

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 安全性予測評価部 主任研究官

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症に関して、ロドデノールの代謝とメラノサイト傷害の可能性を示唆する報告がなされているが、病態や発症機序は未だ不明な点が多い。症例の多くは改善したが、拡大・難治性白斑も見いだされている。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。

ロドデノール白斑患者および健常人検体の解析により、改善例、難治例に関わらず病変辺縁部においてグルタチオン合成酵素の有意な発現低下が認められた。また、尋常性白斑症例との自己抗体の違い、HLA-DA とチロシナーゼの直接会合によるメラニン産生抑制とロドデノールによる増強、皮膚炎や紫外線の影響、ロドデノール白斑モデルマウス病態への細胞接着分子の関連の可能性などの知見を得た。これらは発症機序やロドデノールの感受性の違いに関わることが考えられる。

安全性評価に関し、ロドデノールや白斑誘導性類似化合物はチロシナーゼによる代謝活性化が報告されている。化合物の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する方法について反応条件の検討を進めた。またロドデノール代謝物重合体(メラニン)を合成し細胞内での強い酸化促進作用を明らかにした。代謝活性化による細胞傷害仮説の検証を試みたが、チロシナーゼ高発現により 4-SCAP は毒性増強される一方、ロドデノールなどチロシナーゼ阻害剤はむしろ内因性チロシン代謝による細胞毒性を抑制する結果を得た。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た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
伊藤祥輔	藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

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
五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部長

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問題に関しては、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。白斑患者の多くは使用中により症状の改善がみられるものの、塗布部以外にも白斑が波及する難治性白斑も報告されており、病態形成機序は未だ不明である。

本研究では、原因究明をさらに進め、患者および正常人検体を免疫組織学的に解析し、白斑症状の進行の個体差や病態を明らかにする。また独自開発したロドデノール白斑モデルマウスを使用して病態解明を行う。

ロドデノールをはじめとする白斑誘導性類似化合物は共通してチロシナーゼによる代謝活性化を受けることが報告されている。本研究では、代謝活性化とメラノサイトの傷害との関わりについて、[I] 個体差の大きいメラノサイトに代替する細胞モデルを構築、[II]代謝物重合体(メラニン)を合成し、解析を行う。また代謝産物オルトキノンは反応性が高く極めて不安定であり、直接の測定は困難である。本研究では[III]代謝産物オルトキノンをSH 基を持つ化合物と反応させて測定する方法の確立を試みた。代謝活性化によるチオール基の修飾反応は、毒性や抗原性の発現への関わりが予想される。そこで感作代替試験 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。

B. 研究方法

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。そこで本研究では、ロドデノール配合薬用化粧品による白斑病変辺縁部皮膚と健常人の正常皮膚について、グルタチオン合成酵素(GCLC)の発現を免疫組織学的に比較解析する。(倫理面への配慮)本研究は、「世界医師

会ヘルシンキ宣言(2013年10月改訂)」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」を遵守して行う。収集するデータに個人情報は含めず、試料とともに各研究実施機関で適切に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、個人情報が送られることはない。

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、自己抗体を解析する。また紫外線がメラノサイトの機能、メラニン産生へ与える影響を検討した。(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ている。

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]

脱色素斑を発症した患者、および健常人より皮膚片を採取し、その皮膚片からメラノサイトとケラチノサイトをそれぞれ培養し、この培養細胞を使用して感受性や免疫応答に関わる分子の発現等を解析する。また、日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布して作成したロドデノール白斑モデルマウスの白斑解析を行い、病態解明を行う。(倫理面への配慮)患者の試料を集めるために倫理委員会に研究計画を申請して、承認を得ている。また、動物実験に関しては本学の動物実験委員会により、承認されている。

4. 安全性評価[III]:代謝活性化評価法 [秋山]

4-置換フェノール類のチロシナーゼによる代謝とシステイン含有ペプチドとの反応について、測定

条件を検討した。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)はマッシュルーム由来チロシナーゼと混合してインキュベートし、酢酸酸性にして反応を止めた試験溶液を、ODS カラムを用い、トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液を移動相とした LC/MS によって分析した。

5. 安全性評価[III]:代謝物の解析 [伊藤]

ロドデノール (RD) に由来するメラニンによる細胞内抗酸化剤の酸化的枯渇を通常のメラニンと比較検討した。RD-ユーメラニン (RD-EM) および Dopa-ユーメラニン (Dopa-EM) は RD あるいは Dopa をチロシナーゼで 4 時間酸化し、RD-フェオメラニン (RD-PM) および Dopa-フェオメラニン (Dopa-PM) の場合はシステイン共存下で反応し調製した。引き続きグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH と反応させ、抗酸化物質の残存量は HPLC 法にて定量した。また、酸化により生成した酸化型グルタチオンおよびシスチンも合わせて定量した。

6. 安全性評価[II]:細胞評価法 [最上]

ロドデノールおよび白斑誘導性類似化合物の細胞毒性発現におけるチロシナーゼ代謝の役割を、293T 細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し解析した。ヒトチロシナーゼを用いた代謝試験に利用するために、膜貫通領域を欠く可溶性ヒトチロシナーゼの発現・精製法を検討した。

C. 研究結果

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川・安田]

ロドデノールによる白斑を生じた症例のうち、改善 23 例、難治 17 例の白斑病変辺縁部と尋常性白斑 2 例、正常皮膚 10 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、改善例病変辺縁部 0.602、難治例 0.646 に対し正常

皮膚 1.16 ($P < 0.01$) で、改善例、難治例に関わらず病変辺縁部において有意に 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]

尋常性白斑で甲状腺抗体、MCHR-1、TYRP2 に対する自己抗体を認めた。ロドデノール白斑では上記自己抗体は認めなかった。HLA-DR とチロシナーゼの直接会合がメラニン産生を抑制する機序を見出した。ロドデノールはさらにその効果を増強した。皮膚炎や紫外線の影響でロドデノールがメラノサイト毒性以下の濃度でメラノサイトに負の影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの影響にはロドデノールの NF- κ B 抑制経路が関与する可能性が考えられた。

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]

患者およびボランティアからの生検標本を使用して免疫組織化学的な解析を行い、ストレス応答に関する分子の発現を解析した。その結果、患者群では、グルタチオン合成系の遺伝子発現誘導が健常人に比べ、低下している結果が得られた。

モデルマウスの解析では、白斑形成、ならびに色素再生に細胞接着分子がかかわっていること、また、紫外線と VitD3 軟膏は色素再生増強作用があること、色素再生が認められた部位にも認められない白斑部もメラノサイトの遊走は認められた。

4. 安全性評価:代謝活性化評価法 [秋山]

ロドデノールを含め白斑誘導性類似化合物はチロシナーゼによる代謝活性化が知られている。Raspberry ketone (RK)、hydroquinone monobenzyl ether (MBEH) 及び 4-tert-butylphenol (4-TBP) は、マッシュルームチロシナーゼ及び DPRA(Cys) との反応後、いずれもロドデノール

(RD)と同様に減少し、ペプチドと結合したカテコール又はそのフラグメントが検出された。終濃度 0.1–0.5 mmol/L の RD を基質とした反応において、RDの減少速度は初期 RD 濃度に比例し、また DPRA(Cys)の減少速度もほぼ同じであることから、この濃度範囲でチロシナーゼによる酸化を評価できると考えられた。基質濃度を 0.3 mmol/Lとした反応において RD 及び RK はいずれも反応開始後 30 分まで経時的に減少した。

5. 安全性評価:代謝物の解析[伊藤]

チロシナーゼ代謝物の重合により生じるロドデノール(RD)-EM は Dopa-PM とほぼ同速度でグルタチオンおよびシステインを酸化した。生成物の大半は酸化型グルタチオンおよびシステインであった。また、同時に H₂O₂ の産生が確認された。RD-PM および Dopa-EM の酸化活性は、RD-EM、Dopa-PM の 2 分の 1 程度であった(図 1)。RD-EM は、アスコルビン酸および NADH についても効率よく酸化した。

6. 安全性評価:細胞評価法 [最上]

白斑誘導性 4-置換フェノール類(ロドデノールやモノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-ter-ブチルフェノール(4-TBP)、4-SCAP など)はチロシナーゼにより代謝活性化される。代謝産物によるメラノサイト傷害仮説を検証するために、293T 細胞にヒトチロシナーゼを発現すると、4-SCAP の細胞毒性が顕著に増強された。しかし、ロドデノールや 4-TBP、MBEH などチロシナーゼ阻害作用を有する化合物は内在性チロシン代謝による毒性発現をむしろ抑制する効果を示すことが判明した。

代謝活性化試験において、マッシュルームチロシナーゼに替えてヒトチロシナーゼを用いるために、その可溶性型の調製を検討した。ヒトチロシナーゼの膜貫通領域を欠きシグナルペプチドを含むアミノ酸残基 1-456 を GS リンカーで His タグと結合し、293T 細胞に発現させた。分泌さ

れる活性を維持した可溶性ヒトチロシナーゼを簡易に精製する方法を確立した。

D. 考察

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

グルタチオン合成酵素(GCLC)の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。ロドデノールによる白斑を生じた症例では改善例、難治例に限らず、GCLC 発現が低下しており、また、発症後 1 年以上経った検体でも低下していることから、患者は元々 GCLC の発現が低いために、抗酸化作用が弱く、ロドデノールによるメラノサイト傷害を受けやすい個体であったことが推測される。今後さらに検体数を増やし、解析を進める予定である。

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。さらにメラノサイトに対するロドデノールの毒性が紫外線で増強する可能性が明らかとなり、紫外線ストレスへの反応性の個人差が、発症率に影響している可能性が考えられた。

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]

ロドデノール感受性は、グルタチオン合成系の遺伝子発現が関わっていることが示唆された。

ロドデノール脱色素斑モデルマウスを使用した本研究により紫外線や VitD3 軟膏は、ロドデノール白斑に対して有効な治療法になりうることが示された。

4. 安全性評価:代謝活性化評価法[秋山]

白斑症例の原因物質として報告がある 4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し、RD を基質とした反応で

RD 及び DPRA(Cys)の減少速度が RD の初期濃度及び時間に依存していたことから、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法としての条件の一部が満たされた。

5. 安全性評価:代謝物の解析 [伊藤]

ロドデノール(RD)はチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを生産する。オルトキンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオン、システインなどの非タンパク性 SH 化合物のみならず、タンパク中のシステイン残基とも反応し、付加体を形成する。これが RD によるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、B16 メラノーマを用いた実験では、上記の代謝に加え、RD 由来のメラニンが産生することが確認されている。一方、天然のフェオメラニンは強い酸化促進作用を持つことが近年明らかにされた。そこで今回、RD-EM および RD-PM を調製し、その酸化促進作用を調べた。その結果、RD-EM の酸化促進作用は、フェオメラニンに匹敵することが分かった。

6. 安全性評価:細胞評価 [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序として、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増強が想定されている。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としてヒトチロシナーゼ強制発現細胞を検討したが、予想通りチロシナーゼによる細胞毒性増強が観察されたのは 4-SCAP のみで、ロドデノール、4-TBP、MBEH ではむしろ内因性チロシン代謝による毒性を抑制する「チロシナーゼ阻害作用」が観察された。各化合物のチロシナーゼへの基質/阻害作用のバランスの違いが異なる結果をもたらしたと推定している。メラノサイトでは、チロシナーゼは下流のメラニン合成酵素とともにメラノソームに局在する。今後、白斑誘導性化合物の毒性発現におけるメラノソームや下流経路が役割を有する可能性、あるいは細胞毒性以外のエンドポイントが白斑と相関する可能性など、今後検討の必要がある

と考えられる。

E. 結論

ロドデノール白斑の発症機序解明のため、患者検体とモデルマウスからの試料を使い、多面的に病態解明を行った。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關与すると考えられる分子機構・免疫異常が明らかになった。白斑発症機構は単一の要因では説明がつかないことから、各研究のさらなる展開が望まれる。

安全性評価法の確立に向け、白斑誘導性化合物のチロシナーゼによる代謝活性化と細胞毒性との関係、代謝物の酸化促進作用を解析するとともに、代謝活性化をシステイン含有ペプチドとの結合反応により測定する方法を検討した。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

Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H: Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol.* 2016;1(6):16054.

Terao M, Itoi S, Matsumura S, Yang L, Murota H, Katayama I:Local Glucocorticoid Activation by 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 in Keratinocytes: The Role in Hapten-Induced Dermatitis. *Am J Pathol.* 2016;186(6):1499-510.

Shindo S, Murota H, Katayama I:Possible association of pigmentary demarcation line with cervical conization and contraceptives. *J Dermatol.* 2016;43(12):1444-5.

Arase N, Yang L, Tanemura A, Yang F, Suenaga T, Arase H, Katayama I:The effect of rhododendrol inhibition of NF- κ B on melanocytes in the presence

of tyrosinase. *J Dermatol Sci.* 2016;83(2):157-9.

Itoi-Ochi S, Terao M, Murota H, Katayama I: Local corticosterone activation by 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in keratinocytes: the role in narrow-band UVB-induced dermatitis. *Dermatoendocrinol.* 2016;8(1):e1119958.

Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S: Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(28):E4061-8.

Terao M, Katayama I: Local cortisol / corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016;84(1):11-6.

Tanaka A, Ikinaga K, Kiyohara E, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Fujimura R, Mizui M, Isaka Y, Katayama I: Critical renal adverse event induced by nivolumab therapy in a stage IV melanoma patient. *J Dermatol.* 2016

Abe Y, et al: Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci.* 81(1): 35-43 (2016)

Hayashi M, et al: A novel three dimensional imaging method for the measurement of area in vitiligo and chemical leukoderma. *J Dermatol Sci.* 84(2):219-221 (2016)

Okamura K, et al: Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes. *J Dermatol Sci.* 85(2):131-134 (2017)

Gan EY, et al: Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30(1):28-40 (2017)

Ito S., Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2016.

Ito S., Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing raspberry ketone produces

(E)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 859-868, 2017.

2. 学会発表

Katayama I, Yang L, Yang F, Kotobuki Y, Murota H, Tanemura A, Wataya-Kaneda M: Breakdown of skin homeostasis in the pathogenesis of autoimmune vitiligo. The 7th Annual Meeting of Korean Society of Vitiligo The 1st Meeting of East Asia Vitiligo Association. Korea (2016.4.16)

楊飛、金田眞理、室田浩之、小野慧美、楊伶俐、片山一朗: The mechanism of diminishing sweating in patients with tuberous sclerosis. 第43回皮膚かたち研究会 東京 (2016.6.19)

荒瀬規子 種村篤 楊伶俐 楊飛 西岡めぐみ 高橋彩 片山一朗: ロドデノール白斑発症機構の解析 第27回日本色素細胞学会シンポジウム 岐阜 (2016.11.12-13)

Tanemura A, Tanaka A, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I, Oiso N. Leukoderma lesion in extra-mammary paget's disease. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Katayama I. Patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Katayama I, Takahashi A, Yang F, Yang L, Arase N, Tanemura A, Kaneda M. Mast cell activation promotes possible transient hypermelanosis of the perilesional skin in rhododendrol-induced-leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Arase N, Tanemura A, Yang L, Jin H, Nishioka M, Yang F, Aoyama Y, Suenaga T, Arase H, Katayama I. Immunological analysis of the patients with vitiligo vulgaris and rhododendrol-induced leukoderma. 第41回日本研究皮膚科学会総会 仙台 (2016.12.9-11)

谷田佳世、その他: 眼皮膚白皮症2型(OCA2)の1例、宮城地方会第373回例会、宮城県建設産業会館、2016年3月5日

鈴木民夫: 日本人の皮膚色決定にかかわる遺伝子、北海道地方会第405回例会、ホテルロイトン札

幌、2016年3月19日

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Masakazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, Kayoko Matsunaga, Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin: 1st meeting of the East-Asia Vitiligo Association. Severance Hospital, Seoul, Korea, April 16, 2016

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu: Rhododendrol-induced leukoderma analyzed with a model mouse: VITILIGO INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2016, the hotel NH Vittorio Veneto, Roma, Dec. 2-3, 2016

秋山卓美, 清水久美子, 伊藤祥輔, 内野正, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol のシステ

イン含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年7月)

秋山卓美, 清水久美子, 富田由花, 伊藤祥輔, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol 及び構造類似化合物の Cys 含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 日本薬学会第137年会(2017年3月)

伊藤祥輔, 黄倉真恵, 若松一雅, 山下利春. ロドデノールユーメラニンは強い酸化促進作用をもつ. 第27回日本色素細胞学会. 平成28年11月12日. 岐阜

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