

201427051B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の
原因究明・再発防止に係る研究

平成 25 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告

- ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究 …… 1
川西 徹

II. 分担総合研究報告

1. 原因究明（臨床）に関する研究 …… 1 1
石川 治、土岐 清香、岸 史子
2. 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 …… 1 3
最上 知子
3. 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 …… 2 5
秋山 卓美
4. 再発防止に関する研究 …… 3 5
秋山 卓美、飯島 正文、川島 眞、杉林 堅次、藤井 まき子、
小島 肇、小野 敦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 4 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 4 7

I. 総合研究報告

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究

研究代表者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 所長

ロドデノールによる白斑発症の原因究明を臨床及び基礎の両面から進めるとともに、再発防止を目的とした新たな医薬部外品の承認審査・製造販売後安全対策の方策を検討した。

1. 発症機序の解明に係る調査研究

ロドデノール誘発性白斑と診断した症例を対象に追跡調査を行った。化粧品を1年以上使用していた症例が85%で、約半数は1年以内に脱色素斑が出現した。自験170例を、使用部位にロドデノール誘発性白斑が一致し、中止により色素が再生される典型例(141例)と、中止後も白斑が新生・拡大する症例や非使用部位に白斑が現れる非典型例(29例)に分類し、臨床的に比較検討した。年齢、化粧品使用数、使用期間、既往歴等、患者背景に差はなかったが、非典型例では、完全脱色素斑や紅斑を伴う症例が多かった。顔面頸部では色素が再生しやすいが、非典型例の躯幹四肢では拡大増悪例が多く、白毛やサットン現象など、免疫学的機序を介するメラノサイトの傷害を示唆する所見を確認した。

白斑発症の機序解明を目的に、ロドデノールならびに類似化合物について文献を調査し、ロドデノールの品質、代謝・細胞毒性について検証を行った。ロドデノールは原薬の純度に問題は無く、褐色モルモットに塗布すると、ヒトの症例のように表皮メラノサイトを著しく減少すること、メラノサイトのチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝活性化され、グルタチオン等との反応やタンパクを修飾することが報告された。本研究班においても、オルトキノン体が毒性発現に強く関わることを確認したが、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。職業性白斑の原因物質として知られる4-置換フェノール類は、直接作用に加え免疫を介した二相性のメラノサイト消失機序が知られており、代謝による毒性発現や細胞応答等において、ロドデノール作用との類似性が認められた。

2. 再発防止に向けた対応策の検討

白斑等健康被害の再発防止のため、非臨床、臨床評価及び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。即ち(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)医薬部外品の開発段階における前臨床試験内容、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「安全性評価ガイドライン(仮称)」を作成することとし、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、前記ガイドラインに入れることとした；(4)原則として承認後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を提言した。(5)企業から国への副作用報告制度の強化策として、個別症例報告を義務化する

とともに、白斑を想定して「治療に要する期間が 30 日以上 の症例」を重篤な副作用報告に加えるべきと提言した； (6) 添付文書の充実として、使用を中止すべき症状として白斑及び周辺組織での色素増強を念頭に「色抜けや黒ずみ」を加えることを提言した。

研究分担者

石川 治 群馬大学大学院医学系研究科教授
最上知子 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部長
秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部長

研究協力者

岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学教授
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
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
杉林堅次 城西大学薬学部教授
藤井まき子 昭和薬科大学准教授

A. 研究目的

ロドデノールを配合した薬用化粧品は、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が、本化粧品を使用後に白斑（肌がただらに白くなった状態）になったとの健康被害の報告が寄せられ、平成 25 年 7 月以降、製品の自主回収が行われた。本研究ではロドデノールによる白斑発症の原因究明を臨床及び基礎の両面から進めるとともに、再発防止を目的とした新たな医薬部外品の承認審査・製造販売後安全対策の方策を検討する。

ロドデノールによる白斑発症の臨床面からの原因究明を目的として、ロドデノール含有化粧品により白斑を生じたと考えられる患者について解析を行い、その特徴を明らかにする。

また日本皮膚科学会等でも、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いるが、ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序について、これらの報告の検証、確認を行うとともに、白斑を引き起こすことが報告されている既知物質である 4-置換フェノール類の文献情報を調査し、白斑発症機序について考察する。

さらに、以上の原因究明のための調査研究結果も踏まえ、再発防止の観点から、医薬部外品の、承認申請・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、さらには添付書類等への記載内容について提言することを目的とする。

B. 研究方法

1. 原因究明に関する研究（臨床解析）

2014 年 10 月までに群馬大学医学部附属病院皮膚科においてロドデノール誘発性白斑と診断した 70 症例を対象として追跡調査を行った。岡山大学病院及び関連病院を受診したロドデノール誘発性白斑症例 100 例について、患者背景、症状、既往歴、血液検査、病理学的検査、及び経過を比較、解析した。

（倫理面への配慮）

本研究に先立ち、患者には研究内容を説明し、文書による同意（承諾書）を得ている。

2. 原因究明に関する研究（基礎研究）

2-1. ロドデノール及び類似物質による白斑に関する調査

化学物質や抗メラノーマ薬候補により誘導される白斑、皮膚脱色素斑形成に関する論文を収集し調査した。また、ロドデノールの代謝・メラノサイト傷害性に関する論文ならびに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

「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」(参考資料)を調査した。

2-2. ロドデノールの品質及び代謝試験

薬用化粧品の原料として使われたロドデノール及び化粧品からロドデノールを抽出し、純度等を調べた。ヒトメラノサイトや角化細胞を用いてロドデノールの代謝と毒性について、またアスコルビン酸による還元反応を利用し、チロシナーゼ代謝物の変化と細胞毒性との関係について解析を行った。さらにマウスやヒトのメラノーマ細胞を用い、毒性発現とチロシナーゼの関与を検証した。

3. 再発防止に関する研究

医薬部外品の承認申請時から市販後の安全管理までの各段階を調査し、また、ロドデノール配合薬用化粧品の承認申請時にカネボウ化粧品から提出された資料や、本件の発生頻度も参考データとして参照した上で、承認申請区分の細分化、安全性評価法のあり方、長期投与(安全性)試験の方法(症例数、期間等含む)、表示による注意喚起、製造販売後調査方法、副作用に関する報告制度、製造後の安全管理基準について検討した。

C. 研究結果

1. 臨床解析

2013年7月～11月に当科のロドデノール誘発性脱色素斑専門外来を受診した患者は54名で、うち53名は女性であった。年齢分布は29歳～81歳、平均値55歳、中央値52.5歳であった。ロドデノール含有化粧品の使用開始から脱色素斑出現までの期間は、3ヶ月以下は11%、3～6ヶ月以下13%、6～12ヶ月以下24%、12～24ヶ月以下19%、24～36ヶ月以下15%、36ヶ月以上11%、不明は7%であった。ロドデノールのパッチテストを6例に実施したがいずれも陰性であった。脱色素斑部では表皮内のメラノサイトの消失、真皮脈管周囲のリンパ球浸潤、真皮へのメラニンの滴落がみられた。(平成25年度分担研

究報告書 石川)

ロドデノール誘発性白斑は原則として使用部位に一致し、中止により自然に色素は再生される(典型例)。しかし、中止後も白斑が新生・拡大する症例や、非使用部位にも白斑が現れる症例が存在した(非典型例)。自験170例を上記の基準に基づいて分類したところ、典型例141例、非典型例(遠隔拡大例)29例であった。この2群について患者背景、初診時現症、ロドデノール使用中止後1年の経過につき臨床的に比較検討した。年齢、化粧品使用数、使用期間、既往歴に両群間で差はなかったが、非典型例(遠隔拡大例)では完全脱色素斑、紅斑を伴う症例が多かった。1年後の経過では、顔面頸部は躯幹四肢に比べ色素が再生しやすく、非典型例の躯幹四肢では拡大増悪例が55.6%を占めていた。注目すべき点として、非典型例では白毛化やサットン現象など、メラノサイト傷害を示唆する所見を伴う症例を認めた(平成26年度分担研究報告書 石川)。組織学的解析において、メラノフェージの有無及びメラノサイトの残存率、CD8陽性細胞優位の細胞免疫応答像及び細胞浸潤度等は、非典型例、典型例および尋常性白斑例(対照群)において差はなかった。(平成26年度総括研究報告書)

治療においては活性型ビタミンD3軟膏、タクロリムス含有軟膏外用は外用無しの群と比較し色素再生率の差は出なかった。また、ビタミンC内服、光線療法においても治療効果に有意差はなかった。(平成26年度分担研究報告書 石川)プロトピック軟膏が有効というエビデンスは得られなかった。合併症としては、白斑周囲色素増強が問題になっている。(平成26年度総括研究報告書)

2. 基礎からの分析

基礎からの原因究明に関して、①ロドデノール及び類似化合物による白斑症状とその機序について文献情報を調査し、②ロドデノールの代謝とメラノサイト毒性について検討を行った。

2-1. ロドデノール及び類似物質による白斑発症

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、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-CAP やその誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4S-CAP 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。これらの化学物質は、黒色モルモットへの高濃度塗布やマウス皮下投与により皮膚の色素脱失を起こすことが確認されている。4-TBP や MBEH による皮膚メラノサイトの減少・消失については、メラノサイトへの直接傷害作用と免疫系を介する二相性の作用が示唆されている。

ロドデノールを褐色/黒色モルモットに高濃度塗布すると、皮膚メラノサイトと色素が減少し、引き続き 4-TBP と同様に脱色素斑が回復することが、カネボウ/花王による報告/論文において発表されている。(平成 25-26 年度分担報告書 最上)

2-2. チロシナーゼによる代謝とメラノサイト選択的な毒性発現

メラノサイトへの直接作用にはメラニン合成系が大きく関わる。ロドデノールは 4-TBP、MBEH、4-SCAP 誘導体と同様に、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 化合物に付加反応し、タンパクを修飾することが報告された。4-TBP、MBEH、4-SCAP 誘導体は活性酸素種 ROS を産生することが確認されている。オルトキノン体は ROS 産生に加え、グルタチオン等と反応して細胞内のレドックスバランスに影響し、細胞内酸化ストレスを増加することにより、メラノサイト選択的毒性発現をもたらすと考えられている。(平成 25-26 年度分担報告書 最上)

2-3. ロドデノールの品質、代謝及び細胞毒性

本研究班において、原料中及び製品中のロドデノールの鏡像異性体 (R 体と S 体) 存在比はほぼ

1:1 であること、ロドデノール中の合成原料のラズベリーケトンの重量比は 0.04%以下であり、原薬純度の問題は無いことを確認した。また、ロドデノールがチロシナーゼ及びメラノサイトによって水酸化体 (カテコール体) に代謝され、ラズベリーケトンとともにカテコール体がより強い細胞毒性を示すことを明らかとした。

ロドデノールのチロシナーゼ産物であるオルトキノン体は極めて不安定である。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培養でオルトキノンの生成を防ぐと、ロドデノールカテコール体の細胞毒性が低減されることを見いだした。(平成 25-26 年度分担報告書 秋山)

ロドデノールはチロシナーゼにより代謝されて毒性が増強し、このことがメラノサイト選択的毒性発現をもたらすと推定されることから、チロシナーゼによる毒性増強について、他の白斑誘導性 4-置換フェノール類を含めて検証を試みた。しかしながら、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り、高感受性細胞は入手できなかった。メラノーマ細胞の利用を検討したところ、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なく、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。(平成 26 年度分担報告書 最上)

2-4. 免疫誘導の可能性

4-TBP や MBEH による白斑は、長期間曝露された人の全てには発症せず、化合物接触部位以外にも広がる場合がある。MBEH の白斑発症には、メラニン色素合成の低下に加えて、色素細胞傷害性 T 細胞を介する自己免疫応答が寄与することが、塗布部への T 細胞浸潤や *in vitro* での MEBH 暴露メラノーマ細胞による T 細胞活性化実験により示唆されている。また TBP はモルモット皮膚感作性試験 GPMT、MBEH はヒトパッ

チテストにおいて、それぞれチロシナーゼ代謝やメラノサイトと関連した応答を誘導することが示されている。

4-TBP、MBEH、4-SCAP 誘導体は、チロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されると、SH 基やタンパク、チロシナーゼ等への付加反応性を獲得する。この結果、ハプテン抗原の形成あるいは、細胞傷害の増強により、ハプテン特異的免疫応答あるいは傷害されたメラノサイトに対する自己免疫応答誘導が可能となる。加えて、細胞死誘導、チロシナーゼ修飾に伴うメラノサイト抗原の放出、小胞体ストレス応答を介する炎症性サイトカイン産生など、(自己)免疫誘導につながる応答が報告されている。

ロドデノールについては、動物の皮膚感作性や光感作性試験では概ね陰性と報告されているが、4-TBP、MBEH、4-SCAP 誘導体と同様に、チロシナーゼ代謝活性化によるタンパク修飾や、小胞体ストレス応答など、免疫誘導につながる応答が報告されている。(平成 25-26 年度分担報告書最上)

3. 再発防止策

非臨床、臨床及び製造販売後のそれぞれの段階において安全性を担保するよう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

医薬部外品については承認申請区分の整備が十分ではなかった。そこで既承認品と新規申請品との同一性の範囲を明確にし、有効成分、効能効果、用法用量、新添加物等相違部分によって細分化するために、新たな区分とその区分において添付すべき資料の範囲を決定した。(平成 26 年度分担研究報告書 再発防止)

2) 安全性評価ガイドライン

主に皮膚適用医薬部外品の開発段階における前臨床試験内容の充実、及び動物代替試験の取り扱いや皮膚透過試験、さらには臨床試験を含む安全性評価ガイドライン素案の作成を行った。平成

18 年事務連絡「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」、及び平成 26 年事務連絡「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。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内容とすることを決定した。(平成 26 年度分担研究報告書 再発防止)

3) 長期投与 (安全性) 試験

白斑の原因となったロドデノール含有薬用化粧品では、承認申請時に臨床試験を行っていたが、白斑の発生を予知できなかった。そこで、再発防止の観点から臨床試験を充実させるために、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長期投与試験を提案した。即ち、皮膚科専門医の管理下で臨床試験を構築、実施、判断するとした。収集症例数は 100 例以上 (12 か月) とし、6 ヶ月間で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。(平成 26 年度分担研究報告書 再発防止)

4) 使用上の注意

薬用化粧品の使用上の注意では、注意すべき症状として白斑を想定したものはなかった。そこで、化粧品の使用上の注意事項の表示の「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、と提言を行い、さらに、本注意の対象範囲を決定した。(平成 26 年度分担研究報告書 再発防止)

5) 製造販売後調査

従来、明確でなかった新医薬部外品の製造販売後調査の実施方法の内容を議論した。調査例数は原則として 1000 例、実施期間は原則として承認後 2 年間とする。本調査は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こととする。得られた情報は社内評価委員会、必要に応じ社外の専門家の意見を聴取して評価、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こととして提言した。(平成26年度分担研究報告書 再発防止)

6) 副作用報告

今回のロドデノールによる白斑は、製造販売業者による副作用情報の収集体制の不備及び情報入手後の国への報告等の対応の遅れも被害拡大の一因と指摘されている。そこで、副作用の情報を迅速に把握し必要な安全対策をすることにより、健康被害の拡大を防ぐことを目的として義務付けられている副作用等の国への報告の範囲を拡大することが必要と考えられた。医薬部外品・化粧品の場合、学術論文や学会報告等の研究報告のみが報告対象とされていた。個別症例報告を法令上義務化するとともに、対象範囲を重篤な副作用症例に加えて、治療に要する期間が30日以上 の症例も含むよう拡大することを求めた。(平成25年度分担研究報告書 再発防止)

7) 製造販売後の安全管理の基準 (GVP)

GVP 省令において製品の安全性に関する情報の収集、検討及びその結果に基づく必要な措置の立案、実施が義務付けられている。医薬部外品・化粧品の製造販売業者については、「学会報告、文献報告その他研究報告に関する情報」及び「その他安全管理情報」のみが収集対象とされていた。研究班は、収集対象として医療関係者からの情報や行政機関からの情報等を追加すべきと意見した。(平成25年度分担研究報告書 再発防止)

D. 考察

1. 原因究明に関する検討 (臨床解析)

ロドデノール含有薬用化粧品使用によると考えられる白斑患者の追跡調査からは、少なくとも2つの白斑発症機序が関係していることが推定される。すなわち、1つはロドデノール代謝物による直接的メラノサイト傷害によるものであり、使用中によりロドデノール代謝産物が枯渇する

ことによりメラノサイト傷害は止み、白斑は軽快・治癒に向かう。これらは、典型例における白斑の発症機序と考えられる。もう1つは、免疫学的機序を介する持続的な間接的メラノサイト傷害である。すなわち、傷害を受けた、あるいはアポトーシスに陥ったメラノサイト由来の新規抗原が生体に認識されることにより抗原反応性の免疫担当細胞群を誘導し、これらが持続的に正常メラノサイトを攻撃するという機序である。この機序によって白斑の新生・拡大を説明できる。この免疫学的機序を証明し、詳細に解明することが難治例の治療法確立には不可欠である。また、非典型例を臨床的及び組織的に尋常性白斑と鑑別することは困難であり、ロドデノール誘発性皮膚障害の重症度、臨床経過と病型によって救済の重み付けをする必要があると考える。

2. 原因究明に関する検討 (基礎からの解析)

2-1. 類似化合物による白斑症状事例とその機序

4-TBP や MBEH などのフェノール/カテコール誘導体については、工場労働での曝露などにより職業性白斑を生じた事例が報告され、黒色モルモットで皮膚色素脱失作用が確認されている。また 4-SCAP やその誘導体は抗メラノーマ薬候補として研究が進められ、メラノーマや皮膚メラノサイトを選択的に傷害する。これら 4-置換フェノール誘導体の場合、皮膚色素脱失のメカニズムは、メラノサイトへの直接作用と免疫系を介する二相性の作用が想定される。メラノサイトへの直接作用にはメラニン合成系が大きく関わり、メラニン合成阻害作用とともに ROS 産生が確認されている。チロシン類似の 4-置換フェノール誘導体がチロシナーゼで代謝されて酸化ストレスを増大し、細胞を傷害する機序が推定されている。

4-TBP や MBEH、4-SCAP 誘導体では、免疫応答の誘導も色素脱失に寄与する。チロシナーゼ代謝によるハプテン抗原形成によりハプテン特異的な免疫応答、加えてメラノサイトへの自己免疫の誘導が、発症の個人差、全身性の進行、病変部への細胞障害性 T 細胞の浸潤などから予測さ

れている。

2-2. ロドデノールの品質及びメラノサイト傷害性

ロドデノール原薬の純度はほぼ 100%で、白斑はロドデノールに由来するものと考えられた。ロドデノールを褐色/黒色モルモットに高濃度塗布し、皮膚メラノサイトと色素の減少、4-TBP と同様の脱色素斑の回復が、カネボウ化粧品報告ならびに花王による論文において発表されている。

ロドデノールは、4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼにより反応性の高いオルトキノン体への代謝が報告されており、代謝活性化とメラノサイト選択的毒性との関わりが推定される。またロドデノールの毒性は細胞のチロシナーゼ活性に依存しており、メラノサイトは感受性の異なる 2 群に分かれることが報告された。本研究班において、アスコルビン酸を用いた還元が毒性を抑制する結果を得たことから、オルトキノン体の毒性が示唆される。一方カネボウ報告/花王の報告/論文では、ロドデノールによる ROS 産生は検出されていない。メカニズム解明のためには、4-TBP や MBEH との比較解析が必要とされるが、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から、チロシナーゼによる代謝や毒性増強を安定して評価できる細胞系の確立が必要となる。

ロドデノールは、動物を用いた感作性・光感作性試験ではおおむね陰性であったが、ヒト患者では遠隔部に白斑が拡大増悪した臨床症例が認められている。4-TBP や MBEH、4-SACP 誘導体と同様に、免疫誘導によるメラノサイト傷害の可能性が示唆されることから、さらなる解明が必要と思われる。

3. 再発防止策

医薬部外品の承認申請・審査にあたっては、特に、安全性、作用緩和な範囲内の有効性及び品質を評価することが重要である。昨年度の研究班における検討を踏まえ、申請時の添付資料の範囲を定めるとともに、従来の 5 つの申請区分から細

分化して、新たに 11 の申請区分を設けることが決められ、医薬食品局長通知として発出されている。

ロドデノールは新有効成分で、含有薬用化粧品の承認申請時には臨床試験としてヒトパッチ試験及び効能・効果に関するヒト使用成績試験が実施されていたが、今回の健康被害を予見することができなかった。実施方法に改善が必要として、長期安全性試験について具体的な症例数と期間を示し皮膚科専門医の管理下で実施するべきとした。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、本件については医薬部外品であり、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。使用方法を考慮した臨床試験の用量設定について議論があり、塗布量と皮膚中濃度との関係が重要であることが確認された。

使用上の注意において、白斑及び周辺組織での色素増強を念頭に、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「色抜けや黒ずみ」を追記する追加の注意喚起が必要とした。また、気付かないうちに白斑が生じていた症例を踏まえ、肌に異常が生じていないかよく注意して使用するような注意喚起が必要とした。改訂は医薬食品局長通知として発出されている。

新医薬部外品の製造販売後調査の実施方法について検討を行った。きめ細かな情報収集を行うべきであるとし、得られた情報を社内外で十分に評価し報告する体制作り重要であることが確認された。検討を元に製造販売後調査ガイドラインが厚生労働省から発出される予定となっている。

製造販売業者による副作用情報の収集体制の不備及び情報入手後の国への報告等の対応の遅れが被害拡大の一因であると指摘されている。研究班は、医薬部外品・化粧品について副作用報告制度の強化が必要であると考え、個別症例報告を法令上義務化するとともに、白斑を想定し「治療

に要する期間が 30 日以上」の症例」を重篤な副作用に加え報告対象に含めるべきと提言した。また製品の安全性に関する情報が、社内で一元的に扱われていなかったことが指摘されている。副作用報告の対象範囲の拡大に合わせて、医療関係者からの情報や行政機関からの情報等も GVP 上の収集対象として追加するべきであると考えた。研究班の意見を踏まえ、GVP 省令が改正されている。

さらに、医薬部外品の開発段階における前臨床試験方法の拡充を目的に「安全性評価ガイドライン（仮称）」を作成することとしており、臨床長期安全性試験の内容も組み込み、その骨子を作成した。今後、動物代替試験の取り扱いや皮膚透過性試験など具体的な内容について取りまとめる予定である。

E. 結論

1. ロドデノールを褐色モルモットに高用量塗布するとメラノサイトが著しく減少し、ヒトにおける臨床症状（白斑）と類似の結果が得られることを文献および報告の調査により確認した。

2. ロドデノール原薬を分析したところ、不純物等に関する品質面に問題はないことを確認した。

3. 細胞実験および文献調査により、ロドデノールはメラノサイトのチロシナーゼによりオルトキノン体により代謝活性化され SH 基との付加反応性を獲得するとともに、より強力な細胞毒性を発現することを確認した。この反応が白斑発症の引き金になることが示唆されるが、用いるメラノサイトの細胞間で感受性に大きな差がみられた

4. ロドデノール誘発性白斑症患者では、化粧品の使用中止後も脱色素斑が新生・拡大する症例や、非使用部位に脱色素斑が現れる症例が存在した。これらの非典型例では白毛やサットン現象など、免疫学的機序を介するメラノサイト傷害を示唆する症例も認められた。

5. 既に白斑誘導が報告されている 4 置換フェノール類の作用および作用メカニズムに関する文献調査を行い、ロドデノールの作用との類似性を

考察した。

6. 薬用化粧品による白斑等の再発防止の観点から、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枠組みの改善のため、以下の提言および検討を行った。

(1) 承認申請区分の見直しおよび各添付資料に関する提言

(2) 承認申請に必要な安全性評価項目と内容の見直しおよび安全性評価ガイドライン策定に向けた検討

(3) 承認申請に必要な臨床長期安全性試験内容の検討

(4) 製品の製造販売後調査内容の整備に関する提言

(5) 副作用報告制度の強化に関する提言

(6) 白斑事例を考慮した使用上の注意の改訂に関する提言

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

塩見真理子、青山裕美、岩月啓氏. ロドデノール誘発性脱色素斑 Rhododenol-induced leukoderma の臨床. 皮膚病診療, 36, 590-595 (2014).

2. 学会発表

岸 史子, 天野博雄, 茂木精一郎, 石川 治. 当院におけるロドデノール関連脱色素斑患者のまとめ. 第 81 回日本皮膚科学会群馬地方会 (2013 年 12 月)

土岐清香, 岸 史子, 天野博雄, 茂木精一郎, 石川 治. 当科におけるロドデノール関連脱色素斑患者の追跡調査. 第 86 回日本皮膚科学会群馬地方会 (2015 年 3 月)

塩見真理子、青山裕美、岩月啓氏 (岡山大学皮膚科). 遠隔部位に脱色素斑を生じたロドデノール誘発性脱色素斑症例 12 例の検討. 日本皮膚

科学会雑誌, 124(4), 811 (2014) (2014 年会議録)

塩見真理子、木村麻耶、山崎修、青山裕美、岩月啓氏、井上雅子、鈴木規弘、山田琢、片山治子。岡山大学と関連病院におけるメラニン産生抑制剤使用後に発症した白斑症例 16 例の検討。日本皮膚科学会雑誌, 123, 2287 (2013) (2013 年会議録)

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

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)

Akiyama, T., Shimizu, K., Fujimaki, H., Uchino, T., Nishimaki-Mogami, T., Ikarashi, Y. 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

II. 分担総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」

分担研究報告書(総合研究報告書)

原因究明(臨床)に関する研究

研究分担者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学	教授
研究協力者	土岐 清香	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学	助教
研究協力者	岸 史子	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学	助教

2013年8月から2014年10月までに群馬大学医学部附属病院皮膚科においてロドデノール誘発性白斑と診断した70症例を対象として追跡調査を行い、臨床的解析を行った。

A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状を呈した患者の使用中止後の追跡調査を行い、使用中止後の白斑症状の経過を明らかにする。

B. 研究方法

2013年8月から2014年10月までに群馬大学医学部附属病院皮膚科においてロドデノール誘発性白斑と診断した70症例を対象とし、問診および定期的受診により得られたデータを用いて臨床的に解析した。

(倫理面への配慮) 患者全員から文書によるインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

ロドデノール誘発性白斑は原則として使

用部位に一致し、中止により自然に色素は再生されるのが典型例である。しかし、中止後も白斑が新生・拡大する症例や、非使用部位にも白斑が現れる非典型例が存在する。自験例を上記の基準に基づいて分類したところ、典型例(57例)、非典型例(13例)であった。この2患者群について患者背景、初診時現症、ロドデノール使用中止後1年の経過につき臨床的に比較検討したが、年齢、化粧品数、使用期間、既往歴に両群間では差はなかったが、非典型例では完全脱色素斑、紅斑を伴う症例が多かった。1年後の経過では、顔面頸部は躯幹四肢に比べ色素が再生しやすく、50%以上色素再生が認められた割合は典型例では顔面頸部88.5%、躯幹四肢34.7%、非典型例：顔面頸部46%、躯幹四肢3.2%であった。さらに

非典型例の軀幹四肢では拡大増悪例が55.6%を占めていた。注目すべき点として、非典型例では白毛化やサットン現象など、免疫学的機序を介するメラノサイト障害を示唆する所見を確認できた。治療に関しては、活性型ビタミンD3軟膏、タクロリムス含有軟膏外用は外用無しの群と比較し色素再生率の差は出なかった。また、ビタミンC内服、光線療法においても治療効果に有意差はなかった。

D. 考案

これまでの追跡調査からは、少なくとも2つの白斑発症機序が推定される。なわち、1つはロドデール代謝物による直接的メラノサイト傷害によるものであり、使用中止によりロドデノール代謝産物が消失することによりメラノサイト傷害は止み、白斑は軽快・治癒に向かう。これらは、典型例における白斑の発症機序と考えられる。もう1つの機序は、免疫学的機序を介する持続的な間接的メラノサイト傷害である。すなわち、傷害を受けた、あるいはアポトーシスに陥ったメラノサイト由来の新規抗原が生体に認識されることにより抗原反応性の免疫担当細胞群を誘導し、これらが持続的に正常メラノサイトを攻撃するという機序である。この機序によって白斑の新生・拡大を説明することができる。

E. 結論

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状を呈した患者の約8割（すなわち、典

型例）は、患者により程度は異なるものの自然軽快傾向を示した。一方、約2割の患者では白斑症状が拡大・新生しており、このような患者に対する治療法の確立が急務である。そのためには、非典型例における白斑の発症機序を解明することが不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 岸 史子, 天野博雄, 茂木精一郎, 石川 治: 当院におけるロドデノール関連脱色素斑患者のまとめ. 第81回日本皮膚科学会群馬地方会 2013.12.19 前橋

2. 土岐清香, 岸 史子, 天野博雄, 茂木精一郎, 石川 治: 当科におけるロドデノール関連脱色素斑患者の追跡調査. 第86回日本皮膚科学会群馬地方会 2015.3.19 前橋

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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白斑症状に関する調査研究

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

ヒトや実験動物の皮膚に白斑様症状を誘導する化学物質について文献調査を行った。代表的なクラスが「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」であり、職業的白斑の原因物質として知られる 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)誘導体は特に顕著な作用を示す。これらの 4-置換フェノール類は、チロシナーゼにより代謝されて活性酸素種 ROS を産生し、皮膚のメラノサイトを選択的に傷害する直接作用に加え、免疫を介する二相性の作用がメラノサイト消失をもたらす機序が明らかにされており、個人差の大きい白斑発症との関連が推定されている。

ロドデノールについては、褐色モルモットにおいて皮膚色素とメラノサイトを減少し、培養メラノサイトにおいてはチロシナーゼ活性に大きく依存する毒性を発揮すること、チロシナーゼによりオルトキノン体へ代謝活性化され、グルタチオン等 SH 基への付加反応やタンパクを修飾することが報告された。本研究班においても、オルトキノン体が毒性発現に強く関わることを確認したが、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。チロシナーゼによる代謝活性化と毒性発現に加え、小胞体ストレス応答誘導などロドデノールの作用には、上記 4-置換フェノール類の作用と極めて高い類似性が認められた。

A. 研究目的

ロドデノール含有化粧品の使用者に生じた白斑症状の原因究明のために、類似化合物による白斑の事例およびそのメカニズムについて、文献ならびに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「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」について情報を調査した。また、ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序として、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に着目し、白斑誘導性 4-置換フェノール類の文献調査を行うとともに、メラノーマ細胞を用いて検証した。

B. 研究方法

化学物質により誘導される白斑、皮膚脱色素斑形成に関する論文を、vitiligo、depigmentation、phenol、chemical leukoderma 等を検索語として探索した。内容の検討にあたっては論文の被引用数も参考とした。また上記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との比較検討を行った。

ま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 (Stealth™ 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、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. 化学物質による白斑・脱色素斑症例

化学物質に接触したり曝露されたりすることにより皮膚に白斑/脱色素斑が生じる現象は古くから知られており、最初の報告は1939年に遡る。ゴム手袋に含まれるヒドロキノンモノベンジルエーテル(モノベンゼン, MBEH)に曝露された工場労働者48人中25人に白斑が発症し、ヒトおよび黒色モルモットの皮膚に塗布すると色素脱失が起こったことが紹介されている(Cummings and Nordlund, 1995)。1977年には英国で4-tert-ブチルフェノール(4-TBP)を扱う工場労働者198人のうち54人に発症した事例がLancetに報告されている(James *et al*, 1977)。このような職業性白斑は特にフェノール誘導体に大量曝露された工場労働者に高頻度に発生しており、動物実験を含めた詳細な文献調査に基づき、皮膚のメラノサイトを選択的に減少、あるいは消失させて白斑・脱色素斑形成を誘導する化学物質の代表的なクラスが「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」であることが報告されている(Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004) (図1)。置換基の側鎖が長いノニルフェノールやオクチルフェノールを扱う工場労働者には白斑は認められないが異論もある(James *et al*, 1977)。

白斑の原因とされる多くの化合物は主に接触した場所のみ局所的な色素脱失を起こすが、化合物によっては白斑は曝露された場所から離れた場所にも広がる。4-TBPおよびMBEHは特に顕著な作用を有しており、作用機構の研究が進められている。

2. 化学物質による実験動物での皮膚色素脱失

職業性白斑がはじめて報告されたMBEHが皮膚色素脱失を起こすことは、黒色モルモットを使って確認されている(Peck and Sobotka, 1941)。MBEHを5ヶ月間混餌投与しても外皮に影響は認められなかったが、皮膚に50%軟膏あるいはエーテル溶液を塗布すると数週間から数ヶ月で色素が消失した。

4-TBP およびそのチロシナーゼによる代謝産物4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)についても黒色モルモットを用いて検討され、4-TBP および 4-TBC の10%DMSOあるいはプロピレングリコール溶液を3週間毎日皮膚に塗布すると強力な色素脱失が生じた。色素低下は3ヶ月までに回復したことが報告されている(Gellin *et al*, 1970)。

アルキル置換カテコール類の脱色素作用についても、黒色モルモットを用いて構造活性相関が検討されている。1~10%含有のクリームを皮膚に1ヶ月間塗布すると、4-イソプロピルカテコールに最も強力な色素脱失効果が認められ、適用部位の皮膚からはメラノサイトや色素顆粒が消失した。この報告では脱色素化合物に分類されるメルカプトアミン類も評価し、N-(2-メルカプトエチル)-ジメチルアミンに弱い効果を認めている(Bleehen *et al*, 1968)。

4-S-システアミルフェノール(4-SCAP) (図1)やその誘導体NPr-4-SCAPは、抗メラノーマ薬候補として研究が進められており、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)。

3. メラノサイト選択的な毒性発現—チロシナーゼによる代謝活性化と酸化ストレス仮説

4-TBP および MBEH はチロシナーゼを阻害しメラニン合成を低下するとともに、メラノサイトを選択的に傷害することにより皮膚色素脱失が誘導されると考えられている。これらの化合物は *in vitro* で皮膚角化細

胞(ケラチノサイト)よりメラノサイトに高い毒性を示す (Yang *et al*, 2000; Hariharan *et al*, 2010) (表 1)。

皮膚色素であるメラニンにはチロシナーゼを初発酵素とする複数の過程を経て合成される(図 2)。4-TBP および MBEH はメラニン前駆体であるチロシンに似た構造を持ち、チロシナーゼを阻害するが (Yang *et al*, 1999; van den Boorn *et al*, 2011a)、チロシナーゼにより代謝されてメラノサイト選択的な毒性を発現する機序が提唱されている。

チロシンがチロシナーゼによりドーパキノンに転換されると同様に(図 2)、4-TBP もチロシナーゼにより、オルトキノン体である *tert*-ブチル-*o*-ベンゾキノンに代謝される(図 3 左)。これに伴い、セミキノンフリーラジカルやパーオキシド、活性酸素種 ROS 産生が促進され細胞を傷害する機序が提唱され (Boissy and Manga, 2004)、実際に 4-TBP 処理メラノサイトでは ROS 産生が促進することが示されている (Manga *et al*, 2006)。同様にオルトキノン体に代謝される MBEH も (図 3 右) (Manini *et al*, 2009)、メラノサイトでは ROS 産生を増加する (van den Boorn *et al*, 2011a)。

4-TBP の代謝により生じる酸化ストレスにより、遺伝的に弱いメラノサイト、例えば細胞内のラジカルスカベンジ系に欠陥を持つような細胞が傷害される可能性が想定されている。白斑症 (vitiligo) の患者では表皮メラノサイトにおける過酸化水素レベルが高いことが知られており (Dell'anna and Picardo, 2006)、また白斑患者由来のメラノサイトは培地にカタラーゼを添加すると 4-TBP による細胞毒性が低減することから (Manga *et al*, 2006)、白斑発症には酸化ストレスに対するメラノサイトの耐性/感受性が大きく関わっており、4-TBP による酸化ストレスの増加が発症の引き金になる可能性が推定されている (Manga *et al*, 2006; Boissy and Manga, 2004)。

4-TBP や MBEH の細胞毒性は細胞のチロシナーゼレベルとは一致しないが、メラニン合成系とは密接に関わることが報告されている。チロシナーゼを欠損するメラノサイトにおいても 4-TBP の細胞毒性は認められ、チロシナーゼを過剰発現しても変わらない

(Yang *et al*, 2000)。4-TBP の細胞毒性は、むしろチロシナーゼ関連タンパク質 1 (TYRP1) を過剰発現すると増強されることから、TYRP1 の関与が示唆されている (Boissy and Manga, 2004; Manga *et al*, 2006)。TYRP1 はメラニン合成の下流においてインドールキノン産生に関わる酵素である。

MBEH の細胞毒性もチロシナーゼ活性とは相関せず、細胞にチロシナーゼを過剰発現させても MBEH 感受性は変わらなかった (van den Boorn, 2011)。細胞内のメラニン量と MBEH 感受性は逆相関する報告もなされ、MBEH はメラニン合成系発現を促進し、メラニン合成が酸化ストレスに対して保護的に働くことが感受性に影響する可能性が推定されている (Hariharan *et al*, 2010)。

一方、抗メラノーマ作用を示す 4-SCAP やその誘導体 NPr-4-SCAP もオルトキノン体に代謝される (Hasegawa *et al*, 1997; Ito S *et al*, 2012) (表 1)。4S-CAP 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 の毒性には 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。

4. 皮膚感作性

4-TBP の白斑形成に遅延型アレルギーが関わる可能性について、モルモットを使った感作性試験

GPMT (Guinea Pig Maximization Test) が行われた。4-TBP の感作性は認められなかったが、4-TBP のチロシナーゼによる代謝で生じる 4-TBC は強力な感作性と 4-TBP との交差反応性を示した (Zimerson *et al*, 1999)。

MBEH については、ヒト (健康人) でパッチテストを行うと陽性は 1.2% であったが、皮膚色素過剰症患者に 2~6 ヶ月塗布すると 13% の人に感作性を示し、皮膚炎を発症した (Lerner and Fitzpatrick, 1953)。白斑症の患者に塗布すると有色部に皮膚炎を発症し、パッチテストでメラノサイトが存在する部位にのみ炎症を起こすことが報告されている (Nordlund *et al*, 1985)。

5. チロシナーゼによるハプテン形成と免疫系の関与

MBEH や 4-TBP の毒性はそれほど強くなく、いずれも IC50 は数百 μM のレベルである。また白斑発症には個人差が大きいことから、発症には免疫系が関与することが推定されている。まず、(1)4-TBP がメラノサイトにアポトーシスを誘導する感受性が、樹状細胞とのコミュニケーションにより増大することが報告されている (Kroll *et al*, 2005)。また、(2)MBEH および 4-TBP はメラノサイト生存率に大きく影響しない濃度 (250 および 300 μM) で小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) を誘導し、免疫応答増強につながるサイトカイン IL-6・IL-8 産生を誘導することが報告されている (Toosi *et al*, 2012)。

また、(3)MBEH や 4-TBP はチロシナーゼで活性代謝物に代謝され、ハプテン抗原となり得るタンパク付加体を形成することが明らかにされている。メラニン生合成経路において、チロシンがチロシナーゼによりドーパを経て産生されるドーパキノン、分子内のアミノ基が付加してインドールに環化し、あるいはシステインの SH 基と Michael 付加反応し、それぞれユウメラニン、フェオメラニンへと合成される (図 2)。4-TBP もチロシナーゼにより 4-tert-ブチルカテコール、続いてオルトキノン体である tert-ブチル-o-ベンズキノンに代謝され、グルタチオンやタンパクの SH 基に Michael 付加する反応性を獲得する (Thornerby-

Andersson *et al*, 2000) (図 3 左)。4-SCAP やその誘導体 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)。MBEH も同様にオルトキノン体 4-ベンズキシ-1,2-ベンズキノンに代謝され、SH 基と付加反応する (Manini *et al*, 2009) (図 3 右)、あるいはチロシナーゼの SH 基とも反応し、酵素を不可逆的に阻害してメラニン合成を低下する (van den Boorn *et al*, 2011a)。このようなタンパク修飾体がハプテン抗原として提示され、ハプテン特異的な免疫応答が誘導される機序が提唱されている (Becker and Schrama, 2011)。

6. 化学物質による自己免疫の誘導

白斑には様々な病因の疾患が含まれるが、頻度の高い尋常性白斑については、自己免疫性の疾患と考えられている。環境要因や生理的要因が引き金となって局所的なメラノサイトの死をもたらし、メラノサイト抗原が提示され、自己免疫応答を引き起こす。その結果、メラノサイトの破壊は全身に、離れた場所にも起こるとする説が広く受け入れられている (Manga and Orlow, 2012; Passeron and Ortonne, 2012)。実際に白斑患者の皮膚脱色部位には T 細胞が浸潤していることが知られている (Le Poole *et al*, 2004)。

職業性白斑の事例においても、白斑は 4-TBP や MBEH に長期間曝露された人全てには発症せず、また化合物に接触した部位以外にも広がることから、化学物質が引き金となって自己免疫が誘導され、メラノサイトが破壊される機序が推定されている (Boissy and Manga, 2004)。

MBEH は尋常性白斑の患者において、脱色素斑を目立たなくする目的で正常な皮膚を脱色素する薬として FDA に認可されている。MBEH を塗布した直後の脱色は局所に起こるが、数ヶ月後には予期せぬ場所に起こる場合が知られている。脱色素部位の皮膚には CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞が浸潤していたことから、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 (Becker and Schrama, 2011; van den Boorn *et al*, 2011b)。MBEH を皮膚に

塗布するとメラノサイトへの自己免疫応答を誘導することは、メラノーマ細胞を移植したマウスで確認されている。(van den Boorn *et al*, 2010)。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)。

MBEH などの化学物質が自己免疫応答を誘導するメカニズムとして、(1)MBEH によるメラノサイトの死が抗原提示を促進する可能性が提唱されている (Hariharan *et al*, 2011)。また、(2) 上述した MBEH 代謝物のチロシナーゼ修飾に伴い、メラノサイト抗原を含むエクソソームがメラノサイトから放出されることが報告されている (van den Boorn *et al*, 2011a)。

7. カネボウ化粧品による非臨床試験報告書の概要

平成 26 年 3 月に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、ならびに引き続き発表された論文 (Kuroda *et al*, 2014) において、ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール) の皮膚色素脱失作用については、褐色モルモットの皮膚に 30% (50%エタノール) 溶液を 1 日 3 回塗布し、確認されている。開始 17~21 日で皮膚の高度白色化、31~98 日の時点で皮膚基底部のメラノサイトや表皮全体のメラニン顆粒の減少が認められた。また塗布休止 31~52 日での回復が報告されている (カネボウ化粧品報告書 2-1-1)。

ロドデノールのメラノサイト生存率に及ぼす影響については、チロシナーゼ活性に大きく依存する結果が得られている。メラノサイトのロドデノール感受性は細胞のラインにより大きく異なっており、13 ラインの IC₅₀ 値は 0.14~0.54mM と 5.54~6.8mM の二群に分かれ、前者はチロシナーゼ活性が高く、後者は低い傾向が認められた。同一ラインのメラノサイトにおいてチロシナーゼを siRNA ノックダウンで 50%低下させた場合には IC₅₀ 値は 0.052mM から 5.9mM に増加した。

チロシナーゼ阻害剤 (フェニルチオウレア) によっても毒性が低減された。またチロシナーゼ代謝産物と想定されるロドデノールの水酸化体 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノールの 2 種のメラノサイトラインに対する IC₅₀ 値はそれぞれ、0.19mM、<0.1mM とロドデノールの 6.6mM、7.3mM に比較して低いことから、ロドデノールの細胞毒性の発現にはチロシナーゼが大きく関わることを示されている。ロドデノール (~1mM) による ROS の産生は認められていない。一方、表皮角化細胞に対する細胞毒性は 1mM 以下では認められなかった (カネボウ化粧品報告書 2-2, 2-3-1, 2-3-2)。

免疫応答の関与について、ロドデノール処理ケラチノサイトにおいて炎症性サイトカイン産生は認められなかった。またロドデノールの皮膚感作性については GPMT および LLNA (Local Lymph Node Assay) 試験では認められなかった (カネボウ化粧品報告書 2-2-1)。CCET (Cumulative Contact Enhancement Test) では高濃度群で疑わしい皮膚反応が認められ、連続した閉鎖貼付の影響が示唆されている。光感作性評価については AS-AA (Adjuvant-Strip-AA) および Harber の両試験で陰性であった。なおマウスを使用する LLNA 以外の試験では褐色モルモットが使用されている。(カネボウ化粧品報告書 2-1-2)。

ロドデノールはメラノサイトの小胞体ストレス応答を誘導し、eIF2 α のリン酸化と炎症性サイトカイン IL-8 の遺伝子発現を誘導した。またこれらの応答はチロシナーゼ阻害により抑制されることが示されている (カネボウ化粧品報告書 2-3-3) (Sasaki *et al*, 2014)。

8. ロドデノール代謝・細胞毒性に関する発表論文

ロドデノールの代謝に関しては、平成 26 年 9 月に上記カネボウ化粧品グループより (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