

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10152

研究課題名(和文) オリジナルモデルマウスを用いたロドデノールによる白斑発症機序の解明

研究課題名(英文) Risk assesment of chemical leukoderma

研究代表者

飯田 真智子 (Iida, Machiko)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・研究員

研究者番号：60465515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：白斑は皮膚色がまだら状に白く抜ける皮膚疾患である。近年、日本を含むアジア諸国において2%ロドデノールを含む美白剤使用による白斑被害が報告された。30%ロドデノールによる白斑毒性を評価した動物実験は報告されているが、実際に白斑を発症したより低濃度(2%)ロドデノールによる白斑毒性を再現した報告はない。我々は、ヒト類似皮膚を持つモデル動物を用いて、2%ロドデノールおよび2%ラズベリーケトンの外用により高感度に白斑毒性を検知できる評価システムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質による白斑被害を未然に防ぐには、白斑毒性を高感度に検知できるシステムが求められる。本研究ではヒト類似皮膚をもつモデルマウスにこれまでの報告にはない低濃度(2%ロドデノール、2%ラズベリーケトン)の化学物質を外用し白斑毒性が再現されるかを検討した。その結果、過去の皮膚毒性試験ではほとんど着目されることのなかった尾部皮膚において例外なく白斑を誘発することに成功した。モデルマウスの尾の皮膚を用いた本試験法は、化学物質による白斑毒性を高感度に検知できる新たな毒性評価法として有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Leukoderma is a skin disorder in which patchy hypopigmentation develops. Recently, more than 16,000 people in Asian countries developed chemical leukoderma due to the use of whitening agents containing 2% (w/w) rhododenol. Previous studies showed that 30% rhododenol caused leukoderma in animal experiments. However, the development of leukoderma caused by lower concentrations of chemicals such as 2% rhododenol, has not been reported. We demonstrated that external treatment with 2% rhododenol and 2% raspberry ketone caused the development of leukoderma in the tail skin of hairless mice with loss of epidermal melanocytes and melanin in the lesions. Thus, we developed a novel evaluation system that enables sensitive assessment of the risks of chemical leukoderma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：白斑 毒性評価 皮膚疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 白斑は、フェノール誘導体やカテコール誘導体などの化学物質によって誘発されることが知られる (Hariharan et al., 2010; Harris, 2017; Lengagne et al., 2004)。フェノール誘導体であるラズベリーケトン、4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノンに曝露した化学工場の従業員に白斑が発症した事例は職業性白斑として報告された (Fukuda et al., 1998)。また近年では、ラズベリーケトンの還元型であるロドデノール (4-(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール) を 2% (w/w) 含有する皮膚美白剤を使用により、16,000 人以上の人々が白斑を発症したことが報告された (Nishigori et al., 2015; Sasaki et al., 2014)。2% のロドデノールによる白斑毒性は、当該美白剤使用者の約 2% で報告された (Nishigori et al., 2015)。すなわち、これらの白斑患者はロドデノールに対して過敏に反応していることが示唆される。

(2) 過去に 30% ロドデノール外用により白斑毒性を再現した動物実験は複数報告されている (Kuroda et al., 2014; Abe et al., 2016)。しかしながら、実際にヒトで白斑が発症した 2% ロドデノールでの白斑毒性を再現した動物モデルは存在しない。将来起こりうる化学物質による白斑被害を未然に防ぐためには、低濃度化合物であっても、そのリスクを敏感に評価できる新しい手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

動物モデルを用いてより高感度に化学物質による白斑毒性を検知できる評価システムを開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

星野実験動物株式会社から購入したヘアレス (Hr/Hr) マウス (HOS:HR-1) を C57BL/6 マウスに 6 代にわたって戻し交配し、10 代以上にわたって兄弟交配を行った。本研究は、名古屋大学の動物実験委員会 (承認番号 30258) の承認を得て行った。

(2) 組織学的解析

メラノサイトの検出には、抗 TRP2 抗体 (1:100; Santa Cruz) および Alexa Fluor 594 抗ヤギ IgG (1:1000; Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた (Iida et al., 2016; Kato et al., 2004; Ohgami et al., 2010)。

(3) 半定量解析

背部皮膚の色は、明るさ (白さ) の指標である L^* 値 (色彩色差計 CR-400; コニカミノルタセンシング社) により評価した (Kato et al., 2011)。尾部皮膚については画像解析用ソフトウェア WinROOF (三谷産業株式会社) を用いて解析した (Kato et al., 2011)。

(4) メラニン密度の評価

フォンタナ-マッソン染色（武藤純薬工業株式会社）により検出された表皮メラニンのデジタル像を画像解析用ソフトウェア WinROOF により 2 値化し、トレースされたドット総量/解析エリアをメラニン密度とした。

（ 5 ）統計解析

2 群間の比較には、Wilcoxon の符号付き順位検定およびカイ二乗検定を用いた。3 群間の比較には、Steel-Dwass 検定を用いた。解析ソフトは JMP Pro（バージョン 11.0.0; SAS Institute）を用いた。

4 . 研究成果

（ 1 ）外用による化学物質のリスクを評価するための一般的な手法として、第一に背部皮膚への化学物質の外用を行った（Abe *et al.*, 2016 ; Kuroda *et al.*, 2014）。ヘアレスマウス（Yajima *et al.*, 2017）の背部皮膚に、2 %（w/w）ロドデノールおよび同濃度のラズベリーケトン、溶媒を外用した。しかしながら、外用開始から 14 週間を経ても背部皮膚に白斑は観察されなかった。組織学的解析においても、ロドデノール、ラズベリーケトン、溶媒を外用した背部皮膚の間で、表皮メラニン量およびチロシナーゼ関連プロテイン-2（TRP-2）陽性細胞（メラノサイト）の数に差はなかった。以上より、ヘアレスマウスの背部皮膚では化学物質による白斑を鋭敏に検知することが難しいと判断された。

（ 2 ）背部皮膚を用いたリスク評価に失敗したため、通常ほとんど実験で用いられることのない尾部皮膚に着目した。その結果、外用開始から 4 週間後には、2 %ラズベリーケトンあるいは 2 %ロドデノールの外用により軽度ではあるが肉眼的に検出可能な初期の白斑が認められた。一方、溶媒を外用した尾部皮膚では白斑の発症は認められなかった。外用から 14 週間をかけて、2 %ラズベリーケトンと 2 %ロドデノールを外用した領域限定的に進行性の白斑が全マウスで観察された。L*値の解析によりラズベリーケトンおよびロドデノールを外用した尾部皮膚の黒さは、溶媒を外用した群と比べて 99 %以上減少していた。組織解析により、2 %のラズベリーケトンおよび 2 %のロドデノールで処理した尾部皮膚の表皮メラニンのレベルは、高感度メラニン検出法である Fontana-Masson 染色でも検出できないほど低かった（Kato *et al.*, 2011）。2 %ラズベリーケトンと 2 %ロドデノールで処理した尾部皮膚の表皮における TRP-2 陽性細胞（メラノサイト）の数は、溶媒で処理した尾部皮膚の 12 %以下であった。

（ 3 ）背部皮膚と尾部皮膚の白斑毒性に対する感度の違いを調べるために、背部皮膚メラノサイトおよび尾部皮膚メラノサイトのメラニン産生活性をメラノサイト内メラニン量により比較した。その結果、背部皮膚では TRP-2 陽性細胞の 13 %、尾部皮膚では 83 %がメラニン陽性であった。また、尾部皮膚の表皮のメラニン密度は背部皮膚の表皮メラニン密度の 50 倍以上、メラノサイト数は 4.5 倍以上であった。これらの結果から、背部皮膚と尾部皮膚では、メラニン産生量やメラノサイト数に定量的な違いがあることが分かった。先行研究では、ロドデノールによるメラノサイトの細胞毒性は、メラノサイトにおけるメラニン産生を調節するチロシナーゼ活性に依存することが示されていることから（Giebel *et al.*, 1990; Kasamatsu *et*

al., 2014; Sasaki et al., 2014)、背部皮膚と尾部皮膚におけるメラノサイトの量的な違いと質的な違いの両方が、ロドデノールによる白斑誘発の感受性の違いに影響した可能性がある。

(4) 30%のラズベリーケトンと30%のロドデノールで処理した尾部皮膚では、処理後2週間の時点ですでに明瞭な白斑が観察された。また、10%よりも30%のラズベリーケトンおよびロドデノールの方が白斑は重篤であった。

(5) 本研究では、マウス尾部皮膚という独自の手法を用いることで、2%のロドデノールによる白斑を再現することが出来た。今後、本評価システムを用い白斑の発症メカニズムが解明できれば、その発症機序に基づいて白斑リスクを高感度かつ大規模スクリーニング可能な新しい *in vitro* システムの開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Oshino R, Tanihata H, Al Hossain A, Ohgami N, Kato M.	4. 巻 91
2. 論文標題 Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 3507-3516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-017-1975-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizutani Y, Kuga D, Iida M, Ushida K, Takagi T, Tokita Y, Takahashi M, Asai M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Use of Anti-phospho-girdin Antibodies to Visualize Intestinal Tuft Cells in Free-Floating Mouse Jejunum Cryosections.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments: JoVE	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iida M, Tazaki A, Deng Yi, Chen W, Yajima I, Kondo-Ida L, Hashimoto K, Ohgami N, Kato M	4. 巻 235
2. 論文標題 A unique system that can sensitively assess the risk of chemical leukoderma by using murine tail skin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 713 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2019.06.185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Deng Y, Ohgami N, Iida M, Tazaki A, Intoh A, Kondo-Ida L, Lu R, Tsuzuki T, Yokoyama S, Kato M	4. 巻 10
2. 論文標題 Histological analysis of the skin of Abca1-deleted mice: A potential model for dry skin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 336-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2019.3621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 李香、鄒存超、矢嶋伊知朗、大神信孝、加藤昌志
2. 発表標題 動物モデルを用いた紫外線による健康リスクの多角的評価
3. 学会等名 第86回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Iida M, Tanaka M, Mizutani Y, Yoshizaki K, Tokita Y, Asai N, Takahashi M, Asai M
2. 発表標題 Development of epileptic seizures in Girdin/ccdc88a knockout mice.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Machiko IIDA, Yasuhiro OMATA, Ichiro YAJIMA, Awoi SATO, Takehito KAJIWARA, Ryoko TASAKA, Masaru HORI, Masashi KATO	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 458
3. 書名 Plasma Medical Science (1st Edition) 分担執筆: Chapter 5-4-3, Melanoma, Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasma irradiation on melanocytic tumors developed in RET-transgenic mice.	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 白斑毒性及び黒皮症毒性の試験方法	発明者 加藤昌志、飯田真智子	権利者 国立大学法人名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-104698	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター 発達障害研究所
<https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/department/index5.html>
 名古屋大学大学院医学系研究科 環境労働衛生学ホームページ
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>
 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 ホームページ
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	加藤 昌志 (Kato Masashi) (10281073)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	