

(図 4) (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(Ito *et al.*, 2015)、ハプテン形成の可能性が示された。また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)。ロドデノールによる ROS 産生が認められない条件下で、代謝物カテコール体は強力に ROS 産生を促進した (Sasaki *et al.*, 2014)。また、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、前項カネボウ化粧品報告に記載されたように、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論文化されている (Sasaki *et al.*, 2014; Kasamatsu *et al.*, 2014)。

9. 本研究班におけるロドデノール代謝・毒性試験

本研究班において協力研究者秋山は、ロドデノールのカテコール体 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノールがチロシナーゼ (マッシュルーム) およびヒトメラノサイトにより産生されること、ロドデノールに比較しカテコール体はより強い細胞毒性を示すことを明らかにしている (H26 分担研究報告書 II 秋山)。

引き続き協力研究者秋山は、アスコルビン酸共存下でロドデノールのチロシナーゼ反応を行うと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、ロドデノールカテコール体の細胞毒性が減弱することを見いだしている (H27 分担研究報告書 II 秋山)。

ロドデノールのチロシナーゼ依存的なメラノサイト毒性発現について (Sasaki *et al.*, 2014; 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、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。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。

D. 考察

1. チロシナーゼによる代謝活性化の役割

化学物質による白斑については毒性学の教科書において、チロシンに似た構造を持つフェノール化合物が皮膚の色素低下・脱失を起こす事例が紹介されている (Casarett & Doull's, Toxicology: The Basic Science of Poisons 8th Edition, pp851-852)。また皮膚科専門誌の総説においても、ヒトや実験動物で皮膚脱色素作用を示す代表的な化学物質が「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」に分類され (Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004)、米国では臨床で用いられる MBEH と、強力な職業性白斑の事例が知られる 4-TBP、さらに抗メラノーマ薬候補 4-SCAP 誘導体についてメカニズムが詳細に研究された。

4-TBP と MBEH, NPr-4-SCAP の場合、メラノサイトへの直接傷害作用に加えて免疫系を介する二相性のメラノサイト消失機序が明らかにされている (Becker and Schrama, 2011; Ishii-Osai *et al.*, 2012)。直接の傷害作用にはメラニン合成系が大きく関わっており、4-TBP, MBEH, NPr-4S-CAP はいずれもメラニン合成を阻害するとともにチロシナーゼにより代謝されて ROS を増加することが確認され (表 1)、酸化ストレス増加がメラノサイト選択的な毒性発現をもたらすと考えられている。

4-TBP や MBEH, NPr-4-SCAP では、免疫応答やメラノサイトに対する自己免疫誘導も色素脱失作用に大きな役割を持つことが知られる (Passeron and Ortonne, 2012; Toosi *et al.*, 2012; Ishii-Osai *et al.*, 2012)。MBEH の事例では全身性の進行、病変部への細胞障害性 T 細胞の浸潤、発症の個人差など、(尋常性) 白斑患者と同様の症状から、メラノサイトに対する自己免疫の誘導が推定されている (Manga and Orlow, 2012)。NPr-4S-CAP も、細胞障害性 T 細胞を介する抗メラノーマ作用を発揮することが明らかにされている (Ishii-Osai *et al.*, 2012)

これらの 4-置換フェノール類により化合物への免疫/自己免疫が誘導/増強される機序として、(1) 4-TBP, MBEH, 4-SCAP 修飾によるチロシナーゼハプテン抗原形成(Thornerby-Andersson *et al*, 2000; van den Boorn *et al*, 2011a; Ito *et al*, 2012)とメラノサイト抗原の放出(van den Boorn *et al*, 2011b; Becker and Schrama, 2011)、(2)ネクローシス/アポトーシスによるメラノサイトの死と樹状細胞による増強(Kroll *et al*, 2005)、(3)小胞体ストレス応答を介する炎症性サイトカイン産生促進が提唱されている(Passeron and Ortonne, 2012)。

職業性白斑の事例においては、遺伝的な要因が感受性の違い/個人差をもたらすと考えられている(Boissy and Manga, 2004)。白斑疾患は自己免疫の引き金を引くことにより発症するとする説が受け入れられており、化学物質は引き金となる環境要因のひとつと解釈されている(Manga and Orlow, 2012; Passeron and Ortonne, 2012)。尋常性白斑に関連が見いだされた遺伝子の多型、また MHC(HLA)クラス I の解析が、化学物質による白斑発症の原因究明の手がかりになる可能性も大きいと考えている。

2. ロドデノールによる白斑様病態形成のメカニズムについて

カネボウ化粧品による非臨床試験において(参考資料)、ロドデノールが褐色モルモットの皮膚基底層のメラノサイトやメラニン顆粒を減少させて色素脱失を形成すること、作用は可逆的であることが確認され、臨床での知見が実験的に裏付けられた。可逆的な皮膚色素脱失は、ロドデノールと構造が類似する 4-TBP でも報告されているが、MBEH を含め過去の報告は黒色モルモットが使われており、また塗布溶剤も異なることから、ロドデノールと強度の比較は難しい。

In vitro においてロドデノールはメラノサイトにチロシナーゼ活性に応じた毒性を示し、メラノサイト選択的な傷害が皮膚脱色素斑形成に直接寄与する可能性が示唆された。ロドデノールは、4-TBP や MBEH,

4-SCAP, NPr-4-SCAP 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(Ito *et al*, 2014a) (図 4) (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。本研究班においても、ロドデノールはメラノサイトやチロシナーゼにより代謝され、代謝産物カテコール体はより強い毒性を発揮することを確認している(H26 分担研究報告書 II 秋山)。さらに、オルトキノン体の生成を防ぐ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おり、細胞毒性はオルトキノンが引き起こしていることが間接的に示唆された(H27 分担研究報告書 II 秋山)。

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のが推定される。ロドデノールは 4-TBP や MBEH, NPr-4-SCAP と同様に小胞体ストレス応答を誘導したが(表 1)、これら化合物とは異なり ROS の産生は認められていない(Sasaki *et al*, 2015)。このような異同に基づきメカニズムを解明するためには、同一実験内での比較検討と、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。またヒト由来メラノサイトは、感受性の個人差が示唆される。チロシナーゼのみが感受性の違いをもたらすのか、さらなる解明が必要と思われる。

4-TBP や MBEH、N-Pr-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

ヒトや実験動物で白斑様症状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」であり、特に効果が強力な 4-TBP、MBEH、NPr-4SCAP では、皮膚メラノサイトへの直接作用と免疫系を介する二相性のメラノサイト消失機序が知られている。

ロドデノールは、褐色モルモットにおいて皮膚の色素脱失作用、メラノサイトに対しては、チロシナーゼ活性に大きく依存する毒性が報告された。さらに、ロドデノールは上記 4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼによりオルトキノン体へ代謝活性化されてグルタチオン等の SH 基への付加反応性を獲得することが報告された。本研究班においても、オルトキノン体が細胞毒性に強く関わることを確認した。代謝活性化による毒性発現に加え、小胞体ストレス応答の誘導などロドデノールの作用には、白斑誘導性フェノール類の作用と極めて高い類似性が認められた。

[引用文献]

Becker JC, Schrama D. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1185-7.
 Bleehen SS, Pathak MA, Hori Y, Fitzpatrick TB. *J Invest Dermatol* 1968; 50:103-17
 Boissy RE, Manga P. *Pigment Cell Res.* 2004 ; 17: 208-14
 Casarett & Doull's, Toxicology: The Basic Science of Poisons 8th Edition, pp851-852
 Cummings MP, Nordlund JJ. *Am J of Contact Dermatitis* 1995; 6: 122-7
 Dell'anna ML, Picardo M. *Pigment Cell Res* 2006; 19:

406-11
 Fukuda Y, Nagano M, Futatsuka M. *J Occup Health* 1998; 40: 118-122
 Gellin GA, Possick PA, Perone VB. *J Invest Dermatol* 1970; 55: 190-7
 Hariharan V, Klarquist J, Reust MJ, Koshoffer A, McKee MD, Boissy RE, Le Poole IC. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 211-20
 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
 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 *in press*
 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
 James O, Mayes RW, Stevenson CJ. *Lancet* 1977; 2: 1217-9
 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
 Kroll TM, Bommasamy H, Boissy RE, Hernandez C, Nickoloff BJ, Mestrlil R, Caroline Le Poole I. *J Invest Dermatol* 2005;124:798-806
 Kuroda Y1, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T. *J Toxicol Sci.* 2014;39:615-23.
 Le Poole IC, Wańkiewicz-Kalińska A, van den Wijngaard RM, Nickoloff BJ, Das PK. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004; 9:68-724
 Lerner AB, Fitzpatrick TB. *JAMA* 1953; 152:577-82
 Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. *Am J Pathol.* 2006;169:1652-62.
 Manga P, Orlow SJ. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 1752-5.
 Manini P, Napolitano A, Westerhof W, Riley PA, d'Ischia M. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22:1398-405.
 Nordlund JJ, Forget B, Kirkwood J, Lerner AB. *Arch*

Dermatol. 1985; 121:1141-4.
Passeron T, Ortonne JP. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2502-4
Peck SM, Sobotka H, *J Invest Dermatol* 1941; 4: 325-329
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.
Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. *Pigment Cell Res.* 2006; 19: 550-71.
Tandon M, Thomas PD, Shokravi M, Singh S, Samra S, Chang D, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 2023-9
Thörneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13:33-8.
Toosi S, Orlow SJ, Manga P. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132:2601-9
van den Boorn JG1, Konijnenberg D, Tjin EP, Picavet DI, Meeuwenoord NJ, Filippov DV, van der Veen JP, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *PLoS One.* 2010; 5:e10626.
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
van den Boorn JG, Melief CJ, Luiten RM. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:673-9.
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.
Yang F, Boissy RE. *Pigment Cell Res.* 1999; 12: 237-45.
Yang F, Sarangarajan R, Le Poole IC, Medrano EE, Boissy RE. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:157-64.
Zimerson E, Bruze M, Goossens A. *J Occup Environ Med* 1999; 41:23-8.

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

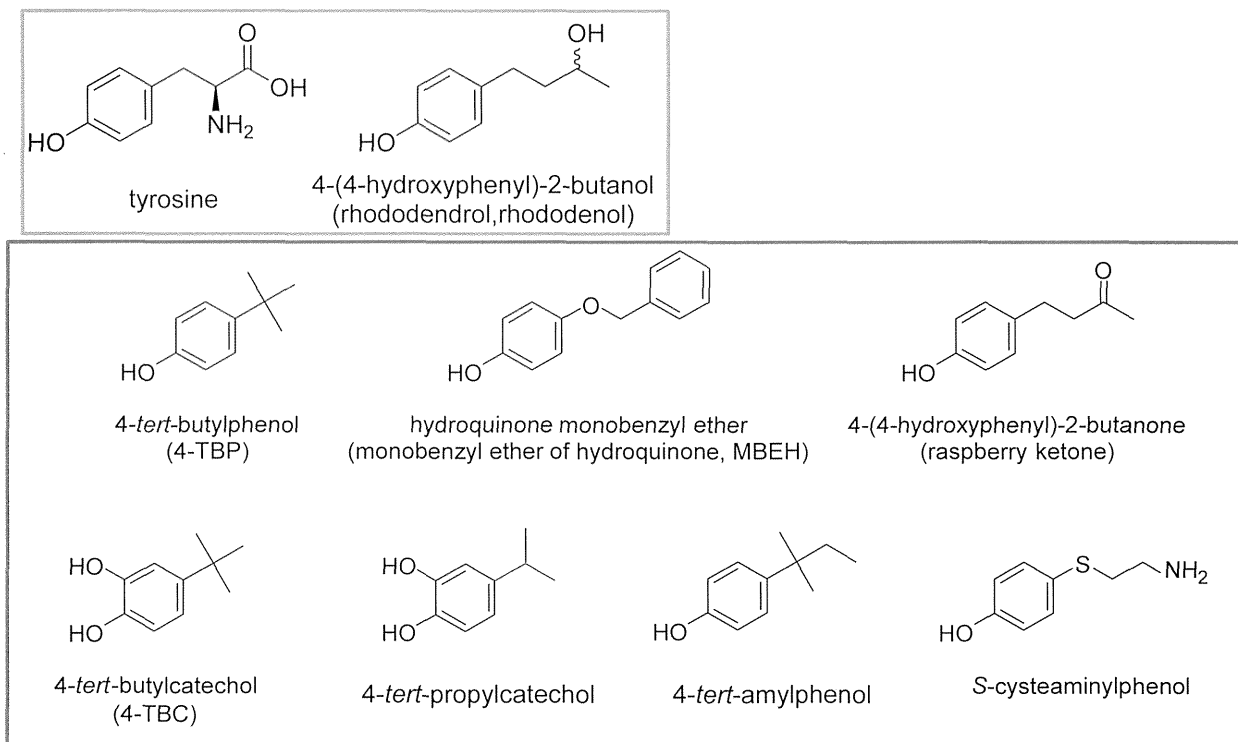


図1 チロシン、ロドデノール、および職業性白斑や皮膚色素脱失を起こす化合物

(Peck 1941, Bleehen 1968, Gellin 1970, James 1977, Ito 1987, Fukuda 1998, Cummings 1995, Boissy 2004, Solano 2006)

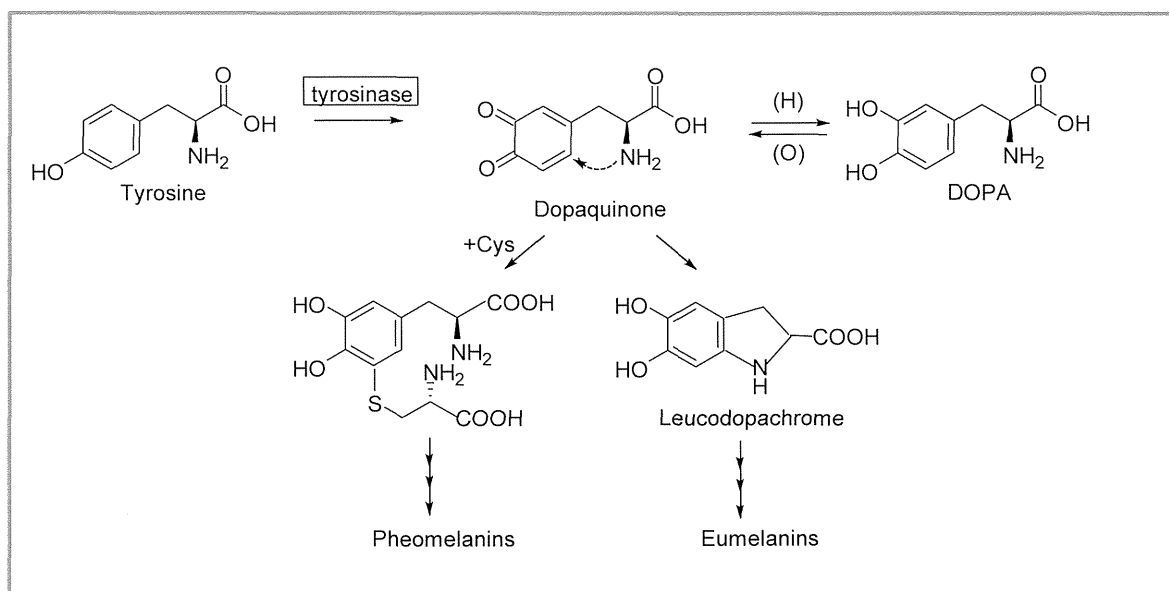


図2 メラニン合成経路

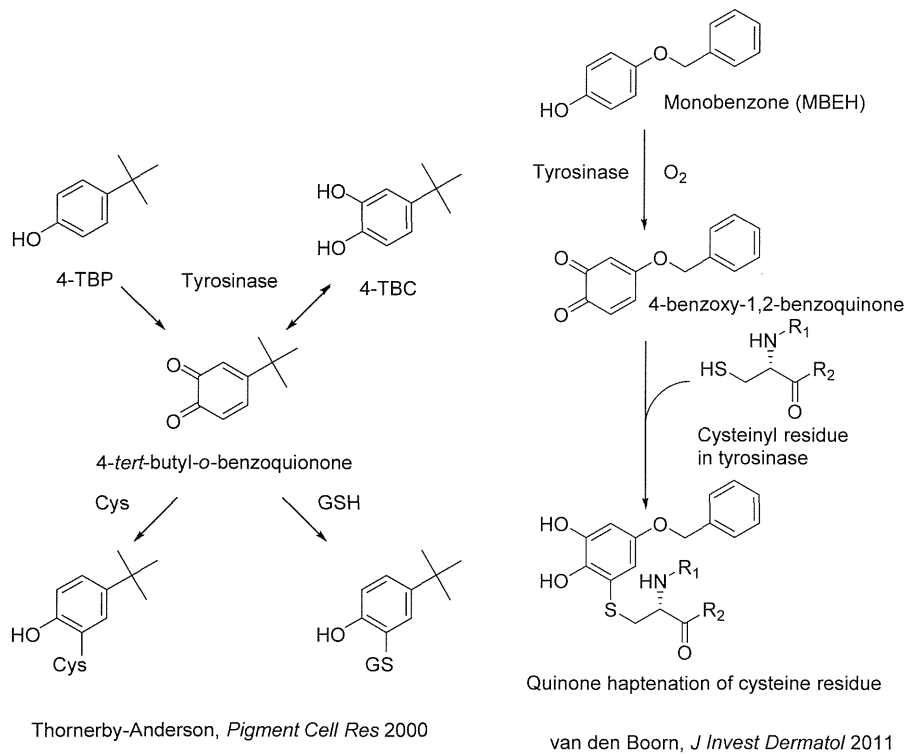


図3 4-TBPとMBEHのオルトキノン体への代謝とSH基との反応

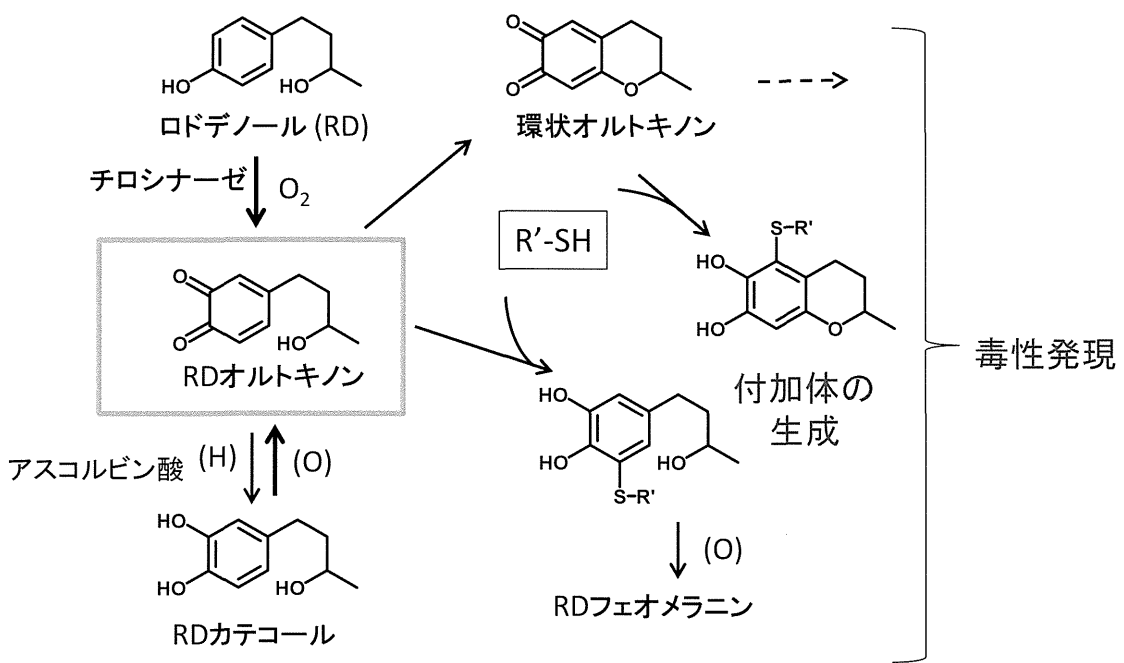
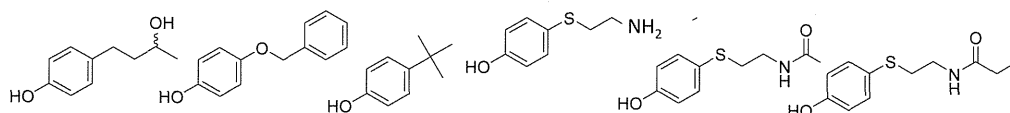


図4. ロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化

ロドデノールはチロシナーゼにより、オルトキノン体へ代謝される。オルトキノン体は反応性が高く、環化、H₂O付加するほか、システイン・グルタチオンやタンパクの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)

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

原因究明に関する調査研究

Ⅱ. ロドデノールの細胞毒性に関する研究

研究協力者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究要旨:

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(ロドデノール)を配合した美白化粧品の使用者に白斑が生じる事例が多数発生し、大きな問題になった。我々はロドデノールが皮膚のメラノサイトやケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび製造原料である 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン)が各種細胞に与える影響を調べた。また、これら化合物の細胞内酵素による化学変化についても検討した。キラルカラムおよび ODS カラムを装着した HPLC により、製品に配合されていたロドデノールは光学異性体混合物であり、R:S 存在比はほぼ 1:1 であること、ロドデノール中のラズベリーケトン、製品へのラズベリーケトンの混入はごくわずかであることがわかった。ロドデノールの水酸化体はヒトメラノサイトおよびヒトケラチノサイト(HaCaT 細胞)のいずれに対してもロドデノールおよびラズベリーケトンに比べて強い細胞毒性が認められた。ロドデノールおよびラズベリーケトンを添加した細胞の培養上清中にはそれぞれの水酸化体が検出された。またこれらの化合物はチロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代謝されることを確認した。以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等により水酸化体に代謝され、これらがメラノサイトの細胞死に強く関与することが示唆された。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*-キノンの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, HPBoI, 図 1)を配合した薬用化粧品は、医薬部外品として、平成 18 年 7 月に申請され、薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ、平成 20 年 1 月に「メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ等」の効能効果で承認されたものである。4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン, HPBoNe, 図 1)から合成されて製品に配合される。使用後に白斑(肌がまだらに白くなった状態)になったとの報告が寄せられ、平成 25 年 7 月 4 日から製造販売業者が自主回収を実施した。その後 1 万 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。

本研究では、ロドデノールが皮膚のメラノサイトやケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび合成原料であり白斑の原因となるとの報告(Fukuda *et al.*, *J. Occup. Health*, **40**, 118 (1998))のあるラズベリーケトンが各種細胞に与える影響を調べた。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。

B. 研究方法

1. 試料, 試薬および細胞

ロドデノール, 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(DHPBoI), 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(DHPBoNe), ロドデノールを配合した医薬部外

品はカネボウより提供いただいた。はカネボウより提供頂いた。ラズベリーケトン¹は和光純薬工業製、マツシユルム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 製を用いた。

ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) は、東北大学農学研究科仲川清隆准教授よりご提供頂いた。ヒト正常メラノサイトは、African American 由来 (Lot No. 01392) と Asian-Caucasian 由来 (Lot No.01440) の 2 系統をクラボウより購入した。

2. ロドデノールの光学異性体存在比と純度

ロドデノールの光学異性体の分離は資生堂製キラルカラム Chiral CD-Ph を用いた HPLC により、またラズベリーケトンとの分離は Waters 製逆相カラム ACQUITY UPLC CSH C18 を用いて行った。

3. ロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性および化学変化

HaCaT細胞またはヒトメラノサイトの細胞懸濁液を調製し、約24時間前培養した後、試験物質のDMSO溶液を培地で希釈して添加した。CO₂インキュベータ内でさらに約24時間培養した。

ATP量を測定するCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)及びプレートリーダーを用いて細胞毒性を評価し、培養上清をさらに遠心分離して逆相カラムを用いたLC/MS分析に供した。

4. チロシナーゼによる酸化

50 mmol/L KPB (pH6.5)中でロドデノール、ラズベリーケトン、DHPBol または DHPBone の濃度 0.33 mmol/L、マツシユルムチロシナーゼ濃度 30 U/mL で好氣的に 25°Cでインキュベートし、YMC 製逆相カラム Hydrosphere C18 を用いた HPLC により分析した。

5. アスコルビン酸添加の影響

HaCaT 細胞を前培養後、試験物質と同時にアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウムまたはアスコルビン酸 2-グルコシドを加え、24 時間培養後に細胞毒性を評価した。これら 3 物質の存在下でマ

ツシユルムチロシナーゼと試験物質を反応させた。

C. 研究結果

1. ロドデノールの光学異性体存在比と純度

ロドデノールをキラルカラムを装着した HPLC により分離したところ、図 3 に示すように R 体と S 体 (図 2) が分離し、ピーク面積から存在比がほぼ 1:1 であることが判明した (表 1)。

原料のメタノール溶液と製品のメタノール抽出液を逆相 HPLC で分析した。図 4 に示すように、合成原料であるラズベリーケトンのピークはロドデノールと比較してごく小さく、表 2 に示すように、ロドデノールに対する重量比は 0.04%以下であった。

2. ロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性および化学変化

ロドデノールはチロシンを酸化して DOPA に変換するチロシナーゼの阻害剤として開発されたものであるが、図 5 に示したように、自らがチロシナーゼの作用により水酸化体 DHPBol に変換される可能性が考えられた。ラズベリーケトンも同様に DHPBone に酸化される可能性がある。そこで、ロドデノール、ラズベリーケトンおよび両者の水酸化体をヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) と正常ヒトメラノサイトに適用し、細胞の生存率および培養上清中の化合物の分析を行った。

図 6 に示すようにいずれの化合物も HaCaT 細胞に対し濃度依存的な毒性を示した。表 1 に示すようにロドデノール及びラズベリーケトンより水酸化体の LC₅₀ が小さく、水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。

メラノサイトとしてはチロシナーゼ活性が高いと考えられる African American 由来のもの及び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 由来のものを用いた。チロシナーゼ活性を測定したところ、African American 由来メラノサイトは Asian-Caucasian 由来メラノサイトの 2 倍の活性を有していた。図 7 及び図 8 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。

また、表 1 に示すように HaCaT の場合と同様に水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。

ロドデノールまたはラズベリーケトンを 2.5 mmol/L の濃度で 24 時間適用した African American 由来メラノサイトの培養上清を LC/MS により分析した。ロドデノールを適用した培養上清中に DHPBol が検出され、ラズベリーケトンを適用した培養上清中に DHPBone が検出された。これらは培地のみの場合には検出されず、ロドデノールとラズベリーケトンが細胞内に取り込まれてチロシナーゼなどの酵素により水酸化体に代謝されることが示唆された。

3. チロシナーゼによる酸化

ロドデノールがチロシナーゼの基質となるかどうか試験管内反応によって検討した。ロドデノールまたはラズベリーケトンマッシュルーム由来チロシナーゼと 25℃ でインキュベートして反応液を LC/MS で分析した。0 分と 10 分の比較を図 9 に示す。ロドデノールを用いた反応液には DHPBol が構造不明のピーク A などとともに検出され、チロシナーゼによってチロシンと同様の酸化反応の基質となることが確認された。ラズベリーケトンからも同様の酸化反応を経て DHPBone などが生成した。構造不明のピークは DHPBol と DHPBone についてチロシナーゼとともにインキュベートした場合にも見られた。

4. アスコルビン酸添加の影響

試験管内反応で見られたピーク A などの生成物は、DHPBol が 2 段階目の酸化を受けた *o*-キノンの可能性が高く、これが細胞毒性を表している可能性がある。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 のアスコルビン酸をあらかじめ添加してから DHPBol を添加した。その結果、細胞毒性が低減した。アスコルビン酸 2-グルコシドでは変化しなかった。

また、アスコルビン酸の存在下でチロシナーゼ反応を行ったところ、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くなった。

D. 考察

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

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

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

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

HaCaT 細胞およびメラノサイトにおいても、ロドデノールやラズベリーケトンに比べ、それぞれの水酸化体ははるかに低い LC₅₀ 値を示した。ロドデノールおよびラズベリーケトンは 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。

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

アスコルビン酸を 1 mM 添加すると、HaCaT 細胞に対する DHPBol の毒性が減弱した。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*-キノンに 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。

E. 結論

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

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

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

ロドデノールおよびラズベリーケトンはマッシュルーム由来チロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代

謝されることを確認した。また、水酸化体がチロシナーゼによりさらに化学変化を受けることが示された。

以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等により水酸化体または *o*-キノンに代謝され、これらがメラノサイトの細胞死に強く関与することが示唆された。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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 NISHIMAKI-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

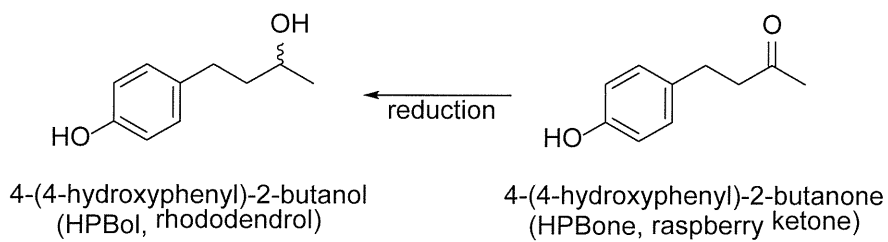


図 1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

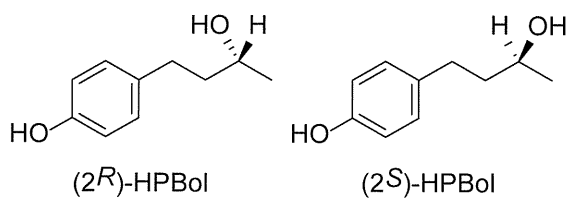


図 2. ロドデノールの光学異性体.

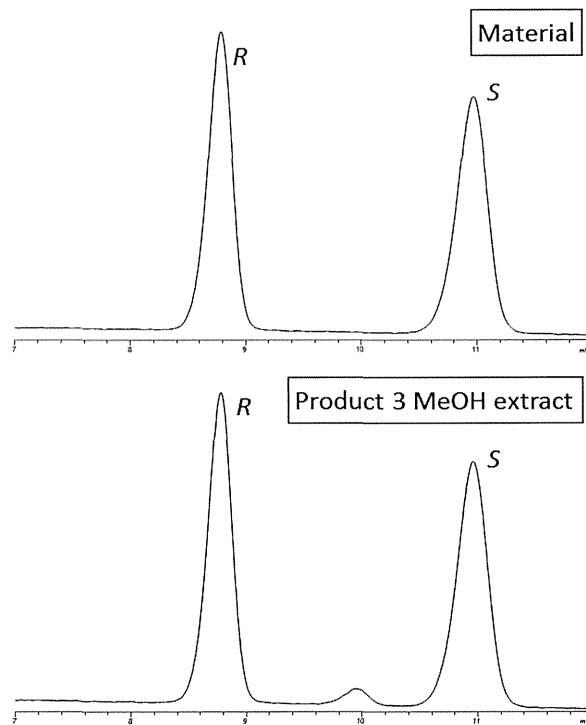


図 3. 原料および製品に含まれるロズマノールのキラルカラムによる分析. 上段:原料. 下段:製品.

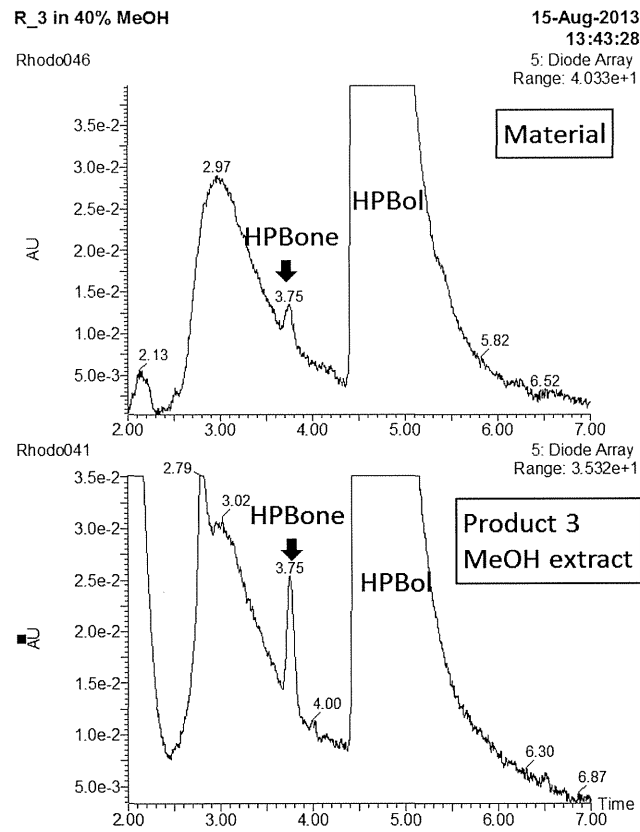


図 4. 原料および製品に含まれるロズマノールとラズベリーケトン. 上段:原料. 下段:製品.

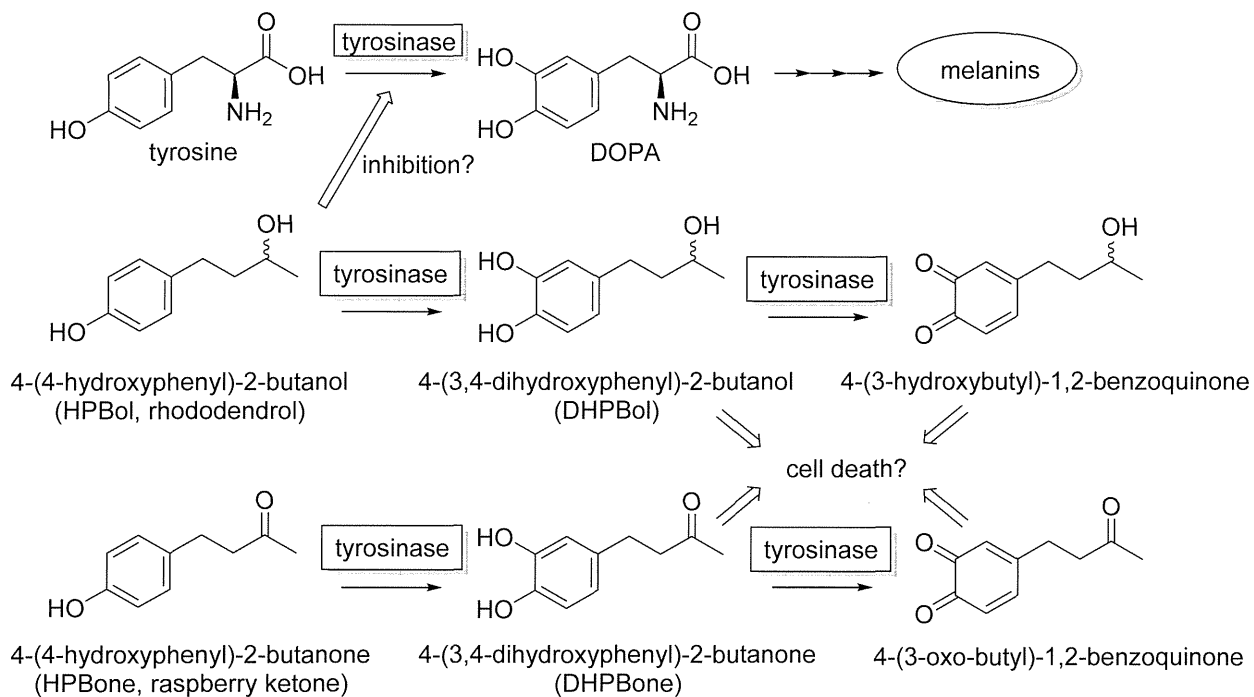


図 5. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

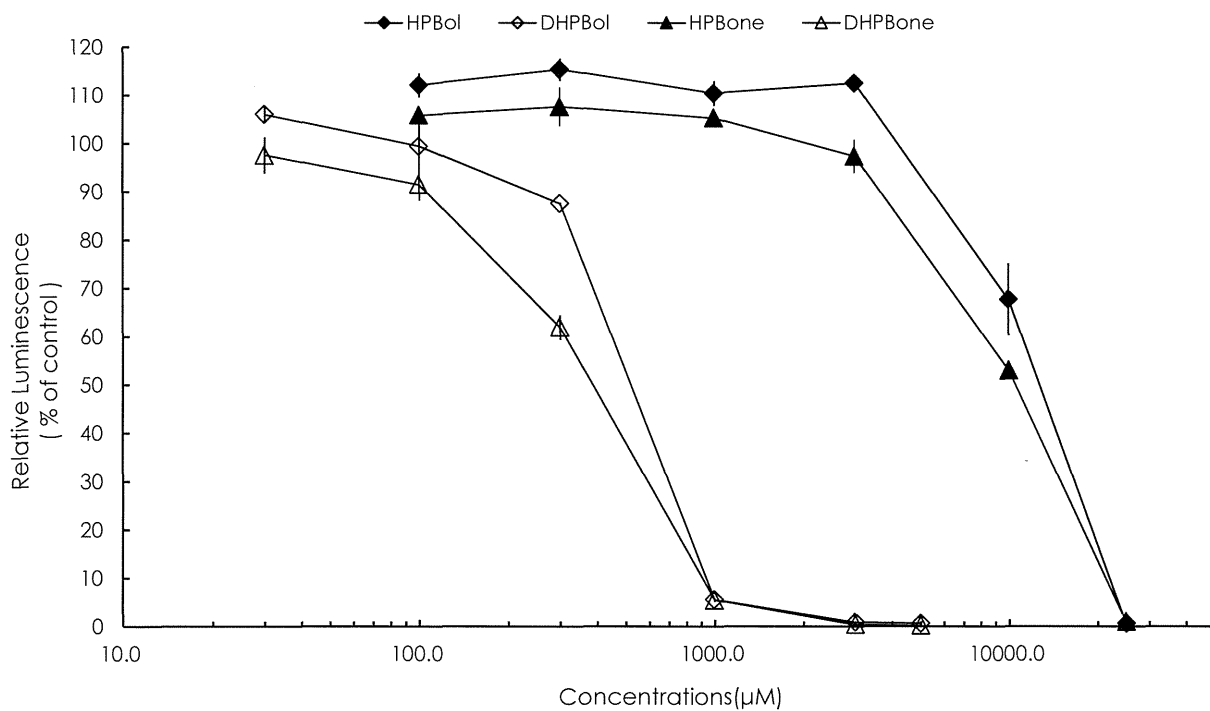


図 6. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した HaCaT 細胞の生存率.

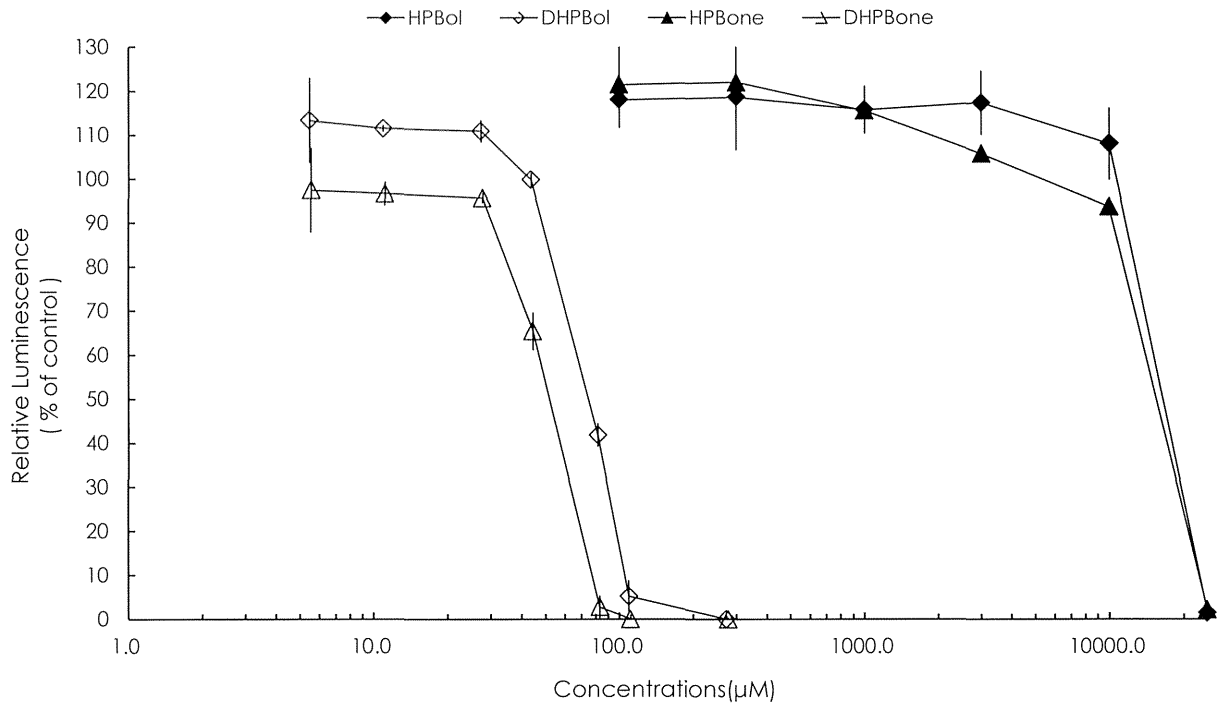


図 7. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した African American 由来メラノサイトの生存率.

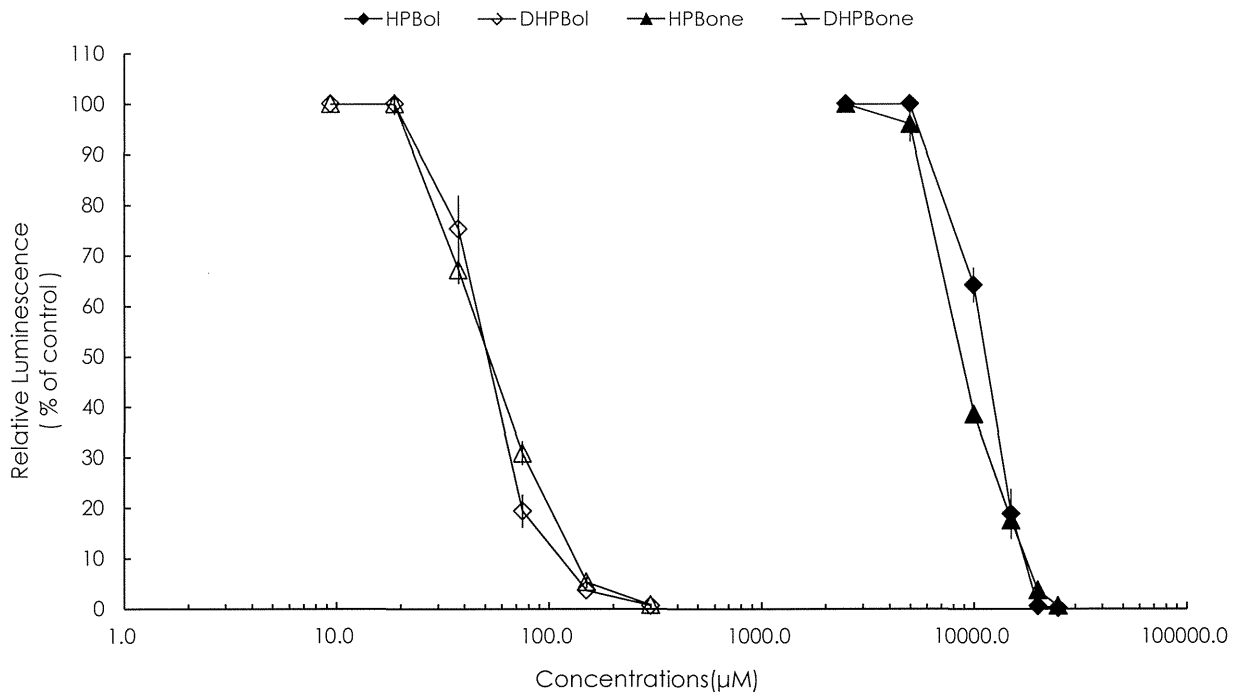


図 8. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した Asian-Caucasian 由来メラノサイトの生存率.

表 1. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体に対する細胞の LC₅₀.

Chemical	LC ₅₀		
	HaCaT	Melanocyte	
		African American	Asian-Caucasian
HPBol	12.7	16.5	11.2
HPBone	10.5	15.5	9.2
DHPBol	0.52	0.072	0.051
DHPBone	0.39	0.049	0.052

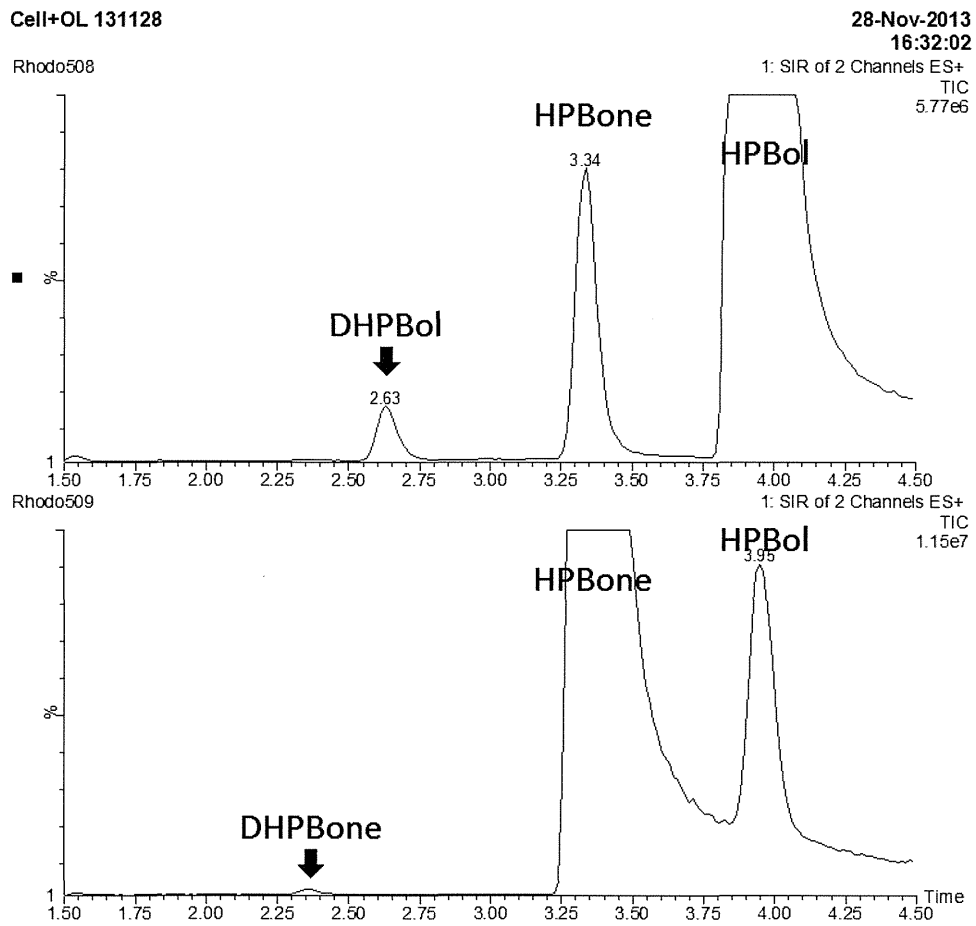


図 9. ロドデノールおよびラズベリーケトンを適用したメラノサイトの培養上清中の化学変化体.

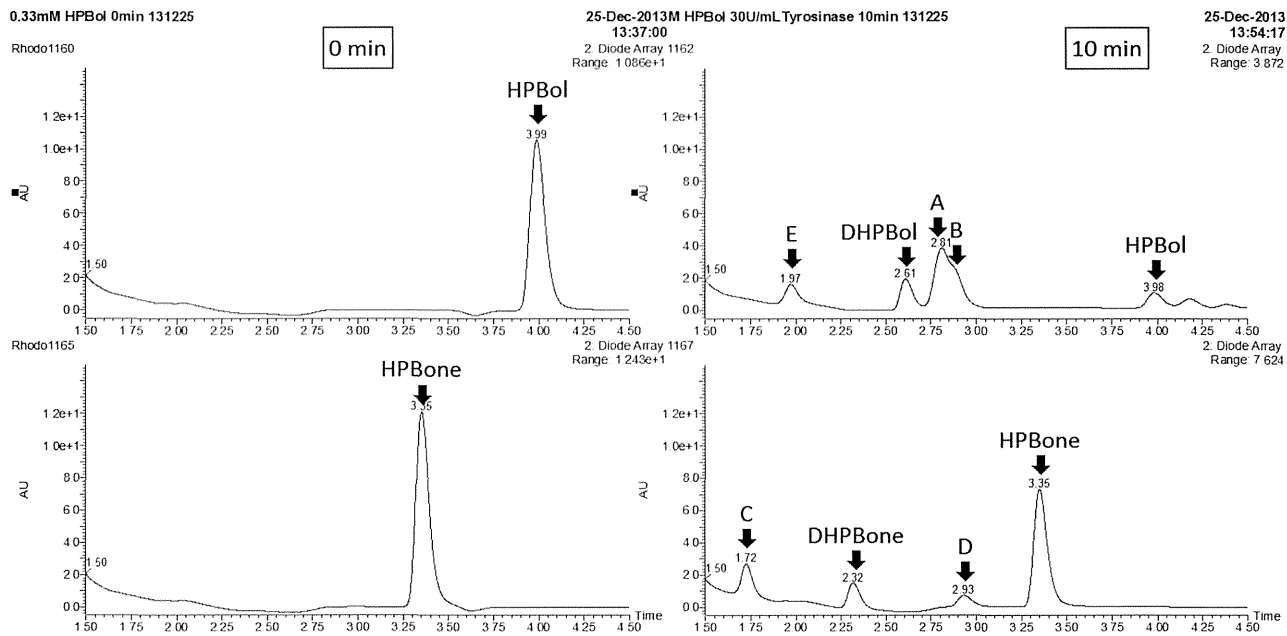


図 10. ロドデノールおよびラズベリーケトンのマッシュルームチロシナーゼとの反応産物.

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)

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

カネボウ化粧品等が製造販売した 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(ロドデノール)を配合した薬用化粧品の使用者において、製品との関連性が疑われる白斑(肌がまだらに白くなった状態)の症例が確認され、製品の自主回収が行われた。白斑等健康被害の再発防止のため、非臨床、臨床評価を含む医薬部外品の承認審査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、代替法の取り扱いや皮膚透過試験、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、1000例の、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。(5)企業から国への副作用報告制度の強化策として、医薬品等と同様に重篤な副作用の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)」を報告対象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」を加えることを提言した。

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の使用者において、製品との関連性が疑われる白斑症例の報告があり、カネボウ化粧品は、平成 25 年 7 月 4 日から製品の自主回収を行っている。カネボウ化粧品によると、平成 27 年 1 月末までに、1 万 9 千人以上から白斑様症状の申し出があり、約 70 万個の製品を回収したとしている。本品は、薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ、平成 20 年 1 月に医薬部外品として「メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ」等の効能効果で承認されたものである。

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

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

B. 研究方法

ロドデノール配合薬用化粧品の承認申請時にカネボウ化粧品から提出された資料や、医薬部外品の開発から承認審査、製造販売後までの各段階における安全性確保のための現行の枠組み、具体的には、承認申請時

に求められる非臨床試験、臨床試験の種類及び方法（症例数、期間等含む）、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、副作用報告のあり方、製造販売後の安全管理の基準等を調査し、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、使用上の注意の改訂、製造販売後調査ガイドライン案、企業から国への副作用報告制度、製造販売後の安全管理の基準（GVP）について検討を行った。

C. 研究結果及びD. 考察

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、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に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議論した。

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。

添付する資料についても詳細を決定した（平成26年度分担研究報告書）。例として、（イ）起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料、（ロ）物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料、（ハ）安定性に関する資料、（ニ）安全性に関する資料、（ホ）効能又は効果に関する資料のうち区分1については旧区分1と同様原則としてすべてが必要、区分2-1から2-5については（ニ）は不要又は個別判断だが2-2については吸収・分布・代謝・排泄に関する資料が必要としている。

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