

厚生労働行政推進調査事業費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
政策研究事業

美白成分の安全性評価法の策定に関する
研究

平成30年度 総括研究報告書

(H29-医薬-指定-003)

研究代表者 最上 知子

平成31年3月

目 次

I. 総括研究報告

美白成分の安全性評価法の策定に関する研究

最上 知子 1

II. 分担研究報告

1. 臨床からの原因究明

石川 治 7

2. 臨床からの原因究明：機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析

荒瀬 規子 9

3. 臨床からの原因究明：ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミンD3の作用機序の解析

鈴木 民夫 11

4. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（I）

秋山 卓美 13

5. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築(II)

伊藤 祥輔 19

4. 安全性評価法(細胞系)の構築

最上 知子 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 24

美白成分の安全性評価法の策定に関する研究

研究代表者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症に関しては、症例の多くは改善したが、一部患者に使用中止後も難治性白斑が見いだされ、病態や発症機序には未だ不明の点が残されている。本研究では、患者由来組織やモデル動物を用いさらなる解明を進める。また白斑誘導性類似化合物に共通するチロシナーゼによる代謝活性化に注目して測定方法を検討し、美白成分の安全性評価法策定に貢献する。

患者および健常人検体の解析を行い、①皮膚の免疫組織学的検討では、肥満細胞の脱顆粒率は難治例病変部において有意に上昇することが判明した。②尋常性白斑患者で認められる抗甲状腺抗体や抗メラノサイト抗体が RD 白斑患者では有意に認めないことが判明し、異なる発症機構が示唆された。③RD 白斑部での色素再生を促進する活性型ビタミン D3 の分子機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、白斑誘導性 4-置換フェノール類の代謝活性化を、*in vitro* あるいは細胞で評価する方法を検討した。*In vitro* では①23 種の 4 置換フェノールのチロシナーゼ依存的な SH ペプチドとの結合を解析し、化学構造と反応性との関係を明らかにし、②4-置換フェノール構造を有するレスベラトロール(RES)チロシナーゼによる代謝、SH との反応性、代謝産物のプロオキシダント活性を明らかにした。③グルタチオン・システイン付加体産生のヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた評価手法を構築し、代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、付加体測定が有用であることを示した。

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
鈴木民夫	山形大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
荒瀬規子	大阪大学大学院医学系研究科助教
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	藤田医科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
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(RD)配合薬用化粧品による白斑発症問題に関しては、平成 25 年度より二期にわたる厚生労働科学研究において、再発防止策の検討と原因究明研究が行われた。班内外の研究により、RD 白斑病変部でのメラノサイト異常、リンパ球の異常、メラノサイトのオートファジーへの影響、RD のチロシナーゼによる代謝、代謝物の強い酸化促進作用など、病態形成の手がかりとなる知見が得られている。しかし一部患者では、塗布部以外にも白斑が波及する難治性白斑も報告され、未だ不明な点が多い。

本研究では、上記の厚生労働科学研究の結果を踏まえ、患者由来組織やモデルマウスを用いた病態解明を継続し、白斑発症や病態形成の機序、進行に関わる因子等を明らかにする。

また美白成分の安全性評価法の確立に向けた

検討を行う。RD および類似構造の白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼにより代謝活性化される。今年度は、*in vitro* および細胞を用いた評価方法を検討した。

B. 研究方法

1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

本研究では RD 誘発性脱色素斑における肥満細胞の役割を明らかにするために、RD 含有化粧品による白斑病変辺縁部皮膚と健康人の正常皮膚について、肥満細胞の局在、脱顆粒の有無について免疫組織学的に比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「世界医師会ヘルシンキ宣言(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を含めず、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]

RD 白斑患者、尋常性白斑患者、コントロール群の血清検体で抗甲状腺抗体、抗メラノサイト抗体の発現を比較した。

(倫理面への配慮)

RD 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 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. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析[鈴木]

日本人皮膚モデルマウスに RD を塗布して RD 白斑モデルマウス作成した。そして、その白斑に

VitD3 軟膏を塗布した。その後に VitD3 を塗布したマウス皮膚から RNA を採取し、マウス・マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

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. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、マッシュルームチロシナーゼ酸化により生成するオルトキノン、Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))と結合させ、HPLC で分析した。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

レスベラトロール(RES) 100 μ M を pH 6.8 あるいは 5.3 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは N-アセチルシステイン(NAC)を加えた。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に発現させ、24 時間後に薬物処理を開始し、細胞および培地を回収し、代謝産物を HPLC で解析した。細胞生存率および細胞内グルタチオン量を測定した。

C. 研究結果

1. 患者由来組織を用いた原因究明 [石川・安田]

RD による白斑を生じた症例のうち、改善 29 例、難治 15 例の白斑病変と正常皮膚 58 例に対し、抗トリプターゼ抗体で染色し、200 倍視野での真皮内肥満細胞数を計測、そのうち形態的に脱顆粒している肥満細胞数を計測した。その結果、総肥満細胞数は改善例病変部 7.74、難治例病変部 7.77 に対し、正常皮膚 8.59 と差はみられな

かった。しかし、脱顆粒率は改善例病変部 65.6%、正常部 61.0%に対し、難治例病変部で 73.4% (P=0.021)と、難治例病変部において有意に脱顆粒が増えていた。

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]

RD 誘発白斑と尋常性白斑は臨床的な類似性を有する。尋常性白斑患者で認められる自己抗体が RD 白斑患者血清中では有意に認められないことが判明した。

3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

RD 白斑に色素再生を促進する効果が確認された活性型ビタミン D3 について、その作用機序を解析した。VitD3 を塗布したモデルマウスの皮膚 RNA の発現遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、いくつかの遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。我々はその中である遺伝子(遺伝子 A)に着目した。培養色素細胞を使った実験では、確かに VitD3 添加条件下で、遺伝子 A の発現が亢進していることを確認した。さらに、その遺伝子をノックダウンするとメラニン合成が亢進しなくなることが明らかとなった。

4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼにより代謝活性化を受ける。4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、*in vitro* でチロシナーゼ酸化し DPRA(Cys)ペプチドと反応させ、検液を HPLC で分析し、DPRA(Cys)単独で分析した結果と比較した。基質の保持時間は基質溶液を単独で分析することにより求めた。

その結果、4-methylphenol (*p*-cresol)、

4-ethylphenol、4-propylphenol、4-butylphenol、4-amyphenol、4-hexylphenol、4-heptylphenol、4-benzylphenol、rhododendrol、raspberry ketone、4-propoxyphenol、4-butoxyphenol、4-amyloxyphenol、4-hexyloxyphenol、および 4-benzyloxyphenol (monobenzone) では DPRA(Cys)及び基質のピークが減少または消失し、結合ペプチドと考えられるピークが生成した。一方、4-isopropylphenol、4-*sec*-butylphenol、4-cyclohexylphenol、4-*tert*-amyphenol、4-phenylphenol、4-methylthiophenol、4-methoxyphenol、及び 4-ethoxyphenol では DPRA(Cys)及び基質のピークの減少が見られなかった。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

レスベラトロール(RES)は RD と同様に 4-置換フェノール構造を有する。*In vitro* で代謝を調べたところ、RES はチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物は pH 6.8 では極めて不安定であるが、pH 5.3 においては 485 nm に吸収極大をもつオルトキノン体の生成が確認された。オルトキノン体は反応性が高く、NAC と二付加体および三付加体を生成した。システイン、グルタチオン(GSH)も二付加体を生成した。また RES キノンは、牛血清アルブミン(BSA)および SH 基を保護した NEM-BSA に付加体を形成した。BSA ではチオール基が NEM-BSA ではアミノ基が反応に寄与したものと推測される。

RES のチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。RES オリゴマーは、GSH を 60 分で 50%減少し、GSSG に酸化させた。RD オリゴマーは GSH を 90%減少させた。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通するチロシナーゼによる代謝活性化を、細胞で

の代謝物解析により評価する方法を検討した。ヒトチロシナーゼを一過性に発現した 283T 細胞を用いると、RD および 4SCAP どちらの場合にも 2 時間曝露により、グルタチオン・システイン付加体の濃度依存的な産生と培地への放出が観察された。

一方、チロシナーゼ発現により、内因性のチロシンも効率良くドーパキノンに転換され、タンパク・非タンパク性 SH 付加体・メラニンが大量に産生されることが判明した。48 時間後にはグルタチオン・細胞生存率が低下していた。4SCAP では 2 時間で細胞生存率低下が認められるのに対し、RD は内因性チロシン由来代謝物の産生を抑制しており、細胞生存率低下・グルタチオン低下を抑制することが判明した。

D. 考察

1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

RD 誘発性脱色素斑難治例において、肥満細胞の脱顆粒が増えていることを明らかにした。肥満細胞から脱顆粒により分泌されるヒスタミンは通常メラノサイトにおけるメラニン合成を促進することが報告されている。脱顆粒率の高さが RD 誘発性脱色素斑の難治化における原因なのか、結果なのかはさらなる検討が必要である。

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]

RD 誘発白斑患者では尋常性白斑患者に認められる自己免疫性甲状腺炎などの背景因子は薄いことが考えられた。また白斑発症に自己抗体が関与する可能性が尋常性白斑より低い可能性が考えられた。

3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

VitD3 が RD 白斑部における色素再生を更新させることを明らかにし、さらにその分子機序を解析

した。その結果、VitD3 によって誘導される遺伝子 A は、メラニン合成を更新しているキー遺伝子の 1 つであることが示唆された。今後はさらにその詳細な機序を明らかにしていく。

4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

チロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化は RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する応答である。23 種の 4 置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか *in vitro* での検討を行った。水酸基のパラ位に結合する炭素が 1 級または 2 級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が 3 級、4 級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが 1 又は 2 の化合物は酸化が起きず、3 以上の化合物は結合ペプチドを生成した。以上の結果から、置換基全体の大きさとベンゼン環に結合した原子に属する電子の状態がチロシナーゼの活性部位と複雑に相互作用していることが示唆された。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II) [伊藤]

RES は 4-置換フェノール構造を有しており、チロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを生じた。オルトキノ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、付加体を形成した。RES がメラニン産生細胞に対して細胞障害性をもつか否かは明確には示されていないが、我々の先行研究(Okura ら、J Dermatol Sci, 2015)では、B16メラノーマ細胞およびヒトメラノサイトに対して IC50 値が 30 μ M 程度の強い増殖抑制を示している。また、RES オリゴマーは RD オリゴマーほどではないが、プロオキシダント活性をも

つことも興味深い。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

チロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化を、ヒトチロシナーゼを高発現させた 293T 細胞で評価する方法を検討した。オルトキノン、システイン・グルタチオン付加体の検出は、RD や 4SCAP の 2 時間曝露により可能であった。

オルトキノン体は細胞内 SH プールの枯渇、自身や代謝物の ROS 産生による毒性発現が予想されてきた。実際、4SCAP や内因性チロシンのオルトキノン体生成はグルタチオン・細胞生存率を低下させた。しかしながら、RD は自身の SH 付加体を産生する一方で、内因性チロシン代謝を阻害し、グルタチオン・細胞生存率低下をむしろ抑制した。したがって、RD がチロシナーゼに依存した毒性を発現しない原因が明らかになり、毒性評価ではなく、付加体測定の有用性が示された。最近、各種フェノール類の白斑誘導能は細胞毒性ではなく、SH 枯渇能および免疫原性と関連することが報告されている。

細胞を用いた代謝解析法では、in vitro で評価可能な化合物のチロシナーゼへの親和性に加え、内因性基質(チロシン)との競合、化合物の細胞への取り込み速度の差を示唆する結果が得られた。今後、多様な 4-置換フェノール類につき白斑誘導能との相関を検討予定である。

E. 結論

RD 白斑において、RD 誘発性脱色素斑の難治化に、肥満細胞の脱顆粒が関わる可能性が示された。RD 誘発白斑では患者の自己免疫的背景は尋常性白斑より少なく、白斑発症にも自己免疫の関与がやや薄い可能性が示された。また活性型ビタミン D3 による白斑部色素再生機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、in vitro で各種 4 置換フェノール類の側鎖構造とチロシナーゼによる代謝活性化との関係を解析すると

ともに、同じく 4-置換フェノール構造を有するレスベラトロール(RES)の代謝活性化と酸化促進作用を明らかにした。またヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた SH 付加体産生評価手法を構築し、代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、付加体産生の評価が有用であることを示した。さらなる解析を進め、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

Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I. Novel autoantibody against the β 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers. *Br J Dermatol.* 178:272-275, 2018

Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H. Fc γ RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules. *Int Immunol.* 2019, in press

Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H. Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019, 511(4):862-868, 2019

Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oiso N, Matsunaga K, Suzuki T, Nishigori C, Kawamura T, Shimizu T, Ito A, Fukai K, Abe Y, Yang L, Tsuruta D, Takeoka K, Iwatani Y, Hidaka Y, Nishida M, Yamauchi-Takahara K, Arase H, Fujimoto M, Katayama I. Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma. Submitted.

Masaki T, Nakano E, Okamura K, Ono R, Sugawara K, Lee MH, Suzuki T, Nishigori C.: A case of xeroderma pigmentosum complementation group C with diverse clinical features. *Br J Dermatol.* 2018 Jan 12. (2018)

Okamura K, Hayashi M, Nakajima O, Kono M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T.: A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(1):79-84. (2018)

Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.: Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(2):315-319. (2018)

Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O: Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study. *J Cutan Pathol.* 46(2):123-129. (2019)

Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31, 523-528, 2018. Doi: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int J Mol Sci.* 19, E552, 2018. Doi: 10.3390/ijms19020532.

Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp Dermatol.* 27, 754-762, 2018. Doi: 10.1111/exd.13555.

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.*, in revision.

2. 学会発表

荒瀬規子 金田眞理 室田浩之 中川幸延 山岡俊文 平安恒幸 荒瀬 尚
片山一朗:大阪大学皮膚科における皮膚肥満細

胞増多症16症例の解析. 第117回日本皮膚科学会総会 広島 (2018.5.31-6.3)

前川亜耶 荒瀬規子 清原英司 玉井克人 片山一朗 金田眞理:壮年期に肺機能障害を伴い皮疹が悪化した表皮融解性魚鱗癬に関する考察. 旭川 (2018.10.6-2018.10.7)

Hideki Tsuji, Koichiro Ohmura, Shuhei Sakakibara, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hitoshi Kikutani, Tsuneyo Mimori, Hisashi Arase. Recognition of DNA/HLA-class II complex by anti-DNA antibodies from SLE patients. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Hui Hin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase. TSHR-stimulating autoantibody production by TSHR/MHC class II complexes. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Multiple MC1R variants associated with extensive freckles and red hair found in a Mongolian family. Tamio Suzuki, et al. : International Investigative Dermatoplogy 2018, Rosen Shingle Creek Resort, Orlando, Florida, May 16-19, 2018

Hereditary hypopigmentary disorders: a better understanding from a genetic view. Tamio Suzuki: 5th Eastern Asia Dermatology Congress, Dianchi International Convention & Exhibition Center, Kunming, China. June 20-23, 2018

Chemical vitiligo: instructive evidence that we have learned from Rhododendrol-induced leukoderma. Tamio Suzuki: The 70th KDA Annual Autumn Meeting Seoul COEX Intercontinental Hotel, Seoul. Korea, October 20-21, 2018

鈴木民夫:第117回日本皮膚科学会総会学術大会 EL2:白斑の up to date「日本白斑学会設立の経緯と目指すところ」、リーガロイヤルホテル広島、広島市、2018年5月31日

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

臨床からの原因究明

研究分担者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究協力者 安田正人 群馬大学医学部附属病院皮膚科 講師

研究要旨:

ロドデノール(RD)誘発性脱色素斑は RD 含有化粧品の使用により、主にその使用部位に生じる脱色素斑である。多数例は化粧品の使用中止により色素再生を示すが、中止後も脱色素斑が拡大する症例、使用部位以外に脱色素斑が新生する症例もみられる。これまでに私たちは、改善例と難治例の病態の違いとして、グルタチオン合成酵素(GCLC)が少なくグルタチオンが十分に供給されないこと、E カドヘリンの増加によりメラノサイトの遊走性が低下することが難治化の一因であることを明らかにした。今回、RD 誘発性脱色素斑における肥満細胞を免疫組織化学により解析し、肥満細胞の RD 誘発性脱色素斑の病態への関与を検討した。RD 誘発性脱色素斑において総肥満細胞数は正常皮膚と差はみられなかったものの、脱顆粒率は難治例病変部において有意に上昇していた。肥満細胞の脱顆粒が RD 誘発性脱色素斑の難治化にどのような役割を担っているのかについてはさらなる検討が必要である。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)誘発性脱色素斑の病態は徐々に明らかになってきているが、RD 含有化粧品を使用しても全例に白斑を生じるわけではないこと、通常中止後は改善する白斑が中止後も拡大する症例や新たに白斑を生じる難治例があることなど、未だ不明な点も多い。本研究では、これまでに患者から採取された病変部検体、ならびに難治性白斑を呈した患者の検体、および対照として正常人検体を免疫組織学的に解析することで、白斑症状の進行の個体差や病態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では RD 誘発性脱色素斑における肥満細胞の役割を明らかにするために、RD 含有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、肥満細胞の局在、脱顆粒

の有無について免疫組織学的に比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「世界医師会ヘルシンキ宣言(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を含めず、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。

C. 研究結果

RDによる白斑を生じた症例のうち、改善29例、難治15例の白斑病変と正常皮膚58例に対し、抗トリプターゼ抗体で染色し、200倍視野での真皮内肥満細胞数を計測、そのうち形態的に脱顆粒している肥満細胞数を計測した。その結果、

総肥満細胞数は改善例病変部 7.74、難治例病変部 7.77 に対し、正常皮膚 8.59 と差はみられなかった。しかし、脱顆粒率は改善例病変部 65.6%、正常部 61.0% に対し、難治例病変部で 73.4% ($P=0.021$) と、難治例病変部において有意に脱顆粒が増えていた。

D. 考察

RD 誘発性脱色素斑難治例において、肥満細胞の脱顆粒が増えていることを明らかにした。肥満細胞から脱顆粒により分泌されるヒスタミンは通常メラノサイトにおけるメラニン合成を促進することが報告されている。脱顆粒率の高さが RD 誘発性脱色素斑の難治化における原因なのか、結果なのかはさらなる検討が必要である。

E. 結論

RD 誘発性脱色素斑の難治化に、肥満細胞の

脱顆粒が関与している。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

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

臨床からの原因究明:

機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析

研究分担者 荒瀬 規子 大阪大学 助教

研究要旨:

ロドデノール誘発白斑と尋常性白斑は臨床的な類似性を有する。尋常性白斑はメラノサイト特異的 T 細胞と共に自己抗体の存在も知られる。今回両疾患で種々の自己抗体を解析した。尋常性白斑患者で認められる抗甲状腺抗体や抗メラノサイト抗体がロドデノール白斑患者では有意に認めないことが判明し異なる発症機構が示唆された。

A. 研究目的

本研究ではロドデノール含有化粧品が白斑を使用者の一部にのみ発症した個体差を分子的に解析し発症原因を明らかにする事で化粧品成分の安全性評価法を一般化する事を目的とする。

B. 研究方法

ロドデノール白斑患者、尋常性白斑患者、コントロール群の血清検体で抗甲状腺抗体、抗メラノサイト抗体の発現を比較した。

(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 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。

C. 研究結果

尋常性白斑患者で認められる自己抗体がロドデノール白斑患者血清中では有意に認められないことが判明した。

D. 考察

ロドデノール誘発白斑患者では尋常性白斑患者に認められる自己免疫性甲状腺炎などの背景因子は薄事が考えられた。また白斑発症に自己抗体が関与する可能性が尋常性白斑より低い可能性が考えられた。

E. 結論

ロドデノール誘発白斑では患者の自己免疫的背景は尋常性白斑より少なく、白斑発症にも自己免疫の関与がやや薄い可能性が示された。今までの知見を有機的に結びつける事により真の病因を明らかにできると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (本研究課題関連のみ記載)

1. 論文発表

Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I. Novel autoantibody against the β 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ul-

cers. *Br J Dermatol.* 178:272-275, 2018

Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H. FcγRIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules. *Int Immunol.* 2019, in press

Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H. Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019, 511(4):862-868, 2019

Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oiso N, Matsunaga K, Suzuki T, Nishigori C, Kawamura T, Shimizu T, Ito A, Fukai K, Abe Y, Yang L, Tsuruta D, Takeoka K, Iwatani Y, Hidaka Y, Nishida M, Yamauchi-Takahara K, Arase H, Fujimoto M, Katayama I. Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma. Submitted.

2. 学会発表

荒瀬規子 金田眞理 室田浩之 中川幸延 山岡俊文 平安恒幸 荒瀬 尚
片山一朗:大阪大学皮膚科における皮膚肥満細胞増多症16症例の解析. 第117回日本皮膚科学会総会 広島 (2018.5.31-6.3)

前川亜耶 荒瀬規子 清原英司 玉井克人 片山一朗 金田眞理:壮年期に肺機能障害を伴い皮疹が悪化した表皮融解性魚鱗癬に関する考察. 旭川 (2018.10.6-2018.10.7)

Hideki Tsuji, Koichiro Ohmura, Shuhei Sakakibara, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hitoshi Kikutani, Tsuneyo Mimori, Hisashi Arase. Recognition of DNA/HLA-class II complex by anti-DNA antibodies from SLE patients. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Hui Hin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase. TSHR-stimulating autoantibody production by TSHR/MHC class II complexes. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

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

臨床からの原因究明

ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析

研究分担者 鈴木民夫 山形大学医学部皮膚科学講座 教授

研究要旨:

ロドデノール白斑に色素再生を促進する効果が確認された活性型ビタミン D3 について、その作用機序を解析した。VitD3 を塗布したモデルマウスの皮膚 RNA を採取し、マウス・マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的に解析したところ、遺伝子 A の発現が亢進していることが明らかとなり、培養細胞でも同様の結果が確認された。

A. 研究目的

我々はロドデノール白斑モデルマウスを確立し、それを用いてロドデノール白斑部に対して有効な治療法を探索してきた。その結果、活性型ビタミン D3 (VitD3) 軟膏が色素再生を促進することを見出してきた。そこで、VitD3 による色素再生促進機序を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布してロドデノール白斑モデルマウス作成した。そして、その白斑に VitD3 軟膏を塗布した。その後 VitD3 を塗布したマウス皮膚から RNA を採取し、マウス・マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的

に解析した結果、いくつかの遺伝子の発現が更新していることが明らかになったが、我々はその中である遺伝子(遺伝子 A)に着目した。培養色素細胞を使った実験では、確かに VitD3 添加条件下で、遺伝子 A の発現が亢進していることを確認した。さらに、その遺伝子をノックダウンするとメラニン合成が亢進しなくなることが明らかとなった。

D. 考察

VitD3 がロドデノール白斑部における色素再生を更新させることを明らかにし、さらにその分子機序を解析した。その結果、VitD3 によって誘導される遺伝子 A は、メラニン合成を亢進しているキー遺伝子の 1 つであることが示唆された。今後はさらにその詳細な機序を明らかにしていく。

E. 結論

VitD3 外用による色素再生促進効果についての機序を明らかにした。ロドデノール白斑患者への治療として有効性が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成 30 年度)

1. 論文発表

Masaki T, Nakano E, Okamura K, Ono R, Sugasawa K, Lee MH, Suzuki T, Nishigori C.: A case of xeroderma pigmentosum complementation group C with diverse clinical features. *Br J Dermatol*. 2018 Jan 12. (2018)

Okamura K, Hayashi M, Nakajima O, Kono M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T.: A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 32(1):79-84. (2018)

Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.: Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion. *Pigment Cell Melanoma Res*. 32(2):315-319. (2018)

Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O: Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study. *J Cutan Pathol*. 46(2):123-129. (2019)

2. 学会発表

Multiple MC1R variants associated with extensive freckles and red hair found in a Mongolian family. Tamio Suzuki, et al. : International Investigative Dermatology 2018, Rosen Shingle Creek Resort, Orlando, Florida, May 16-19, 2018

Hereditary hypopigmentary disorders: a better understanding from a genetic view. Tamio Suzuki: 5th Eastern Asia Dermatology Congress, Dianchi International Convention & Exhibition Center, Kunming, China. June 20-23, 2018

Chemical vitiligo: instructive evidence that we have learned from Rhododendrol-induced leukoderma. Tamio Suzuki: The 70th KDA Annual Autumn Meeting Seoul COEX Intercontinental Hotel, Seoul, Korea, October 20-21, 2018

鈴木民夫: 第 117 回日本皮膚科学会総会学術大会 EL2: 白斑の up to date「日本白斑学会設立の経緯と目指すところ」、リーガロイヤルホテル広島、広島市、2018 年 5 月 31 日

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

安全性評価法(代謝物分析系)の構築(I)

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

研究要旨:

メラノサイト中のチロシナーゼを阻害することによるメラニン生成抑制を唱って薬用化粧品に配合された rhododendrol (RD) により化粧品の使用者の皮膚に白斑が生じる事例が多数発生した。RD をはじめとする白斑誘導性 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼにより酸化されて *o*-キノンを生じることが報告されている。チロシナーゼによる酸化をペプチドへの結合を利用して検出する試験法の開発を目的として基質特異性を検討した。

23 種の 4 置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか検討した。水酸基のパラ位に結合する炭素が 1 級または 2 級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が 3 級、4 級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが 1 又は 2 の化合物は酸化が起きず、3 以上の化合物は結合ペプチドを生成した。

A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売した rhododendrol (ロドデノール, RD, 図 1) を配合した薬用化粧品は、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「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。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。

RD は、メラノサイトにおいて tyrosine の酸化を触媒するチロシナーゼを競合的に阻害してメラニン生合成を抑制するとされているが、tyrosine と同様の 4-置換フェノールの構造を持つ RD 自身もチロシナーゼによる酸化的代謝を受けることを、平

成 25 年から開始した厚生労働科学研究費補助金「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」の分担研究「原因究明に関する調査研究」で明らかにした。RD はマッシュルーム由来チロシナーゼに酸化されて *o*-キノンになり、さらに還元反応により生じた 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) カテコールなど複数の化合物として検出された。

白斑誘導が知られる 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼで酸化され、白斑発症との関連が強く示唆される。薬用化粧品の安全性確保のため、試験方法の開発が望まれることから、厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」の分担研究「安全性評価法の構築(I)」において、チロシナーゼによる酸化を検出する試験

法の検討を行った。Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))をリン酸緩衝液(pH6.5)中でマッシュルーム由来チロシナーゼおよび rhododendrol と混合して反応させたところ、カテコールが結合したペプチドが生成した。白斑を誘導した4置換フェノール raspberry ketone, hydroquinone monobenzyl ether 及び 4-*tert*-butylphenol も同様であった。不安定な *o*-キノンがシステインペプチドと結合して安定化したと考えられた。

本研究では、さらに多くの4置換フェノールを基質として用い、基質特異性の検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

4置換フェノールとして 4-methylphenol (MePI, *p*-cresol), 4-ethylphenol (EtPI), 4-propylphenol (PrPI), 4-butylphenol (BuPI), 4-amyphenol (AmPI), 4-hexylphenol (HxPI), 4-heptylphenol (HpPI), 4-benzylphenol (BzPI), rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-isopropylphenol (iPrPI), 4-*sec*-butylphenol (sBuPI), 4-cyclohexylphenol (cHxPI), 4-*tert*-amyphenol (tAmPI), 4-phenylphenol (PhPI), 4-methylthiophenol (MeSPI), 4-methoxyphenol (MOPI), 4-ethoxyphenol (EtOPI), 4-propoxyphenol (PrOPI), 4-butoxyphenol (BuOPI), 4-*tert*-butoxyphenol (tBuOPI), 4-amyloxyphenol (AmOPI), 4-hexyloxyphenol (HxOPI), 4-benzyloxyphenol (BzOPI, monobenzene)を用いた(Fig. 1)。RD はカネボウより提供いただいた。その他の4置換フェノールは和光純薬工業、東京化成工業又はシグマアルドリッチから購入した。マッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入し、システインペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) はスクラムより購入した。

2. 反応条件

60 μ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5)に 97 μ L の超純水を加え、9.0 μ L の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、13.5 μ L の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)を加えて混合した。0.5 μ L の 1.0×10^4 units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5)を加えて 25°Cで 30 分間インキュベートした。120 μ L の 0.5%酢酸を加えて混合し、検液とした。

3. HPLC

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. \times 50 mm; particle size, 1.7 μ m; Waters);カラム温度, 40°C;移動相 A, 0.1% TFA in water;移動相 B, 0.08% TFA in acetonitrile;流量, 0.35 mL/min. グラジエント 1: 0–2 min, 10%B; 2–20 min, 10–37%B; 20–21 min, 37–90%B; 21–23 min, 90%B; 23–23.5 min, 90–10%B; 23.5–28 min, 10%B. グラジエント 2: 0–2 min, 10%B; 2–32 min, 10–55%B; 32–33 min, 55–90%B; 33–35 min, 90%B; 35–35.5 min, 90–10%B; 35.5–40 min, 10%B.

保持時間の小さい基質にはグラジエント1を、保持時間の大きい基質にはグラジエント2を用いた。

C. 研究結果

検液をHPLCで分析し、DPRA(Cys)単独で分析した結果と比較した(Fig. 2, 3)。基質の保持時間は基質溶液を単独で分析することにより求めた。

その結果、MePI, EtPI, PrPI, BuPI, AmPI, HxPI, HpPI, BzPI, RD, RK, PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI 及び BzOPI では DPRA(Cys)及び基質のピークが減少または消失し、結合ペプチドと考えられるピークが生成した。一方、iPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI, PhPI, MeSPI, MeOPI 及び EtOPI では DPRA(Cys)及び基質のピークの減少が見られなかった。

D. 考察

Rhododendrol (RD) がメラノサイト内でチロシナ

ーゼにより酸化を受けた代謝物に変換されることが白斑発症と関連していることが強く示唆される。それに続く発症メカニズムは明らかになっていないが、チロシナーゼにより酸化を受けることを検出可能な試験方法の開発が望まれる。そこで「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」の分担研究「安全性評価法の構築(I)」において検討したチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合させる方法について基質特異性の検討を行った。

23種の4置換フェノールを基質として反応を行い、HPLCで検液を分析した。すると、15種の4置換フェノールでは、反応液中のDPRA(Cys)が減少して結合ペプチドと考えられるピークが出現した。これらのうちMePI, EtPI, PrPI, BuPI, AmPI, HxPI, HpPI, BzPI, RD及びRKは、フェノールの水酸基のパラ位に結合するのが1級又は2級の炭素である。また、PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI及びBzOPIはフェノールの水酸基のパラ位に結合するのが酸素でエーテル結合を形成しており、かつ酸素に結合するのが炭素3個以上からなる直鎖の炭素鎖である。

一方、8種の4置換フェノールでは反応液中のDPRA(Cys)が減少しなかった。基質のピークも明確に観察されていることから、チロシナーゼによる酸化反応が進行していないと考えられる。これらのうちiPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI及びPhPIは水酸基のパラ位に結合する炭素が3級又は4級である。また、MeSPI, MeOPI及びEtOPIは、水酸基のパラ位に結合するのがイオウまたは酸素で、かつこれらに結合するのがメチル基またはエチル基

である。

以上の結果から、置換基全体の大きさとベンゼン環に結合した原子に属する電子の状態がチロシナーゼの活性部位と複雑に相互作用していることが示唆された。

E. 結論

23種の4置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか検討した。水酸基のパラ位に結合する炭素が1級または2級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が3級、4級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが1又は2の化合物は酸化が起きず、3以上の化合物は結合ペプチドを生成した。

F. 健康危険情報

なし

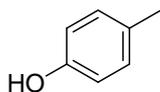
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

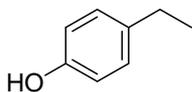
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

Phenol substituted with a primary carbon at position 4

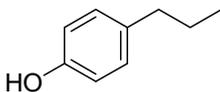


4-methylphenol (MePI, *p*-cresol)

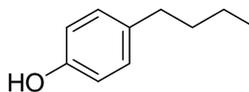
Phenols substituted with a secondary carbon at position 4



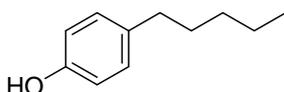
4-ethylphenol (EtPI)



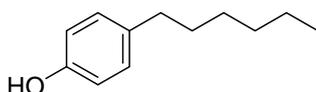
4-propylphenol (PrPI)



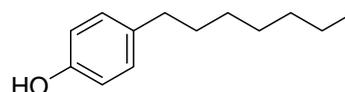
4-butylphenol (BuPI)



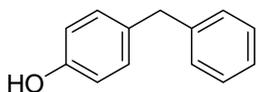
4-amylphenol (AmPI)



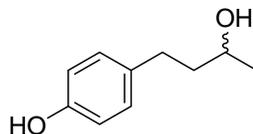
4-hexylphenol (HxPI)



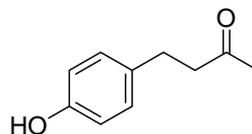
4-heptylphenol (HpPI)



4-benzylphenol (BzPI)

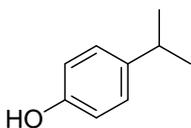


rhododendrol (RD)

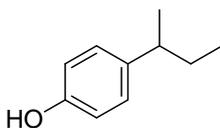


raspberry ketone (RK)

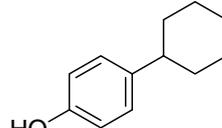
Phenols substituted with a tertiary carbon at position 4



4-isopropylphenol (iPrPI)

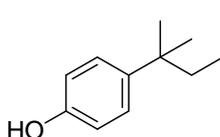


4-sec-butylphenol (sBuPI)

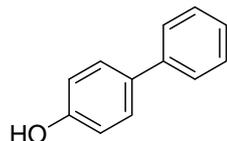


4-cyclohexylphenol (cHxPI)

Phenols substituted with a quaternary carbon at position 4

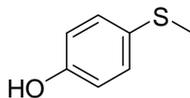


4-*tert*-amylphenol (tAmPI)

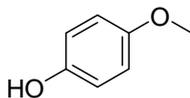


4-phenylphenol (PhPI)

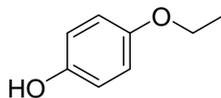
Phenols substituted with an ether group at position 4



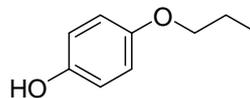
4-methylthiophenol (MeSPI)



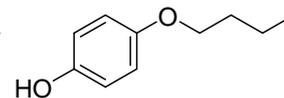
4-methoxyphenol (MeOPI)



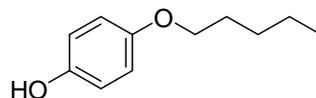
4-ethoxyphenol (EtOPI)



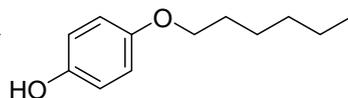
4-propoxyphenol (PrOPI)



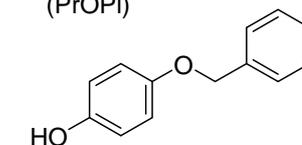
4-butoxyphenol (BuOPI)



4-amylloxyphenol (AmOPI)



4-hexyloxyphenol (HxOPI)



monobenzyl ether of hydroquinone (BzOPI, monobenzene)

Fig. 1. Structures of 4-substituted phenols.

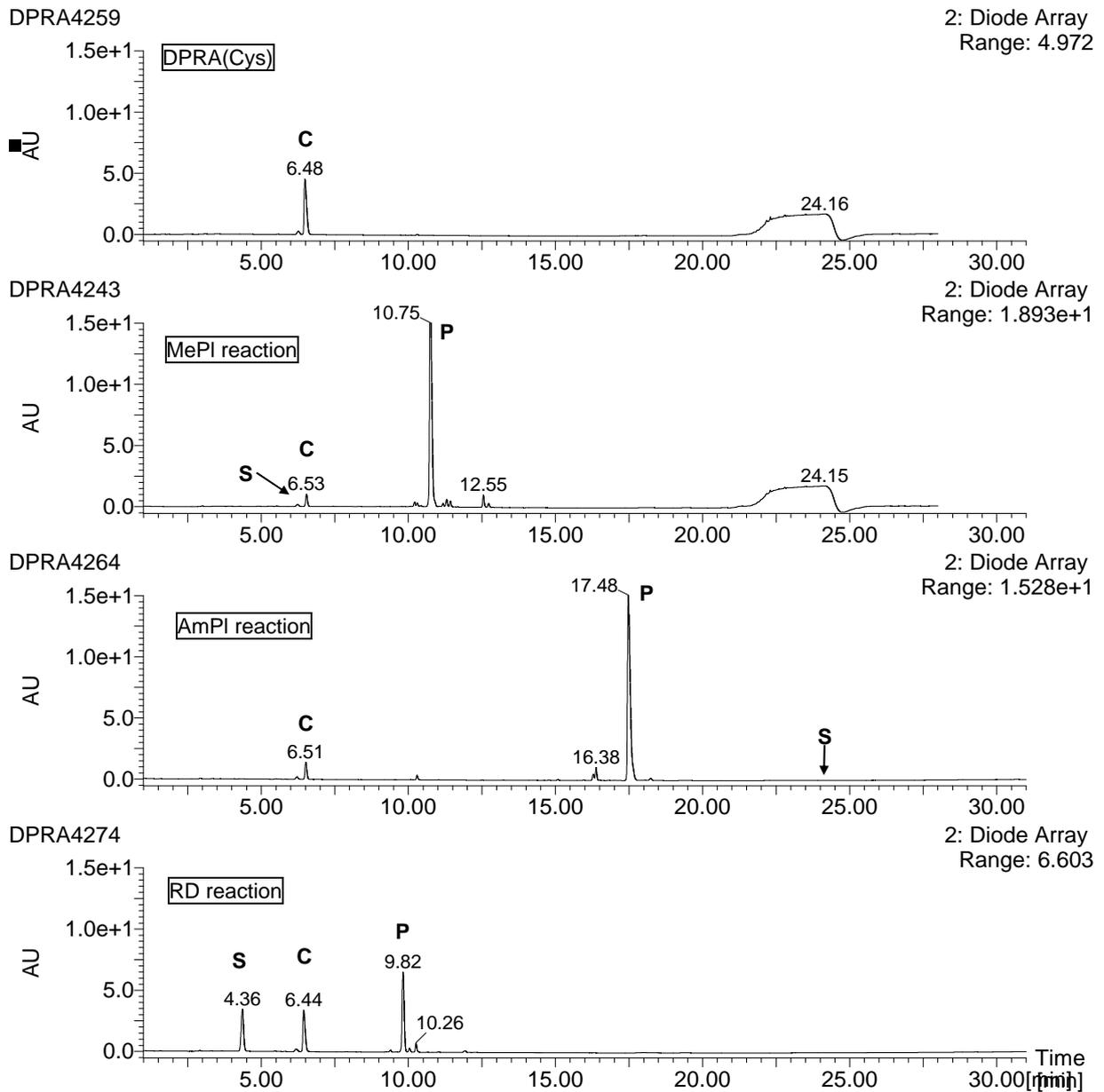


Fig. 2. Reaction with MePI, AmPI and RD as substrates.

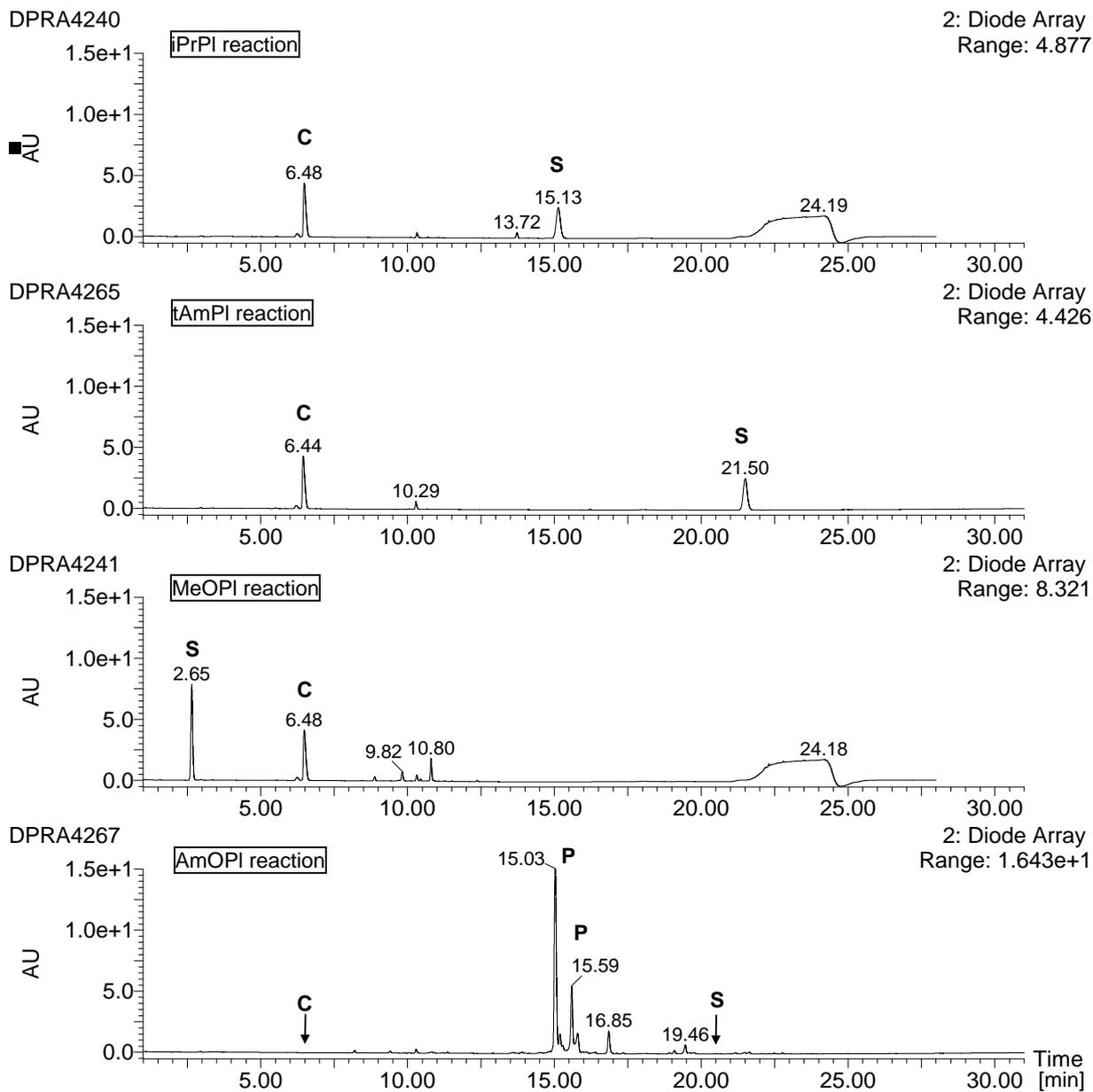


Fig. 3. Reaction with iPrPI, tAmPI, MeOPI and AmOPI as substrates.

安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを産生する。レスベラトロール(RES)は健康によいとされ、広範に摂取されている。しかし、RESはRDと同様に4-置換フェノール構造を有するので、チロシナーゼによる代謝を調べた。その結果、RESはチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノンを生成した。オルトキノンはN-アセチルシステイン(NAC)と反応して、二付加体、三付加体を形成し、また牛血清アルブミンとSH基を介して結合した。一方、RESのチロシナーゼ酸化により調製したRESオリゴマーはGSHをGSSGに酸化する、プロオキシダント活性をもつことが示された。これらの結果から、RESのチロシナーゼ酸化は細胞障害性をもたらす可能性が示唆された。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示す(IJMS, 2018)。レスベラトロール(RES)は、その抗酸化作用、抗炎症作用、抗老化作用などにより健康によいとされ、広範に摂取されている。皮膚におけるその作用についても、一般に美白剤としての効果が期待されている。しかし、RESはRDと同様に4-置換フェノール構造を有し、チロシナーゼにより反応性の高いオルトキノンを酸化され、メラニン産生細胞に対して毒性を發揮する可能性が懸念される。そこで今年度は、RESのチロシナーゼ酸化によるオルトキノンの生成とそのチオール化合物との結合形成などを調べた。

B. 研究方法

RES 100 μ M を pH 6.8 あるいは 5.3 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは N-アセチルシステイン(NAC)を加えた。

C. 研究結果

RESはチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物は pH 6.8 では極めて不安定であるが、pH 5.3 においては 485 nm に吸収極大をもつオルトキノンの生成が確認された。オルトキノンは、AA で還元してカテコール体として同定した。オルトキノンの高い反応性は、NAC の存在下で二付加体および三付加体を生成することにより示された。これらの付加体の構造は、NMR および MS による確認された。システイン、グルタチオン(GSH)も二付加体を生成した。

RES キノンがタンパクと SH 基を介して結合するかどうか、牛血清アルブミン(BSA)および SH 基を保護した NEM-BSA を用いて調べた。その結果、BSA は 314 nm に吸収極大をもつ付加体を形成した。一方、NEM-BSA は 390 nm に吸収をもつ付加体を形成した。BSA ではチオール基が NEM-BSA ではアミノ基が反応に寄与したものと推測される。

RES のチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。pH 7.4 で 120 分間酸化して RES オリゴマーを調製し、そこへ GSH を加えて GSH の減少と GSSG への酸化を追

跡した。その結果、60分後にはGSHは50%減少し、その大部分はGSSGに酸化された。一方、RDオリゴマーはGSHを90%減少させた。

D. 考察

RESはチロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを産生する。オルトキノ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。RESがメラニン産生細胞に対して細胞障害性をもつか否かは明確には示されていないが、我々の先行研究(Okuraら、J Dermatol Sci, 2015)では、B16メラノーマ細胞およびヒトメラノサイトに対してIC50値が30 μ M程度の強い増殖抑制を示している。また、RESオリゴマーはRDオリゴマーほどではないが、プロオキシダント活性をもつことも興味深い。

E. 結論

RESのチロシナーゼ酸化はRES-キノン、次いでRES-オリゴマーを産生し、前者は細胞内タンパクと結合することにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化(枯渇)することにより細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31, 523-528, 2018. Doi: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int J Mol Sci.* 19, E552, 2018. Doi: 10.3390/ijms19020532.

Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp Dermatol.* 27, 754-762, 2018. Doi: 10.1111/exd.13555.

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.*, in revision.

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

安全性評価法(細胞系)の構築

研究分担者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

研究協力者 伊藤祥輔 藤田医科大学 医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)や4SCAPを含む白斑誘導性4-置換フェノール類は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝活性化されることが報告されている。ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を用いた評価方法を検討し、RDあるいは4SCAP曝露により2時間後には、オルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体が細胞・培地において検出されることが判明した。オルトキノン産生は毒性をもたらすと予想されている。実際に4SCAPは速やかに、内因性チロシンもドーパキノンに転換され、やや遅れてグルタチオン・細胞生存率低下を引き起こしたのに対し、RDは内因性チロシン代謝物産生を阻害し、グルタチオン・細胞生存率低下をむしろ抑制する効果を示した。したがって、白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、SH付加体産生の評価が有用と考えられる。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症に関して、本研究の目的は、白斑発症と強く相関する細胞応答を明らかにし、その評価系を構築することである。RD類似の4-アルキル/アリル置換フェノール構造を有する白斑誘導性化合物は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることが報告されており、白斑発症において、化合物のチロシナーゼによる代謝活性化の関与が強く示唆される。

RDについては、チロシナーゼ依存性のメラノサイト毒性が報告されている。そこで前期研究班(平成27-28年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」)ならびに昨年度の研究において、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化がメラノサイト傷害をもたらす可能性を検証してきた。

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、①メラノーマ細胞 B16 あるいは

B16BL のチロシナーゼ発現を変化させ、②293T細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し検討したが、①②ともにRDの細胞毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、②では、チロシナーゼ発現による細胞毒性増強が4S-システアミニルフェノール(4SCAP)とともに、内因性チロシンに対しても顕著に観察された。RDなど外来のフェノール類はオルトキノン体に代謝され毒性を発揮することが予測されたが、内因性チロシン代謝物ドーパキノンも同様の顕著な毒性が示唆され、白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化を、細胞毒性を指標として評価することは困難と判断した。

そこで本年度は、②のヒトチロシナーゼ強制発現293T細胞を用い、チロシナーゼによる代謝活性化を代謝物解析により直接測定する方法について検討を行った。

B. 研究方法

293T細胞にヒトチロシナーゼを一過性に発現さ

せ、24 時間後に薬物処理を開始し、細胞および培地を回収し、代謝産物を既報 (Ito et al., *Pigment Cell Melanoma Res.*, 28, 295-306, 2015) に従い、HPLC で解析した。細胞生存率は ATP 含量の測定により、細胞内グルタチオン量は酵素・化学発光法により決定した。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞におけるロドデノール (RD) の代謝活性化

これまでの伊藤らによる *in vitro* およびメラノーマ細胞での研究から、RD のチロシナーゼ代謝で RD キノンが生じ、システインやグルタチオン、さらにはタンパクの SH 基と反応して付加体を生成することが判明している。293T 細胞にヒトチロシナーゼを一過性に高発現させ検討したところ、本細胞においても、RD 曝露により、RD キノンのグルタチオンおよびシステイン付加体が顕著に産生され、ほとんどが培地に検出されることが判明した。細胞タンパクのシステインへの付加体も検出された。培地のグルタチオン付加体、システイン付加体、細胞タンパクシステイン付加体の比率はほぼ 6:1:3 であった。RD キノンのシステイン付加体がさらに環化した RD フェオメラニンも培地において検出された。

チロシナーゼ発現により、内因性チロシンから生じるドーパキノンのグルタチオン付加体、細胞タンパクシステインへの付加体も検出された。RD 非処理のコントロール細胞では、ドーパキノンならびにシステイン付加体の環化重合で生じるユーメラニン・フェオメラニンが大量に生成し、培地にも放出されていた。RD 曝露により、内因性チロシン由来のシステイン・グルタチオン付加体やメラニンの生成が強力に抑制されることが判明した。

2. RD の代謝活性化の経時変化

RD 代謝物産生の経時変化を検討したところ、RD 曝露後 2 時間で、RD キノンのグルタチオン

付加体・システイン付加体が主に培地に検出され、5 時間後に倍増していた。細胞内での検出量は 5 時間後には低下しており、付加体は産生後に速やかに放出されることが推定された。また 2 時間曝露において、RD キノンのグルタチオン付加体・システイン付加体産生の RD 濃度依存性を確認した。

3. 4SCAP の代謝活性化

白斑誘導性フェノールである 4SCAP についても、本細胞に曝露すると 2 時間後に 4SCAP オルトキノンのグルタチオン付加体 2 種類が培地および細胞で検出され、濃度依存的な増加が認められた。グルタチオン付加体の産生量は RD とほぼ同程度であったが、4SCAP の場合には、オルトキノン体自体が細胞内ならびに大量に培地に検出され、母化合物である 4SCAP も RD の 10 ~ 30 倍の高量が細胞内に存在した。

4. チロシナーゼ代謝に伴う細胞内グルタチオン量への影響と細胞毒性

RD を各濃度範囲で 2、5、24 時間処理したところ、細胞生存率への影響はほとんど認められず、むしろ未処理細胞での 24 時間後の生存率低下を防ぐ効果が認められた。細胞内グルタチオン量も同様に推移した。

4SCAP も各濃度範囲で 2、4、6、24 時間処理したところ、高濃度では 2 時間の時点で顕著な細胞毒性と細胞内グルタチオン低下が認められた。

D. 考察

RD や類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する「チロシナーゼによる代謝活性化」化の細胞を用いた評価法を検討した。生成するオルトキノン体は、付加反応性が極めて高く、細胞内 SH 基との反応を引き起こす。タンパク中のシステイン残基への付加は、タンパク・細胞機能を変化させ、あるいは抗原性を生じて白斑発症メカニズムと深く関連

することが予想される。本細胞モデルにおいても、RD オルトキノンのタンパクシステインへの付加を確認した。しかしながら、タンパク付加体の分析は煩雑であることから、非タンパク性のシステイン、グルタチオン付加体を代替マーカーとし、評価する方法を検討した。

本研究では2時間の曝露によりRDと4SCAPで付加体産生を確認できた。より長時間の結果から、RD システイン付加体のRD フェオメラニンへの転換など、二次的な反応の進展が示唆されることから、今後2時間曝露の条件での検討を予定している。

オルトキノンの高い反応性は、細胞内SHプールの枯渇をもたらし、またオルトキノンの体やさらなる代謝産物がROSを産生し、毒性を発揮すると推定されている。4SCAPは大量のオルトキノンの転換され、短時間に細胞毒性を発現した。内因性チロシン代謝により生じるドーパキノンも細胞内SHと反応し、やや遅れてグルタチオン・細胞生存率が低下した。RDについても、RDキノンのSH付加体が効率的に産生された。一方で、RDは内因性チロシン代謝物の生成を阻害し、むしろSH低下と細胞生存率低下を抑制する効果を発揮することが判明した。したがって、代謝物解析によりRDがチロシナーゼに依存した毒性を発現しない原因が明らかになり、毒性評価ではなく、付加体測定の実用性が示された。最近、各種フェノール類の白斑誘導能は細胞毒性ではなく、SH枯渇能および免疫原性と関連することが報告されている。

細胞を用いた代謝解析法では、*in vitro* で評価

可能な化合物のチロシナーゼへの親和性に加え、内因性基質(チロシン)との競合、化合物の細胞への取り込み速度の差を示唆する結果が得られた。今後、多様な4-置換フェノール類につき白斑誘導能との相関を検討予定である。

E. 結論

ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用い、RDや白斑誘導性4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の評価を検討し、細胞内でのグルタチオン・システイン付加体生成と培地への放出を観察した。毒性評価に比較して有用性が示された。

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

なし

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hayashi M, Suzuki T	Albinism and Other Genetic Disorders of Pigmentation.	Sewon Kang et.al.	Fitzpatrick's Dermatology 9th Edition	Mc Graw Hill Education	New York	2019	1309-1329
鈴木民夫	そばかす、肝斑、黒皮症	福井次矢、高木 誠、小室一成	今日の治療指針 2019 私はこう治療している	医学書院	東京	2019	1291

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masaki T, Nakano E, Okamura K, Ono R, Sugasawa K, Lee MH, Suzuki T, Nishigori C.	A case of xeroderma pigmentosum complementation group C with diverse clinical features	<i>Br J Dermatol.</i>	178	1451-1452	2018
Okamura K, Hayashi M, Nakajima O, Kono M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T	A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	32	79-84	2018
Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.	Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	32	315-319	2018
Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O	Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study.	<i>J Cutan Pathol.</i>	46	123-129	2019

Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I.	Novel autoantibody against the β 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers.	<i>Br J Dermatol.</i>	178	272-275	2018
Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H.	Fc γ RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules.	<i>Int Immunol.</i>	In press		2019
Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H.	Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27free heavy chain.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	511(4)	862-868	2019
Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K	The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation	<i>Pigment Cell Melanoma Research</i>	31	523-528	2018
Ito S, Wakamatsu, K	Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	19	E522	2018
Goto N, Tsujimoto M, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C	4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stresses	<i>Experimental Dermatology</i>	27	754-762	2018

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 最上知子・モガミトモコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人群馬大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 平塚 浩士

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
- 2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 群馬大学大学院医学系研究科・教授
(氏名・フリガナ) 石川 治 ・ イシカワ オサム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	群馬大学医学部附属病院	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年2月 / 日

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職名 大学院医学系研究科長

氏名 金田 安史

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科 情報統合医学講座皮膚科学教室・助教
(氏名・フリガナ) 荒瀬規子・アラセノリコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月6日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人山形大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小山 清人

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
- 2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科・教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 民夫 (スズキ タミオ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山形大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
- 2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活衛生化学部 第二室 室長
(氏名・フリガナ) 秋山 卓美 (アキヤマ タクミ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 星長 清隆

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 藤田医科大学 名誉教授
(氏名・フリガナ) 伊藤 祥輔

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 申請中)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。