011; 21: 115-26.
- Hasegawa K, Ito S, Inoue S, Wakamatsu K, Ozeki H, Ishiguro I. *Biochem Pharmacol.* 1997 ; 53: 1435-44
- Inoue S, Ito S, Wakamatsu K, Jimbow K, Fujita K. *Biochem Pharmacol.* 1990 ;39:1077-83
- Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. *J Dermatol Sci.* 2012; 67: 51-60.
- Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:646-53
- Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:744-53.
- Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:1149-53.
- Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015
- Ito Y, Jimbow K. *Cancer Res.* 1987;47:3278-84.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol.* 1987; 88: 77-82.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 77-82
- Prezioso JA, Epperly MW, Wang N, Bloomer WD. *Cancer Lett.* 1992;63:73-9.
- Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K, Inoue S. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:754-63.
- Tandon M, Thomas PD, Shokravi M, Singh S, Samra S, Chang D, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 2023-9
- van den Boorn JG, Picavet DI, van Swieten PF, van Veen HA, Konijnenberg D, van Veelen PA, van Capel T, Jong EC, Reits EA, Drijfhout JW, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:1240-51
- Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. *Br J Cancer.* 1991 ;63:187-90.
- Yamada K, Jimbow K, Engelhardt R, Ito S. *Biochem Pharmacol.* 1989 ;38:2217-21.

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

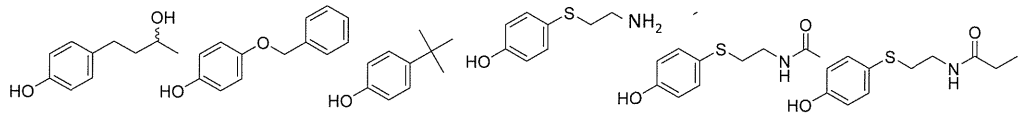
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 白斑誘導性4-置換フェノール類の細胞毒性・代謝・細胞応答 (文献情報)



	RD	MBEH	4-TBP	4-SCAP	NAc-4-SCAP	NPr-4-SCAP
細胞毒性						
メラノサイト/メラノーマ 選択性	○ Ref 1,2	○ Ref 8,9	○ Ref 8,9	○ Ref 15,-17		○ Ref 20
メラニン合成系と関連		× Ref 9	○ Ref 9,13	○ Ref 16	○ Ref 15	○ Ref 20
チロシナーゼ依存性	○ Ref 3,4	× Ref 11	× Ref 8	× Ref 18,		
チロシナーゼによる代謝	○ Ref 4-6	○ Ref 10,11	○ Ref14	○ Ref 19		○ Ref 21
SH付加体形成	○ Ref 5-7	○ Ref 10,11	○ Ref14	○ Ref 19		○ Ref 21
ROS産生	× Ref 3	○ Ref 11	○ Ref13			○ Ref 20
メラノサイト抗原放出		○ Ref 11				
小胞体ストレス	○ Ref 3	○ Ref 12	○ Ref 12			
IL6産生		○ Ref 12	○ Ref 12			
IL8産生	○ Ref 3	○ Ref 12	○ Ref 12			

References

- 1 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（カネボウ株式会社 平成 26 年 3 月）
- 2 Kuroda Y, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T. *J Toxicol Sci.* 2014; 39: 615-23.
- 3 Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K, Inoue S. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:754-63.
- 4 Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, Moriwaki S, Hase T, Suzuki T, Matsunaga K. *J Dermatol Sci.* 2014; 76: 16-24
- 5 Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27: 744-53.
- 6 Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:1149-53.
- 7 Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 *in press*
- 8 Yang F, Sarangarajan R, Le Poole IC, Medrano EE, Boissy RE. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:157-64
- 9 Hariharan V, Klarquist J, Reust MJ, Koshoffer A, McKee MD, Boissy RE, Le Poole IC. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 211-20
- 10 Manini P, Napolitano A, Westerhof W, Riley PA, d'Ischia M. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22:1398-405
- 11 van den Boorn JG, Picavet DI, van Swieten PF, van Veen HA, Konijnenberg D, van Veelen PA, van Capel T, Jong EC, Reits EA, Drijfhout JW, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:1240-51
- 12 Toosi S, Orlow SJ, Manga P. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132:2601-9
- 13 Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. *Am J Pathol.* 2006;169:1652-62
- 14 Thörneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13:33-8.
- 15 Prezioso JA, Epperly MW, Wang N, Bloomer WD. *Cancer Lett.* 1992;63:73-9.
- 16 Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. *Br J Cancer.* 1991 ;63:187-90.
- 17 Yamada K, Jimbow K, Engelhardt R, Ito S. *Biochem Pharmacol.* 1989 ;38:2217-21
- 18 Inoue S, Ito S, Wakamatsu K, Jimbow K, Fujita K. *Biochem Pharmacol.* 1990;39: 1077-83
- 19 Hasegawa K, Ito S, Inoue S, Wakamatsu K, Ozeki H, Ishiguro I. *Biochem Pharmacol.* 1997 ; 53: 1435- 44;
- 20 Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:646-53
- 21 Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. *J Dermatol Sci.* 2012;67:51-60

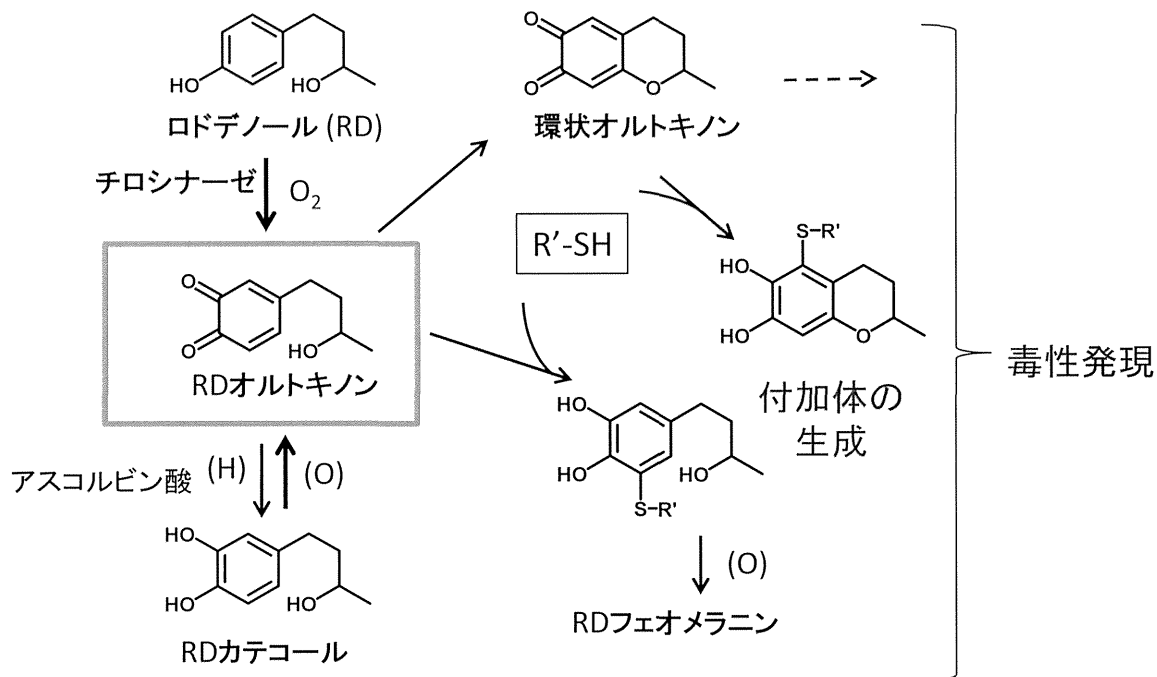


図1. ロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化

ロドデノールはチロシナーゼにより、オルトキノン体に代謝される。オルトキノン体は反応性が高く、環化、 H_2O 付加するほか、システイン・グルタチオンやタバコのSH基に付加反応する。システインが付加すると、フェオメラニン様の色素が生成することになる。これらの代謝物は活性酸素種の生成を介して、毒性を発揮すると推定される。(Ito et al, *Pigment cell Mel Res*, 2014a; Ito et al, *ibid* 2014b; Ito et al, *ibid* 2015)

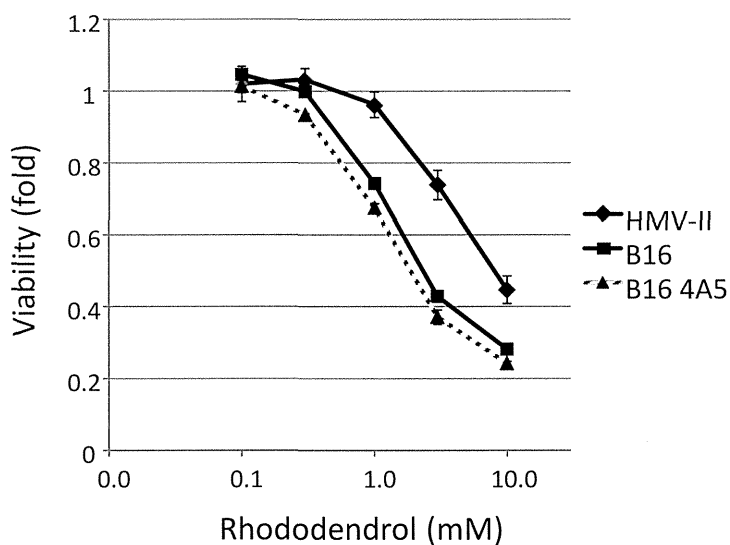


図2. 各種メラノーマ細胞の生存率に及ぼすロドデノールの影響

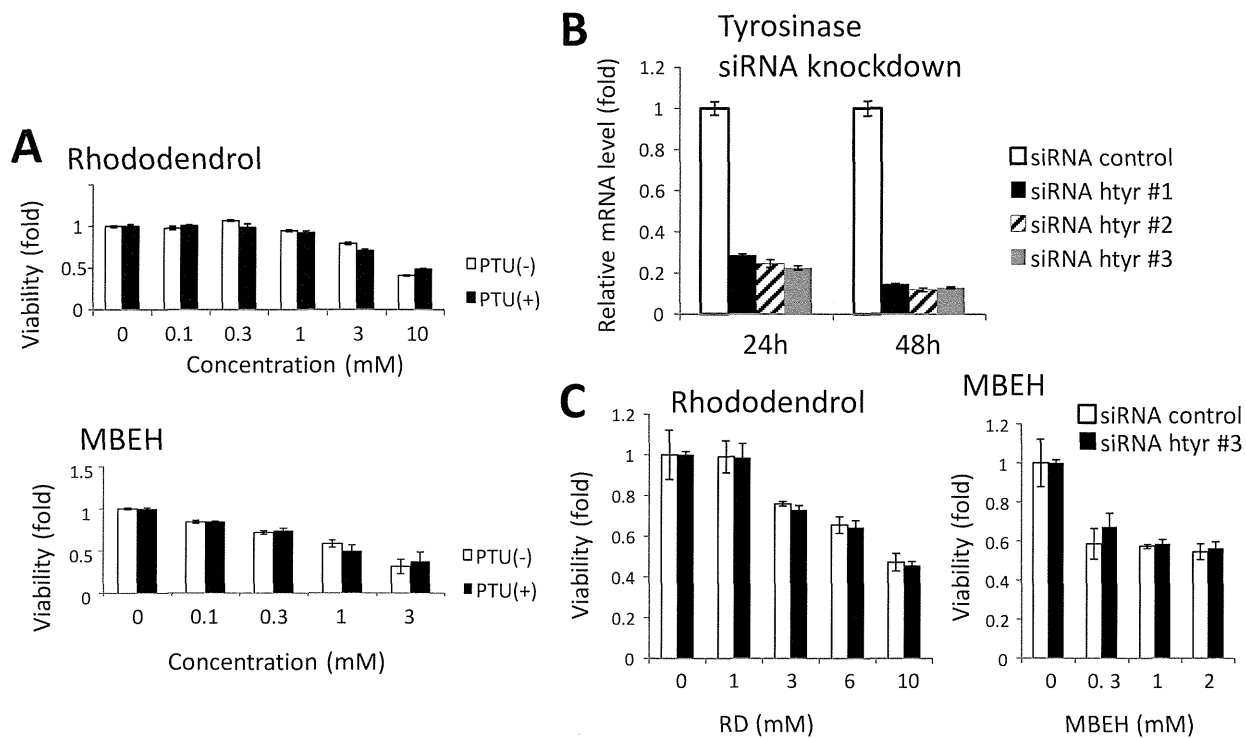


図3. メラノーマHMV-II細胞におけるロドデノールおよびMBEH細胞毒性に及ぼすチロシナーゼ阻害剤・siRNAノックダウンの影響

A.ロドデノール・MBEH 48時間処理の細胞生存率、チロシナーゼ阻害剤PTU(100μM), B. siRNAによるチロシナーゼのノックダウン効果。 C. ロドデノール・MBEH48時間処理の細胞生存率 24時間前にチロシナーゼsiRNA#3処理

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。Asian-Caucasian 由来メラノサイトは昨年度用いた African American 由来メラノサイトと比較して細胞色が薄く、チロシナーゼ活性が低かったが、ロドデノールおよびラズベリーケトンの細胞毒性はメラニン非産生細胞と同程度である点およびこれらの水酸化体の細胞毒性が強く表れる点が共通していた。HaCaT 細胞に対する水酸化体の細胞毒性はアスコルビン酸の添加により抑制された。また、アスコルビン酸はマッシュルーム由来チロシナーゼにより生成した *o*-キノンをカテコールに還元した。細胞毒性への *o*-キノンの強い関与が示唆された。

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, HPBol, 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1万9千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。

そこで昨年度、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

るとの報告のあるラズベリーケトンが各種細胞に与える影響やこれら化合物の細胞内酵素による化学変化について検討した。その結果、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African American由来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。

今年度は、Asian-Caucasian由来ヒトメラノサイトにおける細胞毒性、酸化防止剤による*o*-キノンの生成

抑制が細胞毒性に与える影響について検討した。また、試験管内酵素反応における酸化防止剤による *o*-キノンの還元の効果を検討した。

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 (DHPBol), 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 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°C で保存した。

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

ヒトメラノサイト細胞株 (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 Asian-Caucasian の新生児包皮表皮由来 (Cat No. KM-4009, No.01440) 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) で 1 週間培養した。

3. メラノサイト中のチロシナーゼ活性の測定

マイクロチューブに 2 × 10⁴ 個の細胞を集めた。緩衝液 A (100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 (0.545 M DMF)) 20 μl および緩衝液 B (100 mM Tris pH7.5 (1% NP-40, 0.01% SDS)) 20 μl を加えて振り混ぜながら 4°C で 2 時間インキュベートした。緩衝液 A 80 μl, 20 mM 3-methyl-2-banzothiazolinone hydrazone hydrochloride 60 μl, 5 mM DOPA 40 μl を添加し、37°C で色が変わるまで 0.5~1 時間インキュベートし、505

nm の吸光度をプレートリーダー SpectraMax M5 (Molecular Devices) で測定した。

4. 試験物質の細胞への曝露

培養した細胞を遠心分離により回収し、ヒトメラノサイトは 1.2 × 10⁵ cells/ml, HaCaT 細胞は 1.0 × 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、終濃度 0, 1mM となるようアスコルビン酸を加えて検液を調製した。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。

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。

5. 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 秒間の相対発光強度 (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相対発光強度の平均を 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相対発光強度の平均をバックグラウンドとした。

6. 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, 0.25, 0.5, 1, 2mM となるようアスコルビン酸を加えた。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。その後、HPLC で分析した。

7. HPLC

装置は下記のコンポーネントからなる島津製作所製システムを用いた。システムコントローラー：SCL-10A VP. オートインジェクター：SIL-10AD VP. ポンプ：LC-10AD VP × 2. カラムオーブン：CTO-10AC VP. フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M20A. HPLC 条件は以下のとおり。

カラム：Hydrosphere C18 (4.6 mm i.d. × 50 mm; particle size, 3 μm; YMC), カラム温度：40°C, 移動相：20% methanol with 0.02% TFA, 流量：0.6 mL/min, 検出：275 nm.

C. 研究結果

1. Asian-Caucasian 由来メラノサイトに対するロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性

昨年度報告したように、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2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示された。ラズベリーケトンも同様にDHPBoneに酸化される可能性が示された。そして、この水酸化体またはさらに酸化を受けたo-キノン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。

カネボウ化粧品の検討により、細胞の感受性には差があることが判明した。そこで、より感受性の高い細胞を探索するため、ロドデノールによる白斑が起きた日本人と共通点のある Asian-Caucasian 由来ヒトメラノサイトで検討を行った。

1週間培養した細胞を遠心分離により回収した際、細胞ペレットの色を観察した。昨年度検討した African American 由来メラノサイトは黒色であったが、Asian-Caucasian 由来メラノサイトはわずかに褐色を帯びた白色であった。次にチロシナーゼ活性を測定した。昨年度検討した African American 由来メラノサイトは $0.708 \text{ units}/2 \times 10^4 \text{ cells}$ であったのに対し、本メラノサイトは $0.391 \text{ units}/2 \times 10^4 \text{ cells}$ であった。

続いて、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3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：11.2 mmol/L, ラズベリーケトン：9.2 mmol/L, DHPBol：0.051 mmol/L, DHPBone：0.052 mmol/L であり、昨年度検討した African American 由来メラノサイト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。

2. アスコルビン酸添加の影響

チロシナーゼによるチロシンの酸化反応において、1段階の酸化の産物であるDOPAは放出されず、2段階目の酸化を受けたdopaquinoneが放出される、というメカニズムが提唱されている。ロドデノールについても、チロシナーゼとの反応産物は主としてo-キノンであり、これが細胞毒性を引き起こしている可能性が高いと考えられる。一方、HaCaT細胞にDHPBolを添加した場合の細胞毒性は、DHPBol自体が活性酸素種発生などにより毒性を表しているか、酸化酵素によるo-キノンの生成を経由するのか不明である。

アスコルビン酸はdopaquinoneと共存させるとこれをDOPAに還元することが知られている。DHPBolを培養細胞に添加する際、アスコルビン酸を共存させるとo-キノンの蓄積が抑えられる可能性があると考えられる。そこで、HaCaT細胞に対して1 mMのアスコルビン酸(AA)、アスコルビン酸ナトリウム(AA-S)またはアスコルビン酸2-グルコシド(AA-2G)をあらかじめ添加してからDHPBolを添加し、24時間後の生存率を比較した。

図4に示すように、アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムはDHPBolによる細胞毒性を低減させた。HaCaT細胞においても酸化によりo-キノンに変化した後に毒性を表している可能性が示唆された。

3. アスコルビン酸による試験管内チロシナーゼ反応への影響

メラノサイトに対するロドデノールの毒性を検討する際、細胞が持つチロシナーゼのロドデノール酸化活性を試験管内反応で評価できれば有用で

ある。昨年度の検討でロドデノールが試験管内反応でマッシュルーム由来チロシナーゼの基質となることが示された。しかし、DHPBol の生成量は少なかった。主生成物であるピーク A の構造は不明であり、単離生成を試みたが成功しなかった。また、ピーク A と DHPBol の他にも生成物が確認された。生成した *o*-キノンが非酵素的に化学変化した可能性がある。ロドデノール酸化活性の評価するアッセイ系としては不十分である。

そこで、アスコルビン酸の存在下でチロシナーゼ反応を行い、ロドデノールから生成した *o*-キノンを DHPBol に変換することを試みた。終濃度 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM および 2 mM のアスコルビン酸を添加してロドデノールをマッシュルーム由来チロシナーゼと 25°C でインキュベートし、15 分後の反応液を LC/MS で分析した。図 5 に示すように、0.5 mM 添加時では主生成物はピーク A であるが、1 mM 添加時には DHPBol が主生成物で他のピークはほとんど見られなかった。

D. 考察

被害が確認されている患者の症状は様々であるが、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、申請時には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。

昨年度検討した African American 由来メラノサイトと同様、Asian-Caucasian 由来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て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 1 段階目の酸化を受けた水酸化体または 2 段階目の酸化を受けた *o*-キノンに変換されてから毒性を示すと推測できる。

アスコルビン酸を 1 mM 添加すると、HaCaT 細胞に対する DHPBol の毒性が减弱した。還元能のないアスコルビン酸 2-グルコシドでは効果がなく、試験

管内反応でアスコルビン酸は *o*-キノンを DHPBol に還元していることから、HaCaT 細胞においても細胞毒性は *o*-キノンが引き起こしており、添加したアスコルビン酸を添加した場合は還元されたために毒性がなくなった可能性が示唆された。HaCaT 細胞において DHPBol を酸化した酵素の詳細は不明である。今後メラノサイトを用いて同様の検討を行う。

マッシュルーム由来チロシナーゼを用いた試験管内反応において、高濃度のアスコルビン酸は生成した *o*-キノンをカテコールに還元し、生成物の定量が容易になった。細胞死のメカニズムを考える上で、ロドデノールに対する感受性と細胞が持つロドデノール酸化活性との関連を調査する必要があると考えられ、アッセイ法として有用と考えられる。

E. 結論

Asian-Caucasian 由来メラノサイトは昨年度用いた African American 由来メラノサイトと比較して細胞の呈する色が非常に薄く、チロシナーゼ活性が低かった。しかし、このメラノサイトに対するロドデノールおよびラズベリーケトンの細胞毒性を検討したところ、African American 由来メラノサイトと同様に HaCaT と差がない点、またこれらの水酸化体の細胞毒性が強く表れた点が共通していた。

HaCaT 細胞に対する水酸化体の細胞毒性はアスコルビン酸の添加により抑制された。また、アスコルビン酸はマッシュルーム由来チロシナーゼにより生成した *o*-キノンをカテコールに還元した。細胞毒性への *o*-キノンの強い関与が示唆された。

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, 最上 (西巻) 知子, 五十嵐良明: ロドデノールの代謝とメラノサイトに対する細胞毒性. 第 41 回日本

毒性学会学術年会 (2014 年 7 月)

Takumi AKIYAMA, Kumiko SHIMIZU, Hideo FUJIMAKI, Tadashi UCHINO, Tomoko NISHI-MAKI-MOGAMI, Yoshiaki IKARASHI: Metabolic oxidation of rhododendrol and enhanced cytotoxicity in melanocytes. SOT2015 (2015 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

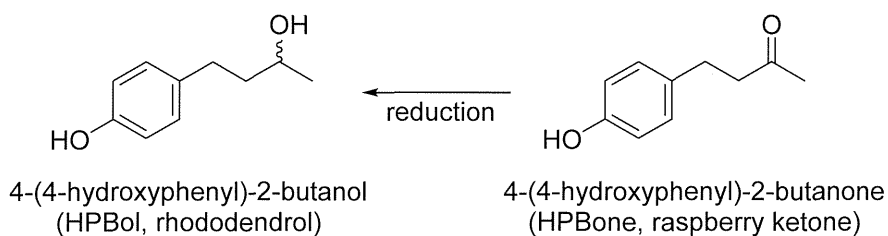


図 1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

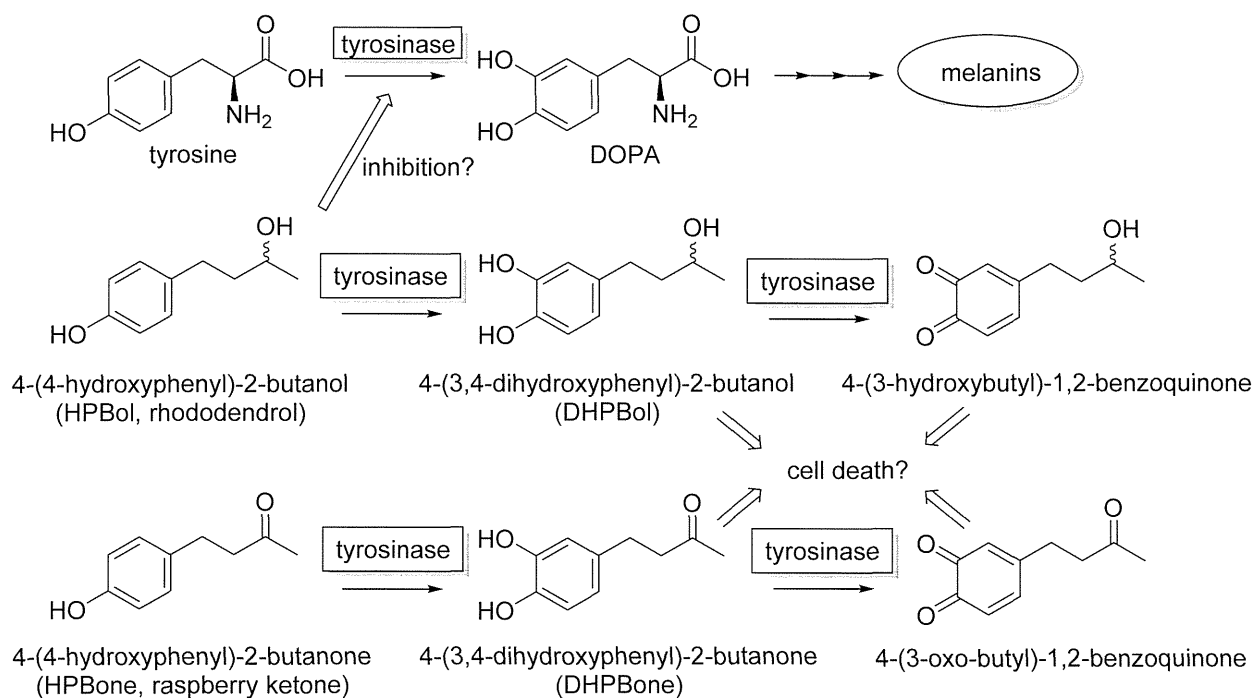


図 2. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

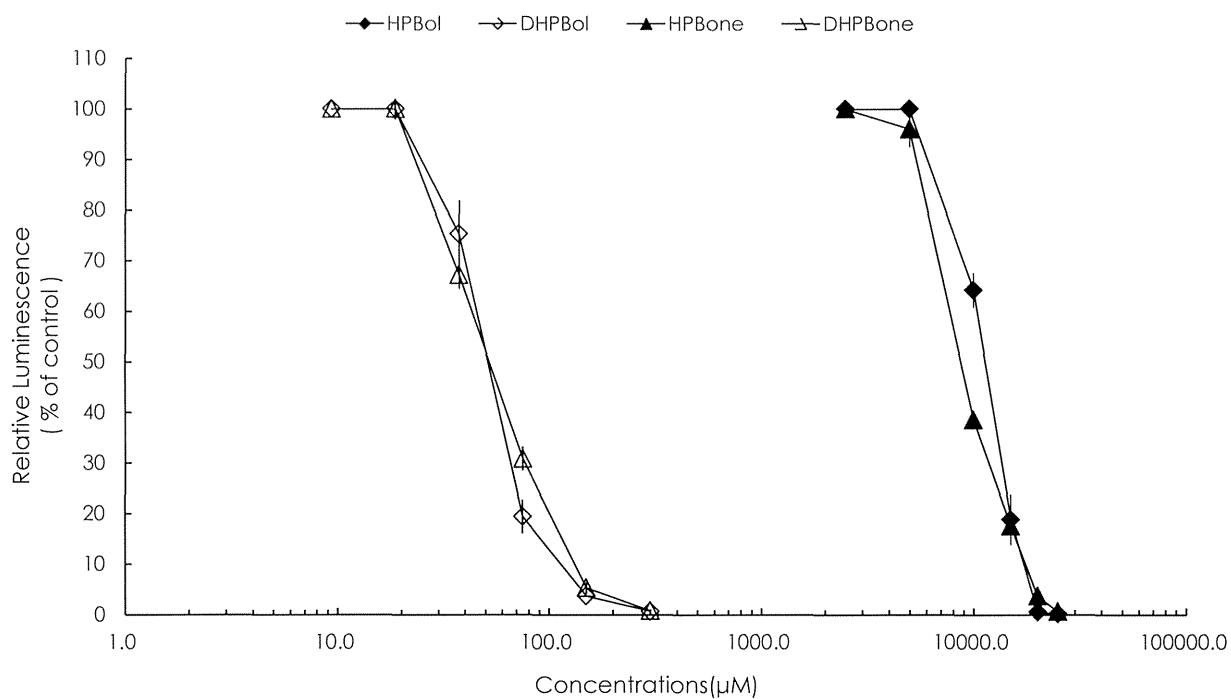


図 3. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した Asian-Caucasian 由来メラノサイトの生存率.

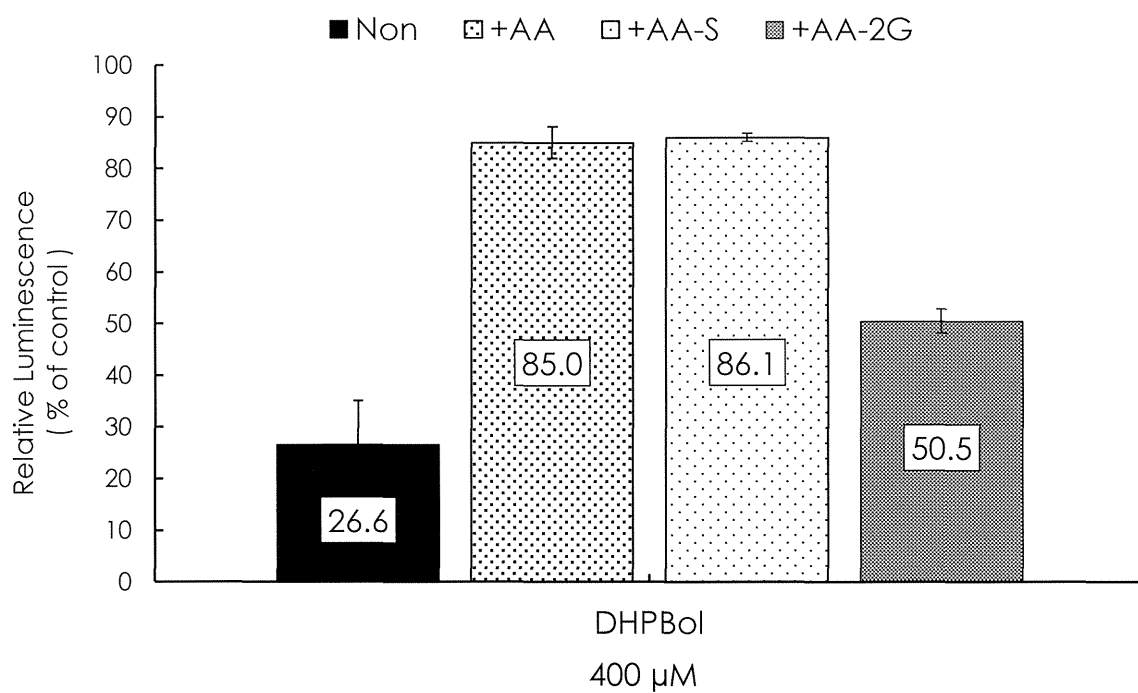


図 4. DHPBol の HaCaT 細胞に対する細胞毒性に与えるアスコルビン酸類の影響.

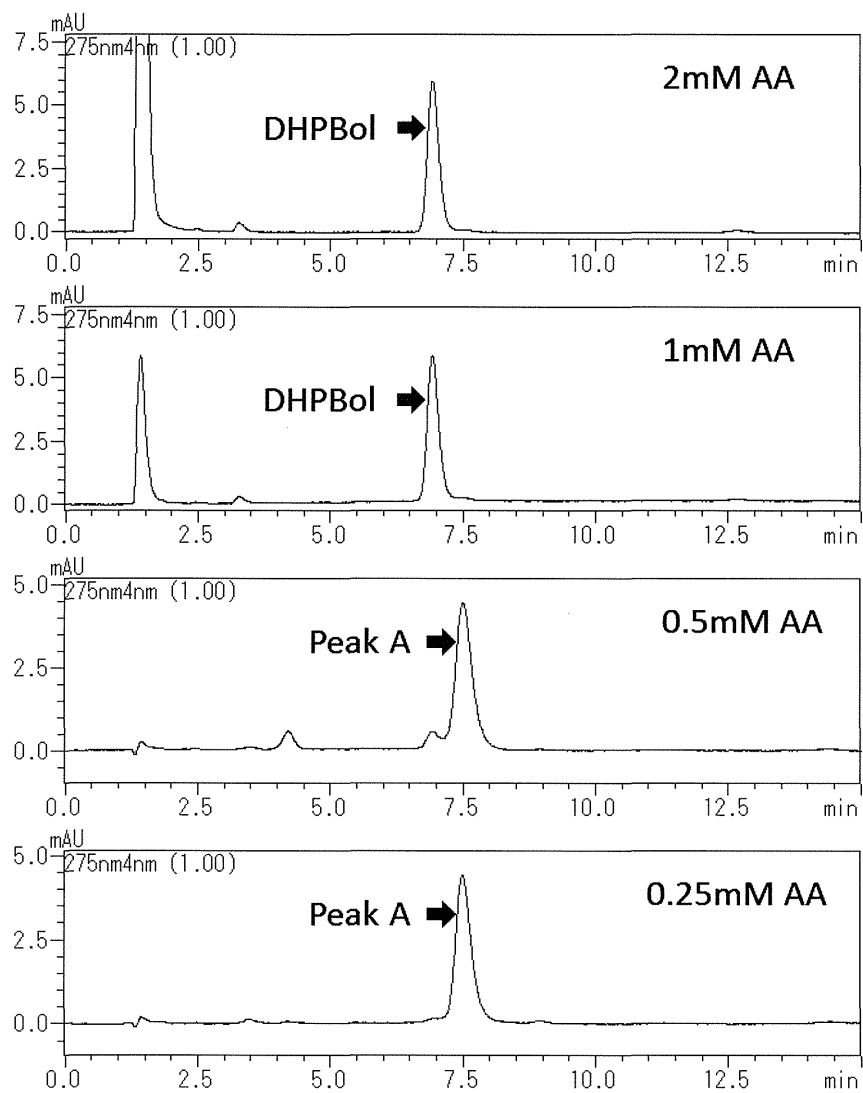


図 5. アスコルビン酸添加時のチロシナーゼ反応産物.

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)
平成 26 年度分担研究報告書

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
藤井まき子 昭和薬科大学薬剤学研究室 准教授
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

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、製造販売後の各段階における対応方策について提言等を行った。昨年度提言を行った副作用報告制度の強化及び製造販売後の安全管理の基準の改正に加えて、(1) 有効成分、効能効果、用法用量、新添加物等によって医薬部外品の区分を従来の 5 から 11 に細分化、それぞれについて承認申請時に添付すべき資料案を提案した；(2) 皮膚に適用する医薬部外品及びその有効成分の開発段階における安全性評価において検討すべき事項を示す「安全性評価ガイドライン（仮称）」を作成することとし、前臨床試験内容、及び *in vitro* 試験の利用や皮膚透過試験、さらには臨床試験を含む骨子をまとめた；(3) 新有効成分含有薬用化粧品の承認申請時に、医療用医薬品に準じて、臨床試験として皮膚科専門医の管理下のもとで 100 例以上（12 ヶ月）の長期安全性試験の実施を求めるべきとし、前記安全性評価ガイドラインに入れることとした；(4) 製造販売後調査として、原則として 1000 例、あるいは承認後 2 年を経過するまでの間、モニター店あるいはアンケートの製品添付等による製造販売後調査の実施と原則として 1 年毎の医薬品医療機器総合機構への報告を提言した。

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。市販後に、本品との関連性が疑われる白斑症例の報告があり、平成 25 年 7 月以降、製造販売業者により製品の自主回収が行われた。

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。

昨年度は副作用報告制度の強化に関して、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、との提言を行った。また、製造販売後の安全管理の基準（GVP）に関して、副作用報告の対象範囲の拡大に合わせて、GVP 省令も改正し、医療関係者からの情報や行政機関からの情報等も収集対象として追加するべきである、と提言した。さらに、薬用化粧品等の使用上の注意に関して、製品の使用を中止すべき症状として、現行の「赤み、はれ、かゆみ、刺激」に加え「色抜け（白斑等）や黒ずみ」を追記すべきである、と提言を行った。

B. 研究方法

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）、適正使用に関する注意喚起の方法、製造販売後調査の方法等を調査し、さらに医薬品におけ

る上記項目の現状についても調査を行い、今後の医薬部外品の安全性等に関する制度、情報収集及び解析の手法及び使用上の注意表示のあり方について検討した。具体的には、医薬部外品の承認申請区分の変更、皮膚適用に係る医薬部外品安全性評価ガイドライン（仮称）、長期投与（安全性）試験の試験設定、昨年度に引き続き使用上の注意の改訂、製造販売後調査ガイドライン案について検討を行った。

C. 研究結果及びD. 考察

昨年度の議論を受け、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. 医薬部外品の承認申請区分の変更

医薬部外品の承認申請に係る区分は従来5区分であった。区分1（新有効成分）は既承認の医薬部外品とその有効成分又は適用方法等が明らかに異なる医薬部外品（新医薬部外品）、区分2は既承認の医薬部外品の承認内容と同一性が認められる医薬部外品、区分2-2（新指定医薬部外品）は平成11年に医薬品から移行した製品群、区分2-3（新範囲医薬部外品）は平成16年に一般用医薬品から移行した製品群、区分3はそれ以外の医薬部外品、具体的には新添加物を含むものや新たな剤形が追加されるもの等であった。

申請区分1、2、3については申請時に添付すべき資料の範囲が異なっていたが、医薬部外品のきめ細かな審査を行うには、

区分2に関しては同一性の範囲をより明確にし、区分3については含量が異なるものや新添加物を含むもの等でより詳細な区分分けが必要と考えられたことから、申請区分の細分化の必要性や区分案、新たな区分において添付すべき資料の範囲について検討を行った。

その結果、下記のような新区分が適当との結論に達した。また、安全性に関する資料を研究班の議論に基づいて追加した。

区分1（新有効成分含有医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分が異なる又は適用方法が明らかに異なる医薬部外品。

区分2-1（新効能医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分は同一であるが、効能・効果が異なる医薬部外品。

区分2-2（新剤形医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分は同一であるが、剤形が異なる医薬部外品。

区分2-3（新含量医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分は同一であるが、配合量が異なる医薬部外品。

区分2-4（新配合医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分及びその配合量は同一であるが、既承認医薬部外品と有効成分の組合せが異なる医薬部外品。

区分2-5（新用法医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分は同一であるが、用法が異なる医薬部外品。

区分3（新添加物含有医薬部外品）：使用前例のない添加物を配合する又は使用前例のある添加物であっても前例を上回る量を配合する等の医薬部外品。

区分4（類似医薬部外品）：既承認品目と同一ではないが、新たに有効性、安全性に関する試験を実施しなくても、既承認品

目と同一性があるものに相当と判断し得る医薬部外品。

区分5-1（同一医薬部外品）：既承認医薬部外品と有効成分及びその配合量、有効成分の組合せ、効能・効果、用法・用量及び剤形が同一の医薬部外品、又は医薬部外品の各種製造販売承認基準に適合する医薬部外品。

区分5-1（新指定医薬部外品）：現行の区分2-2。

区分5-1（新範囲医薬部外品）：現行の区分2-3。

従来の区分との対応を図1に示す。また、新たな区分に申請する際に必要な資料の範囲を表1に示す。

新たな区分は平成26年11月21日付け薬食発1121第7号厚生労働省医薬食品局長通知「医薬部外品等の承認申請について」として発出された。

2. 安全性評価ガイドライン

新規性の高い医薬部外品については、製造販売後、短期間に多くの人に使用される可能性があり、開発段階において、製品の特性や想定される製品の使用方法等を考慮に入れた安全性に関するデータ収集・解析を十分に行う必要がある。そこで、医薬部外品及びその有効成分の開発段階における安全性等に係る非臨床試験、臨床試験の実施に関する検討や評価手法については、「安全性評価ガイドライン（仮称）」として検討すべき事項を取りまとめることとした。

安全性試験の内容については、平成18年7月19日付け事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集（Q&A）」

について」及び本研究班で議論された内容を取り入れた平成26年11月25日付け事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請に関する質疑応答集（Q&A）について」の新添加物の吸収・分布・代謝・排泄、光安全性等に関する考え方を取り込むこととした。

構成は以下の通りとすることとした。

1. 背景
2. 目的
3. 開発の考え方
4. 試験の実施
5. 代替法の利用について
6. 臨床試験についての注意点
7. 安全性に関する資料について
 - (1) 単回投与毒性試験
 - (2) 反復投与毒性試験
 - (3) 遺伝毒性試験
 - (4) がん原性試験
 - (5) 生殖発生毒性試験
 - (6) 局所毒性に関する資料
 - (ア) 皮膚一時刺激性試験
 - (イ) 連続皮膚刺激性試験
 - (ウ) 眼粘膜一時刺激性試験
 - (エ) 連続眼粘膜刺激性試験
 - (オ) 口腔粘膜一時刺激性試験
 - (カ) 口腔粘膜連即刺激性試験
 - (7) 皮膚感作性試験
 - (8) 光安全性試験
 - (9) 吸収・分布・代謝・排泄試験
 - (10) 長期投与安全性試験（臨床）
8. その他（検討中）

それぞれの試験は原則、医薬品毒性試験法ガイドライン、遺伝毒性試験ガイドライン、がん原性試験に関するガイドライン、OECDガイドライン等の公的に確立された試

験法に従って実施することとした。

吸収・分布・代謝・排泄については、実使用時の医薬部外品の適用経路が経皮のものは、原則、経皮吸収についての資料を必要とし、拡散セルを用いた *in vitro* 経皮吸収試験（*in vitro* 皮膚透過試験）による皮膚透過性および／または皮膚角層中濃度の測定を公知で汎用性も高いガイドラインやガイダンスに従って行うこととした。特に、経皮吸収性が高い場合および安全係数があまり大きくない場合などについては必要に応じて分布・代謝・排泄についての資料を、蓄積性が認められるものについては特定の組織や器官への蓄積性について確認した資料を必要とした。

臨床試験については次項で述べる。

なお、この安全性評価ガイドライン（案）は今後、厚生労働省から発出する予定となっている。

3. 長期投与（安全性）試験

現在、新有効成分含有薬用化粧品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。しかしロドデノール含有薬用化粧品による白斑発生を予測するには不十分であった。そこでヒトにおける長期使用時の安全性を確認するための、医療用医薬品の外用剤に準じた長期安全性試験について検討した。以上の長期投与（安全性）試験内容については、2. 安全性評価ガイドラインの(10)に組み込むこととした。

試験内容については、新医薬品の安全性評価の指針である ICH E1 ガイドラインを参考にし、白斑の発症率と発症期間を考慮し

て設定することとした。白斑の発症率については平成 21 年度厚生労働科学研究「白斑の診断基準及び治療指針の確立」による疫学調査、平成 18～20 年の日本皮膚科学会学術委員会による全国調査、ロドデノール含有薬用化粧品の白斑事例を参考にした。発症期間については日本皮膚科学会のホームページを参考にした。ただし、調査の目的や対象によるバイアスがかかっている可能性についても吟味する必要があるとの意見があった。

まず、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した。評価ポイント及び観察回数についても同様に皮膚科専門医と相談の上、設定すべきである。

必要な症例数と試験期間については、ICH E1 ガイドラインでは 300～600 例（6 か月）を対象症例数と定められているが、対象となるものが医薬部外品であり、かつ皮膚科専門医の管理下で実施されることから、当初の設定としては収集症例数を 100 例以上（12 か月）とした。また、6 ヶ月間投与して得られた成績をもって医薬部外品の承認申請が可能とし、その場合 12 ヶ月間使用の成績を承認前に追加提出することとした。

この検討を受けて、平成 26 年 11 月 25 日付け事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請に関する質疑応答集（Q&A）について」が発出された。

また、ロドデノール配合薬用化粧品のシリーズ製品、たとえば化粧水、乳液、クリームを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製品の重ね使用やシリーズ品の使用を想定した試験設定を行うべきという意見がある一方で、その困難

さも指摘された。

用量設定に当たっては塗布量と皮膚中濃度の関係が重要で、また作用メカニズムを考慮して行うべきであり、配合濃度を上げる方法と製品の塗布量を増やす方法について議論がなされ、皮内濃度が両者で同一の場合は塗布量を増やす方法で問題ないとの意見があった。

今後、2. 安全性評価ガイドラインに反映させる予定である。

4. 使用上の注意

化粧品の容器、外箱、添付文書等の使用上の注意については、「化粧品の使用上の注意事項の表示自主基準について（昭和 53 年 1 月 5 日付け薬発第 2 号厚生省薬務局長通知）」により、日本化粧品工業連合会の自主基準が示されており、薬用化粧品（医薬部外品）についても準用することとされている。この使用上の注意において、追加の注意喚起が必要かどうか昨年度本研究班で検討し、現行の「赤み、はれ、かゆみ、刺激」に加え「色抜け（白斑等）や黒ずみ」を追記すべきである、と提言を行った。

本年度は製品の適用部位及び使用方法等を踏まえ、対象範囲について継続して議論を行い、以下のような範囲とした。

○皮膚に適用する薬用化粧品及び化粧品は、原則として、今回の使用上の注意の改訂の対象とする。

例) 頭髪用化粧品類、化粧水類、クリーム乳液類、パック類、ファンデーション類、白粉打粉類、眉目類化粧品類、化粧用油類、洗顔料類

○以下の製品については、今回の使用上の注意の改訂の対象から除外する。

- 1) 必ずしも皮膚に直接適用しない化粧品類
例) 爪化粧品類、歯みがき類、香水類、マスカラ
- 2) 洗い流す用法で用いられ、皮膚への接触時間が短く、白斑の発症が想定しにくい化粧品類
例) 浴用化粧品類、石けん類、シャンプー、リンス、ボディシャンプー
- 3) 使用部位が唇に限定され、美白を目的とした成分を配合していない化粧品類
例) 口紅、リップクリーム

○洗顔料類については、メイク落としで因果関係の否定できない白斑の症例が報告されていること、また、その適用部位も考慮し、洗い流す用法の製品ではあるが、今回の使用上の注意の改訂の対象に含めることとする。

本改訂は平成 26 年 5 月 30 日付け薬食発 0530 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知「化粧品等の使用上の注意について」として発出された。

5. 製造販売後調査

現在、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。期間は 2 年間となっている。

昨年度の研究班における議論の際に出された、(1) 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、(2) 製造販売後調査にも皮

膚科専門医が関与すべきである 等の意見を踏まえ、新医薬部外品の製造販売後調査の実施方法に関するガイドラインの内容について議論を深め、以下のような製造販売後調査ガイドラインとすべきと提言した。

- (1) 製造販売後副作用調査及びその他文献調査等の安全性に関する調査を行うことにより実施する。
- (2) 製造販売後副作用調査は、調査予定例数は原則として 1000 例、調査実施予定期間は原則として承認後 2 年間とする。モニター店による副作用頻度調査又はアンケートの製品添付等による調査により実施する。
- (3) 得られた情報を社内に評価委員会を設置し、必要に応じ社外の専門家の意見を聴取して評価する。そして原則として製造販売承認日から 1 年毎に調査結果を医薬品医療機器総合機構に報告する。

研究班内にはすでに実施されている一般用医薬品の市販後調査における回収率の低さやリスクの高い使い方をしている使用者ほど回収率が低い可能性について意見があったが、多彩なルートでの副作用発生状況の収集を目的としており、何か問題があった場合にはアンケートが集まるのではと考えている。1つの情報収集チャンネルとして実施することは有用と考える。

本ガイドラインは厚生労働省から発出される予定となっている。

E. 結論

昨年度に引き続き、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につ