

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 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 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（協力）研究報告

1. 群馬大学皮膚科におけるロドデノール誘発性脱色素斑患者の臨床解析 9
石川 治、岸 史子
2. 原因究明に関する調査研究
. 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文献調査
13
最上 知子
3. 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 . . . 23
カネボウ化粧品
4. 原因究明に関する調査研究 85
. ロドデノールの細胞毒性に関する研究
秋山 卓美
5. 再発防止に関する研究
秋山 卓美、飯島 正文、川島 眞、杉林 堅次、小島 肇、小野 敦 97

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

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(ロドデノール)配合薬用化粧品の使用者に生じた白斑問題に関して、ロドデノールによる白斑発症機序の解明に係わる調査研究、及び研究結果を踏まえた事故再発防止に向けた対応策を検討した。

1. 発症機序の解明に関わる調査研究：

皮膚科専門外来を受診したロドデノール配合化粧品により白斑を生じたと考えられる患者の約半数は、使用開始 1 年以内に脱色素斑を生じ、脱色素斑部では、表皮内のメラノサイトの消失、真皮上層へのメラニンの滴落に加え、単核球の浸潤が認められた。当該化粧品の使用を中止した患者の 74% に症状の改善が見られたが、複数種別の当該化粧品の併用していた場合は改善が乏しい傾向があった。引き続き患者の経過観察を行うとともに、パッチテストによる白斑への免疫系の関与、および治療法についても検討する。

ロドデノール類似化合物による白斑症状とその機序に関する文献調査、ロドデノール原薬の純度、代謝と細胞毒性についての試験、およびカネボウ化粧品から提供された非臨床試験結果の評価を行った。褐色モルモットへのロドデノール塗布により表皮メラノサイトは著しく減少し、患者の臨床症状と類似の結果が得られることが、カネボウ化粧品の事故後の追試験で示された。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。ロドデノールは、メラノサイトのチロシナーゼにより細胞毒性のより強い水酸化体に代謝され、この代謝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。一方で、職業性白斑を起こすことが報告されているフェノール誘導体である 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) は、メラノサイトへの直接作用に加え、免疫系を介する二相性の作用がメラノサイト消失をもたらすと考えられている。カネボウ化粧品の報告では、ロドデノールは実験動物での感作性試験はおおむね陰性であったが、免疫系の関与についてはさらなる検討が必要と思われる。

2. 再発防止に向けた対応策の検討：

既存の承認審査・市販後安全対策の方策について整理し、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。ロドデノール配合薬用化粧品による白斑問題を教訓に、新有効成分含有薬用化粧品の承認申請時には、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長期安全性試験の実施を求めべきとされた。また白斑事故の拡大は、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が要因と考えられ、企業から国への副作用報告制度の強化が必要であり、副作用報告の対象範囲を広げるべきと提言した。製造販売後調査手法の具体的な工夫、製品の添付文書の充実の内容についても提言した。

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室長

研究協力者

岩月 啓 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

A. 研究目的

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、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。本化粧品を使用後に白斑（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。カネボウ化粧品によると、平成 26 年 3 月末までに、1 万 8 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ている。

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症問題については、日本皮膚科学会等でも原因究明を進めているところであるが、厚生労働省として再発防止に向けた検討を進める必要があることから、厚生労働科学研究として本事業を行うことにした。本研究では製造販売業者及び関

連学会と連携して、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。本研究ではさらに、現状の医薬部外品の承認申請に係る試験方法、製造販売後調査方法、副作用報告制度や適正使用に関する注意喚起の方法などを調査し、再発防止の観点から、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ことにした。

B. 研究方法

1. 原因究明に関する研究（臨床解析）

ロドデノール含有化粧品による皮膚傷害が報道されて以降に、白斑を主訴として群馬大学医学部附属病院皮膚科外来を受診した新規患者、及びそれ以前に尋常性白斑として通院加療中であつた患者でロドデノール含有化粧品の使用歴が確認された患者を解析した。

（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. ロドデノールおよび類似物質による白斑に関する文献調査

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収集し調査した。また、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）も検討した。

2-2. ロドデノールの品質及び代謝試験

ロドデノールの純度及び製品中含量を定量した。さらにロドデノールの合成原料であるラズベリーケトンの混入量を HPLC または LC/MS で分析した。キラルカラムを用いて、ロドデノールの光学異性体存在比を求めた。これらの化合物についてチロシナーゼの代謝実験を行い、生成物を HPLC または LC/MS で分析した。

3. 再発防止に関する研究

ロドデノール配合薬用化粧品の承認申請時に

提出された資料、現行の医薬部外品の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、製造販売後調査手法、副作用報告制度、製造販売後の安全管理の基準、適正使用に関する注意喚起の方法等を調査し、今後の医薬部外品の安全性確保のあり方について検討した。

C. 研究結果

1. 群馬大学皮膚科におけるロドデノール誘発性脱色素斑患者の臨床解析

研究班員所属施設の 54 例（男性 1 名、女性 53 名。年齢分布は 29 歳から 81 歳、平均 55 歳）について解析した。含有化粧品を 1 年以上使用していた方が 85% で、約半数の患者で使用開始 1 年以内に脱色素斑が出現していた。掻痒感 は 44% の患者に、紅斑は 35% の患者に存在した。使用中止後 74% の患者に白斑の改善が見られている。顔面、頸部では色素再生が早く、手背や上肢では色素再生が遅い傾向があった。白斑の面積に関しては、40% の患者で顔面全体に及び、頸部と手背では狭くなる傾向にあった。脱色素斑部の病理所見では、白斑部表皮内のメラノサイトの消失と、真皮上層へのメラニンの滴落、真皮脈管周囲の単核球浸潤がみられた。

2. 基礎からの分析

基礎からの原因究明に関して、ロドデノール類似化合物による白斑症状について文献情報を調査し、ロドデノール原薬および製品サンプルの品質、代謝と毒性、カネボウ化粧品より提供されたロドデノールの非臨床試験結果について評価を行った。

2-1. ロドデノール類似物質による白斑症状に関する文献調査

化学物質により皮膚に白斑/脱色素斑が生じる現象は古くより知られ、1939 年にヒドロキノンモノベンジルエーテル (MBEH) を扱う工場労働者での発症が、引き続き 4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) などの職業性白斑事例が報告されている。黒色モルモットへの高濃度塗布に

より皮膚色素脱失が確認され、構造活性の検討から、白斑/脱色素斑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」と結論されている。

2-1-1. メラノサイト選択的な毒性発現

4-TBP と MBEH は特に顕著な作用を示し、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によって皮膚のメラニンとメラノサイトが減少・消失する機序が提唱されている。

4-TBP と MBEH の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。4-TBP と MBEH は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、活性酸素種 ROS の産生を増加することが確認され、酸化ストレスの増加がメラノサイト選択的な毒性発現に関わると考えられている。

2-1-2. 免疫の誘導

4-TBP と MBEH のメラノサイトに対する毒性は強力ではない (IC₅₀ 値は数百 μM である) ことから、メラノサイトに対する免疫応答が色素脱失作用に大きな役割を持つと予想されている。遅延型アレルギー性に関して、モルモットを使った皮膚感作性試験 GPMT で 4-TBP は陰性、チロシナーゼ代謝物 4-TBC が陽性であった。MBEH はヒトでメラノサイトが存在する部位でパッチテスト陽性を示し、メラノサイトに強く関わる応答が示唆された。

4-TBP と MBEH はチロシナーゼによりカテコール体、オルトキノン体に代謝され、それぞれ SH 基やチロシナーゼへの付加反応性を獲得することから、ハプテン抗原の形成によりハプテン特異的な免疫応答が予想される。また両化合物の場合、白斑は長期間暴露された人の全てには発症せず、化合物に接触した部位以外にも広がることから、メラノサイトに対する自己免疫誘導の可能性も推定されている。(1)アポトーシス、ネクローシスの誘導、(2)メラノサイト抗原の放出、(3)メラノサイト内の小胞体ストレス応答を介する炎症性サイトカイン IL-6・

IL-8 の産生など、(自己)免疫誘導につながる報告がなされている。

2-2 .ロドデノール原薬・製品の品質面での評価および代謝・毒性

ロドデノールは2位に不斉炭素を持ち、鏡像異性体(R体とS体)が存在しうる。キラルカラムで分離したところピーク面積からR体とS体の存在比がほぼ1:1であることが判明した。また合成原料のラズベリーケトンによる白斑事例が報告されていることから含量を分析したところ、ロドデノールに対しラズベリーケトンの重量比は0.04%以下であり、製品に配合されるロドデノールの純度は非常に高いことがわかった。また、製品へのロドデノール配合量は約2%であることを確認した。

ロドデノールがチロシナーゼおよびメラノサイトによって水酸化体に代謝されること、水酸化体はロドデノールより10倍以上強力な細胞毒性を示すことを確認した。

2-3 .カネボウ化粧品による非臨床試験報告

ロドデノールを褐色モルモットに高濃度塗布し、皮膚内色素とメラノサイトの減少が確認された。4-TBPの報告と同様に、ロドデノールによる脱色素斑の回復が観察されている。

ロドデノールのメラノサイトに対する毒性はチロシナーゼ活性に大きく依存しており、ヒトメラノサイトはロドデノール高感受性群と低感受性群に分かれた。しかしROSは検出されなかった。

ロドデノールに感受性の高いメラノサイトにおいても毒性のIC₅₀値は数百μMであった。しかしながら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。また皮膚感受性試験GPMTおよびLLNAにおいてロドデノールは陰性、高感度GPMT改変法であるCCETで疑わしい皮膚反応が認められた。光感作性はAS-AAおよびHaberの両試験で陰性であった。

一方、ロドデノール処理メラノサイトでは、小胞体ストレス応答の誘導が認められた。

3 .再発防止策について

既存の承認審査・市販後安全対策の方策について整理し、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。

3-1 .非臨床試験

申請段階で実施された試験項目で本症例を予期することは困難であった。試験項目の追加の必要性については、原因究明の結果を踏まえる。

3-2 .臨床試験

新有効成分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の実施を求めている。これに加え、長期安全性試験を皮膚科専門医の管理下で実施するべきで、具体的方法については今後検討することにした。化粧品を重ね塗りする可能性を考慮した臨床試験の用量設定も重要であるとした。

3-3 .製造販売後調査

ロドデノール配合薬用化粧品については、承認後2年間で約1200例の製造販売後調査が実施されたが、調査の中で白斑の症例は確認できなかった。対面販売の実態を利用した製造販売後調査を検討してはどうか、調査に皮膚科専門医が関与すべきとの意見が出された。これを踏まえ、医薬部外品の製造販売後調査の実施方法についてガイドライン等を作成すべきとされた。

3-4 .副作用報告

副作用の情報を迅速に把握し必要な安全対策を取ることで、健康被害の拡大を防ぐことを目的として、副作用等の国への報告が義務付けられている。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。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。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し、個別症例報告を法令上義務化するとともに、重篤な副作用症例の対象範囲

を拡大することを求めた。

3-5 . 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るべきと意見した。

3-6 . 使用上の注意

化粧品の使用上の注意事項の表示として、赤味、はれ、かゆみ、刺激の注意はあるが、白斑を示す皮膚の色の変化については記載がない。この表現を追加するべきとの意見があった。

D . 考察

1 . 原因究明に関する検討

1-1 . 臨床からの分析

ロドデノールによる白斑が獲得免疫のアレルギ－反応を介する場合は掻痒と紅斑を伴うが、細胞毒性によっても二次的に炎症反応が惹起され掻痒と紅斑をきたすことがある。ロドデノールで白斑を生じた患者の中にも掻痒と紅斑を伴う人がおり、鑑別するため6例にパッチテストを実施したが、いずれも陰性であった。今回のロドデノールがどちらの機序を介するかを明らかにするためには、多くの症例での検討が必要と考えられる。

研究班員所属施設における患者については製品の使用中止後 74%に改善傾向が認められており、日本皮膚科学会の中間報告とほぼ同じ割合であった。部位による色素再生の早遅の理由は不明である。対象とした症例で治療内容による改善程度に差は見られず、この色素再生は自然経過によるものと推定した。改善が見られない症例に対する治療、あるいは改善を促進する治療を確立することが臨床的には最も重要であ

り、尋常性白斑で行われる皮膚移植も選択肢に入ると思われる。

1-2 . 基礎からの分析

1-2-1 . 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/カテコール誘導体は、工場労働での暴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。これらの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と考えられている。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、メラニン合成阻害とともに ROS 産生が確認され、4-TBP や MBEH 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 のメラノサイト毒性は強力ではなく、免疫応答の誘導が色素脱失に大きく寄与することが予想されている。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が予想される。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おり、細胞死誘導やチロシナーゼ修飾に伴うメラノソーム抗原の放出など、自己免疫につながる報告がなされている。

1-2-2 . ロドデノールの品質および非臨床試験結果とその評価

ロドデノールの合成原料ラズベリーケトンには白斑の事例が報告されているが、ロドデノール原薬での含量は 0.04%以下であり、純度に問題は無いことが確認された。

カネボウ化粧品によるロドデノールの非臨床試験においては、褐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が確認された。4-TBP と同様に脱色素斑の回復も観察され、メラノサイトへの直接効果が可逆的であることを示唆している。しかしながら、職業性白斑事

例の代表的な原因物質である 4-TBP や MBEH などの報告とは動物と塗布溶剤が異なる。ロドデノールの色素脱失メカニズムについてもメラノサイトへの直接作用と免疫を介する二相性の作用と想定される。直接作用については、4-TBP や MBEH の場合と同様に、毒性発現にはチロシナーゼによる代謝が重要であり、このことがメラノサイト選択的毒性をもたらすと考えられる。具体的にはロドデノールの毒性は細胞のチロシナーゼ含量に大きく依存し、メラノサイトは感受性の異なる 2 群に分かれるとともに、代謝により生じる水酸化体がより強力な毒性を示していた。一方ロドデノールでは ROS は検出されず、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思われる。

ロドデノールの場合もメラノサイトに対する毒性は強力ではなく、色素脱失には免疫応答が大きく寄与することも予想される。感作性・光感作性試験ではロドデノールはおおむね陰性であった。一方、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が誘導されており、ロドデノールによる免疫誘導の可能性について、さらなる検討が必要と思われる。

2. 再発防止に関する検討

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の対応方を検討した。ロドデノール配合薬用化粧品については非臨床試験として種々の試験項目が実施されたが、今回の白斑を予期することはできなかった。追加の試験項目を課すことの必要性について引き続き議論することとした。臨床試験として、ヒトパッチ試験及び使用成績試験の実施を求めているが、医薬品外用剤に準じた長期安全性試験を皮膚科専門医の管理下で構築・実施すべきであるとの意見があり、必要な症例数と試験期間について引き続き検討することにした。化粧品は化粧水、乳液、クリームとシリーズアイテムが有り、同一有効成分を含む複数アイテムを重ね塗りする可能性がある。ロドデノールについても複数ア

イテムを使用した人で発症率が高かったと報告されている。こうしたことを考慮した臨床試験の実施方法を策定することも必要と考えた。

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、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に製造販売業者に求めている。現状、医薬部外品の製造販売後調査は必ずしも承認条件とされていないが、「新一般用医薬品」に準じた調査が行われている。問題となった白斑は現行の調査では見つからず、きめ細かな情報収集への改良が必要と考えられた。皮膚科専門医の調査への関与も有効ではないかと議論している。

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。平成 23 年に、加水分解コムギ末を含有する薬用石鹸の使用者で、アナフィラキシーを発現した事例が報告されたことを受け、医療関係者から健康被害の情報を入手した場合には、これを社内においてとりまとめ研究報告するよう通知されたが、法令上の報告義務はないままであった。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べきであると考えた。これを受けて、平成 26 年 2 月 26 日付けで「薬事法施行規則及び医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令の一部を改正する省令（平成 26 年厚生労働省令第 13 号）」が公布され、同年 4 月 1 日から施行されること

となっている。

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。

以上、新有効成分含有医薬部外品の安全性評価に係る臨床試験の拡充、製造販売後調査手法の工夫、副作用報告制度及び GVP の強化、製品の使用上の注意の改訂による適正使用に係る情報提供などが、医薬部外品の副作用による健康被害拡大の再発防止に有益な方策ではないかと考えた。安全性評価に係る非臨床試験、臨床試験の実施に関する検討や評価手法について、「安全性評価ガイドライン(仮称)」として取りまとめることも視野に入れ、さらに検討を進める。

E. 結論

ロドデノール配合化粧品により白斑を生じたと考えられる患者の約半数は、使用開始1年以内に脱色素斑を生じ、脱色素斑部では、表皮内のメラノサイトの消失、真皮上層へのメラニンの滴落に加え、単核球の浸潤が認められた。ロドデノール含有化粧品の使用中止後は約70%の患者で色素の回復がみられ、その回復度は上肢や手背に比べて顔面、頸部では早かった。しかし、ロドデノール含有化粧品を併用していた場合は改善に乏しいと考えられた。なお現行の治療の有無で軽快率に著明な差はなく、治療法については今後も検討が必要であった。患者の中には掻痒感や紅斑を伴う人が存在し、白斑症状と免疫系との関係が疑われた。鑑別にはパッチテストが有用と考えており、臨床面からの白斑発症機序の解明に向けた検討を進める。

基礎からの原因究明として、ロドデノール類

似物質による白斑の文献情報を収集するとともに、カネボウ化粧品から提供されたロドデノールの非臨床試験結果の評価を行った。ロドデノールは褐色モルモットのメラノサイトを著しく減少し臨床知見を裏付けるとともに、メラノサイトのチロシナーゼにより代謝されてより強力な細胞毒性を発現した。原薬の純度に問題はなかった。職業性白斑の原因となる代表的なフェノール誘導体 4-TBP や MBEH の場合には、メラノサイトへの直接効果に加えて免疫系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提唱され、チロシナーゼで代謝されることにより、ROS を産生しメラノサイトを傷害する、タンパク付加によりハプテン抗原を形成するメカニズムがそれぞれ明らかにされている。ロドデノールの感作性試験はおおむね陰性であったが、小胞体ストレス応答を誘導した。ロドデノールの免疫誘導については、今後の解明が必要と思われる。

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いて整理し、各段階における再発防止のための対策について検討した。副作用報告制度の強化が必要であり、製品販売後も安全管理情報の収集を広く行うことが必要と提言した。今後、医薬部外品の開発段階における前臨床試験及び臨床試験のあり方、実施手法について、「安全性評価ガイドライン(仮称)」として取りまとめる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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）

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）

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

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(平成25年度)

群馬大学皮膚科におけるロドデノール誘発性脱色素斑患者の臨床解析

研究分担者 群馬大学医学部医学系研究科皮膚科学 石川 治
研究協力者 群馬大学医学部附属病院皮膚科 岸 史子

研究要旨:

群馬大学医学部附属病院皮膚科を受診した54例を臨床的に解析した。登録患者は54例(男性1名、女性53名、年齢分布は29歳から81歳、平均55歳)、全員が定期通院し経過観察中である。ロドデノール含有化粧品を1年以上使用していた患者が85%、約半数の患者は使用開始1年以内に脱色素斑が出現していた。痒痒感は44%の、紅斑は35%の患者に存在した。使用中止後74%の患者で白斑の改善が見られている。色素再生は顔面や頸部では早く、手背や上肢では遅い傾向がみられている。白斑の面積に関しては、顔面では40%の患者で顔面全体に及び、頸部と手背では面積が狭くなる傾向にあった。白斑部を病理組織学的に検索した症例(2例)では、いずれも表皮内のメラノサイトの消失と、真皮上層へのメラニンの滴落、真皮脈管周囲の単核球浸潤がみられた。

A. 研究目的

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臨床解析を行い、その特徴を明らかにする。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

ロドデノール含有化粧品による皮膚傷害が報道されて以降に、白斑を主訴として群馬大学医学部附属病院皮膚科外来を受診した新規患者およびそれ以前に尋常性白斑として通院加療中であった患者でロドデノール含有化粧品の使用歴が確認された患者を解析対象とした。

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。

C. 研究結果

H25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、これらの患者を対象として臨床解析した。全患者が定期的に通院しており、現在も経過を観察中である。

- ・性別：男性1名、女性53名
- ・年齢分布：29歳～81歳、平均値55歳、中央値52.5歳
- ・ロドデノール含有化粧品使用歴：3ヶ月以下；6%、3～6ヶ月以下；6%、6～12ヶ月以下；4%、12～24ヶ月以下；33%、24～

36 ヶ月以下；34%，36 ヶ月以上；17%

- ・使用開始から脱色素斑出現までの期間：3 ヶ月以下；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；7%
- ・臨床経過概要：改善あり 74%；なし 26%
顔面・頸部は手背等比べて改善傾向が高かった（図 1）。2013 年 12 月の時点では治療の有無による改善率の差はない。



図 1．臨床経過

左：ロドデノール含有化粧品中止 1 か月後（左），4 か月後（右）。

明らかな改善傾向が見られる。

- ・使用部位意外の白斑の有無：あり；9%，なし；91%
- ・痒みの有無：あり；44%，なし；56%
- ・紅斑あり 35%：なし 65%
- ・使用したロドデノール含有化粧品の種類：1 種類；18 名（うち改善あり 11 名），2 種類；13 名（うち改善あり 9 名），3 種類；7 名（うち改善あり 3 名），4 種類；5 名（うち改善あり 2 名），5 種類；2 名（うち改善あり 1 名），6 種類；3 名（うち改善あり 2 名）
- ・脱色素斑の面積

（人）	顔面	頸部	手背	前腕	上腕
ほぼ全面	9	8	4	1	0
25-50%	14	11	5	3	0
0-25%	1	11	11	15	6

・ロドデノールパッチテスト

ロドデノールは日本皮膚科学会のロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会が作成した 2%ロドデノール液を使用した .6 例に実施したが前例陰性であった。

・病理所見（図 2）：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。色素斑部では表皮基底層のメラニン増強，真皮上層へのメラニンの滴落，真皮脈管周囲へのリンパ球浸潤がみられるが，表皮メラノサイトの消失はみられなかった。

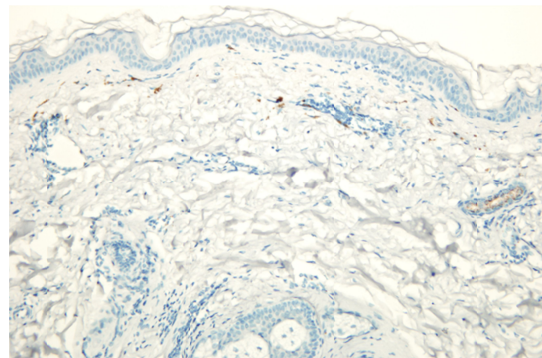


図 2．免疫組織（メラニン A 染色）

白斑部では表皮内のメラノサイトが消失している。

D．考察

最も重要な点は，1．発症機序，2．予後，3．治療である。

発症機序に関しては，アレルギー機序を介

さないロドデノールないしその代謝産物による細胞毒性，および獲得性免疫機序を介するアレルギー反応によるものと考えられる．通常，後者では痒疹と紅斑を伴うが，細胞毒性によっても二次的に炎症反応が惹起され痒疹や紅斑をきたす可能性もありうる．そこで両者を鑑別するためにはパッチテストが有用である．今回の検討では6例前例がパッチテスト陰性であった．どちらの機序を介するかを明らかにするためには，より多くの症例での検討が必要である．

予後に関しては74%に認められており，日本皮膚科学会の中間報告とほぼ同じ改善割合であった．色素再生は顔面・頸部に比べると手背・上肢では遅い傾向が見られているが，その理由は不明である．

今回対象とした症例では治療内容による改善程度に差は見られず，色素再生は自然経過によるものと推定した．問題となるのは改善が見られない症例に対する治療，あるいは改善を促進する治療を確立することである．これら難治例に対しては，尋常性白斑で行われている皮膚移植（suction blister法により正常部から表皮を採取し，同様に表皮を剥離した白斑部に移植する）が選択肢となるかもしれない．

E．結論

- ・ロドデノール含有化粧品の使用中止後は約70%の患者で色素の回復がみられた．
- ・多数のロドデノール含有化粧品の併用していた場合は改善に乏しいと考えられた．
- ・色素回復上肢や手背に比べて顔面，頸部では早い．
- ・治療の有無で軽快率に差はなく，治療については今後検討が必要である．

F．健康危険情報（総括研究報告書にまとめて記入）

G．研究発表

1．論文発表

なし

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
2013.12.19 前橋

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

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文献調査

研究分担者 最上(西巻)知子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

研究要旨

ヒトや実験動物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。皮膚に白斑/色素脱失を引き起こす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。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)は特に顕著な作用を示し、皮膚のメラノサイトを選択的に傷害する直接効果に加え、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と考えられている。4-TBP や MBEH については、チロシナーゼで代謝されることにより活性酸素種 ROS を産生する直接作用に加え、代謝物が自殺基質として SH 基やチロシナーゼに付加する反応性を獲得すること、細胞死の誘導やメラノサイト抗原の放出など、ハプテン抗原形成による免疫応答や自己免疫誘導につながる作用が報告されており、個人差の大きい白斑発症との関連が推定されている。

カネボウ化粧品よりロドデノールの非臨床試験に関する報告書が提供され、褐色モルモットを用いてロドデノールの皮膚色素脱失作用が示されるとともに、皮膚感受性や光感受性はおおむね陰性の結果が示された。メラノサイトに対してロドデノールはチロシナーゼ活性に大きく依存する毒性を発揮し、メラノサイト選択性が示唆されるとともに、ヒトメラノサイトはロドデノール高感受性群と低感受性群に分かれた。免疫系の関与については今後の解明が望まれる。

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、文献調査を行った。また、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)について評価を行った。

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。

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暴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(モノベンゾン, MBEH)に暴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暴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暴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)。

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機序が考えられている。これらの化合物は*in vitro*で皮膚角化細胞(ケラノチサイト)よりメラノサイトに高い毒性を示す(Yang *et al*, 2000; Hariharan *et al*, 2010)。

皮膚色素であるメラニン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*, 2011)、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を経て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4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)、続いて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(図3右)も、メラノサイトではROS産生を増加する(van den Boorn *et al*, 2011)。

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)。

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(健常人)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. 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 μ M 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 μ M)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ンは、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-ベンゾキノンに代謝され、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)。MBEH も同様にオルトキノン体 4-ベンゾキシ-1,2-ベンゾキノンに代謝され、SH 基と付加反応する(Manini *et al*, 2009)(図 3)、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 に長期間暴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、メラノマを移植したマウスで確認されている (van den Boorn *et al*, 2010)。

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

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 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)。

8. 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、ロドデノールの水酸化体 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(図 2)、ロドデノールと比較し水酸化体はより強い細胞毒性を示すことを明らかにしている(分担研究報告書 II)。

D. 考察

1. 類似化学物質による白斑/脱色素斑形成の機序

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)、研究の対象は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 についてのメカニズムの解明にある。

4-TBP と MBEH による皮膚色素脱失の場合は、メラノサイトへの直接作用と免疫系を介する作用との二相性であると考えられている(Becker and Schrama,

2011)。直接の色素脱失にはメラニン合成系が毒性発現に大きく関わる。4-TBP と MBEH は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、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。

しかしながら 4-TBP と MBEH の毒性は強力ではなく、また細胞選択性も高くはない(Becker and Schrama, 2011)。そこで、免疫応答やメラノサイトに対する自己免疫誘導が色素脱失作用に大きな役割を持つことが推定されている(Passeron and Ortonne, 2012; Toosi *et al*, 2012)。MBEH の事例では全身性の進行、病変部に細胞障害性 T 細胞が浸潤、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)。

フェノール誘導体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 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)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が(Passeron and Ortonne, 2012)、完全な証明にはまだ不十分であり、今後の展開が期待される。

職業性白斑の事例において、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. カネボウ化粧品による非臨床試験「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。ロドデノールのメラノサイト毒性発現はチロシナーゼ活性に大きく依存する。また分担研究報告書IIに後述するように、本研究班においても、メラノサイトやチロシナーゼにより水酸化体に代謝され、より強い毒性を発揮することを確認している。4-TBP や MBEH とは異なり、ロドデノール処理メラノサイトに ROS は検出されないが、両化合物と同様に小胞体ストレス応答を誘導した。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が必要と思われる。ロドデノールのメラノサイト生存率への影響は、高感受性群でも IC₅₀ が数百μMと4-TBP や MBEH と同程度であることから、色素脱失には免疫系が大きく寄与することも予想される。今回の報告では遅延型アレルギーを評価する感作性や光感作性試験が行われている。5種類中4種類の試験において、皮膚色素脱失を確認した褐色モルモットが用いられ、4種類の試験で陰性であった。感作性試験 CCET では疑わしい皮膚反応が認められた。連続貼付の影響が考察されており、臨床におけるアレルギー反応の検討結果が期待される。一方、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が誘導されている。今後、4-TBP や MBEH で報告されているように、ロドデノールが細胞

死を誘導するか否か、チロシナーゼ代謝により生じ得るオルトキノン体(図2)が付加体 - ハプテン抗原を形成するかについて明らかにされれば、(自己)免疫誘導の予測につながる可能性があり、引き続き検討が必要と思われる。

ヒト由来メラノサイトはチロシナーゼ活性の高いロドデノール高感受性群と低い低感受性群の2群に分かれ、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。

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」であることが報告されている。特に効果が強力な4-TBPとMBEHについて、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機序がメラノサイト消失をもたらすと想定されており、メカニズムが研究されている。4-TBP と MBEH については、チロシナーゼ代謝による細胞内の酸化ストレス増加、代謝物のSH基やチロシナーゼへの付加、細胞死や小胞体ストレス応答の誘導など、ハプテン抗原やメラノサイト抗原の形成・提示から免疫誘導につながる報告がなされている。

ロドデノールについては、褐色モルモットを用いて皮膚色素脱失作用が示され、皮膚感作性や光感作性はほぼ陰性であることが示された。メラノサイトに対してチロシナーゼ活性に大きく依存する毒性を示し、メラノサイト選択性が示唆された。また小胞体ストレス応答の誘導が示された。免疫誘導の可能性については今後の検討が必要と思われる。

[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.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 77-82
- James O, Mayes RW, Stevenson CJ. *Lancet* 1977; 2: 1217-9
- Kroll TM, Bommasamy H, Boissy RE, Hernandez C, Nickoloff BJ, Mestrlil R, Caroline Le Poole I. *J Invest Dermatol* 2005;124:798-806
- Le Poole IC, Wańkowicz-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
- Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. *Pigment Cell Res.* 2006; 19: 550-71.
- 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.
- 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

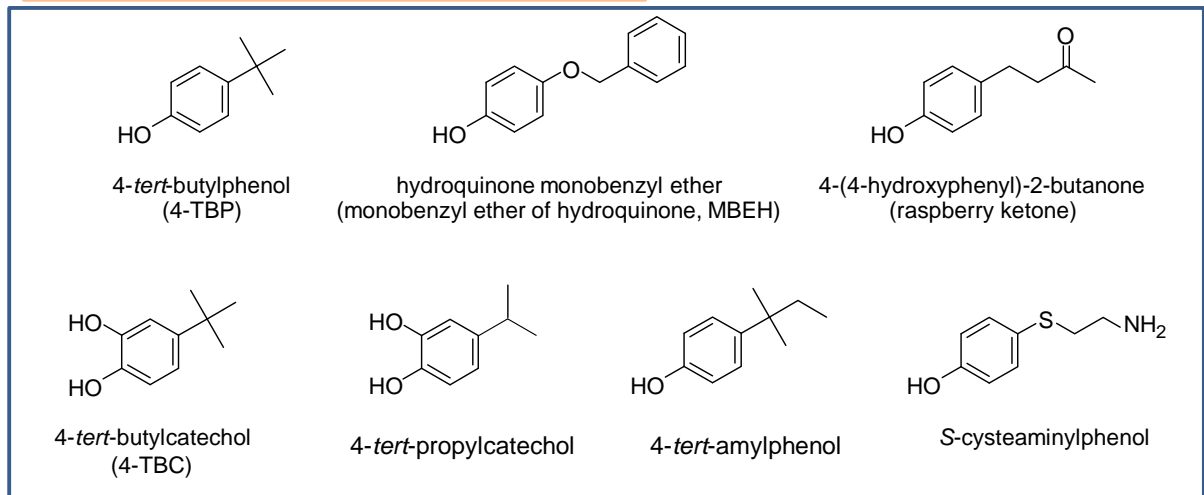
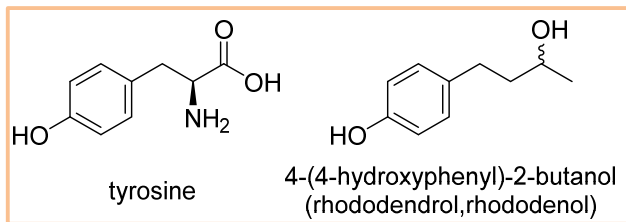


図1 チロシン、ロドデノール、および職業性白斑や皮膚色素脱失を起こす化合物
(Peck 1941, Bleehen 1968, Gellin 1970, James 1977, Ito 1987, Fukuda 1998, Cummings 1995, Boissy 2004, Solano 2006)

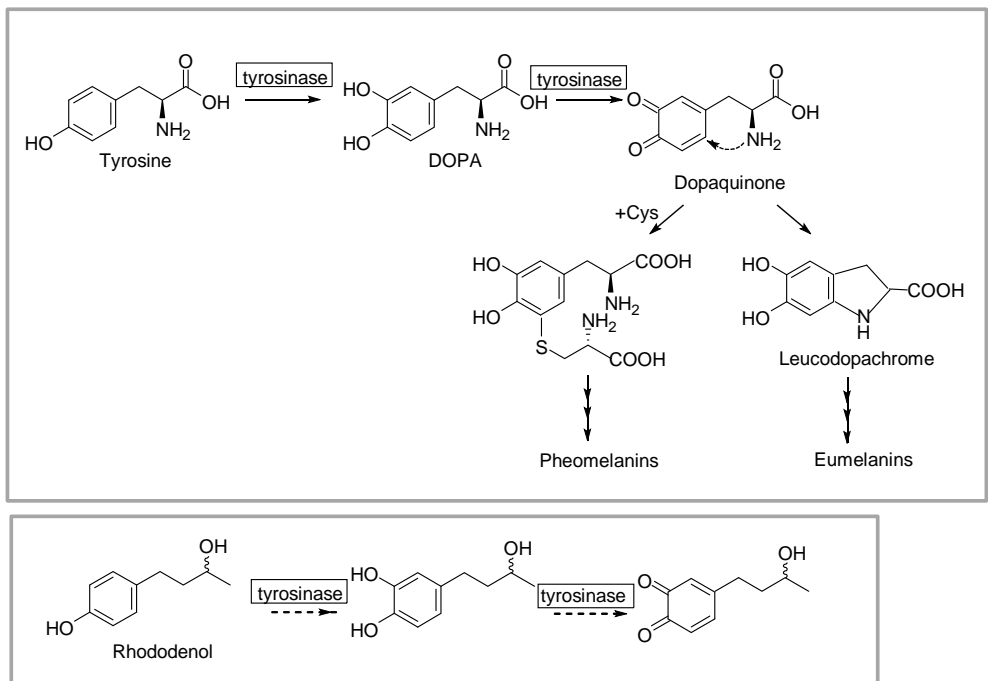
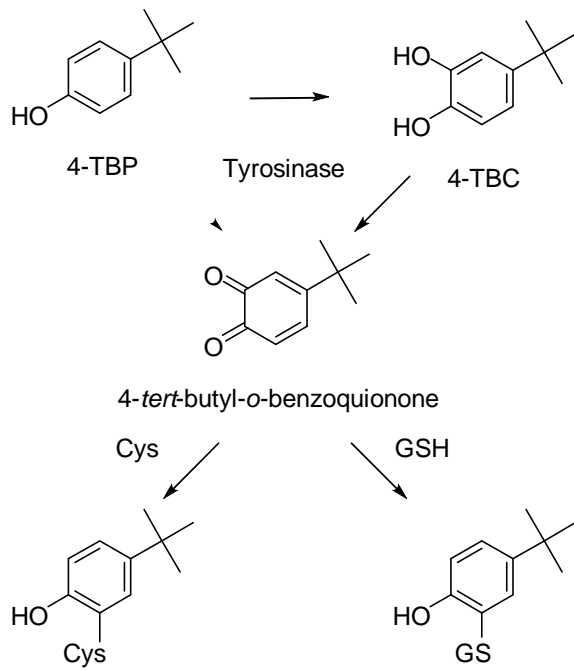
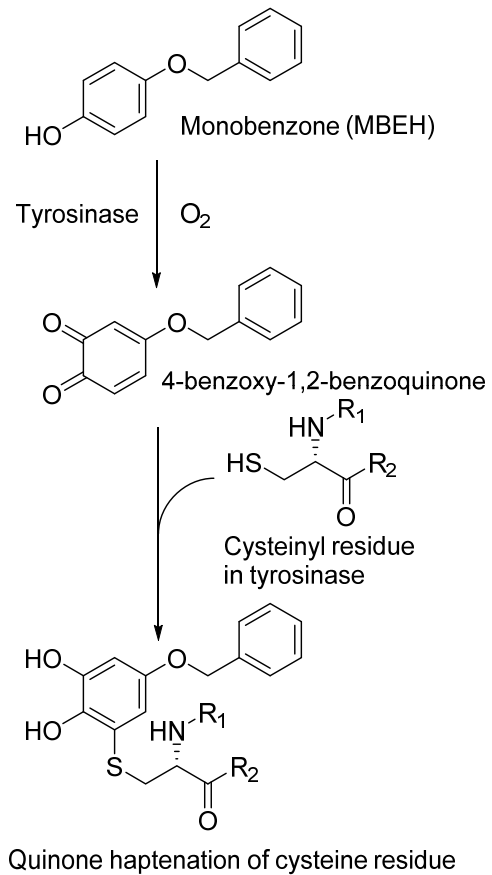


図2 メラニン合成経路および
ロドデノールのチロシナーゼによる想定代謝経路



Thornerby-Anderson, *Pigment Cell Res* 2000



van den Boorn, *J Invest Dermatol* 2011

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

(Web 掲載判については、下記報告書中の写真は掲載容量がオーバーするため除いております(研究代表者))

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

株式会社カネボウ化粧品

目次

1. 目的

2. 検討内容

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討

2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2-1 表皮細胞への障害性及び炎症性サイトカイン等の分泌誘導能の検討

2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価

2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性

2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認

2-3-2 活性酸素の関与の検討

2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討

3. まとめ

4. 引用文献

1. 目的

ロドデノール配合化粧品の使用による白斑様症状について、動物モデルおよび培養色素細胞を用いた非臨床試験を実施することにより病態形成メカニズムについて検討を行う。

2. 検討内容

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討

材料および方法

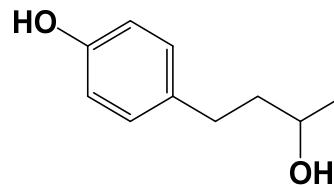
[被験物質]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式： $C_{10}H_{14}O_2$ 、分子量：166.22

Lot.002002

純度：100%



化学構造

[被験動物]

褐色モルモット (Kw1:A-1、東京実験株式会社) 雌、5匹

[試験方法]

・累積塗布

背部被毛を毛刈り、剃毛し、2cm×2cmの区画を背骨を挟んで対になるように6箇所確保した。このうち2対、4箇所 (a)、a')、c)、c'))には塗布開始5日前にUV-B照射を0.75 Joule/cm²行った。このうち1対 (a)、a'))を試料塗布部とした (図1参照)。塗布は、K166 30%液 (溶媒：50%エタノール液)、20 μLを1日に3回 (9:00、13:00、17:00) 塗布した。

塗布期間中に肉眼判定において色素脱失 (++) : 高度な白色化を認める、下記皮膚色の判定方法参照) が確認された場合は、色素脱失反応の可逆性を観察するため、個体毎に塗布30日 (個体No.1)、40日 (個体No.2)、50日 (個体No.5)、60日 (個体No.4) または97日 (個体No.3) で継時的に塗布を休止することとした。また、塗布休止期間は、肉眼判定を継続し、色素脱失が認められなくなり (- : 皮膚に変化を認めない)、且つ同動物のUV-B非照射部皮膚と肉眼判定において差が認められなくなるまでとした。

・皮膚色の判定方法

1日1回 (毎朝) 塗布前に以下の判定基準に従って皮膚白色化と皮膚刺激反応について皮膚判定を行った。塗布開始翌日 (Day 2) より、皮膚の白色化および刺激性反応の有無を以下の基準に基づいて肉眼判定を行った。

<皮膚の白色化¹⁾>

- : 皮膚に変化を認めない
- ± : 軽度の白色化を認める
- + : 中程度の白色化を認める
- ++ : 高度な白色化を認める

<皮膚刺激>

- : 反応は認められない
- ± : かすかな紅斑

- + : 明瞭な紅斑
- ++ : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 痂皮、壊死

・皮膚色の測定：L*値

試験開始前（Day 0）から回復までの週1回以上、試料塗布部位、UV-B照射無処置部位、UV-B非照射部位について、色彩色差計（CR-300、MINOLTA、測定条件：C光源、2°視野）を用いて皮膚色L*a*b*表色系（CIE 1976）のL*値（明-暗）を測定した。色彩色差計の測定項目の条件設定は、L*a*b*測定値を3回測定した値の平均値が表示されるように設定した。

・皮膚標本の作製および観察方法

褐色モルモットの皮膚採取は、試験前（UV-B照射部）、色素脱失形成時（試料塗布部位、UV-B照射無処置部位及びUVB非照射部位）、回復時（試料塗布部位、UVB照射無処置部位及びUVB非照射部位）に吸入麻酔剤（フォーレン吸入麻酔液、アボットジャパン株）にて麻酔後、直径5mmの皮膚トレパン（デルマパンチ、ニプロ医工株）で行った。DOPA陽性メラノサイト数の計測用として表皮剥離標本を、組織学的検査用としてパラフィン包埋標本を作製した。

表皮剥離標本

採取した皮膚は、2N-NaBrで37℃、2時間処理後に表皮を剥離し、DOPA染色（0.1% L-DOPA / PBS、37℃、2時間）を行った。その後10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定、脱水、封入して表皮剥離標本を作製した。標本は光学顕微鏡を用いて観察し、全視野のDOPA陽性メラノサイト数を計測後、1mm²当たりのメラノサイト数を算出した。

パラフィン包埋標本

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後、定法に従ってパラフィン包埋し、組織切片を作製した。組織学的観察用としてヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を、メラノサイト観察用としてS-100免疫染色を、メラニン顆粒観察用としてフォンタナ・マッソン染色（FM染色、核染：ケルンエヒトロート）を施し、光学顕微鏡を用いて観察した。

結果

[皮膚色の肉眼判定]

褐色モルモットのK166塗布部位において、Day 9よりごく軽度の皮膚の白色化が4例にみられ、Day 21には高度な白色化が全例となった。塗布終了後も白色化が続いたが、徐々に回復し、Day 75~141に変化なしとなった（表1参照）。刺激性反応はみられなかった。代表例として動物番号2番の写真を示した（写真1（Day0）、写真2（Day41）、写真3（Day78））。

[皮膚色のL*値]

褐色モルモット皮膚色の皮膚明度（L値）については、塗布14日頃よりUV照射無処置部に比べ有意にL値が上昇した。塗布28日目には、UV照射無処置部、UV非照射無処置部（地肌部）に比べて有意にL値が高くなった。塗布部のL値は、28日目以降、試験試料の塗布を休止するまで高値のまま推移した（図2参照）。

[DOPA 陽性メラノサイト数]

褐色モルモットのDOPA 陽性メラノサイト数を表2 に示した。

メラノサイト数の平均値は、試験前は84.1 個/mm² 個であったが、K166 30%塗布部位において色素脱失形成期で1.3 個/mm² に減少したが、回復期では22.5 個/mm² となった。無処置部位では色素脱失形成期、回復期の順に33.0、25.9 個/mm²、非照射部位では同様に12.8、14.9 個/mm² であった。

[HE 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において軽度の表皮の肥厚が全例、ごく軽度～軽度の表皮および毛包上皮の変性が各1 例にみられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期でごく軽度が2 例、変化なしが3 例であったが、回復期では軽度が全例となった。無処置および非照射部位においても、軽度の表皮の肥厚が色素脱失形成期の無処置部位に1 例、ごく軽度の表皮および毛包上皮の変性が色素脱失形成期の無処置部位に3 例、回復期の非照射部位に1 例みられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期、回復期ともにごく軽度～軽度が全例にみられた（写真4参照）。

[Fontana-Masson 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において、メラニン顆粒は表皮基底層でごく軽度～中等度、有棘層および角層でごく軽度～軽度、毛包部では変化なし～軽度であった。回復期において、表皮基底層で中等度、有棘層、角層および毛包部では軽度であった。無処置および非照射部位では色素脱失形成期、回復期ともに、表皮基底層で軽度～中等度、有棘層、角層および毛包部で変化なし～中等度であった（写真5参照）。

[S-100 免疫染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位において、基底層のメラノサイト数は、色素脱失形成期で0～9、回復期で4～18であった。毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。無処置部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で4～10、回復期で7～16、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。非照射部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で3～5、回復期で3～17、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった（写真6参照）。

考察

本試験では、メラニン色素を有する褐色モルモットを用いて、K166を累積塗布した場合の色素脱失形成及び塗布を休止した場合の回復過程について評価検討を行った。K166 30%溶液の累積塗布を1日3回、20日以上にわたって継続して行った。試料濃度としては30%液を塗布し続けたが、紅斑や浮腫などの皮膚刺激性は発現せず、皮膚色が抜けていくような白色化が徐々に進行し、肉眼観察においても容易に区別出来る色素脱失が形成された。

この色素脱失形成部の皮膚組織では、色素細胞である表皮基底部のメラノサイト、Dopa陽性メラノサイト及び表皮全体のメラニン顆粒の減少が認められた。K166の塗布を休止すると、肉眼観察及び機器測定においても白色化の度合いが弱まり、個体差はあるものの1～2か月ほどかけて、試験開始時の測定値を示すまでに回復した。組織学的には、色素脱失形成時に減少あるいは消失していた色素細胞が回復時には非塗布部とほぼ同等数確認出来た。この色素細胞の再生には、周囲の毛包バルジに存在する色素幹細胞が大きく関与していると考えられ^{2) 3)}、色素幹細胞からメラノサイト前駆体であるメラノプラストに分化成長し、皮膚基底層に移動しながらさらに分化しメラノサイトになり補完されるのではと考えられた。

図1. 累積塗布方法(褐色モルモット)

塗布部位: 1区画(2 cm×2 cm)の6区画

- a) 試料塗布部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- a)' 試料塗布部位(回復性観察部位)
- b) UV非照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- b)' UV非照射部位(回復性観察部位)
- c) UV照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- c)' UV照射部位(回復性観察部位)

表1. 褐色モルモットのK166塗布部の白色化スコアの推移

動物番号	軽度の白色化(±)を示すまでの日数 ¹⁾	高度白色化(++)を示すまでの日数 ²⁾	白色化症状が消失した日数 ³⁾
No.1	9日	21日	82日
No.2	9日	17日	75日
No.3	9日	17日	141日
No.4	11日	21日	91日
No.5	9日	21日	91日

- 1) 塗布を開始してから軽度白色化(±)を示すまでの日数
- 2) 塗布を開始してから高度白色化(++)を示すまでの日数
- 3) 試験開始から、地肌色に回復するまでの日数

表 2 K166 30%群におけるDOPA陽性メラノサイト数

動物 番号	DOPA陽性メラノサイト数 / mm ²									
	試験開始前	白斑形成期					回復期			
	(Day 0)	stage	塗布部位	無処置	非照射	非照射 (尾部)	stage	塗布部位	無処置	非照射
1	74.8	Day31	0.3	50.5	3.5	ND	Day91	18.3	22.7	15.2
2	99.4	Day41	0.7	49.4	13.6	ND	Day78	31.2	13.2	23.8
3	115.5	Day98	0.1	19.6	7.4	16.1	Day141	45.2	57.6	7.1
4	45.7	Day61	2.5	27.0	22.0	ND	Day98	4.2	18.1	11.5
5	85.2	Day51	3.2	18.4	17.4	ND	Day98	13.4	17.9	16.7
mean±S.D.	84.1 ± 26.4		1.3 ± 1.4	33.0 ± 15.9	12.8 ± 7.4	-		22.5 ± 16.0	25.9 ± 18.0	14.9 ± 6.2

写真 1 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 0 (' 13.07.10)

(A) 塗布部位L : 白色化(-)、皮膚刺激(-)

(B) 塗布部位R : 白色化(-)、皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 2 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 41 (' 13.08.20)

(A) 塗布部位L : 白色化(++)、皮膚刺激(-)

(B) 塗布部位R : 白色化(++)、皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 3 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 78 (' 13.09.26)

(A) 塗布部位L : 白色化(ND)、 皮膚刺激(ND)

(B) 塗布部位R : 白色化(-)、 皮膚刺激(-)

(C) 無処置部位L

(D) 無処置部位R

写真 4-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 4-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 4-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 × 40

写真 4-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
HE 染色 × 40

写真 5-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 5-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 × 40

写真 6-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
S-100 免疫染色 × 40

写真 6-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
S-100 免疫染色 × 40

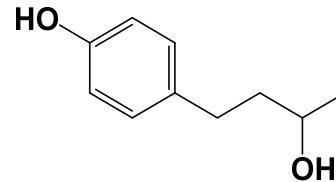
2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価

材料及び方法

[被験物質]

ロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166)は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式： $C_{10}H_{14}O_2$ 、分子量：166.22
Lot.002002
純度：100%



化学構造

[皮膚感作性評価]

・GPMT (Guinea pig Maximization Test) ⁴⁾

1) 動物種および群構成

褐色モルモット (KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

感作試料

- a：FCA と生理食塩液の等量 v/v 乳化物
- b：K166 の 0.8 w/w%液 (溶媒：生理食塩液)
- c：K166 の 1.6 w/w%液 (溶媒：生理食塩液) と FCA の等量 (v/v) 乳化物
- d：生理食塩液
- e：K166 の 50 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)
- f：50%エタノール水

惹起試料

- g：K166 の 50、30、10、5、3、1 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)

3) 感作方法

皮内感作

投与部位は除毛した頸部背側皮膚 (約 4×6 cm) とした。0 日目 (感作開始日) に、感作群は投与試料 a、b、c の順に、対照群には投与試料 a、d、a の順に左右 2 カ所 (但し、投与試料 a と b、a と d の投与間隔を縮める) にそれぞれ 0.1 mL 皮内投与した。

接触感作

投与部位は、除毛した皮内投与部位とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。8 日目に感作群は投与試料 e、対照群は投与試料 f を 2×4 cm のリント布 (西尾衛生材料株) に 0.2 mL 含浸させ、無浸透性絆創膏 (ブレンダーーム：3M 社) 及び粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス 3 号：アルケア株) を用いて 48 時間閉塞貼付を行った。なお、閉塞貼付 24 時間前に 10%ドデシル硫酸ナトリウムのワセリン混合物約 0.5 g を皮内投与部位に開放塗布し、8 日目にエタノールを用いて除去後に閉塞貼付を行った。

4) 惹起方法

投与部位は、除毛した側腹部皮膚とした。除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。感作開始 21 日目に投与試料 g を 1.5×1.5 cm のリント布に 0.1 mL ずつ含浸させ、無浸透性絆創膏を用いて 24 時間閉塞貼付を行った。密着性を良くするために無浸透性絆創膏の外側を更に粘着性スポンジ絆創膏（マイクロフォーム：3M 社）と粘着性伸縮包帯（シルキーテックス 5 号）で固定した。なお、反応の差を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

5) 判定方法

惹起貼付除去 3、24 及び 48 時間後に下記の Draize 法の基準で判定した。

< 紅斑・痂皮形成 >

- 0：紅斑なし
- 1：ごく軽度の紅斑（かすかに認められる程度）
- 2：明らかな紅斑
- 3：中等度から強い紅斑
- 4：深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成（傷害は深部に及ぶ）

< 浮腫形成 >

- 0：浮腫なし
- 1：ごく軽度の浮腫（かすかに認められる程度）
- 2：軽度の浮腫（周囲と明らかに区分可能）
- 3：中等度の浮腫（1 mm 程盛り上がっている）
- 4：強い浮腫（1 mm 以上盛り上がり、周囲にも広がる）

・CCET (Cumulative contact enhancement Test)⁵⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット（KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹）

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

感作試料

感作群：K166 の 50 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

対照群：50%エタノール水

21 日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5、3、1、0.5 及び 0.3 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

3) 感作方法

投与部位

除毛した後背部皮膚とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

投与方法

< 感作開始日 (0 日目) 及び感作 2 日目 >

各感作試料を 2×4 cm のリント布に 0.2 mL ずつ含浸させ、無浸透性絆創膏及び粘着性伸縮絆創膏を用いて下図の CP の位置に 24 時間の閉塞貼付を行った。

< 感作 7 日目 >

下図の X の位置に FCA を 0.1 mL ずつ皮内投与し、感作開始日と同様の処置を行った。

< 感作 9 日目 >

感作開始日と同様の処置を行った。

投与部位	CP	X
感作群	K166 の 50% w/w 液	FCA
対照群	50%エタノール水	FCA

CCET 感作方法

4) 惹起方法

投与部位は除毛した側腹部皮膚とした。除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。初回惹起は感作開始 21 日目に開放塗布で行った。感作群及び対照群に惹起試料をそれぞれ 2 cm² 当たり 0.01 mL ずつ開放塗布した。なお、反応の差を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

5) 判定方法

惹起時の皮膚反応の判定は、塗布 24、48 及び 72 時間後に下記の基準で行った。

< 惹起 (開放塗布) の判定基準 >

- (評点 0): 反応は認められない
- ± (評点 1): かすかな紅斑
- + (評点 2): 明瞭な紅斑
- ++ (評点 3): 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ (評点 4): 痂皮、壊死

・ LLNA (Local Lymph Node Assay) ⁶⁾

1) 動物種および群構成

CBA/J マウス、雌、日本チャールス・リバー株式会社、各溶媒 16 匹

内訳: 1 群 (濃度) 4 匹 × 3 濃度 = 12 匹、溶媒対照群 4 匹

2) 試料の調整

溶媒

A00 (Acetone:Olive oil = 4:1)、MEK (Methyl ethyl ketone)、PG (Propylene glycol)、DMSO (Dimethyl sulfoxide)、70%エタノール水溶液

³H-methyl thymidine

³H-methyl thymidine (Moravek 社製、1mCi/ml) を分取し、PBS を加えて 80 μCi/mL に希釈調製した。

3) 感作方法

毎日一定の時刻、1 日 1 回、3 日間連続、計 3 回、動物の両耳介に、マイクロピペッターを用いて、それぞれ

25 μ L ずつ塗布した。

4) ^3H -methyl thymidine の投与、測定

投与及び回収方法

最終感作の 3 日後に注射針と注射筒(テルモ株式会社)を用いて 0.25 mL/匹を尾静脈内投与した。 ^3H -methyl thymidine 投与の 5 時間後に頸椎脱臼により安楽死させた後、耳介リンパ節 (Auricular lymph node) を採取した。周囲組織を丁寧に取り除き、個体ごとに PBS に浸した。

^3H -methyl thymidine 取り込み量の測定

リンパ節はステンレスメッシュ (#200) を用いて物理的に破碎し、PBS 内で懸濁した後、PBS で 2 度洗浄。続いて 5% Trichloroacetic acid (TCA) を 1 mL 加えて 4 で 18 時間沈殿させた。ペレットを 1 mL の TCA に再懸濁させ、10 mL のシンチレーションカクテル(Ecolume™, MP Biomedicals) に加えて液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3110TR, PerkinElmer 社製) を用いて取り込み量 (DPM / mouse) の測定を行った。

5) 結果の評価

溶媒対照群について各個体の ^3H -methyl thymidine 取り込み量 (DPM / mouse) の平均値を算出する。次いで、実験に供した各個体の取り込み量 (DPM / mouse) を溶媒対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index, SI) を算出した後、被験物質群及び陽性対照群の平均値及び標準誤差を算出し、SI 値が 3 以上を示した場合、陽性と判断した。

$$\text{SI 値} = \frac{\text{各個体の取り込み量 (DPM / mouse)}}{\text{溶媒対照群の取り込み量の平均値 (DPM / mouse)}}$$

[光感作性評価]

・ AS-AA (Adjuvant-Strip-AA) ⁷⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット (KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 8 匹、対照群 4 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用事調製した。

感作試料

感作群：被験物質の 50% 液 (溶媒：50% エタノール水)

対照群：50% エタノール水

21日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5 w/w% 液 (溶媒：50% エタノール水)

3) 光源

主波長UVA (波長310 ~ 400 nm : ピーク350 nm、東芝蛍光ランプFL20S BLB)

4) 感作方法

投与部位は頸部背側2×4cm の区画とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

0 日目（感作開始日）

フロイントの完全アジュバントと注射用水を1：1 の割合で乳化させたものを投与部位の4隅に0.1 mL ずつ皮内投与した後、セロハン粘着テープでStripping を3 回払い、感作試料をそれぞれ0.1 mL ずつ開放塗布した。乾燥後に、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定し、6 本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm 下に厚さ3 mm のガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm 上の高さから照射エネルギー量が10.2 J/cm² となるように照射した。

1～4 日目

0 日目の皮内投与を除く操作を行った。

5) 惹起方法

投与部位は背部全体とし、正中線を軸にして左側に照射部、右側に非照射部を設けた。投与部位は除毛した側腹部皮膚とし、除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。21 日目に惹起試料をそれぞれ0.02 mL ずつ投与部位に滴下し、テフロン棒で背部左側と背部右側が対称になるように15 mm×15 mm 大に塗り広げ、乾燥後に動物の背部右側を粘着性弾力包帯および伸縮ネット包帯を用いてアルミホイルで被覆し、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定した。6 本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm 下に厚さ3 mm のガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm 上の高さから照射エネルギー量が10.2 J/cm² となるように照射した。なお、試料の投与部位による反応を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

6) 判定方法

皮膚反応の判定は、塗布24、48 および72 時間後に下記の基準で行った。

- : 0 : 反応は認められない
- ± : 1 : かすかな紅斑
- + : 2 : 明瞭な紅斑
- ++ : 3 : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 4 : 痂皮、壊死

・光感作性試験（Harber）⁸⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット（KwI:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹）

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用事調製した。

感作試料

感作群：被験物質の50%液（溶媒：50%エタノール水）

対照群：50%エタノール水

27日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

3) 光源

A：主波長UV-B（波長275～380 nm ピーク315 nm、東芝蛍光ランプFL20S・E）

B：主波長UV-A（波長310～400 nm ピーク350 nm、東芝蛍光ランプFL20S BLB）

4) 感作方法

投与部位は頸部背側2×4cmの区画とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。

0日目（感作開始日）および3、6日目に行った。感作試料をそれぞれ0.1 mL ずつ開放塗布した。乾燥後に、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定し、光源Aを6本並列に装着し、投与部位の25 cm上の高さから照射エネルギー量が1J/cm²となるように照射後、光源Bを6本並列に装着し、さらに、その1 cm下に厚さ3 mmのガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm上の高さから照射エネルギー量が30 J/cm²となるように照射した。

5) 惹起方法

投与部位は背部全体とし、正中線を軸にして左側に照射部、右側に非照射部を設けた。投与部位は除毛した側腹部皮膚とし、除毛は電気バリカンを用いて行き、惹起日にシェーバーにて剃毛した。27日目に惹起試料をそれぞれ0.05 mL ずつ投与部位に滴下し、テフロン棒で背部左側と背部右側が対称になるように15 mm×15 mm大に塗り広げ、乾燥後に動物の背部右側を粘着性弾力包帯および伸縮ネット包帯を用いてアルミホイルで被覆し、動物をアクリル樹脂製の固定器に固定した。光源Bを6本の光源を並列に装着し、さらに、その1 cm下に厚さ3 mmのガラス板を据え付けて、投与部位の10 cm上の高さから照射エネルギー量が9 J/cm²となるように照射した。なお、試料の投与部位による反応を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

6) 判定方法

皮膚反応の判定は、塗布24、48 および72 時間後に下記の基準で行った。

- : 0 : 反応は認められない
- ± : 1 : かすかな紅斑
- + : 2 : 明瞭な紅斑
- ++ : 3 : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 4 : 痂皮、壊死

結果

[皮膚感作性試験]

・ GPMT の結果

皮膚反応の総括表を表1に、写真を写真1、2、3、4に示した。

感作群および対照群ともに、いずれの試料においても皮膚反応はみられず、皮膚感作性は陰性と判断した。

・ CCET の結果

皮膚反応の総括表を表2に、写真を写真5、6、7、8に示した。

1) K166 : 50%液

感作群において、塗布48時間後から±が2例にみられ、塗布72時間後には±が3例となった。平均評点は塗布24、48、72時間後の順に0、0.2、0.3であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0であった。

2) K166 : 30%液

感作群において、塗布48 時間後から±が2 例にみられ、塗布72 時間後には±が3 例となった。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.2、0.3 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

3) K166 : 10%液

感作群において、塗布48 時間後から±が2 例にみられ、塗布72 時間後には±が3 例となった。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.2、0.3 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

4) K166 : 5%液

感作群において、塗布48 時間後から±が1 例にみられ、塗布72 時間後においても皮膚反応は残存した。平均評点は塗布24、48、72 時間後の順に0、0.1、0.1 であった。対照群においては、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0 であった。

5) K166 : 3%液、1%液、0.5%液、0.3%液では、感作群および対照群ともに、いずれの判定時においても皮膚反応はみられず、平均評点は0であった。

以上のように、対照群において皮膚反応は全く認められなかったが、感作群にのみ疑わしい皮膚反応が認められた。

・ LLNA の結果

AOO、MEK 溶媒においては最高適用濃度の 50%で「25%を超える耳介厚の増加」、「5%を超える体重の減少」は認められなかったことから 50%、25%、10%の濃度で試験を実施した。また PG においては最高適用濃度の 50%で「5%を超える体重の減少」が認められたことから何かしらの全身性影響が懸念されたため 25%、10%、5%で試験を実施した。一方 70%エタノール水溶媒においても最高適用濃度の 50%で「5%を超える体重の減少」が認められたが、既に終了していたその他の試験結果から 50%での実施で問題ないと考え、50%、25%、10%の濃度で試験を実施した。その結果、いずれの溶媒においても濃度と相関した SI 値の上昇傾向は認められず、SI 値は 3 以上にならないので陰性と判断した (図 1 参照)。

[光感作性試験]

・ AS-AA の結果

皮膚反応の総括表を表 3 に、写真を写真 9、10 に示した。

感作群および対照群ともに、照射および非照射に関わらず、いずれの投与試料においても皮膚反応はみられず、光感作性は認められなかった。

・ Harber の結果

皮膚反応の総括表を表 4 に、写真を写真 11、12 に示した。

1) K166 : 50%液

(1) 照射部

感作群で惹起48hr後にのみに±が1 例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群で惹起48hr後にのみに±が1 例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

2) K166 : 30%液

(1) 照射部

感作群で♂が1例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群で♂が1例にみられ、対照群では皮膚反応はみられなかった。

3) K166 : 10%液

(1) 照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

4) K166 : 5%液

(1) 照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった。

(2) 非照射部

感作群および対照群ともに皮膚反応はみられなかった

以上のように、光照射に特異的な反応はみられず、光感作性は陰性と判断した。

考察

[皮膚感作性評価]

GPMTでは以前の薬事申請時の報告通り、今回も陰性の結果となり再現性が得られた。また今回行ったCCETにおいては、感作群にのみ疑わしい皮膚反応が認められた。CCETは、24時間閉鎖貼付を繰り返す(4回)感作方法であり、連続して貼付することが検出感度を上げた可能性が考えられた。

[光感作性評価]

感作時にUV-A照射を行うAS-AAでは、感作群、対照群ともに皮膚反応は全く見られなかった。一方、感作時にUV-A、UV-Bを併用照射を行うHarberでは、感作群において50%液、30%液でそれぞれ1例のみの皮膚反応が見られた。しかしながら、この反応は照射、非照射に関わらず反応を示し、また、惹起48時間後のみの反応であり、反応の増強や継続がみられなかったことから光感作性は陰性と判断した。また、UV-A、UV-B波長の違いによって光感作性に対する影響は大きくないと考えられた。

表1 GPMTにおける試験結果（総括表）

有効分： 100.0%

評価方法： GPMT（褐色ELFト）

皮内感作： 0.8% （溶媒：生理食塩水）

経皮感作： 50% （溶媒：50%EtOH水）

SDS処理あり

反応例数： 2（1）紅斑/浮腫

惹起試料			有効分濃度（溶媒）	（貼付）除去3hr後		（貼付）除去24hr後		（貼付）除去48hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 21 （閉鎖貼付）	感作試料		50%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			30%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			10%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			5%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			3%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）
			1%（50%EtOH水）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）	0（0） / 0（0）

～ ：溶液

表2 CCETにおける皮膚感作性試験結果（総括表）

感作試料：K166
Lot.002002

有効分：100%

評価方法：CCET（褐色モルモット）

経皮感作：50%（対照群：50%エタノール）

反応例数：+（±）

	番号	惹起試料	有効分濃度（溶媒）		塗布24時間後		塗布48時間後		塗布72時間後	
					感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 21 (塗布)	感作試料	K166 Lot.002002	50%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			30%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			10%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (3)	0 (0)
			5%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
			3%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			1%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			0.5%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			0.3%	(50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

初回惹起試料：全て溶解

表3 AS-AAにおける光感作性試験結果（総括表）

感作試料： K166
 Lot.002002
 有効分： 有姿100%
 評価方法： AS-AA法
 群構成と経皮感作濃度： 感作群： 50%適用、感作時光照射
 対照群： 50%エタノール溶液適用、感作時光照射

< 光感作性試験 >

反応例数： + (±)

	番号	惹起試料	濃度 (溶媒)	照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4
初回惹起		K166	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Day 21		Lot.002002	30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(塗布)			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	番号	惹起試料	濃度 (溶媒)	非照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4	感作群 n=8	対照群 n=4
初回惹起		K166	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Day 21		Lot.002002	30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(塗布)			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

溶液

照射エネルギー量 = 10.2 J/cm²

表4 Harberにおける光感作性試験結果（総括表）

感作試料： K166
 Lot.002002
 有効分： 有姿100%
 評価方法： Harber法
 群構成と経皮感作濃度： 感作群： 50%適用、感作時光照射
 対照群： 50%エタノール溶液適用、感作時光照射

< 光感作性試験 >

反応例数： + (±)

	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 27 (塗布)		K166 Lot.002002	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	番号	惹起試料	濃度（溶媒）	非照射部					
				塗布24hr後		塗布48hr後		塗布72hr後	
				感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5	感作群 n=10	対照群 n=5
初回惹起 Day 27 (塗布)		K166 Lot.002002	50% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			30% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			10% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			5% (50%エタ)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

感作時の照射エネルギー量：UV-A = 30 J/cm²、UV-B = 1 J/cm²

溶液

惹起時の照射エネルギー量：UV-A = 9 J/cm²

写真1 (50 % : 0/0) (30 % : 0/0) (10 % : 0/0)
感作群 (21 日目) 動物番号 1 除去 24hr. 左側腹部 (' 13.09.26)

写真2 (1 % : 0/0) (3 % : 0/0) (5 % : 0/0)
感作群 (21 日目) 動物番号 1 除去 24hr. 右側腹部 (' 13.09.26)

写真3 (50 % : 0/0) (30 % : 0/0) (10 % : 0/0)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 除去 24hr. 左側腹部 (' 13.09.26)

写真4 (1 % : 0/0) (3 % : 0/0) (5 % : 0/0)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 除去 24hr. 右側腹部 (' 13.09.26)

写真5 (K166 0.3% : -)() ()
() () (K166 50 % : ±)
感作群 (21 日目) 動物番号 6 塗布 48hr. 左側腹部 (' 13.08.08)

写真6 (K166 5% : ±)(K166 10% : ±)(K166 30% : ±)
(K166 0.5% : -)(K166 1% : -)(K166 3 % : -)
感作群 (21 日目) 動物番号 6 塗布 48hr. 右側腹部 (' 13.08.08)

写真7 (K166 50% : -)(K166 30% : -)(K166 10% : -)
(K166 5% : -)(K166 3% : -)(K166 1% : -)
对照群 (21 日目) 動物番号 11 塗布 48hr. 左側腹部 (' 13.08.08)

写真8 () (K166 0.3% : -)(K166 0.5% : -)
() () ()
对照群 (21 日目) 動物番号 11 塗布 48hr. 右側腹部 (' 13.08.08)

写真 9 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
感作群 動物番号 1 塗布 48 時間後 (' 13.08.14)

写真 10 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
対照群 動物番号 9 塗布 48 時間後 (' 13.08.14)

写真 11 非照射 (10% : -) (5% : -) (50% : ±) (30 % : ±)
照 射 (10% : -) (5% : -) (50% : ±) (30 % : ±)
感作群 動物番号 3 塗布 48 時間後 (' 13.10.09)

写真 12 非照射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
照 射 (50% : -) (30% : -) (10% : -) (5 % : -)
対照群 動物番号 11 塗布 48 時間後 (' 13.10.09)

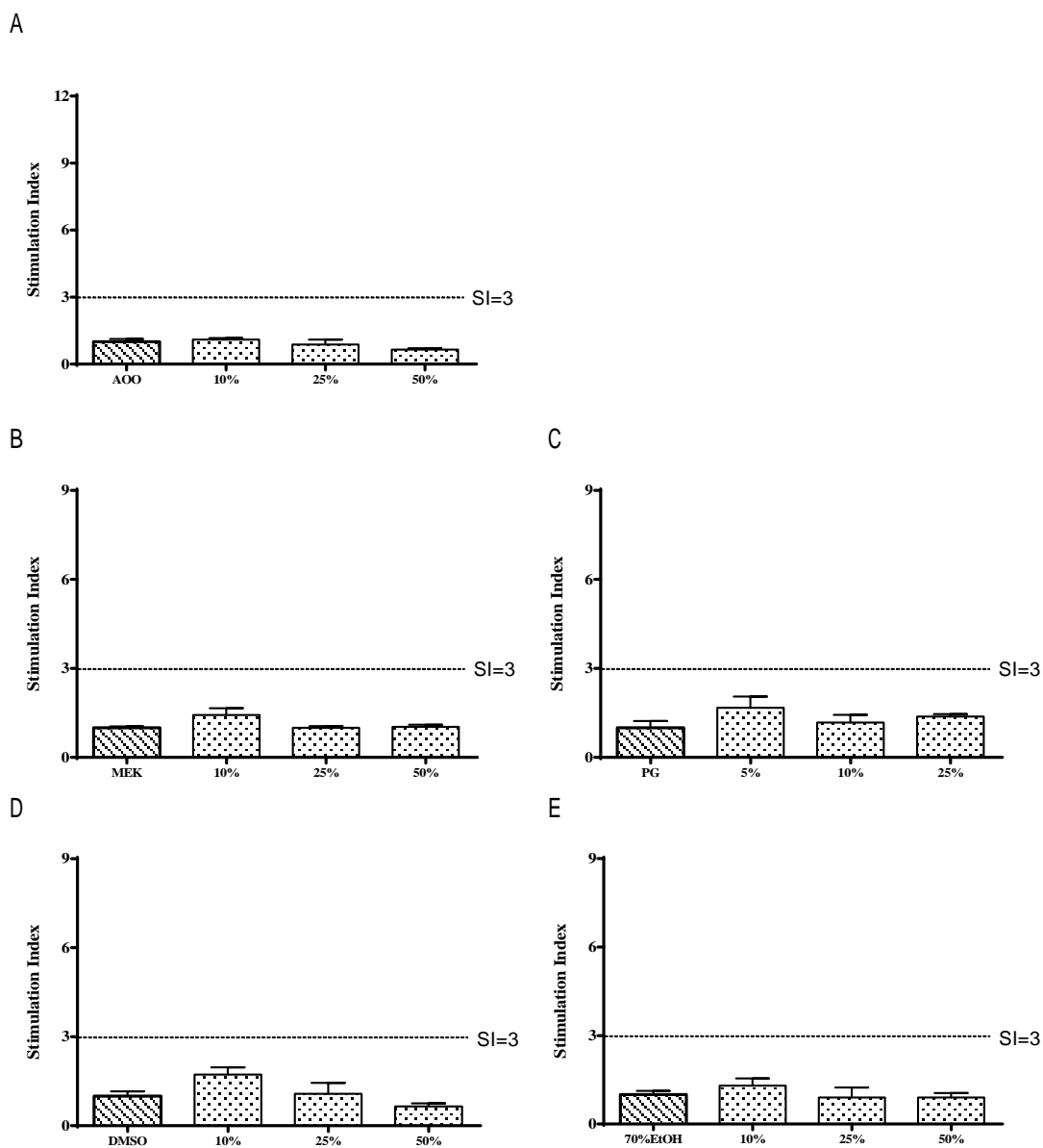


図 1. LLNA における各種溶媒での K166 濃度と SI 値の関係

横軸を K166 の濃度、縦軸を SI 値で示した。感作性陽性判断基準である SI=3 をバーで示した。溶媒は A : AOO、B : MEK、C : PG、D : DMSO、E : 70%エタノール水。

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討

2-2-1 表皮細胞への障害性及び炎症性サイトカイン等の分泌誘導能の検討

材料及び方法

[試薬]

新生児由来正常ヒト表皮角化細胞(KK-4009: lot.927477、クラボウ)を評価に用いた。表皮角化細胞は EpiLife® Medium with 60 µM Calcium(M-EPI-500-CA、Thermo Fisher Scientific)に Human Keratinocyte Growth Supplement (S-001-5、Thermo Fisher Scientific)を添加した培地で培養した。

被験物質として医薬部外品原料として流通されているロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称: K166)を用いた。また、比較対照として Monobenzyl ether of hydroquinone (MBEH、Sigma)、ハイドロキノン(HQ、Sigma)、L-アスコルビン酸 2-グルコシド(AAG2、Sigma)を用いた。

培養上清中のサイトカイン量の定量は、Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA Kit(DLA50、R&D Systems)、Human IL-1ra/IL-1F3 Quantikine ELISA Kit(DRA00B、R&D Systems)、Human IL-6 Quantikine ELISA Kit(D6050、R&D Systems)、Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit(DTA00C、R&D Systems)を用いておこなった。また、細胞障害性の評価には Cell Counting Kit-8(同仁化学)を用いた。

[K166の炎症性サイトカイン分泌誘導能の評価]

1×10^4 個の表皮角化細胞を 24 穴プレートに播種し、添加剤入り EpiLife®培地で 24 時間培養(37℃、5%CO₂)した。その後、培地を添加剤不含の EpiLife®培地に交換し、被験物質を種々の終濃度になるように添加して 24 時間培養した。コントロールは被験物質の溶媒である 50%EtOH とした。培養終了後、培地を回収し、各種 ELISA Kit を用いて培養上清中のサイトカイン量をマニュアルにしたがい測定した。

[K166の細胞障害性の評価]

上記の培地回収後の細胞に添加剤不含の EpiLife®培地を添加し、さらに Cell Counting Kit-8 溶液を添加して CO₂ インキュベーター内で 1 時間反応をおこなった。その後、マイクロプレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定した。細胞障害性は、溶媒コントロール添加時の吸光度に対する被験物質添加時の吸光度の割合(Cell Viability、%)として算出した。

結果及び考察

[細胞障害性]

表皮角化細胞に対する K166 の細胞障害性評価の結果を図 1 に示した。K166 は、終濃度 50 µM 以下では 1.3 倍程度の細胞増殖促進効果が認められたが、それ以上の濃度(~1mM)では特に影響は認められなかった。この結果から、K166 の表皮角化細胞に対する細胞障害性は、終濃度 1mM 以下の範囲では認められないものと推察された。

[炎症性サイトカイン分泌誘導能]

表皮角化細胞に対する K166 の炎症性サイトカイン分泌誘導能評価の結果を図 2~5 に示した。K166 は IL-6 の産生・分泌を終濃度 1mM で約 10 倍誘導した(図 2)。IL-1 については、いずれの濃度でもやや増加傾向が認められたが有意なものではなかった(図 3)。IL-1RA は終濃度 500 µM 以上で分泌が抑制される結果であった(図 4)。TNF-α に関しては、いずれの被験物質においてもキットの検出限界以下の値となった(図 5)。これらの結果から、K166 は高濃度(終濃度 500 µM 以上)で表皮角化細胞に対して炎症性サイトカイン分泌誘導をもたらす可能性が示唆された。しかし、これらの誘導作用は比較対照として用いたその他の物質に比して小さいものであり、実質

的には影響の少ないものと考えられた。

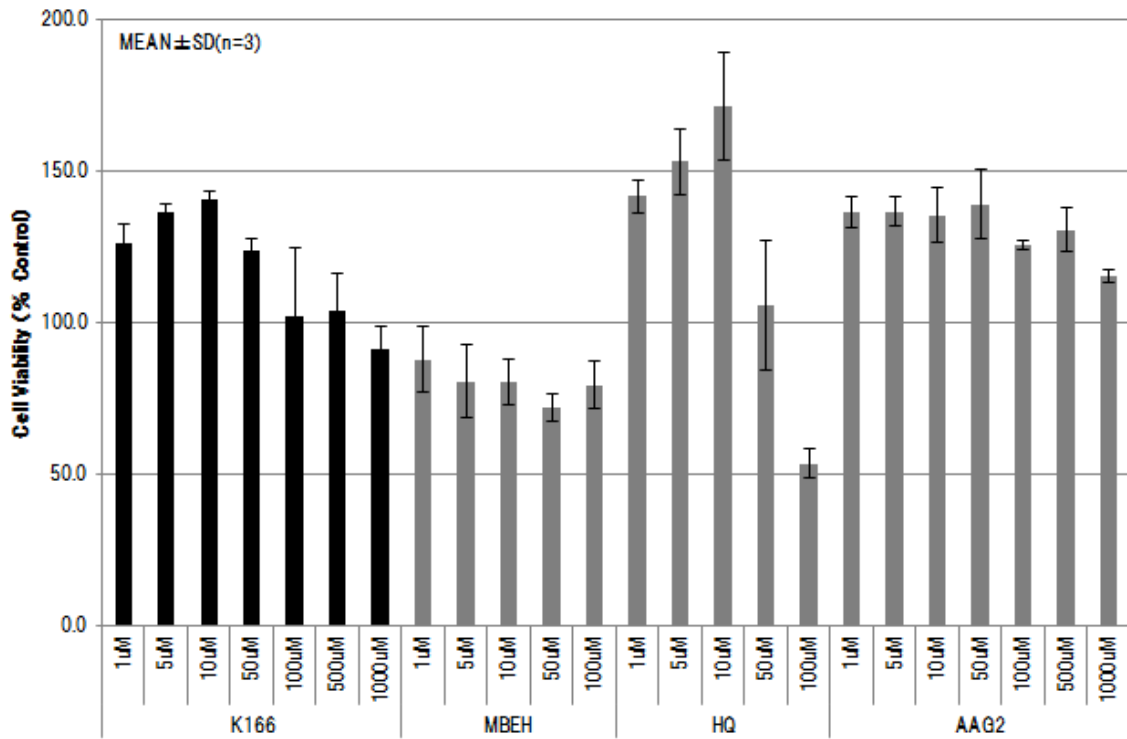


図 1. K166 の細胞障害性の評価

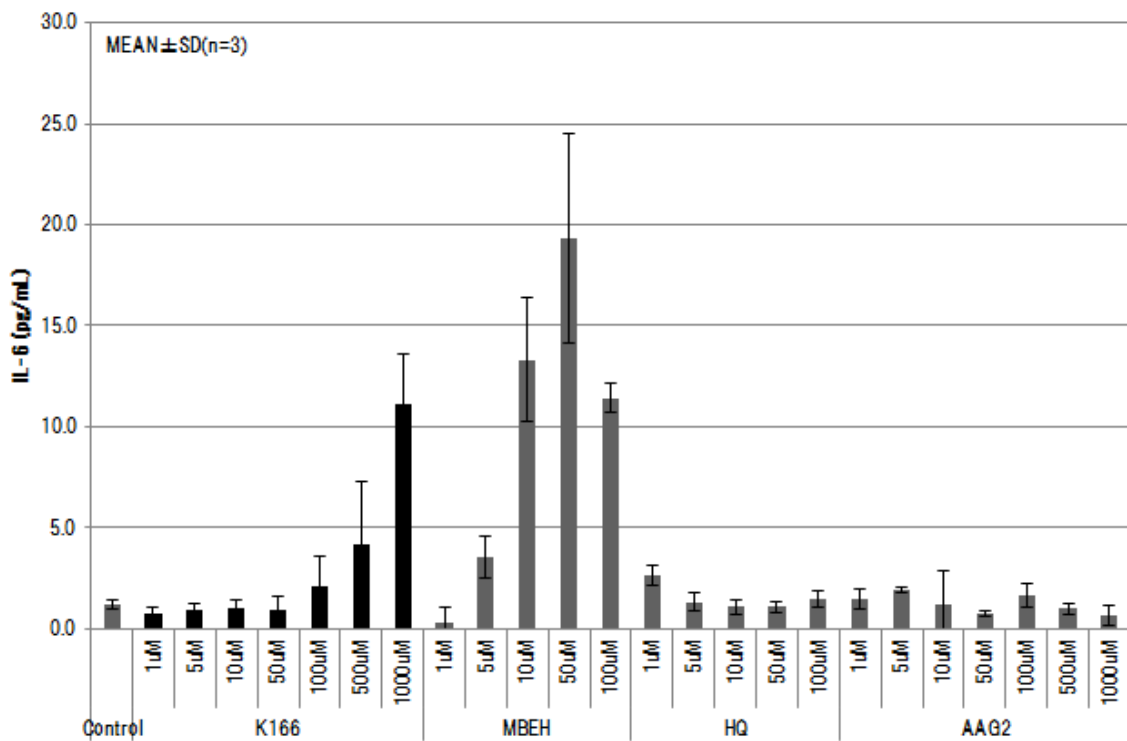


図 2. K166 の表皮角化細胞に対する IL-6 分泌誘導能の評価

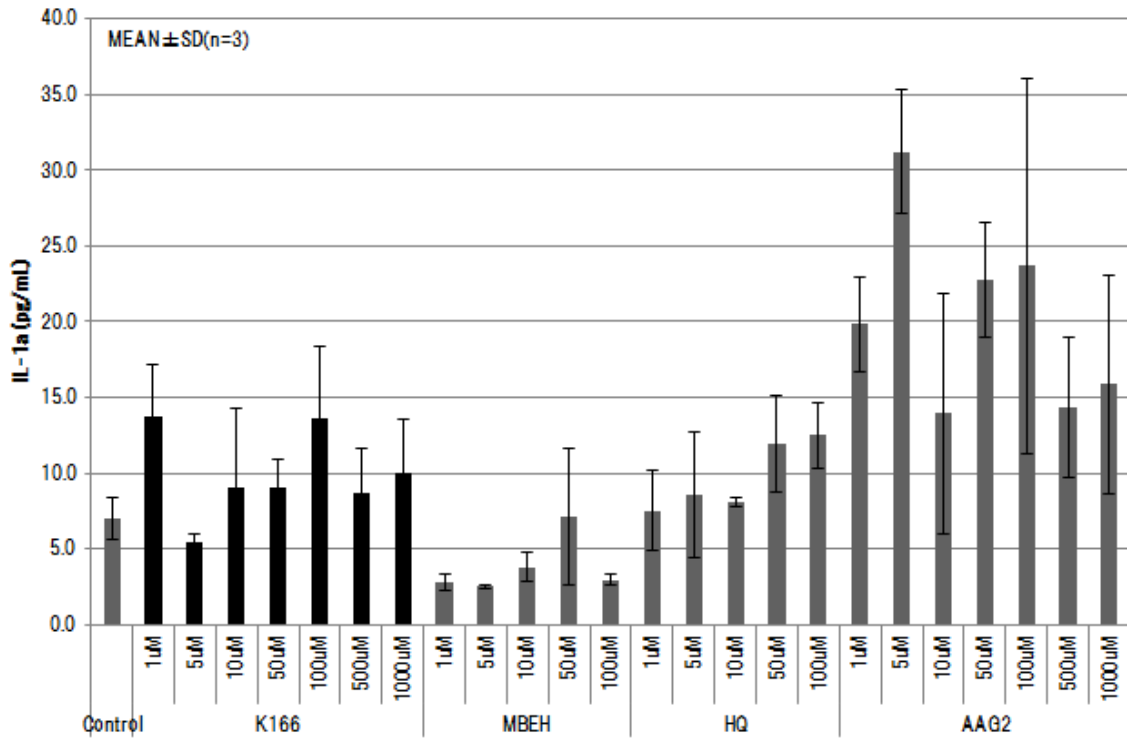


図 3. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1 分泌誘導能の評価

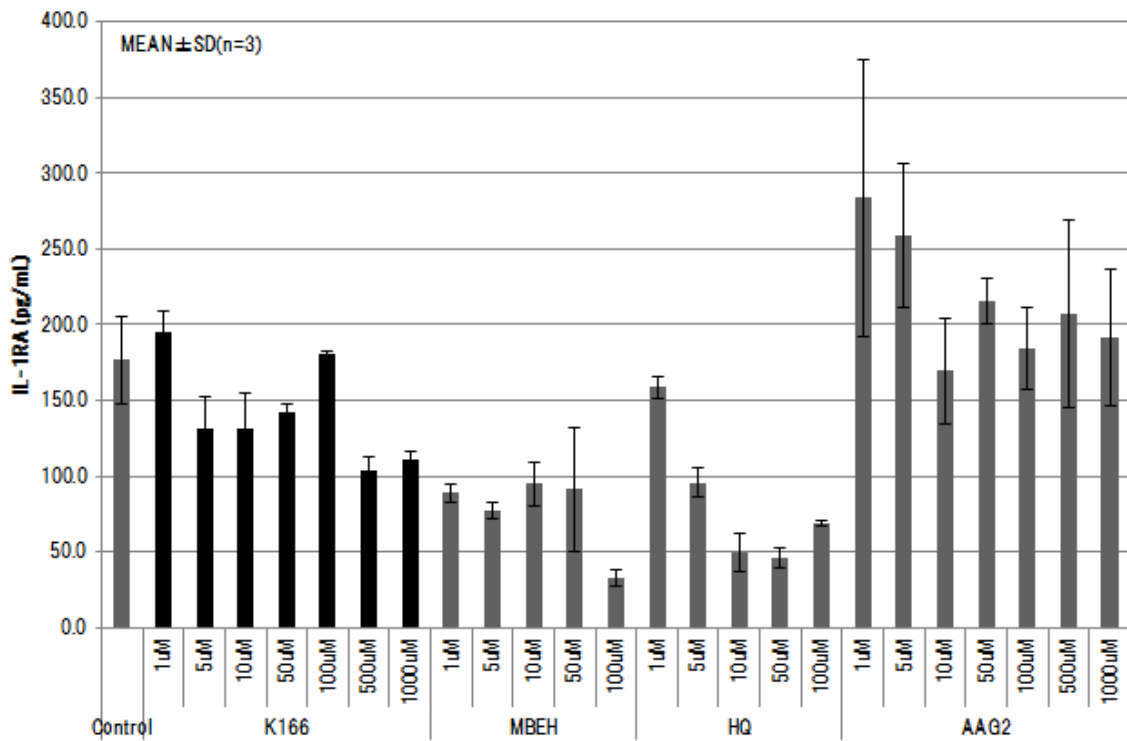


図 4. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1RA 分泌誘導能の評価

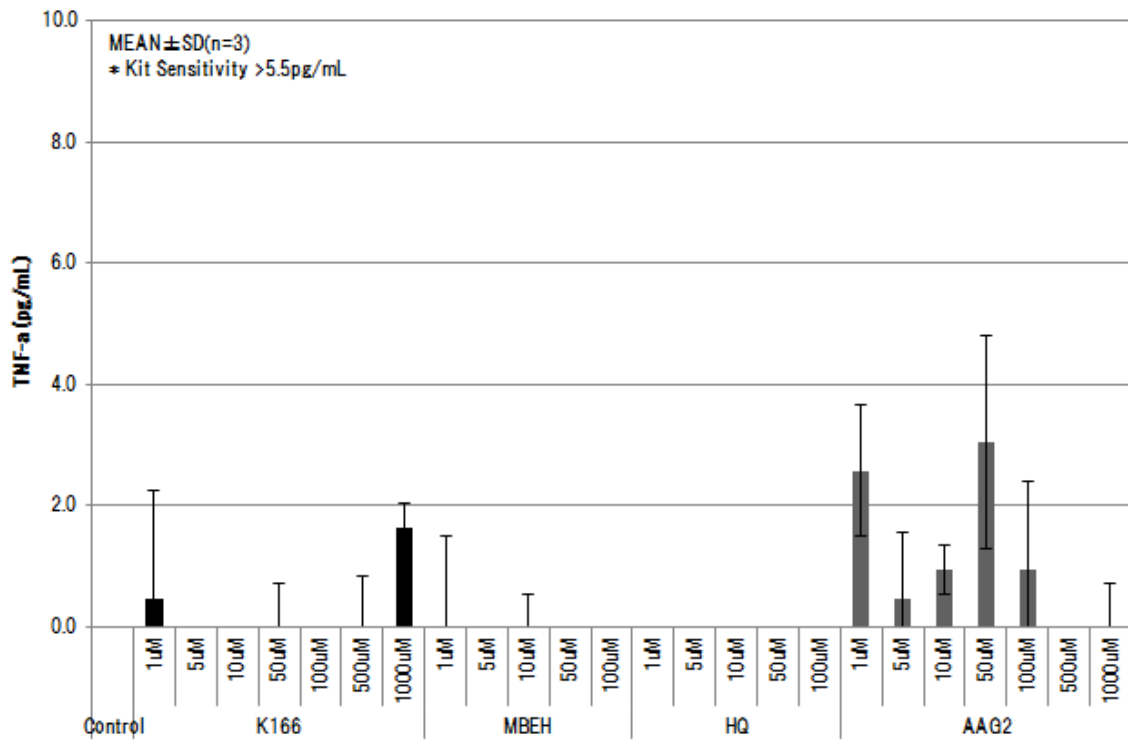


図 5. K166 の表皮角化細胞に対する TNF- α 分泌誘導能の評価

2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価

2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)製を用いた。Stealth RNAi™ siRNA、およびトランスフェクション試薬 Lipofectamine RNAiMAX は、Life Technologies (USA) 製を用いた。

[細胞培養]

PTUを用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数、タンパク量、および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイトを播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日から 1 日間 siRNA による前処理をし、3 日後 K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

[細胞障害性測定]

細胞障害性は細胞増殖測定用試薬アラマブルー (Alamar Bioscience, Inc 製) を用いて測定した。アラマブルーを培地の 10 分の 1 量加え、37 °C にて 1 時間反応させた。反応後の溶液を蛍光プレートリーダーにて測定した。

[タンパク量測定]

細胞を HEPES 緩衝液で洗い、10 % トリクロロ酢酸 (TCA)、エタノール・エーテル 1:1 (体積比) で処理後、1 N NaOH/10%ジメチルスルホキシド中で 60 °C、15 分溶解させた。細胞溶解物のタンパク量を Coomassie Plus Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. 製) にて測定した。

[細胞内チロシナーゼ活性測定]

培養メラノサイトにおけるチロシナーゼ (Tyrosine hydroxylase) 活性は Oikawa の方法によって測定した⁹⁾。培養終了 24 時間前に培地に 1 μCi [³H]-チロシンを加えた。培地 500 μl に活性炭溶液を等量加えボルテックス後、遠心分離した。上清 750 μl を 500 μl の活性炭溶液に加えボルテックス後、遠心分離した。上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

結果及び考察

[PTU を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

チロシナーゼ活性を阻害する PTU を添加することにより、K166 による細胞障害に与える影響をみた。PTU 10 μM、30 μM、100 μM の処理により、濃度依存的に K166 による細胞障害を低減させた (図 1)。また PTU 10 μM、30 μM、100 μM の単独処理において細胞数への影響は与えない一方、濃度依存的にチロシナーゼ活性は阻害した (図 2)。

PTU 処理による K166 の細胞障害の低減はチロシナーゼ活性の阻害に伴う可能性が示された。

[RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性に依存的であることを明らかにするため、RNA 干渉によりチロシナーゼ遺伝子発現を抑制する実験により確かめた。Negative control siRNA 処理でみられた K166 の濃度依存的な細胞障害がチロシナーゼ siRNA 処理によりチロシナーゼ活性を抑制させることにより (図 3) K166 による細胞障害が低減された (図 4)。RNA 干渉を用いた実験において K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性依存的であることが確認できた。

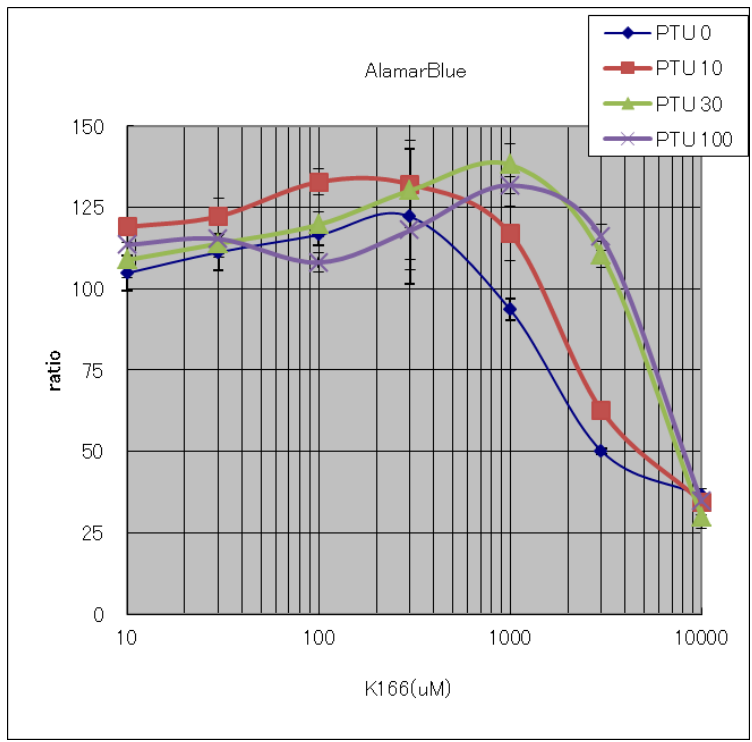


図 1 K166 の細胞障害に対する PTU の影響

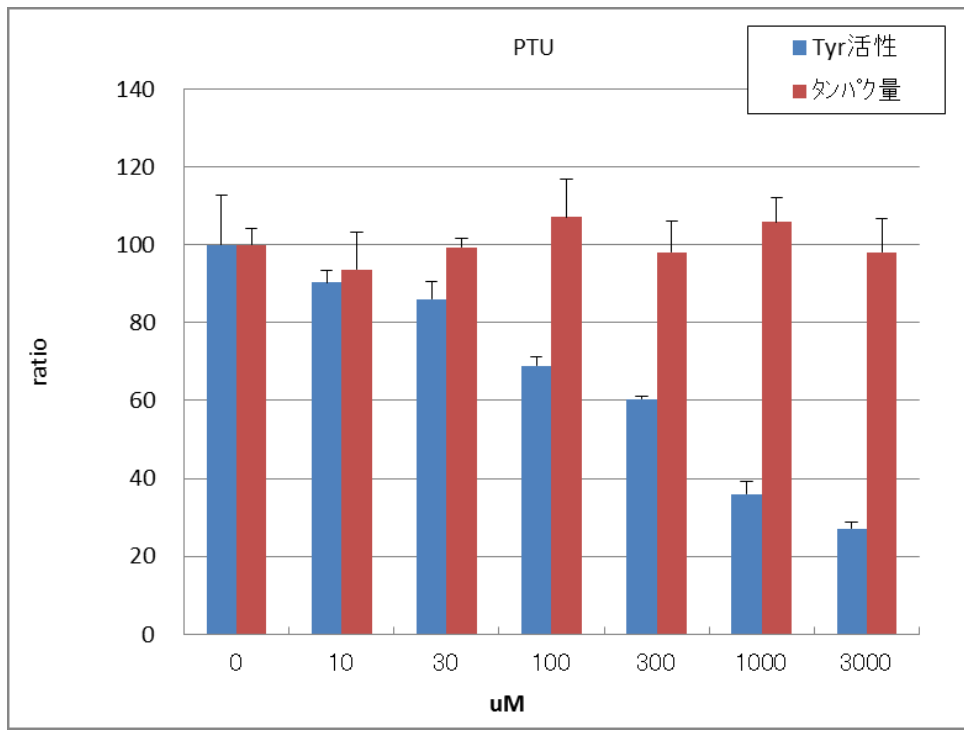


図 2 PTU のチロシナーゼ活性と細胞数への影響

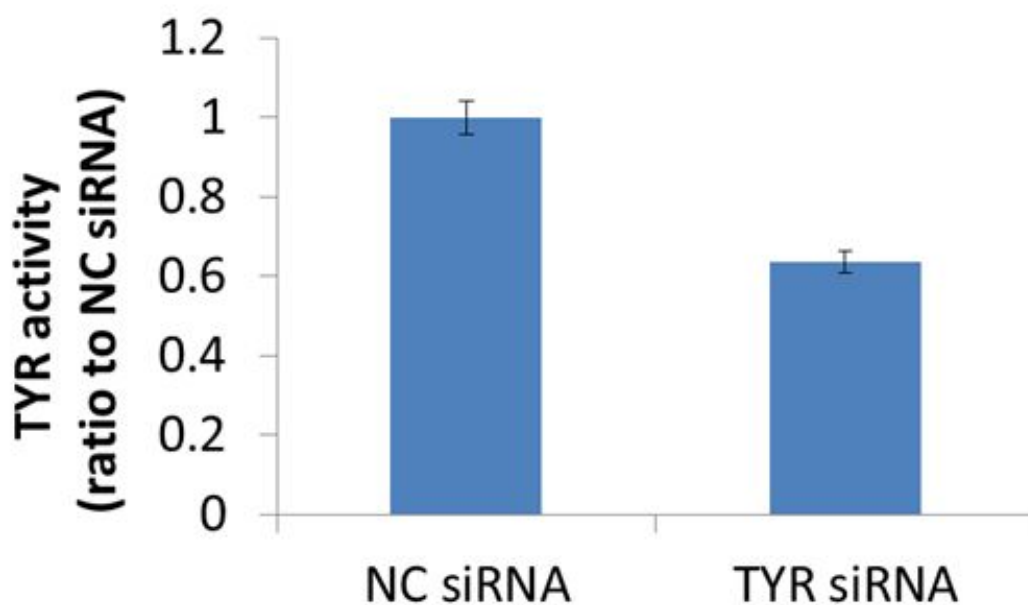


図3 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の確認

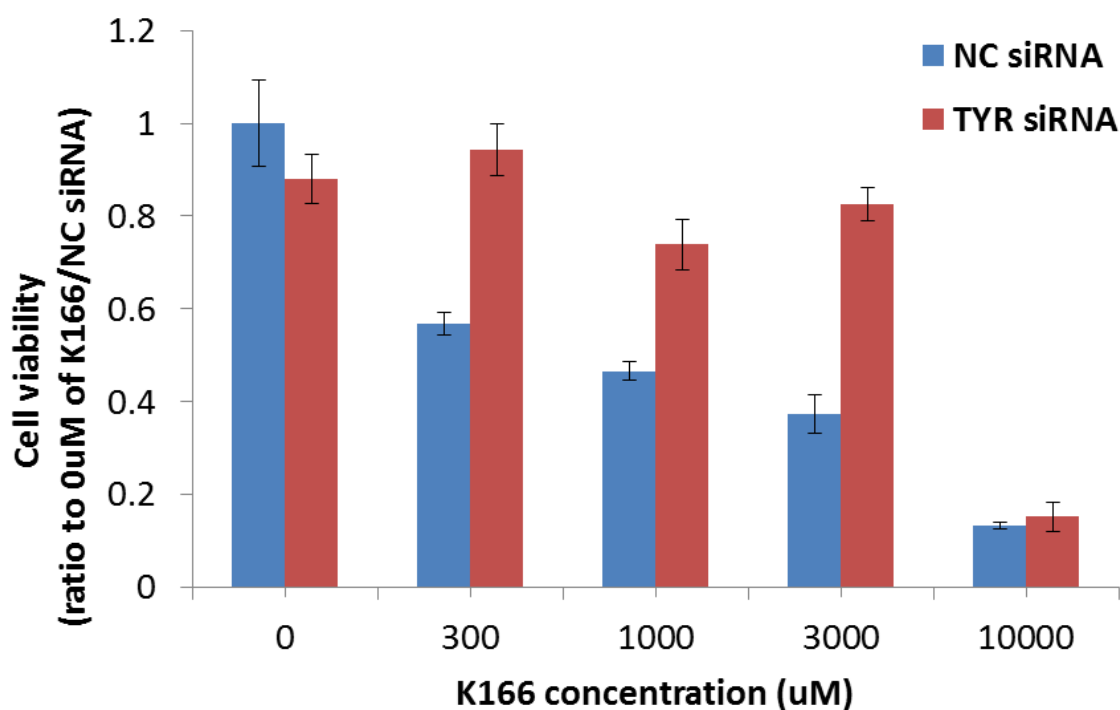


図4 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の K166 チロシナーゼの細胞障害への影響

2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞 (メラノサイト) は、クラボウより購入、あるいは、花王株式会社グループ内の研究所にて、定法に従って包皮より分離後、培養したものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies) に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS) (クラボウ) を添加した培地中で 37 °C、5% CO₂ の環境下で定法に従って培養した。

[チロシナーゼ (DOPA oxidase) 活性の計測]

メラノサイトを定法に従ってトリプシンを添加して剥がした後、顕微鏡下で細胞数をカウントし、 2×10^4 個の細胞を 1.5 mL チューブに回収した。遠心し、上清を除いた後、Phosphate Buffers Saline (PBS) で 2 度洗浄してから、再び遠心により上清を除いた細胞を準備した。あるいは、96-well plate に 1.2×10^4 個/well のメラノサイトを播種し、siRNA を添加して 2 日後の細胞について培地を除いた後、PBS で 2 度洗浄してから、再び上清を除いた細胞を準備した。それらに抽出 Buffer (0.1 M Tris-HCL (pH:7.2)、1% NP-40、0.01% SDS) を 20 μ L、Assay Buffer (4%ジメチルホルムアミド、100 mM Sodium phosphate-buffered (pH:7.1)) を 20 μ L 添加し、4 °C にて 2 時間かけて細胞を可溶化し、DOPA oxidase 活性の測定を行った。その DOPA oxidase 活性測定は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン ヒドラゾン (MBTH) 法を基本とした次に示す方法で行った。すなわち、可溶化した細胞溶液の各 well に、上記 Assay Buffer を 80 μ L、20.7 mM MBTH 溶液を 60 μ L、基質として 5 mM L-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) 溶液を 40 μ L 加え、37 °C にて 30 ~ 60 分間反応させた後に、505 nm の測定波長で吸光度を測定した。

[K166 の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) を除いた培地 (PMA (-) 培地) を用いて播種し、翌日に PMA (-) 培地に希釈して K166 を添加した。4 日後、amar blue 活性を計測した。

[Amar blue 活性の計測]

K166 を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA(-) 培地で希釈した 10% amar blue 溶液 (Bio-Rad) を 100 μ L/well 添加し、CO₂ インキュベーターにて 37 °C でインキュベートした。90 分後に蛍光プレートリーダーにて励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

[チロシナーゼの発現抑制]

96-well plate にメラノサイト (D6C0595) を 1.2×10^4 個/well の密度で、PMA (-) 培地を用いて播種し、翌日に siRNA 導入試薬である TransIT-TKO (Mirus Bio) を用いて添付のプロトコールに従って、25nM の Tyrosinase 特異的 siRNA (Life Technologies) あるいは非特異的 (Control) siRNA (Life Technologies) を添加した。2 日後に DOPA oxidase 活性を計測、あるいは新たな PMA (-) 培地に希釈した K166 を添加し、その翌日に amar blue 活性を計測した。

結果及び考察

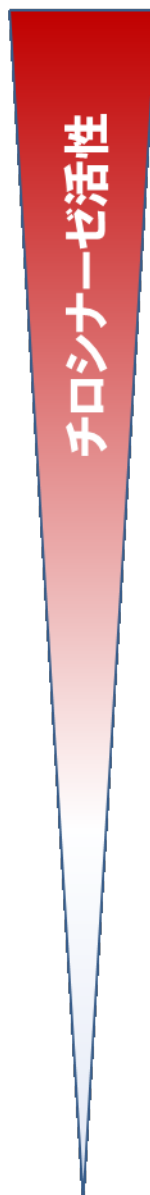
今回の実験で用いた 13 ラインのメラノサイトについて、チロシナーゼ活性の多様性を確認するため、それぞれ 1.5mL チューブに同じ細胞数のメラノサイトを準備し、DOPA oxidase 活性の計測を行った。その結果、メラノサイトのラインによってチロシナーゼ活性はさまざまであることが示された(図 1)。そこで、多様なチロシナーゼ活性を有するメラノサイトにおいて、K166 に対する細胞毒性が異なるかを明らかにするため、これら 13 ラインのメラノサイトにさまざまな濃度で K166 を添加した後、4 日後に alamar blue 活性を計測し、細胞毒性を評価した。K166 無添加の Control と比較して、alamar blue 活性の値が 50%低下する K166 の濃度(IC₅₀ 値)を算出し、その結果を表 1 に示した。この結果を基に、図 1 で示した各メラノサイトの DOPA oxidase 活性(チロシナーゼ活性)と K166 添加による alamar blue 活性の IC₅₀ 値の相関性を示したグラフを図 2 に示した。このグラフより、K166 によるメラノサイトへの細胞毒性とチロシナーゼ活性との関連性が示唆されると共に、K166 に対する毒性感受性が 2 群に分かれる可能性もまた示唆された。

次に、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性がチロシナーゼ活性に依存している可能性を明確にするため、チロシナーゼ活性が高く、また K166 に対する細胞毒性が高い D6C0595 細胞を用いて、RNA 干渉によりチロシナーゼの遺伝子発現を抑制した際の K166 に対する細胞毒性の変化を検討した。細胞を播種した翌日に siRNA を添加し、さらに 2 日後に DOPA oxidase 活性を計測したところ、Control siRNA を添加した細胞と比較して、チロシナーゼ siRNA を添加した細胞で同活性が約 50%程度に低下していることを確認した(図 3)。また、これらの細胞にさまざまな濃度で K166 を添加し、その翌日 alamar blue 活性を計測した結果を図 4 に示した。チロシナーゼの発現抑制により、K166 に対する細胞毒性は顕著に低下し、K166 添加による alamar blue 活性の IC₅₀ 値は、Control siRNA 及びチロシナーゼ siRNA 添加細胞においてそれぞれ 0.052mM 及び 5.9mM であった。すなわち添加濃度で 100 倍以上の顕著な差が認められた。

これらの結果より、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性はチロシナーゼ活性に強く依存することが明らかとなった。

表1 K166添加によるalamar blue活性IC50値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。細胞のDOPA oxidase活性(チロシナーゼ活性)が高い順にその値を示している。



	alamar blue 活性IC ₅₀ 値 (mM)
D 6C0595	0.405
D 5C0126	0.27
D D3C0782	0.54
L 5C0247	5.94
D AA4	0.135
M 5C0570	5.535
L CA4	6.21
L LMC P7	6.75
M 4C0760	6.48
L CA3	5.94
M 4C0465	6.21
L LC1C1022	6.345
L 1C1018	6.21

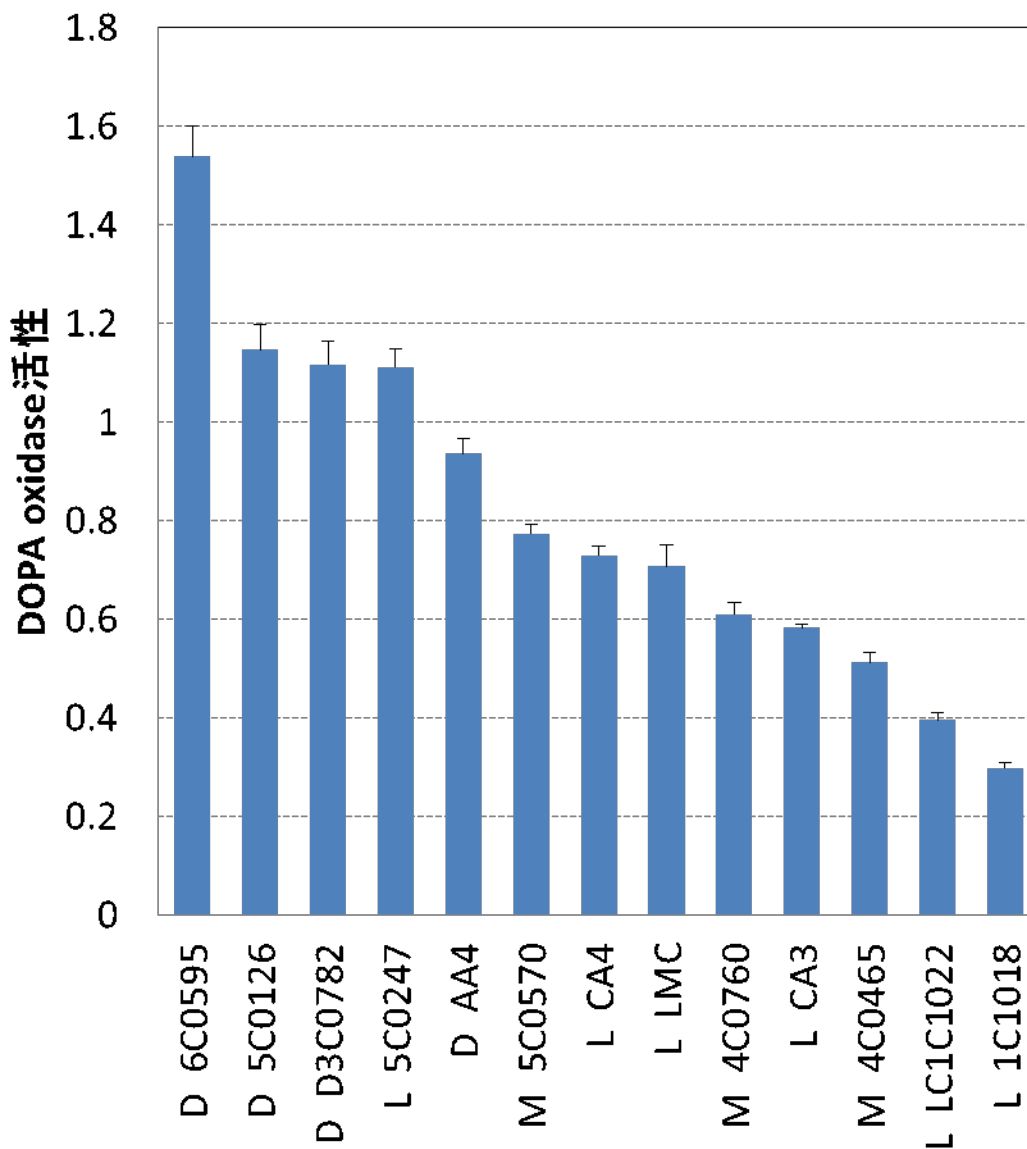


図 1 使用した 13 ラインのメラノサイトにおける DOPA oxidase 活性

細胞ライン名の前に記載の D、M、L はそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。

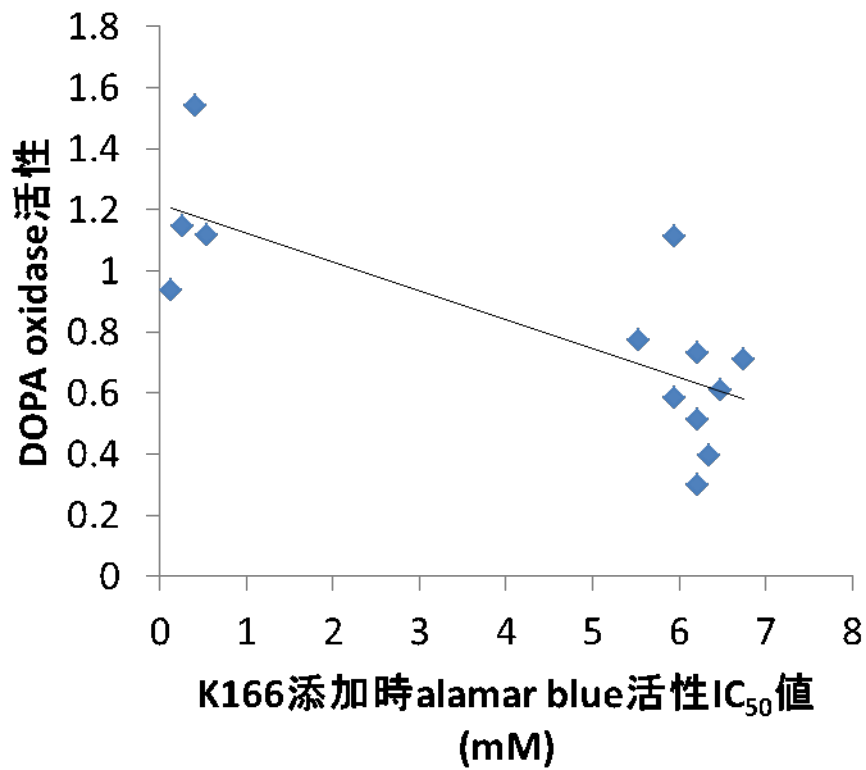


図 2 DOPA oxidase活性とK166添加時のalamar blue活性IC₅₀値との相関

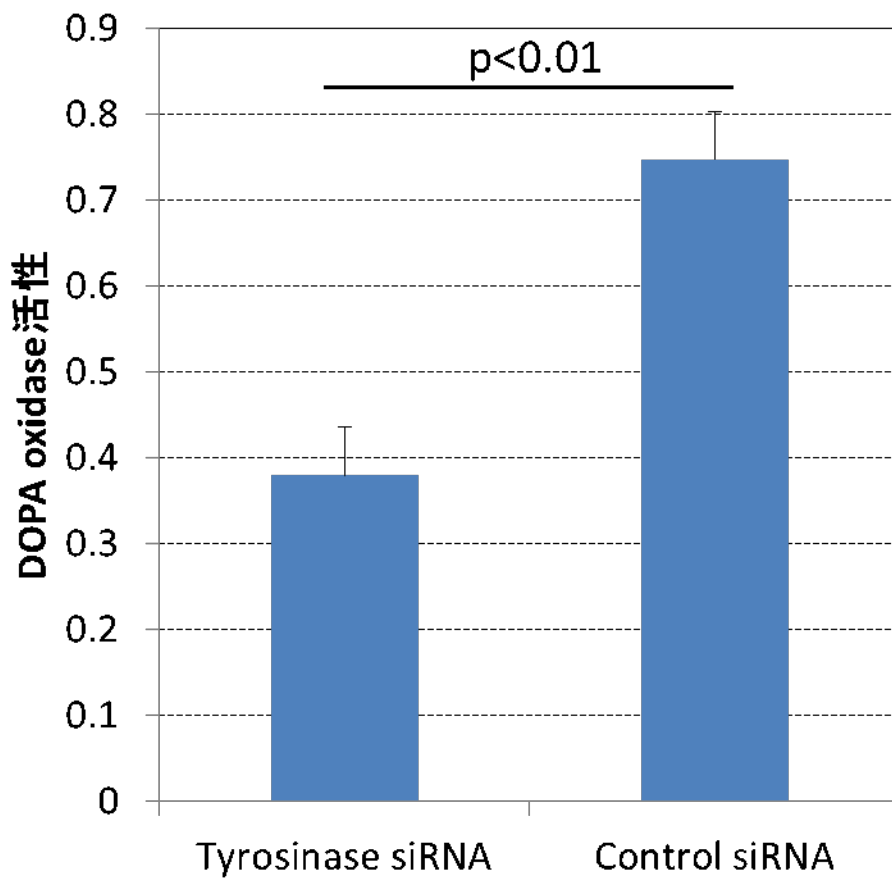


図 3 Tyrosinase発現抑制時のDOPA oxidase活性

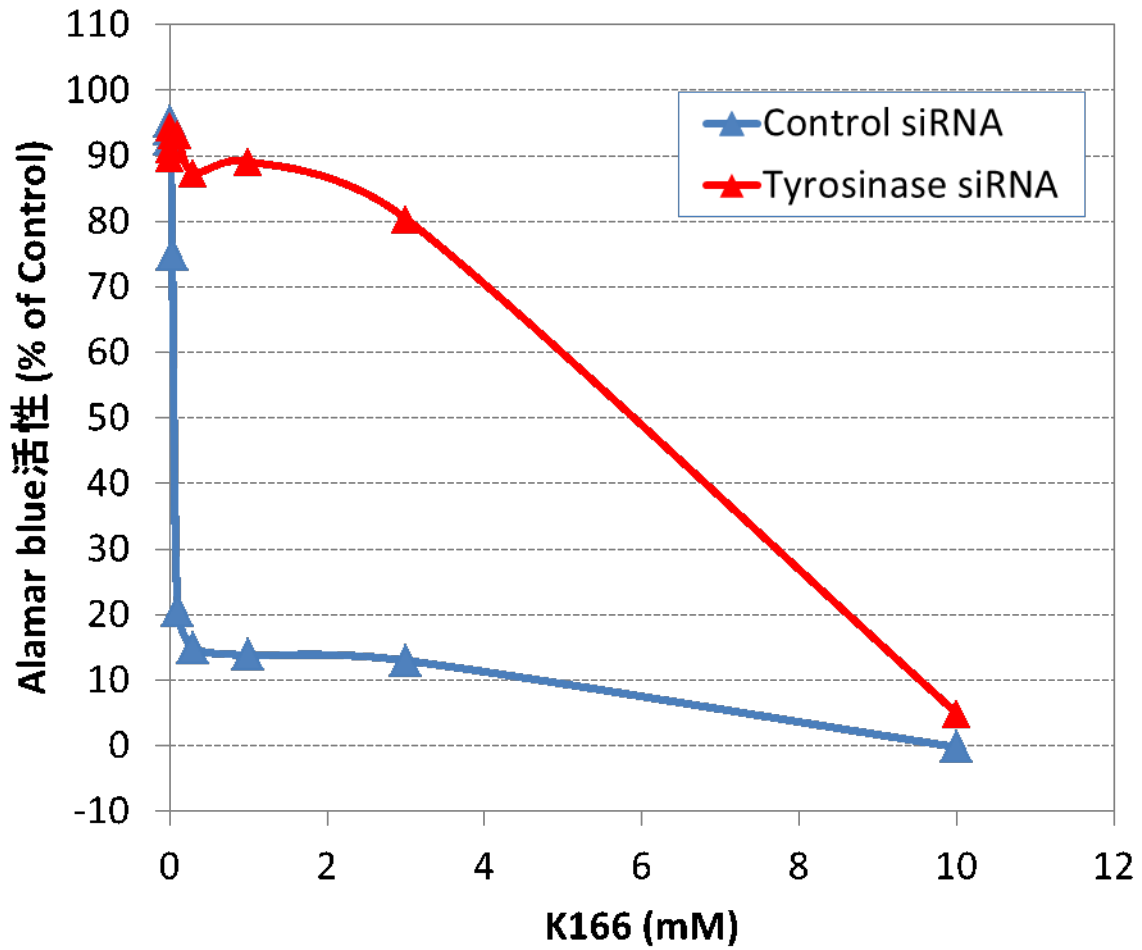


図4 Tyrosinase発現抑制時のK166添加による細胞毒性の変化

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166)は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞(メラノサイト)はクラボウより購入したものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies)に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS)(クラボウ)を添加した培地中で 37℃、5% CO₂の環境下で定法に従って培養した。

[K166 及び K166-0H の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA)を除いた培地(PMA(-)培地)を用いて播種し、翌日に PMA(-)培地に希釈して K166 または K166-0H を添加した。4 日後、Alamar blue 活性を計測した。

[Alamar blue 活性の計測]

化合物を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA(-)培地で希釈した 10% Alamar blue 溶液(Bio-Rad)を 100 μ L/well 添加し、CO₂インキュベーターにて 37℃でインキュベートした。90 分後、蛍光プレートリーダーにて、励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

結果及び考察

K166 とチロシナーゼによる K166 の代謝物であると想定される K166-0H についてメラノサイトにおける細胞毒性を比較した。チロシナーゼ活性が比較的 low、K166 に対する細胞毒性が低い 2 ライン(L LC1C1022、M 4C0760)のメラノサイトを用い、さまざまな濃度で K166 及び K166-0H を添加した後、4 日後に Alamar blue 活性を計測し、それぞれの IC₅₀ 値を算出した(表 1)。いずれの細胞においても、K166 と比較して K166-0H を添加した場合に顕著な IC₅₀ 値の低下が認められた。このことから、K166 がチロシナーゼによって代謝され K166-0H が産生されることで、顕著にメラノサイトに対する細胞毒性が上昇することが示唆された。

表1 K166及びOH-K166添加によるAlamar blue活性IC₅₀値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示す。また、<0.1は0.1未満であることを示す。

	Alamar blue活性 IC ₅₀ 値	
	K166 (mM)	OH-K166 (mM)
L LC1C1022	6.6	0.19
M 4C0760	7.3	<0.1

2-3-2 活性酸素の関与の検討

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[材料及び方法]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。ヒト由来メラノサイトで生じる活性酸素種 (ROS) の検出には、Total ROS/Superoxide Detection kit (ENZ-51010: Enzo) を使用した。メラノサイトは 3.6×10^4 個ずつ 1% HMGS および ROS/Superoxide Detection Mix B (ENZ-51010: Enzo) を混合した modified-MCDB153HAA 培地中に播種した。培養には 15mL チューブを使用した。各チューブに K166 (30, 100, 300, 1000 μM) を添加し、5% CO₂ 下、37 下で 3 時間培養した。無添加の陰性対照群、ピオシアニン (100, 500 μM) 添加の陽性対照群も準備した。

0.1% BSA-PBS で 2 回洗浄した細胞を、フローサイトメトリー (BD FACSCalibur(TM): Becton, Dickinson and Company, CA) を用いた蛍光の測定に供した (Ex=488nm, Em=520nm)。

[結果及び考察]

ヒト由来メラノサイトを K166 処理することで生じる ROS について、フローサイトメトリーによる検出を試みた。結果を図 1 に示す。ROS 誘導試薬であるピオシアニンを添加した条件 (陽性対照) では、メラノサイトからは濃度依存的な ROS の発生が検出された。薬剤を添加しない条件 (陰性対照) では、ROS は検出されなかった。これらの結果から本実験系が成立していると判断した。K166 を添加した条件では、メラノサイトからは ROS の発生は検出されなかった。

本実験の K166 の添加濃度域において、細胞障害性の誘導を確認していることから、K166 によって誘導される細胞障害性には、ROS の関与が小さいと考えられたが、検出感度以下の ROS 寄与の可能性は除外できない。

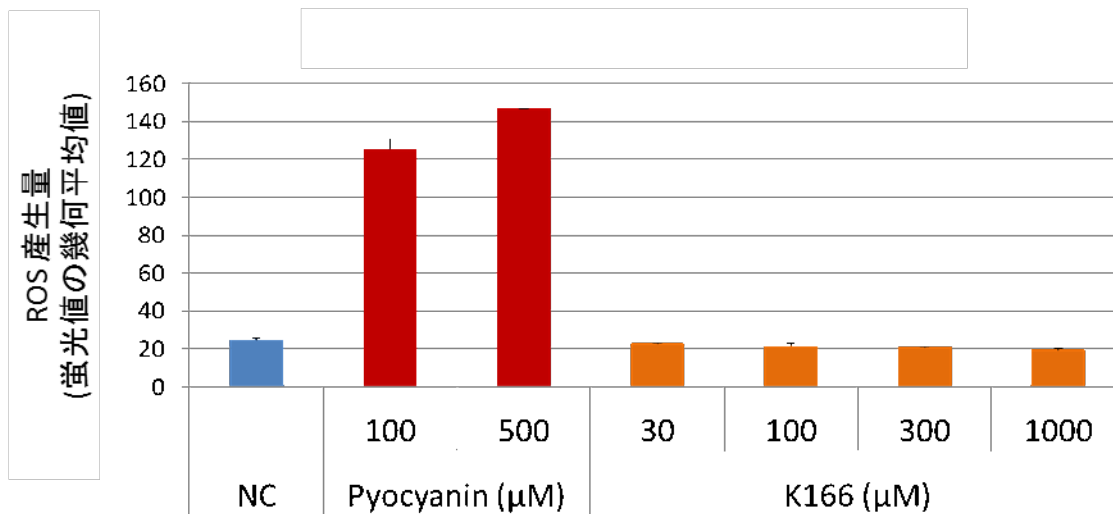


図1. K166 および K166-OH 添加培養メラノサイトにおける ROS の検出

メラノサイトは K166 または K166-OH 存在下で 3 時間培養した。細胞から発生する ROS の検出には Total ROS/Superoxide Detection kit を使用し、フローサイトメトリーで検出された細胞 10,000 個分の蛍光値の幾何平均値 (Geo-mean) を算出した。NC, 無添加陰性対照, PC, ピオシアニン添加陽性対照

2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討

材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (USA)から購入した。

[細胞培養]

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト (Kurabo, Japan) 播種し、翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166、および対照試薬を培地に添加した。K166 の添加の 3、および 6 時間後に回収した細胞溶解液を、それぞれタンパク質発現解析、および遺伝子発現解析に供した。

[タンパク質発現解析]

ウェスタンブロットにより、常法に従い行った。用いた抗体は、抗 p-eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) 抗体、抗 eIF2 抗体 (いずれも Cell Signaling Technology, USA) とし、いずれも 5000 倍に希釈して使用した。

[遺伝子発現解析]

Real-time PCR により、常法に従い行った。TaqMan[®] Gene Expression Assays (GAPDH, Hs99999905_m1; IL-8, Hs00174103_m1; Life Technologies, USA) をプローブとして用いた。

結果及び考察

色素脱失を誘導する MBEH、4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) が、酸化ストレスを介して、メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導し、その下流で Interleukin-6、および 8 の発現が促進される¹⁴⁾。今回、K166 が同様のメカニズムで色素脱失を生じる可能性があることを確認できた。

[eIF2 タンパク質のリン酸化の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 1 にウェスタンブロットにより検出した、リン酸化 eIF2 の発現を示す。eIF2 のリン酸化は、0.3 mM、および 1 mM の K166 処理により、濃度依存的に増加した。この結果から、K166 が培養メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導していることが示された。小胞体内カルシウムを流出させることにより小胞体ストレスを誘導する Thapsigargin (TG)、および Toosi らの報告¹³⁾において小胞体ストレスを誘導することが示された Monobenzylether of hydroquinone (MBEH) によっても eIF2 のリン酸化は誘導された。また、この eIF2 のリン酸化誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。MBEH、および 0.3 mM、1 mM の K166 による eIF2 のリン酸化は、PTU の前処理により抑制された。このことから、K166 による小胞体ストレスの誘導は、チロシナーゼ活性に依存していることが示された。チロシナーゼ非依存的に TG によって誘導された eIF2 のリン酸化は、PTU 処理により抑制されなかった。

小胞体ストレス応答において、eIF2 のリン酸化は、翻訳の停止により、小胞体のフォールディング機能負荷を軽減する他、転写因子 ATF4 の発現を介して、細胞の生死を左右する遺伝子発現を誘導することが知られている¹⁴⁾。従って、K166 によって誘導される小胞体ストレス応答と、メラノサイト細胞障害性との間に密接な関連があることが推察される。

[IL-8 mRNA 発現の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 2 にリアルタイム PCR による IL-8 遺伝子発現解析の結果を示す。K166 は、3 mM 添加時に無添加対照と比較して 35 倍となるのを最大として、処理濃度依存的に IL-8 mRNA 発現を亢進した。10 mM の K166 による発現の亢進が、3 mM と比べて小さかったのは、強い細胞毒性のためであると考えられる。Toosi らの報告において、IL-8 の遺伝子発現は、小胞体ストレス応答の主なエフェクターの一つである転写因子 XBP1 により制御され、MBEH により誘導されることが示されている¹³⁾。この結果は、上記の eIF2 のリン酸化に関する結果と合わせ、K166 が小胞体ストレスを誘導していることを強く示している。上記の発現誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。0.1 mM から 1 mM の K166 による発現誘導は、0.1 mM の PTU 前処理により抑制された。このことから、K166 により誘導される小胞体ストレス下流の応答もチロシナーゼ活性に依存していることが示された。3 mM 以上の K166 による発現は、PTU により抑制されなかったことから、チロシナーゼ活性に依存せずに誘導されたものであると考えられる。

以上は、in vivo において、K166 が局所的な免疫環境を変化させ、病態発現に関与する可能性を示す結果であると考えられる。

上記の結果から、K166 は、チロシナーゼに代謝されることにより小胞体ストレスを誘導し、メラノサイト特異的な細胞障害性に関与していることが示された。

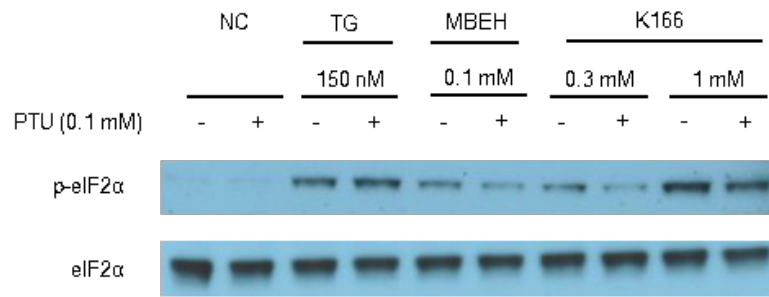


図1. K166によるeIF2 α タンパク質のリン酸化誘導

NC, Negative control; TG, Thapsigargin; MBEH, Monobenzyl ether of hydroquinone; PTU, Phenylthiourea

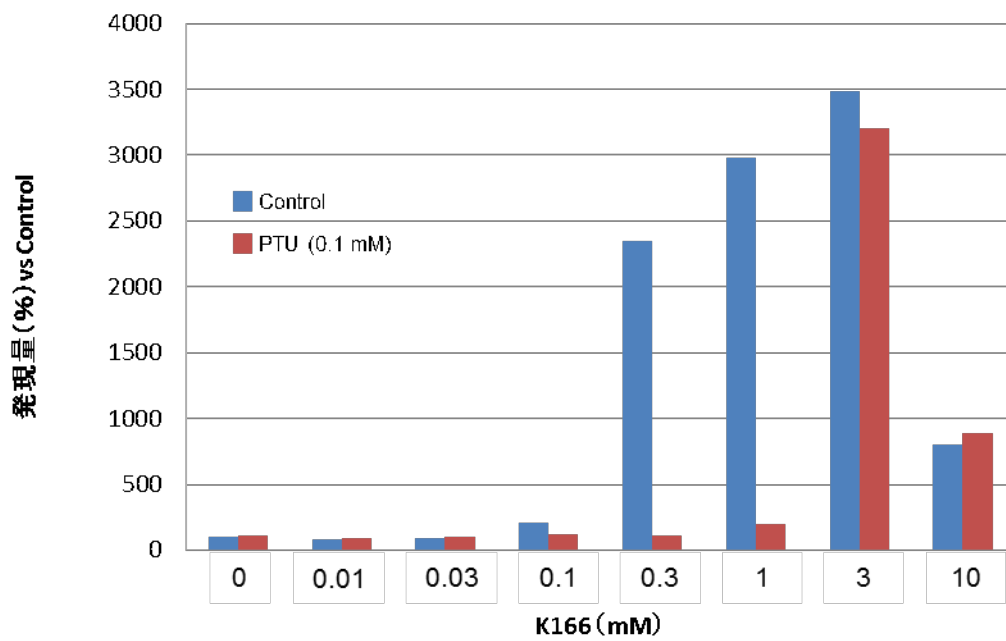


図2. K166によるIL-8遺伝子発現誘導

IL-8の発現量は、内部標準遺伝子GAPDHの発現で除した値で示した。
PTU, Phenylthiourea

3.まとめ

動物モデルおよび培養色素細胞を用いた非臨床試験の結果、ロドデノールによる白斑様症状の形成に関して以下のことが示された。

- ・モルモットに対するロドデノール 30%液の継続塗布により、皮膚明度が上昇、色素脱失部では表皮基底層のメラノサイト、メラニン顆粒ともに減少の傾向を示したが、塗布を休止するとこれらは回復し、地肌の色素が戻った。したがって K166 の累積塗布により生じた色素脱失は、可逆的な反応であると考えられた。

- ・ロドデノールの皮膚感作性については GPMT および LLNA において認められなかったものの、CCET において疑わしい皮膚反応が認められた。光感作性については AS-AA および Harber においていずれも認められなかった。

- ・ロドデノールの表皮角化細胞に対する細胞障害性は 1mM 以下の範囲では認められず、500 μ M 以上で炎症性サイトカイン分泌誘導をもたらす可能性が示唆されたが、その作用は小さいものであった。

- ・メラノサイトを用いた添加試験において、チロシナーゼの活性または発現を低下させることでロドデノールの細胞障害性は緩和されることから、ロドデノールはチロシナーゼの活性依存的に細胞障害性を誘導することが示された。

- ・さまざまなチロシナーゼ活性を有するメラノサイトを用いた検討において、チロシナーゼ活性に依存してロドデノールに対する細胞障害性は 2 群に分かれ、同一ラインのメラノサイトにおいても、ロドデノールに対する細胞毒性はチロシナーゼ活性に大きく依存した。これらの結果はロドデノールによる障害の耐性にチロシナーゼ活性の個人差が係る可能性がある。

- ・チロシナーゼによるロドデノールの代謝物は構造上 ROS を発生すると考えられるが、障害を与える濃度のロドデノールをメラノサイトに添加しても細胞内で ROS の発生は検出されず、ロドデノールは ROS を介さずに細胞障害性を発揮する可能性が示唆された。

- ・ロドデノールは、メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導し、さらにはその誘導がチロシナーゼ活性依存的であることを見出した。

以上より、ロドデノールはチロシナーゼにより代謝され水酸化ロドデノールとなその過程もしくはそれ以降の代謝プロセスにおいて誘導される小胞体ストレスを介してメラノサイトに障害を与えることでその消失を促し、限られた個体に可逆的な白斑様の症状を誘導する可能性がある。

4. 引用文献

- 1) 田山邦昭, フェニルヒドロキノンの脱色素作用およびそのメラノサイト傷害の発現機序に関する実験病理学的研究. 埼玉医科大学雑誌 2002 ; 第 29 巻__
- 2) Wei Chin Chou, Makoto Takeo, Piul Rabbani, Hai Hu, Wendy Lee, Young Rock Chung, John Carucci, Paul Overbeek, Mayumi Ito., 2013. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mclr signaling. NATURE MEDICINE 19, 7, 924-929.
- 3) Emi K Nishimura., 2011. Melanocyte stem cells : a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. 24; 401-410.
- 4) Magnusson, B.; Kligman, A.M.: The identification of contact allergens by animal assay, The Guinea Pig Maximization Test method, J. invest. Derm. 52: 268-276, (1969).
- 5) Tsuchiya S. et al. (1982) Studies on contact hypersensitivity in the guinea pig. Contact Dermatitis : 8, 246-255
- 6) Organization for Economic Corporation and Development (OECD, 2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, TG-429 (Adopted: 22nd July 2010)
- 7) 佐藤悦久, 勝村芳雄, 市川秀之, 小林敏明, 中嶋啓介 : モルモットによる光接触感作性試験法 (Adjuvant-Strip 法), 西日皮膚, 42 巻 5 号, 1980
- 8) L. C. Harber, S. E. Torgovnic and R. L. Baer : Contact Photosensitivity Patterns to Halogenated Salicylanilides
In Man and Guinea Pigs, Arch Derm. 96, 1967
- 9) Oikawa A, Nakayasu M, Nohara M, Tchen TT. Fate of L-[3,5-3H]tyrosine in cell-free extracts and tissue cultures of melanoma cells: a new assay method for tyrosinase in living cells. Arch. Biochem. Biophys. 1972;148:548-557.
- 10) M. Seiji, et al., The Reciprocal Relationship between Melanization and Tyrosinase Activity in Melanosome (Melanin Granules), J. Biochem., 1961, 49, p.700-706.
- 11) S. Naish, et al., Initial Mushroom Tyrosinase-Catalyzed Oxidation Product of 4-Hydroxy anisole is 4-Methoxy-Ortho-Benzoquinone. Pigment Cell Res., 1988, 1, p.379-381.
- 12) P. Manini, et al., A Reactive ortho-Quinone Generated By Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of Skin Depigmenting Agent Monobenzone: Self Coupling and Thiol Conjugation Reactions and Possible Implications for Melanocyte Toxicity. Chem. Res. Toxicol., 2009, 22, p.1398-1405.3) P. Manini, et al., A Reactive

ortho-Quinone Generated By Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of Skin Depigmenting Agent Monobenzone: Self Coupling and Thiol Conjugation Reactions and Possible Implications for Melanocyte Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22, p.1398-1405.

13) Toosi, S., S.J. Orlow, and P. Manga, Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *J Invest Dermatol*, 2012. 132(11): p. 2601-9.

14) Ron D. and P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8: p. 519-29.

原因究明に関する調査研究 ・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。

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, HPBoII, 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1万7千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る。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する。

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(DHPBoI), 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(DHPBoII)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 および LC/MS 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 で保存し

た。

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。

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。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 African American の新生児包皮表皮由来 (Cat No. KM-4009, No.01392) 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) に培地で培養した。

3. 医薬部外品製品中からの抽出

試料 0.4 g に 15 mL のメタノールを加え、5 分間の超音波処理を 2 回施し、20 mL に定容した。これを 0.2 μm のフィルターでろ過して HPLC または LC/MS に供した。

4. キラルカラムを用いた HPLC

装置は 1100 システム (Agilent 社) を用いた。HPLC 条件は以下のとおり。

カラム: Chiral CD-Ph (2.0 mm i.d. × 250 mm; particle size, 5 μm; Shiseido), カラム温度: 40 , 移動相: 25% acetonitrile, 流量: 0.2 mL/min, 検出: 280 nm。

5. 逆相カラムを用いた HPLC および LC/MS

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters 社) を用いた。HPLC および MS 条件は以下のとおり。

カラム: ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d. ×

100 mm; particle size, 1.7 μm; Waters 社), カラム温度: 40 , 移動相: 40%メタノール, 0.02% TFA, 流量: 0.2 mL/min, イオン化: ESI positive, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 120 , 脱溶媒温度: 350 , 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, コーンガス流量: 50 L/hr, 検出: SCAN mode (m/z 50-600)。

6. 試験物質の細胞への曝露

HaCaT細胞は 1.0 × 10⁵ cells/ml, ヒトメラノサイトは 1.2 × 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。

ヒトメラノサイトに対する DHPBoI および DHPBone の曝露実験では、2.4 × 10⁵ cells/ml の細胞懸濁液 50 μl/well を 24 時間前培養し、培養上清を取り除かずに 50 μl/well の検液を加えた。検液は、最終曝露濃度の 500 倍濃度の試験物質の DMSO 溶液を培地で 250 倍に希釈して調製した (DMSO 最終濃度は、0.2%)。

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。

7. 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 秒間の蛍光強度 (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蛍光強度の平均を 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蛍光強度の平均をバックグラウンドとした。

8. 培養上清の LC/MS 分析

細胞培養後 3well 分の培養上清をまとめ、遠心分離を行って上清を得た。適宜培地で希釈して LC/MS 分析に供した。

9. 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 0.33 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℃ で一定時間インキュベートした。

C. 研究結果

1. ロドデノールの光学異性体存在比

ロドデノールは 2 位に不斉炭素を持ち、鏡像異性体 (*R*体と*S*体) が存在する (図2)。そこで、両異性体の原料中および製品中の存在比を検討した。キラルカラムを装着した HPLC により分離したところ、図 3 に示すように分離した。ピーク面積から *R* 体と *S* 体の存在比がほぼ 1:1 であることが判明した (表 1)。

2. ロドデノールの純度

ロドデノールの合成原料であるラズベリーケトンの残留が考えられるため、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、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、絶対検量線法により定量したところ、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。製品に配合されるロドデノールの純度は非常に高いことが示された。また、製品へのロドデノール配合量は約 2% であることが確認された。

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

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。そして、この水酸化体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。

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。LC₅₀ はロドデノール: 12.7 mmol/L, ラズベリーケトン: 10.5 mmol/L, DHPBol: 0.52 mmol/L, DHPBone: 0.39 mmol/L であり、水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。一方、2 位の官能基の違いは細胞毒性に大きな影響は与えていないが、ケトンの方がわずかに毒性が強い傾向にあった。

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 の新生児包皮表皮由来のものを用いた。図 7 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: 16.5 mmol/L, ラズベリーケトン: 15.5 mmol/L, DHPBol: 0.072 mmol/L, DHPBone: 0.049 mmol/L であった。水酸化体は HaCaT に対してよりも低い濃度で毒性を示した。また、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 時間適用したメラノサイトの培養上清を LC/MS により分析した。クロマトグラム上のピークの同定は PDA で得られた波長スペクトルと MS で得られたマススペクトルにより行った。図 8 に示した PDA クロマトグラムで、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。また、ロドデノールを適用した培養上清中にラズベリーケトンが、ラズベリ

ーケトンを用いた培養上清中にロドデノールが、培地の場合よりも多く検出され、水酸化体の生成以外の代謝も起きていることが示唆された。

4. 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、0, 5, 10, 15, 20分後の反応液を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が生成した。また、ロドデノールの反応液にはピークA, BおよびEが、ラズベリーケトンの反応液にはピークCおよびDが検出された。

DHPBolとDHPBoneについても同様にチロシナーゼとともにインキュベートし、生成物を分析した。DHPBolからはピークA, BおよびEが、DHPBoneからはピークCおよびDが検出され(図10)、これらの未同定化合物はロドデノールおよびラズベリーケトンの反応液においてもそれぞれDHPBolとDHPBoneを経て生成していることが示された。

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いったん水酸化体に変換されてから毒性を示すと推測できる。ただし、チロシナーゼ活性を有するメラノサイトとメラニン合成を行わないHaCaT細胞の間でロドデノールやラズベリーケトンの細胞毒性に差がなかったことは、この推測と矛盾するように思われる。一方で水酸化体の毒性はHaCaT細胞よりもメラノサイトで強く表れたため、細胞毒性の本体は水酸化体がさらにチロシナーゼによる化学変化を受けた化合物であると推測することもできるが、さらなる検討が必要である。

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。メラニン生合成において、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。今後、生成物の構造決定もしくは推定を行う予定である。

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。

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)

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

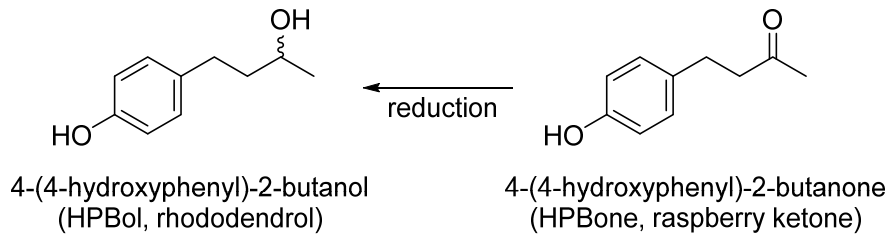


図1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

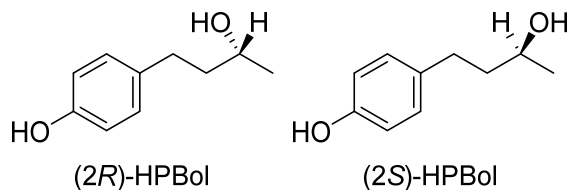


図2. ロドデノールの光学異性体.

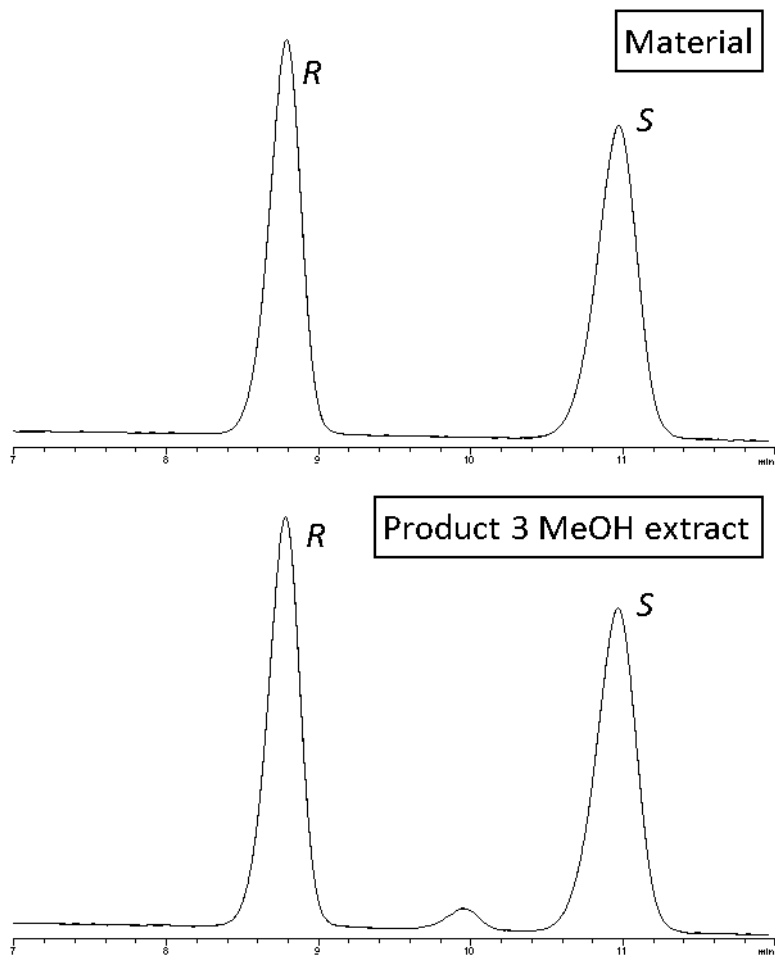


図3. 原料および製品に含まれるロドデノールのキラルカラムによる分析. 上段:原料. 下段:製品.

表 1. 原料および製品に含まれるロドデノール

試料	R 体	S 体
原料	49.8%	50.2%
製品 1	50.0%	50.0%
製品 2	50.0%	50.0%
製品 3	50.2%	49.8%
製品 4	50.0%	50.0%
製品 5	50.0%	50.0%

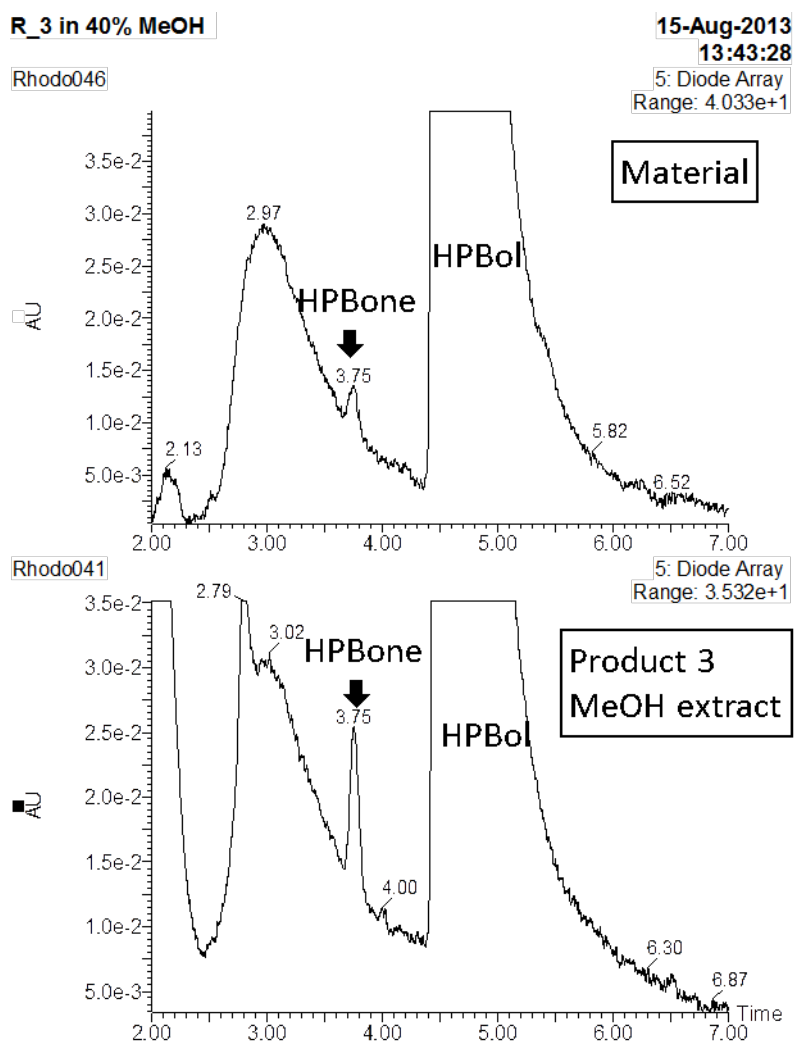


図 4. 原料および製品に含まれるロドデノールとラズベリーケトン.

表 2. 製品中ロドデノール含量とロドデノールに対するラズベリーケトンの重量比.

試料	製品中 HPBol 含量	HPBone 中 HPBone 含量
原料	-	0.008%
製品 1	1.9%	0.018%
製品 2	2.1%	0.011%
製品 3	2.2%	0.027%
製品 4	2.1%	0.027%
製品 5	1.9%	0.031%

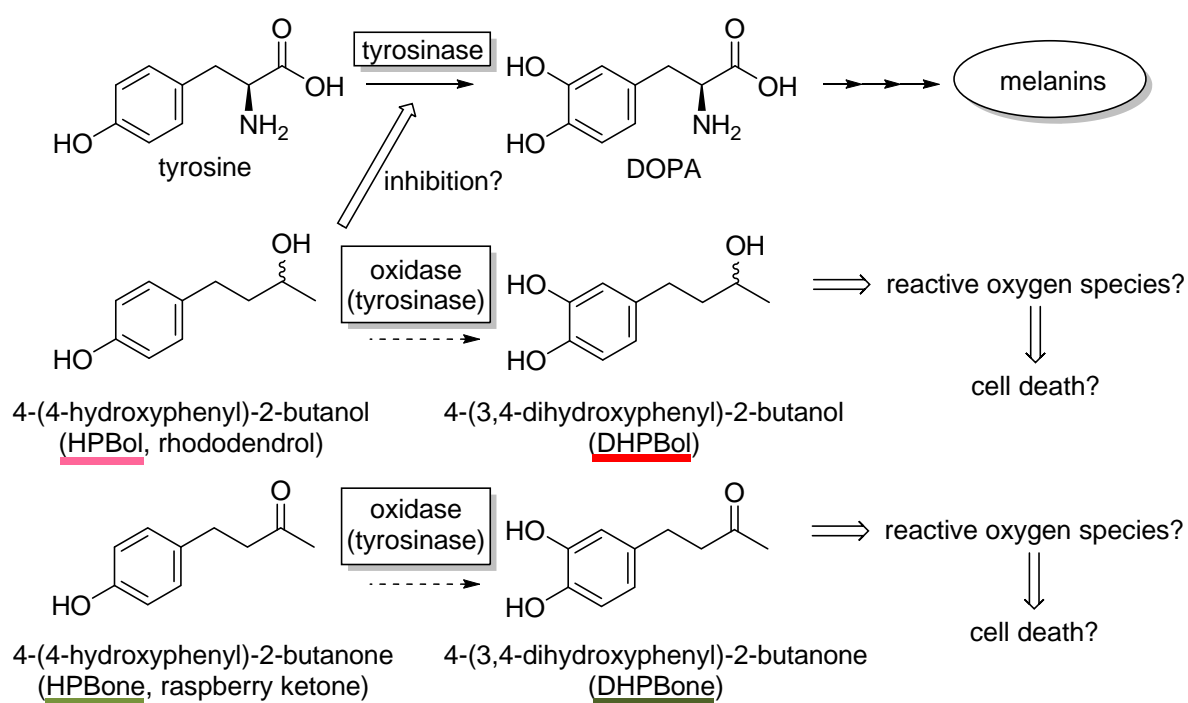


図 5. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

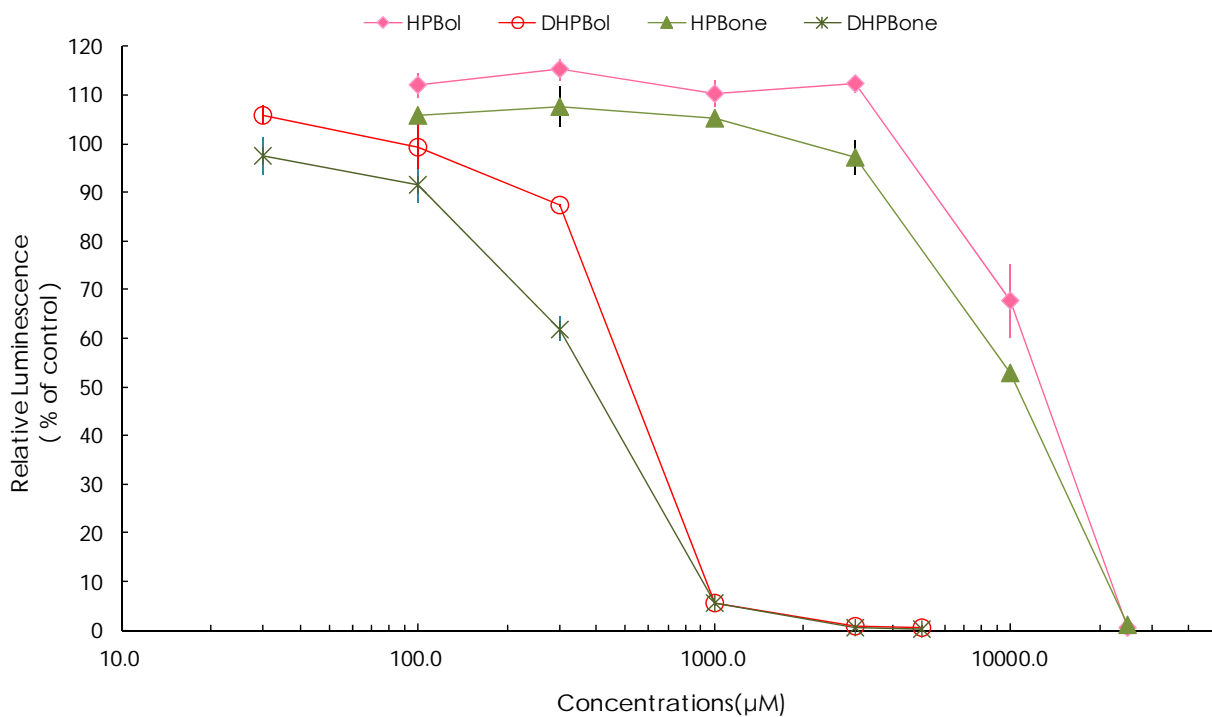


図 6. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した HaCaT 細胞の生存率.

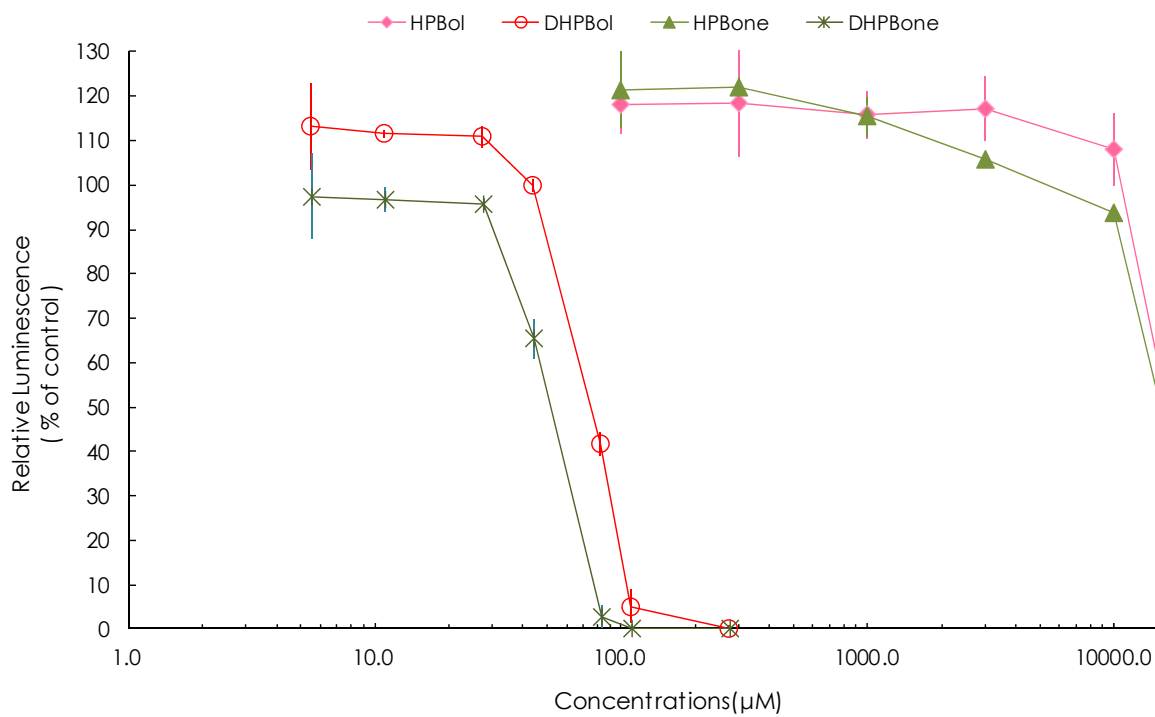


図 7. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用したメラノサイトの生存率.

Cell+OL 131128

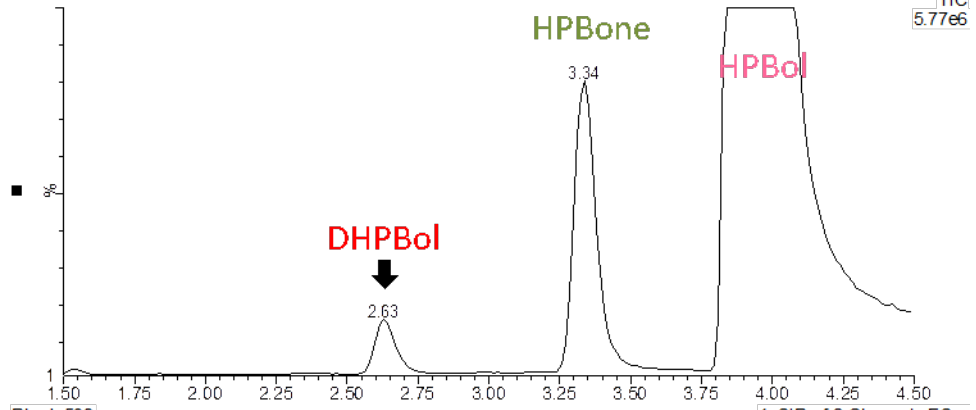
28-Nov-2013

16:32:02

Rhodo508

1: SIR of 2 Channels ES+

TIC
5.77e6



Rhodo509

1: SIR of 2 Channels ES+

TIC
1.15e7

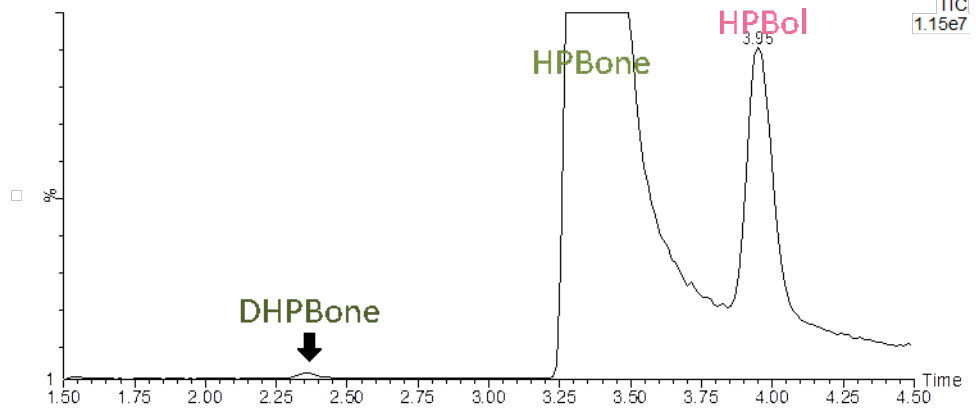


図 8. ロドデノールおよびラズベリーゲトンを適用したメラノサイトの培養上清中の化学変化体.

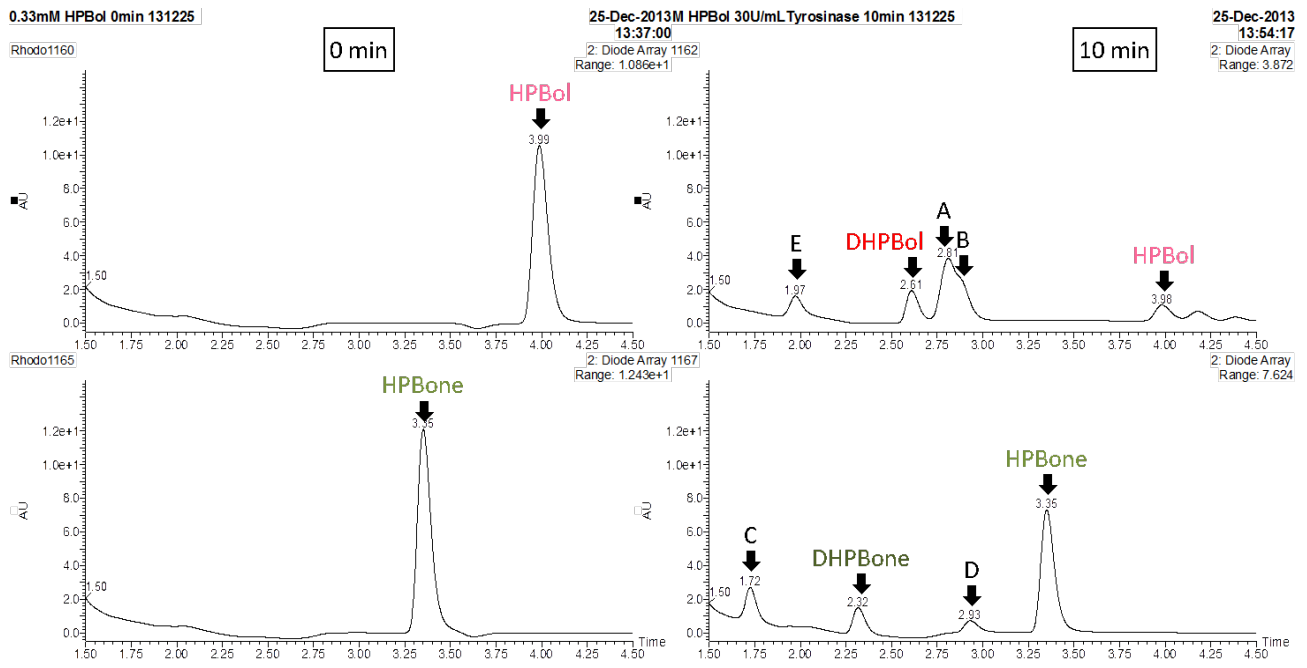


図 9. ロドノールおよびラズベリーケトンのマッシュルームチロシナーゼとの反応産物.

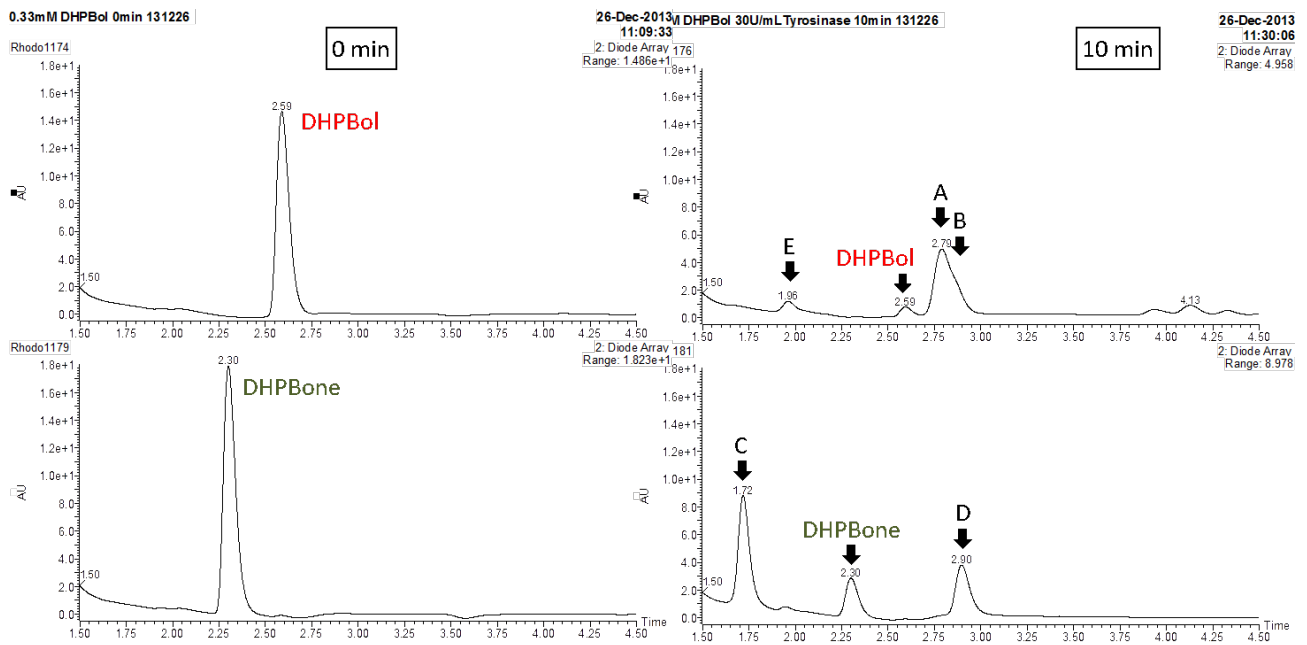


図 10. DHPBol および DHPBone のマッシュルームチロシナーゼとの反応産物.

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（平成 25 年度）

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
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。本研究では、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、製造販売後安全対策における今後の対処方針について検討を行い、新有効成分含有医薬部外品の安全性評価に係る臨床試験の拡充、製造販売後調査手法の工夫、副作用報告制度及び GVP の強化、製品の使用上の注意の改訂による適正使用に係る情報提供などは、医薬部外品の副作用による健康被害拡大の再発防止に有益な方策であるとの結論を得た。

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、昨年 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、本年 3 月末までに、1 万 8 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）、製造販売後調査の方法、副作用報告制度、製造販売後の安全管理の基準、適正使用に関する注意喚起の方法等を調査し、今後の医薬部外品の安全性等に関する情報収集及び解析の手法、企業から国への副作用報告制度及び使用上の注意表示のあり方について検討した。

C．研究結果及びD．考察

ロドデノールによる白斑の発症原因の究明に向けた分担研究は現在進行中であることから、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．非臨床試験

新有効成分含有薬用化粧品の承認申請時に求めている非臨床試験と、実際にロドデノール配合薬用化粧品の申請パッケージに含まれていた非臨床試験及びその内容について調査した。現在、承認申請時に求めている非臨床試験項目に追加の試験を要求しても、ロドデノールによる白斑の発症を予

期できたかどうか結論は出ていない。非臨床試験項目の追加の必要性について引き続き議論することとした。

2．臨床試験

新有効成分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の実施を求めている。これに加え、ヒトにおける長期使用時の安全性を確認することを目的に、医療用医薬品の外用剤に準じた長期安全性試験を実施してはどうかとの意見があった。長期安全性試験は、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の意見があった。必要な症例数と試験期間については、引き続き検討することとした。

また、ロドデノール配合薬用化粧品をシリーズアイテムとして、すなわち化粧水、乳液、クリームと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アイテムを重ね塗りする可能性を考慮し、新規有効成分配合薬用化粧品の開発段階における臨床試験の用量設定も重要なポイントになるのではないかと意見があった。

3．製造販売後調査

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。

現状、医薬部外品の製造販売後調査は、必ずしも承認条件とされておらず、調査の実施方法も通知等で明確にされているわけ

ではないが、一般用医薬品の製造販売後調査の実施要領として示されている「新一般用医薬品の市販後調査の実施について（昭和63年12月26日付け薬安第154号厚生省薬務局安全課長通知）」に準じて、調査が実施されている。

当該通知では、販売店を対象にモニター店を設定し一定の例数を目標に使用者アンケートを実施して副作用の発現頻度を調査する特別調査と、販売店からのいわゆる自発報告により副作用の情報を収集する一般調査を実施することとされている。ロドデノール配合薬用化粧品については、承認後2年間で約1200例の製造販売後調査が実施されたが、調査の中で白斑の症例は確認できなかった。

研究班の議論の中では、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、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が出された。これらの意見を踏まえ、医薬部外品の製造販売後調査の実施方法についてガイドライン等を作成すべきとされた。

4. 副作用報告

今回のロドデノールによる白斑は、承認審査及び製造販売後調査の段階では把握されていなかった副作用であり、その後の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。

薬事法では、医薬品等の副作用の情報を迅速に把握し必要な安全対策を取ることにより、健康被害の拡大を防ぐことを目的として、医薬品等の製造販売業者に、自社製

品による副作用等の国への報告を義務付けている。

医薬品、医療機器等の場合、死亡、障害等入院相当以上の重篤な副作用症例の情報を把握した場合、個別に国に報告することが義務付けられているが、医薬部外品・化粧品の場合、学术论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。

平成23年には、加水分解コムギ末を含有する薬用石鹸の使用者で、アナフィラキシーを発現した事例が報告されたことを受け、医療関係者から医薬部外品又は化粧品による健康被害の情報を入手した場合には、報告書類を社内においてとりまとめ、研究報告として報告するよう通知されたが、法令上は、依然、個別症例の報告義務はないままであった。

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、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考えた。

5. 製造販売後の安全管理の基準（GVP）

今回のロドデノール配合薬用化粧品による副作用の把握が遅れ健康被害が拡大した一因として、製品の安全性に関する情報が、カネボウ化粧品の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。

「医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令（GVP省令）」において、こうした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

義務付けられており、製造販売業の許可要件とされているが、医薬部外品・化粧品の製造販売業者については、国への副作用報告の対象と整合を取る形で、「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、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する。

なお、本研究班の意見を踏まえ、平成 26 年 2 月 26 日付けで「薬事法施行規則及び医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令の一部を改正する省令(平成 26 年厚生労働省令第 13 号)」が公布され、同年 4 月 1 日から施行されることとなっている。現在、施行に向けて、厚生労働省において、具体的な報告の方法を定めた通知等を準備している。

6. 使用上の注意

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑の事例を受けて、厚生労働省は、平成 25 年 8 月 8 日付けで、すべての医薬部外品及び化粧品の製造販売業者に対し、自社製品によると疑われる白斑症例の情報がないか自主点検を行い、必要に応じて国に報告するよう通知した。その結果、平成 26 年 1 月 23 日までに、167 件の白斑の症例が報告され、因果関係の評価が終了した 83 件のうち、製品との因果関係が否定できないとされた症例は 19 例であった。化粧品のみを使用していた症例は 1 例、薬用化粧品(医薬部外品)を使用していた症例(複数の薬用化粧品又は化粧品を併用していた症例を含む)

は 18 例であった。本件は、平成 26 年 2 月 12 日に開催された薬事・食品衛生審議会医薬品等安全部会に報告され、因果関係が否定できないとされた症例は、特定の製品・成分に集中しているわけではなく、現時点で回収等の措置が必要な状況とは言えないとされたが、使用上の注意において、追加の注意喚起が必要かどうか本研究班で検討することとされた。これを受け、本研究班で化粧品等の使用上の注意の記載について検討した。

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。具体的には、皮膚に適用する化粧品及び薬用化粧品については、その容器又は外箱及び添付文書等に、原則として以下のとおり表示することとされている。

容器又は外箱に表示する注意事項

お肌に合わないときは、ご使用をおやめください。

添付文書等に表示する注意事項

1 化粧品がお肌に合わないとき、即ち次のような場合には、使用を中止してください。そのまま化粧品類の使用を続けますと、症状を悪化させることがありますので、皮膚科専門医等にご相談されることをおすすめします。

- (1) 使用中、赤み、はれ、かゆみ、刺激等の異常があらわれた場合
- (2) 使用したお肌に、直射日光があたっ

て上記のような異常が現れた場合
2 傷やはれもの、しっしん等、異常のある部位にはお使いにならないでください。

研究班は、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（白斑等）や黒ずみ」を追記すべきであると考え。また、気付かないうちに白斑が生じていた症例が見られることを踏まえ、肌に異常が生じていないかよく注意して使用するよう注意喚起する必要があると考える。対象製品の範囲については、製品との因果関係が否定できない白斑の症例が、特定の成分に偏らず様々な成分・製品の使用者に見られること、化粧品のみを使用していたケースでも因果関係が否定できない症例が認められることから、皮膚に適用する薬用化粧品及び化粧品を広く対象とすることが望ましいと考えるが、対象製品が広範囲にわたることから、製品の適用部位及び使用方法等を踏まえ、対象範囲を決定すべきである。

以上、研究班は、新有効成分含有医薬部外品の安全性評価に係る臨床試験の拡充、製造販売後調査手法の工夫（情報収集体制の充実、皮膚科専門医の関与等）、副作用報告制度及び GVP の強化、製品の使用上の注意の改訂による適正使用に係る情報提供などが、医薬部外品の副作用による健康被害拡大の再発防止に有益な方策ではないかと

考える。

医薬部外品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）」として取りまとめることも視野に入れ、来年度も引き続き検討する予定である。

E . 結論

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いて整理し、各段階における再発防止のための対策について検討した。来年度は、医薬部外品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、「安全性評価ガイドライン（仮称）」として取りまとめることも視野に入れ、さらに検討を進める。

F . 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G . 研究発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年