

機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究

研究代表者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症に関しては、白斑病変部での表皮メラノサイトの消失やロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性増強が報告され、代謝を介するメラノサイト傷害機序が提唱されている。本研究では、基礎・臨床からの発症機序の解明を進め、白斑発症や個体差に重大な因子を明らかにし、試験方法を検討することにより、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

ロドデノール誘発性白斑の病態・発症機序は未だ明らかでは無い。症例の多くは改善したが、拡大・難治性白斑が見いだされている。本研究において、患者および正常人皮膚の解析により、難治性白斑病変部でグルタチオン合成酵素の発現が有意に低下することが判明した。また、ロドデノールがメラノサイトのオートファジー経路に影響を及ぼすこと、患者皮膚組織の解析より形態的に尋常性白斑と異なるメラノサイト異常、患者末梢血中のリンパ球の異常を明らかにしており、これらは発症機序やロドデノールの個体による影響の違いを説明する一助となると考えられる。また、日本人モデルマウスを用いてロドデノール誘発性脱色素斑を再現し、紫外線の色素再生効果や発症機序解析への有用性を示した。

安全性評価については、ロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化を、システイン含有ペプチドとの結合により測定評価する方法、ならびにチロシナーゼ依存の細胞毒性として評価する方法について検討を行った。引き続き条件の至適化や、発症機序解明の成果を取り入れて試験系の改良を進め、化粧品成分・医薬部外品による新たな健康被害防止につなげる予定である。

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
片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
鈴木民夫 山形大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
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

研究協力者

安田正人 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教
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

濱田利久 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学講師
伊藤祥輔 藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症の原因に関しては、平成 25-26 年度の厚生労働科学研究「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)のほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失が報告され、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強やそれに由来するメラノサイト傷害の機序が提唱されている。しかし、白斑は使用

者の一部にのみ発生し、患者の多くは使用中止により症状の改善がみられるものの、使用中止後も白斑の拡大や新生がみられる難治性白斑を呈することがあり、病態形成機序は未だ不明である。免疫学的な発症機構も想定されている。

本研究では、基礎・臨床からの原因究明をさらに進める。患者から採取された病変部検体、難治性白斑を呈する患者の検体、尋常性白斑検体、正常人検体を用い、免疫組織学・細胞生物学的、分子機構について解析し、白斑症状の進行の個体差や病態、発症原因を明らかにすることを目的とする。また日本人皮膚モデルマウスによるロドデノール誘発性脱色素斑モデルを用い、発症機序の解明と有効な治療法の確立を行う。

白斑の発症にはロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化とメラノサイトの傷害/応答の関与が強く示唆される。しかしながら、様々な由来のメラノサイトはロドデノールに対する感受性に大きな差異があることが報告されている。本研究ではメラノサイト代替の細胞モデルを調製し、チロシナーゼ依存細胞毒性評価の方法を検討する。またチロシナーゼ代謝により生じるオルトキノンは反応性が高く、細胞内のチオール基と結合し、毒性や抗原性の発現に関わることが予想される。そこで代謝活性化とチオール基の修飾を、感作代替試験 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 用システイン含有ペプチドとの結合により測定する方法を検討する。ロドデノール類似化合物の白斑誘導能との関係を明らかにし、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

B. 研究方法

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症例ならびに尋常性白斑患者の病変部皮膚、健常人の正常皮膚を組織学的に比較解析した。また皮膚片より培養色素細胞と表皮角化細胞を調製・培養し、細胞生物学・分子生物学的に解析した。(倫理面への配慮)本研究は「世界医師会ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守する。

収集データに個人情報を含めず、試料と共に各研究実施機関で連結可能匿名化を行う。外部分析協力機関へは検体と被験者コード番号(検体認識番号)のみ送付され、個人情報は送られない。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

培養メラノサイトへのロドデノールの分子学的な影響を測定すると同時に患者皮膚生検サンプルや血液を用いてメラノサイトやリンパ球サブセット、自己抗体を解析した。(倫理面への配慮)ロドデノール誘発性脱色素斑または尋常性白斑患者に於ける HLA・末梢血リンパ球・皮膚局所の免疫解析(大阪大学医学部附属病院・研究倫理審査委員会 13421-2 承認済み)に基づき患者より同意書を取得の上研究を進めた。

3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

日本人モデルマウスは、國貞隆弘博士(岐阜大教授)との共同研究により作成した hk14-SCF Tg マウスで、体幹の色素沈着が日本人に近い系統を選択しヘアレス化した。皮膚色は日本人に近く、表皮基底層メラノサイト数はヒト表皮にとほぼ同様である。本マウスを使用してロドデノール誘発性脱色素斑の再現実験を行い、効率的に脱色素斑を発症する条件を確立し、続いて発症機序解明と治療法の開発を行った。(倫理面への配慮)本研究は山形大学医学部動物実験委員会により承認された。

4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

ロドデノールおよび類似物質のチロシナーゼ代謝による毒性増強と白斑誘導との関係検討のため B16 メラノーマ細胞のチロシナーゼを diBucAMP 処理で誘導、siRNA ノックダウン、阻害剤フェニルチオウレア処理により変え、あるいは HEK293 細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し、ロドデノール類似化合物の細胞毒性に及ぼす影響を検討した。

5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋

山]

ロドデノールはマッシュルームチロシナーゼと共に、ロドデノールおよび raspberry ketone のカテコール体は単独で、システイン含有ペプチドとインキュベーションし、生成する付加体を HPLC および LC/MS で分析した。ペプチドは OECD 感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) で使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys)を用いた。別途、チロシナーゼ共存下でのロドデノールのペプチド付加反応を大スケールで行い、生成物を HPLC で生成し、標準品を作成した。

C. 研究結果

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

これまでの研究で、ロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。そこでグルタチオン合成酵素(GCLC)について免疫組織学的に解析した。難治性白斑病変部 5 例と正常皮膚 8 例に対し、抗 GCLC 抗体、抗 MART-1 抗体で染色し、MART-1あたりの GCLC シグナルを定量した。その結果、病変部 0.623、正常皮膚 1.17(P=0.018)で、病変部において有意に GCLC の発現が低下していた。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

本研究ではロドデノールによりメラノサイトのオートファジー経路が活性化すること、逆にオートファジーが抑制された状態で細胞死を誘導しやすい事を明らかにした。さらに患者皮膚組織の解析より形態的なメラノサイト異常・メラニンの滴落を見いだした。また患者末梢血中のリンパ球の異常を見出した。

3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

日本人皮膚モデルマウス背部にロドデノール溶液を外用すると、2 週間後には脱色素斑が生じた。脱色素斑はまだら様で、メラニンの消失、

表皮基底層のメラノサイトの減少・消失が認められ、患者所見とほぼ同様であった。メラノサイトの減少・消失はロドデノール塗布 7 日目には認められた。本モデルでチロシナーゼ活性がないアルビノマウスでは、表皮メラノサイトの減少は認められず、チロシナーゼ依存性の作用が in vivo の系で明らかにされた。治療法を検証し、タクロリムス軟膏をロドデノール脱色素斑部に外用したが、7 週間で対照のワセリン外用部位にも順調な色素再生が認められ、効果は確認できなかった。紫外線 UVB 照射により色素再生がより増強されていることが確認できた。

4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

白斑誘導性フェノール類(ロドデノールやモノベンジルエーテルヒドロキノン、4-ter-ブチルフェノールなど)は共通してチロシナーゼにより代謝活性化される。メラノサイト/メラノーマ細胞特異的傷害による白斑誘導が推定され、その解明のため、チロシナーゼ依存的細胞毒性の評価方法を検討した。個体差の大きいヒトメラノサイトの代替として用いた B16 メラノーマ細胞では、チロシナーゼ発現量を cAMP で発現誘導、フェニルチオウレア阻害、siRNA ノックダウンし変化させたが、白斑誘導性フェノール類による細胞毒性にチロシナーゼ依存性は観察されなかった。そこで HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼを高発現したが、内在性のチロシンが代謝され顕著な毒性を発現し、評価の支障となることが判明した。

5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋山]

ロドデノールがチロシナーゼにより代謝され、生じたオルトキノンが細胞内のチオール基と結合する反応と白斑誘導との関連が想定されている。ロドデノールの代謝活性化とチオールの修飾を、感作試験 Direct Peptide Reactivity Assay 用システイン含有ペプチドとの結合により測定する方法を検討した。ロドデノールおよび raspberry ketone の代謝物カテコール体は混合により、ロド

デノールはマッシュルームチロシナーゼとの反応によりペプチドのシステイン基と反応することをマススペクトルで確認し、HPLC で定量した。

D. 考察

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

GCLC の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。これがロドデノールによって生じた結果なのか、難治性白斑を生じる原因なのか現時点では不明である。今後さらに症例を蓄積し、その詳細を明らかにしていきたい。また、その他の因子についても検討を続ける予定である。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

ロドデノール誘発白斑では今まで知られている細胞毒性以外にメラノサイトのオートファジーの状態が関与する事が考えられた。また、通常の尋常性白斑と異なるメラノサイト異常や免疫学的な機構の関与が疑われた。

3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

ロドデノール誘発性脱色素斑のモデルマウスを作製した。ロドデノール外用により、表皮のメラノサイトが減少・消失しており、患者の皮膚で認められた変化と同様な所見を得ることができた。有効な治療法の開発については、今回はタクロリムス軟膏の外用と紫外線照射による色素再生効果を調べた。前者の効果は確認できなかったが、紫外線(UVB)の効果については確認できた。今後も、他の治療法の効果について検証することが可能である。

4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

白斑誘導性フェノール類に共通するメラノサイト傷害の機構として、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化と毒性発現が想定されている。新規美白剤の安全性評価には、個体差の大きいヒトメラノサイトに代替する細胞モデルが必要とされる。活性代謝物オルトキノン体の毒性発現には ROS

産生や SH プールの減少・タンパク修飾などが、毒性防御には細胞内のレドックス系やグルタチオンプール等が関わることが予測され、両システムのバランスが細胞による応答の違いをもたらすと推定される。引き続き、ヒトチロシナーゼ強制発現細胞に、防御系遺伝子を共発現するなど改良を試み、高感受性メラノサイトの代替となる細胞モデルの調製、細胞毒性以外のエンドポイントの選定を行う。

5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋山]

ロドデノールがチロシナーゼ代謝され生じるオルトキノン体は反応性が高く、SH 基との結合は Ito らにより実証された。グルタチオンとの結合は保護的に働く一方、システインと RD フェオメラニンを生成し、またタンパク質システイン残基との結合はタンパク機能障害や抗原性発現の可能性がある。白斑誘導能との関係解明のため、チロシナーゼ、SH 基供与体、被検物質の 3 者による試験管内反応を検討した。SH 基供与体として OECD 感作性試験代替法 TG442C Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) において使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys)を用いた。物性・分析法が明確で供給体制が十分であるためである。引き続き試験条件を至適化し、ロドデノール類似化合物の白斑誘導能との関係を明らかにする。

E. 結論

ロドデノール白斑の発症機序解明と美白成分の安全性評価法構築を目指し、実際の症例におけるグルタチオン合成酵素の低下、ロドデノールの個体による影響の違いに関与すると考えられる分子機構・免疫異常を明らかにし、治療法や発症機序解明に有用なロドデノール脱色素斑モデルマウスを作成した。また、白斑発症と関連が強く示唆されるロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化を、システイン含有ペプチドとの結合により測定、ならびにチロシナーゼ依存の細胞毒性として評価する方法を検討した。発症機序解明の成果を取り入れ改良を進め、新たな健康被害防止につなげる予定

である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

最上(西巻)知子. 化学物質による白斑 - 職業性白斑の機序とロドデノール白斑 - . *Bull Natl Inst Health Sci.* 2015; 133, 13-20

Tanimura, K., Jin, H, Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H.: 2015. β 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood.* 125: 2835-2844.

Eleftheriadou V, Thomas K, van Geel N, Hamzavi I, Lim H, Suzuki T, Katayama I, et al.: Vitiligo Global Issues Consensus Group: Developing core outcome set for vitiligo clinical trials: international e-Delphi consensus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28(3): 363-9.

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I: 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: Insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2015; 77(3): 182-5.

Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I: An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. *J Der-*

matol Sci. 2015; 77(3): 185-8.

Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I : Possible involvement of CCR4+CD8+ T cells and elevated serum CCL22 and CCL17 in Patients with Rhododendrol-induced Leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2015; 77(3): 188-90.

Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kago-hashii Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K: Guide for medical professionals (i.e., dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol.* 2015; 42(2): 113-28.

Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I: Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberculous Sclerosis Complex. *JAMA Dermatol.* 2015; 151(7): 722-30.

Matsumura S, Terao M, Murota H, Katayama I : Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2015; 78(3): 215-23.

Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ : NUA2 Amplification Coupled with PTEN Deficiency Promotes Melanoma Development via CDK Activation. *Cancer Res.* 2015; 75(13): 2708-15.

Tanaka M, Yang L, Wataya-Kaneda M, Suzuki T, Okamura K, Hozumi Y, Yang F, Katayama I : Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 in a Japanese infant. *J Dermatol.* 2015; 42(9): 906-7.

ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会, 伊藤 明子, 青山 裕美, 鈴木 加余子, 鈴木 民夫, 種村 篤, 錦織 千佳子, 伊藤 雅章, 片山 一郎, 伊藤 祥輔, 大磯 直毅, 深井 和吉, 船坂 陽子, 山下 利春, 松永 佳世子: ロドデノール誘発性脱色素斑症例における三次全国疫学調査結果. *日本皮膚科学会雑誌* 2015; 125No. 13.

2. 学会発表

Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Silencing of tuberous sclerosis complex (TSC) 2 via siRNA causes reduction of autophagy and impairment of melanogenesis in cultured human skin epidermal melanocytes: implication for a potential mechanism of hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex: 2015 World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada (2015. 6.8-6.13)

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in hypopigmented macules in patients with tuberous sclerosis complex: The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (2015.12.11-13)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Katayama I : Dynamic visualization of dendritic cells in the skin from patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma: 14th International Workshop on Langerhans Cells (2015.11.7 京都)

Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T: Immunohistopathological analysis of frizzled-4-positive immature melanocytes from hair

follicles of patients with Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci* 80: 156-158, (2015).

Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T: Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci*. 81(1):35-43 (2016)

阿部優子、鈴木民夫 教育講演「白斑:ロドデノール誘発性脱色素斑 up to date!」病態解明その3 動物モデルからわかったこと第 114 回日本皮膚科学会総会 横浜 2015.5.29-31

Okamura K, Abe Y, Yoshizawa J, Ohe R, Yamakawa M, Hozumi Y, Suzuki T “Histopathological investigation on patients with Rhododendrol-induced leukoderma” The 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015

T. Suzuki “Rhododendrol-induced leukoderma”The 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015

阿部優子、岡村賢、穂積豊、田宮元、鈴木民夫”ロドデノール誘発性脱色素斑の病態:動物モデルと遺伝子解析”第 26 回日本色素細胞学会学術大会 札幌 2015.11.14-15

Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T “Immunohistopathological analysis immature melanocytes from hair follicles of patients with Rhododendrol-induced leukoderma” 第 40 回日本研究皮膚科学会 2015.12. 11-13

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案登録、3. その他
なし