

令和元年6月17日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00766

研究課題名(和文)生活素材の白斑の発生メカニズムの解明と白斑発生を予測する評価方法の構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro methods for predicting chemical leukoderma caused by whitening agents in cosmetics.

研究代表者

前田 憲寿 (MAEDA, Kazuhisa)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：50454137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：過去に白斑を発生した化合物は高チロシナーゼ存在下で細胞毒性が強く、低チロシナーゼ存在下で細胞毒性が弱かった。白斑が報告されているフェノール性化合物には色素細胞内の高チロシナーゼのメラノソームに多数の空胞変性を引き起こす作用が認められた。これらにはチロシナーゼ存在下でヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)の発生作用が強いことが分かった。チロシナーゼによってヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)の発生によるプレメラノソームの破壊及びそれに引き続いてメラノサイトの消失が誘導され、その結果、皮膚の脱色素が白斑として臨床症状として現れることが推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、過去に白斑を発生した化合物による白斑発症メカニズムは、過去に白斑を発生した化合物がチロシナーゼによってヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)が発生したため、メラノソームの破壊、さらにはメラノサイトの死滅によって引き起こされることが推察された。さらに、本評価系で白斑を引き起こすことがない他の美白有効成分と比較をすることによって、白斑を引き起こす可能性がある薬物かどうかを推測するin vitro 評価系として用いることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Melanocytes cultured under conditions with high tyrosinase activity developed cytotoxicity when exposed to compounds known to cause leukoderma, while those cultured under conditions with low tyrosinase activity did not. Phenolic compounds that cause leukoderma were applied to melanocytes at the concentration to be absorbed percutaneously under conditions with high tyrosinase activity and they were observed under an electron microscope, demonstrating a large number of vacuolar degenerations in intracellular melanosomes for phenolic compounds known to cause leukoderma, but not for non-leukoderma-causing compounds. Subsequently, the generation of hydroxyl radical during tyrosinase reaction was examined, because whitening agents that inhibit tyrosinase activity serve as substrates for tyrosinase. As a result, phenolic compounds that cause leukoderma generated hydroxyl radical, while non-leukoderma-causing compounds did not.

研究分野：化粧品科学

キーワード：美白 白斑 ヒドロキシラジカル 皮膚内濃度

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日本では、1980年以降にビタミンCの安定化誘導体（リン酸L-アスコルビルマグネシウム、L-アスコルビン酸 2-グルコシド）をはじめ、コウジ酸、アルブチン、4-ブチルレゾルシノール、エラグ酸、リノール酸、4-メトキシサリチル酸カリウム塩、3-O-エチルアスコルビン酸、アデノシン1リン酸、トラネキサム酸など約20種類もの薬用美白化粧品の有効成分が開発され、医薬部外品として承認され使われ続けてきた。効能効果も「日やけによるしみ・そばかすを防ぐ」から2001年以降は「メラニンの生成を抑え、しみ・そばかすを防ぐ」または、メラニンの蓄積をおさえ、しみ・そばかすを防ぐ」に変更された。美白剤の作用点として、「メラノサイトにメラニンを作れ」という指令を抑制するタイプ、メラノサイトに働きかけ、メラニン合成の重要な酵素であるチロシナーゼを阻害したり、チロシナーゼの分解を早めたりすることによりメラニンの合成を阻害するタイプ、メラノソーム成熟・運搬・転送分子を抑制するタイプ、表皮の新陳代謝を促進、すなわち角質剥離や表皮のターンオーバーを促進してメラニンの蓄積を防ぐタイプ、酸化還元によってメラニンを分解するタイプがある。

チロシナーゼを阻害するタイプにはアルブチン、コウジ酸、4-ブチルレゾルシノール、エラグ酸、マグノリグナン、ロドデンドロール、4-メトキシサリチル酸カリウム塩があるが、このなかでロドデンドロール{(±)ロドデンドロール、4-(3-Hydroxybutyl)phenol}が配合された薬用化粧品を使用した人に白斑が確認され、2013年7月4日に自主回収されることが発表された。白斑の被害症状は2015年3月31日現在で19,461人になったと報告され、そのうち10,620人は症状がほぼ回復したが、3年経過しても白斑が残ったままの人が多数存在している。ロドデンドロールは、厚生労働省より薬事法に基づく承認を得た医薬部外品有効成分であるが、p位置換フェノール(p-フェノール)であり、過去に報告されたp位置換フェノールによる白斑に関する論文から、ロドデンドロールにも白斑の懸念が予見されたはずであるが、医薬部外品の有効成分として承認されてしまった。その原因として、用いた *in vitro* 評価方法に問題があり、メラノサイト特異的毒性を評価できなかったことにある。

p位置換フェノールの白斑発生メカニズムとしては、主に色素細胞(メラノサイト)に対する毒性によるとされている。これらp位置換フェノールは、チロシナーゼによって毒性物質が発生し、チロシナーゼが存在するメラニン生成小器官であるメラノソームを破壊するが、その程度が小さければ、白斑が治る可能性がある。しかしながら、カミソリ負け等により、その皮膚内濃度が高くなり毒性が強くなり現れ、それが長期に及べば、メラノサイトを殺してしまうため、永久的白斑を引き起こすことになる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬用美白化粧品(医薬部外品)に配合される有効成分による白斑の発生を予測する *in vitro* 評価方法を構築することである。具体的には、過去に白斑を発生させたフェノール化合物について共通のメラノサイト特異的毒性発現メカニズムを解明し、毒性発現メカニズム、毒性発現濃度および経皮吸収率から、白斑を発生する危険性について予測する *in vitro* 評価方法を構築することである。薬用スキンケア化粧品のほとんどに美白を訴求する有効成分が配合され、成人女性が使用量・使用頻度を制限することなく、それらを日常自由に使用するものであるため、白斑という副作用は決して発生させてはならない。本研究の成果としては、開発薬剤が白斑を発生する危険性のないことを裏付ける評価方法のひとつとして利用できることを提案する。

3. 研究の方法

(1) 試薬

ロドデンドロール [(±) Rhododendrol] は和光純薬株式会社、アルブチン (Hydroquinone-β-D-glucopyranoside)、4-ブチルレゾルシノール(4-Butylresorcinol)は東京化成工業株式会社、ラズベリーケトン、4-メトキシサリチル酸は Sigma-Aldrich、マグノリグナンはフナコシ株式会社から購入した。4-メトキシサリチル酸カリウム塩は4-メトキシサリチル酸をカリウム塩にして用いた。その他の試薬は和光純薬株式会社等から購入して使用した。

(2) 皮膚内推定濃度の測定

皮膚内推定濃度は、被験物質のオクタノール/水分分配係数(K_o/w)を測定して、Potts & Guyの皮膚透過係数予測式(i)より皮膚透過係数を求め、ヘアレスマウス皮膚を用いて拡散セルで *in vitro* 皮膚透過速度を測定して Fick の拡散第1法則(ii)より、1.5cm²暴露での皮膚透過量を計

算して、その値を皮膚湿重量で割って皮膚内濃度を推定する方法で行った。

Potts&Guy の皮膚透過係数予測式 : $\text{LogP}(\text{cm/s in P}) = -6.3 + 0.71 \times \log \text{Ko/w} - 0.0061 \times \text{MW}$ (i)

Fick の拡散第 1 法 : $dQ/dt = PCv$ (ii)

MW: 分子量, Q: 皮膚透過量(mg/cm^2), t: 暴露時間, Cv: 暴露濃度(mg/cm^3)

なお、4-メトキシサリチル酸カリウム塩の $\text{pKa} = 3.31$ (25°C) であり、Henderson-Hasselbalch の式(iii)より、4-メトキシサリチル酸カリウム塩は pH によって経皮吸収されやすい分子型とほとんど経皮吸収されないイオン型の比率が変わるので、水相を pH6.3 に調整してオクタノール/水分配係数を測定した。

$\text{Cunion} + \text{Cion} = \text{Cunion}(1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}})$ (iii)

Cunion: 分子型(非解離型)、Cion: イオン型(解離型)

(3) 皮膚透過速度の測定

被験物質を含む化粧水の処方(100g 中グリセリン 4g、1,3-ブタンジオール 6g、PEG60 水添ヒマシ油 0.2g、フェノキシエタノール 0.35g、被験物質は後述する量、pH6.3 に水酸化カリウム調整、残りは水)を作製した。100g 中ロドデンドロールは 2g、マグノリグナンは 0.5g、アルブチンは 7g、4-ブチルレゾルシノールは 0.3g、4-メトキシサリチル酸カリウム塩は 3g。また、ロドデンドロールの酸化型で職業白斑が報告されたラズベリーケトン(ラズベリーケトン)はロドデンドロールと同量の 2g とした。

フランツ型拡散セル(37°C 恒温循環水)にヘアレスマウスの背部皮膚を装着し、被験物質を含む化粧水 $15\mu\text{L}$ を表皮側(1.5cm^2)に塗布した。レシーバー相をマグネットスターラーで攪拌し、20 分毎に 2 時間までサンプリングした。サンプルは -30°C で保管し、後日、レシーバー相の被験物質の濃度を HPLC で測定した。測定条件は次の通りである。カラム: CAPCELL PAK C18 $4.6\text{mm}\phi \times 250\text{mm}$ 、カラム温度: 40°C 、流速: 毎分 1.0mL 、注入量: $10\mu\text{L}$ 、検出波長と移動相はロドデンドロール: 281nm、アセトニトリル:0.1%酢酸 (20:80)、マグノリグナン: 290nm、メタノール:0.1%酢酸 (85:15)、アルブチン: 285nm、メタノール: 0.1%酢酸 (10:90)、4-ブチルレゾルシノール: 280nm、メタノール: 0.1%酢酸 (60:40)、4-メトキシサリチル酸: 294nm、メタノール:0.1%酢酸 (85:15)、ラズベリーケトン: 281nm、アセトニトリル:0.1%酢酸 (20:80)である。1g の皮膚をクロロホルム:メタノール(2:1)に一晩浸漬し、脂質を除去後に水分を凍結乾燥機で除き皮膚の乾燥重量を測定し、皮膚固形分、薬剤が溶解する皮膚流動分を算出した。

(4) 美白成分の細胞毒性発現濃度の測定

チロシナーゼ活性の高い色素細胞とチロシナーゼ活性の低い色素細胞を 24well に 7 万ずつ播種し、 $500\mu\text{L}$ の 10%ウシ血清を含む DMEM で 1 日培養後に、10%ウシ血清を含む DMEM に①被験物質を加えて 3 日間培養した。培地交換後に Cell Counting kit-8 を $50\mu\text{L}$ ずつ加え、2 時間培養後に 450nm の吸光度を測定して生細胞数を求めた。ロドデンドロール、マグノリグナン、アルブチン、4-ブチルレゾルシノール、4-メトキシサリチル酸カリウム塩の濃度は製品配合量(2%、5%、7%、0.3%、3%)と経皮吸収量に基づき設定した。ラズベリーケトンはロドデンドロールと同量の濃度に設定した。

(5) チロシナーゼ共存下での美白有効成分の細胞毒性発現濃度の測定

色素細胞を 24Well に 10 万ずつ播種し、 $500\mu\text{L}$ の 10%ウシ血清を含む DMEM で 1 日培養後に 2%ウシ血清を含む DMEM に①被験物質、②被験物質とチロシナーゼ(マッシュルーム $10\text{U}/\text{mL}$)を加えて 3 時間培養した。培地交換後に Cell Counting kit-8 を $50\mu\text{L}$ ずつ加え、2 時間培養後に 450nm の吸光度を測定して生細胞数を求めた。

(6) 透過型電子顕微鏡による細胞形態の観察

培養した細胞を 1.5%パラホルムアルデヒド・0.5%グルタルアルデヒド/PBS で 4°C 、1 時間前固定後、リン酸緩衝液にて攪拌洗浄し、遠心分離して細胞を集め、次いで 1%四酸化オスミウムで後固定し、同様に遠心分離し、細胞を集め、Agar にて固めてから細切した。以降の作業は通常と同様にアルコールの上昇系列で脱水、置換し、Epon 樹脂に包埋し、電顕ブロックを作製した。電顕ブロック作製後、トルイジンブルー染色標本作製した。トルイジンブルー染色標本を観察し、電顕ブロックを選択し、超薄切片を作製した。透過型電子顕微鏡観察を行い撮影した。

(7) ヒドロキシラジカルの測定

96Well プレート(Corning Coster)に、リン酸塩緩衝液(PBS) $78\mu\text{L}$ 、被験試薬 $2\mu\text{L}$ 、チロシナーゼ(マッシュルーム $10\text{U}/\text{mL}$) $10\mu\text{L}$ 、5mM Hydroxyphenyl Florescein (HPF)を $10\mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で反応し、0、30、60、90、120、150、180、210、240 分後にヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)により生成した強蛍光性化合物の蛍光強度(励起:485nm、蛍光:528nm)を蛍光プレートリーダー

で測定した。被験物質は 20mmol/L から倍々希釈を行い 6 水準で行った。

(8) H₂O₂ の測定

96Well プレート(Corning Coster)に、リン酸塩緩衝液(PBS)78μL、被験試薬 2μL、チロシナーゼ(マッシュルーム 10U/mL)10μL、5mmol/L H₂DCF_A を 10μL ずつ加え、37°Cで反応し、0、30、60、90、120、150、180、210、240 分後に過酸化水素(H₂O₂)により生成した蛍光性化合物の蛍光強度(励起:485nm、蛍光:528nm)を蛍光プレートリーダーで測定した。被験試薬の濃度は 20mmol/L から倍々希釈を行い 6 水準で行った。

(9) ヒドロキシラジカルの発生部位の測定

色素細胞を 4 チャンバースライドに 3 万ずつ播種し、400μL の 10%ウシ血清を含む DMEM GlutaMAX で 1 日培養後に 10%ウシ血清を含む DMEM GlutaMAX に 125μmol/L のロドデンドロールを加えて 3 日間培養した。5mmol/L Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF)を 2μL 加え、37°C で 1 時間反応した。4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定後に、PBS で洗浄して、10%ヤギ血清でブロッキング後に抗体 TRP-1 抗体(TMh-2)と Alexa Fluor® 488 標識 抗ラット IgG ヤギ・ポリクローナル抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察し、撮影した。

4. 研究成果

白斑が報告されているロドデンドロールとその酸化型のラズベリーケトン、チロシナーゼ存在下でヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生作用が強いことが分かった。さらに、マグノリグナンにもヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生作用が強いことが分かった。これらは p 位置換フェノールであり、構造類似性があることがわかる。一方、ハイドロキノンの配糖体であるアルブチンのヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生作用は弱いことが分かった。レゾルシノール構造である 4-ブチルレゾルシノールにはヒドロキシラジカル(\cdot OH)発生作用は認められなかった。ヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生メカニズムとしては、遊離した H₂O₂ とチロシナーゼの Cu(I)-Cu(I)によってフェントン反応が起こり、ヒドロキシラジカル(\cdot OH)が発生すると考えられるが、H₂O₂ の発生がヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生よりも遅れていることから、ヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生には別のメカニズムの存在が考えられる。これらの結果から、少なくとも白斑が報告されているロドデンドロール(\cdot OH)とその酸化型のラズベリーケトンは、チロシナーゼ存在下でヒドロキシラジカルの発生作用が強く、ヒドロキシラジカル(\cdot OH)発生が白斑発症に関与する可能性があるが、H₂O₂発生は白斑発症に関与しないといえる。

Potts & Guy の皮膚透過係数予測式から試算した定常状態での皮膚内推定濃度と白斑危険性の有無について示した。ロドデンドロールとマグノリグナンの「*in vitro* 色素細胞毒性濃度/皮膚内推定濃度」の値は 0.2 より小さく、安全性保証倍率は非常に低く、細胞毒性を示す最小濃度をはるかに上回る量が皮膚に存在することになり、また、その皮膚内推定濃度でヒドロキシラジカルの発生は強く、もし肌が白くなっても、それはメラノサイトに対する毒性によるものであることが推測された。一方アルブチンや 4-ブチルレゾルシノールの「*in vitro* 色素細胞毒性濃度/皮膚内推定濃度」の値は、10 より大きく、安全性保証倍率は十分に高く、皮膚内推定濃度で色素細胞に対する毒性がなく、また、その皮膚内推定濃度でヒドロキシラジカルの発生は強くなく、白斑の危険性はないといえる。4-メトキシサリチル酸カリウム塩は pH6.0 ではイオン型になっているので、皮膚透過量は少なく、安全性保証倍率は高く、皮膚内推定濃度で色素細胞に対する毒性がなく、また、その皮膚内推定濃度でヒドロキシラジカルの発生はなく、白斑の危険性はないといえる。

皮膚内推定濃度でヒドロキシラジカル(\cdot OH)を発生する美白有効成分としては、ロドデンドロールとマグノリグナンがある。ロドデンドロールは白斑を発生することが発覚したが、マグノリグナンも白斑を引き起す懸念があり、注意が必要である。色素細胞に白斑を生じるロドデンドロール、ラズベリーケトン、マグノリグナンを暴露して電子顕微鏡で観察した結果、細胞内のメラノソームに多数の空胞変性が認められた。

以上の研究により、過去に白斑を発生した化合物の色素細胞特異的毒性発現のメカニズムとその濃度を明らかにすることができた。チロシナーゼによってヒドロキシラジカル(\cdot OH)の発生によるプレメラノソームの破壊及びそれに引き続いてメラノサイトの消失が誘導され、その結果、皮膚の脱色素が白斑として臨床症状として現れることが推察される。また、本評価系で白斑を引き起こすことがない他の美白有効成分と比較をすることによって、白斑を引き起こす可能性がある薬物かどうかを推測する *in vitro* 評価系として用いることができると考えられる。皮膚内推定濃度で細胞毒性がなく、メラニン生成抑制効果を示すことに加えて、ヒドロキシラジカルを生成しないことも白斑を引き起こさない美白有効成分(医薬部外品)の必要条件になる

と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

Lihao Gu, Haifeng Zeng, Tomomi Takahashi and Kazuhisa Maeda

In Vitro Methods for Predicting Chemical Leukoderma Caused by Quasi-Drug Cosmetics.

Cosmetics 2017, 4(3), 31 (査読有)

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。