

審査報告書

平成 17 年 2 月 2 日
独立行政法人医薬品医療機器総合機構

医薬部外品製造承認申請のあった下記品目にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下のとおりである。

記

[販 売 名] カネボウ ホワイトニングE
[申 請 者] カネボウ株式会社
[申請年月日] 平成 15 年 4 月 11 日
[剤型・含量] 薬用化粧品（乳液）
(有効成分)
5, 5'-ジプロピルービフェニル-2, 2'-ジオール  w/w%
グリチルリチン酸ジカリウム  w/w%
[申 請 区 分] 医薬部外品区分 1
[特 記 事 項] 承認後、少なくとも 2 年間の安全性に関する市販後調査を実施することが適当と判断する。
[審査担当部] 一般薬等審査部

審査結果

平成 17 年 2 月 2 日

[販 売 名] カネボウ ホワイトニングE

[申 請 者] カネボウ株式会社

[申請年月日] 平成 15 年 4 月 11 日

[審査結果]

医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目は下記の効能・効果及び用法・用量のもとで医薬部外品として承認して差し支えないと判断し、化粧品・医薬部外品部会において審議されることが妥当と判断した。

なお、本申請品目に配合される 5, 5'-ジプロピルービフェニル-2, 2'-ジオールは、医薬部外品として新規有効成分であることから、承認後、少なくとも 2 年間の安全性に関する市販後調査を実施することが適当と判断する。

[効能・効果] メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ。日やけ・雪やけ後のほてり。肌を整える。皮膚をすこやかに保つ。皮膚にうるおいを与える。皮膚を保護する。皮膚の乾燥を防ぐ。

[用法・用量] 適量を顔又は身体各部の肌に塗布する。

審査報告

平成 17 年 2 月 2 日

1. 申請品目

〔販 売 名〕 カネボウ ホワイトニングE

〔申 請 者〕 カネボウ株式会社

〔申請年月日〕 平成 15 年 4 月 11 日

〔剤型・含量〕 薬用化粧品（乳液）

（有効成分）

5, 5'-ジプロピル-ビフェニル-2, 2'-ジオール

■ w/w%

グリチルリチン酸ジカリウム

■ w/w%

〔申 請 区 分〕 医薬部外品区分 1

〔申請時効能・効果〕 メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ。日やけ・雪やけ後のほてり。肌を整える。皮膚をすこやかに保つ。皮膚にうるおいを与える。皮膚を保護する。皮膚の乾燥を防ぐ。

〔申請時用法・用量〕 適量を顔又は身体各部の肌に塗布する。

2. 提出された資料の概要及び審査の概要

（本品目については、専門協議における専門委員の意見を踏まえ、医薬品医療機器総合機構（以下「総合機構」という。）において審査を行ったものである。）

イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

本申請品目（以下、「本製剤」という。）に配合される 5, 5'-ジプロピル-ビフェニル-2, 2'-ジオール（以下「本成分」という。）は、4-プロピルフェノールの二量体であり、リノール酸と同様にメラノサイト内のチロシナーゼ量の増加を抑制することにより、皮膚における過剰な色素沈着を防止する物質である。

なお、本成分の作用は、チロシナーゼの分解を促進するものではなく、チロシナーゼタンパクの成熟過程を抑制し成熟チロシナーゼの量を減少させることによりメラニンの生成を抑制するものである。

申請者は、このフェノール性二量体の中から、感作性や皮膚刺激性等の問題がないものをスクリーニングする中で、B16 メラノーマ細胞メラニン生成抑制試験、A-1 系ホルモット紫外線色素沈着改善試験を行なった結果、本成分がメラニン生成抑制作用、色素沈着改善作用を有し、また、安全性、安定性にも優れることを見出し本製剤を開発した。

なお、本成分は、国内開発品であること、外国にはまだ市場展開は行なわれていないことから、外国における使用実績はない。

ロ. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料

本成分の化学構造は、

により確認されている。

規格及び試験方法の規格値は実測値からみて適切に設定されており、また、記載の整備等もなされており、総合機構は妥当なものと判断した。

本成分の安定性については、苛酷試験（熱：■℃・■カ月、光：120 万 Lux/hr）、加速試験（40℃・75%RH・6 カ月）、長期安定性試験（室温・■カ月・■）が実施された結果、いずれの試験でも、特段の変化は認められなかった。

製剤の安定性については、苛酷試験（熱：■℃・■カ月、光：120万 Lux/hr（■℃・■カ月））、加速試験（40℃・75%RH・6カ月）、長期安定性試験（室温・■℃・■カ月・■年）が実施された。苛酷試験（光）において、含量低下が見られたため、遮光容器での光苛酷試験が実施された結果、遮光下では含量低下が起きないことが確認されたことから、本成分の保存条件として遮光が必要と考えられた。その他はいずれの試験においても特段の変化は認められなかった。

以上のことから、本成分は遮光下であれば室温で 36 カ月間安定であり、本製剤は通常の流通過程において 36 カ月安定であると推定された。

なお、長期保存試験については、平成17年2月18日に保存期間を終了し、規格値の測定後速やかに報告書が提出される予定である。

(本成分の安全性について)

マウス単回経口投与毒性試験(2000mg/kg)が実施された結果、本成分 2000 mg/kg において、死亡動物はなく、一般症状、体重変動及び剖検所見に異常は認められなかったことから、概略の致死量は 2000 mg/kg 以上と考えられる。

ラット 90 日間反復経皮投与毒性試験 (250、500、1000 mg/kg/日) が実施された結果、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査の各所見において、いずれの投与群でも本成分による異常は認められず、無毒性量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/日以上と判断された。

ラット胎児器官形成期投与試験（100、300、1000 mg/kg/日）において、母動物に及ぼす影響については、いずれの投与群とも死亡・瀕死例及び流・早産例は認められなかった。一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、剖検所見、妊娠黄体数及び着床数

に本成分の投与による影響は認められなかった。なお、着床率の有意な低値が 300 mg/kg/日群のみにみられたが、投与用量に関連した変化ではないことから、毒性学的意義はないと判断された。

胎児に及ぼす影響については、着床後死亡数、着床後死亡率、生存胎児数、生存胎児の性比、雌雄別胎児体重、骨化進行度、外表異常、骨格異常、骨格変異ならびに内部器官異常の各出現率に関し、本成分の投与による影響は認められなかった。なお、着床前死亡数及び着床前死亡率の有意な高値が 300 mg/kg/日群のみにみられたが、投与用量に関連した変化ではないことから、毒性学的意義はないと判断された。

これらの結果から、母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量は 1000 mg/kg/日以上と判断された。

ウサギ胎児器官形成期投与試験 (50、150、500 mg/kg/日) において、母動物に及ぼす影響については、いずれの群とも死亡及び瀕死例は認められなかった。50 及び 150 mg/kg/日群では、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検所見に本成分の投与による影響はみられなかったが、500 mg/kg/日群では、膣口出血、体重、体重増加量及び摂餌量の低値がみられた。また、流・早産は 500 mg/kg/日群で 2 例に認められたが、いずれの投与群においても、妊娠黄体数、着床数及び着床率に本成分の投与による影響は認められなかった。なお、150 及び 500 mg/kg/日群では、塗布部位の発赤がみられたが、本成分による局所刺激性に基づく変化と判断され、毒性学的意義はないものと判断された。

胎児に及ぼす影響については、50 及び 150 mg/kg/日群では、着床後死亡数、着床後死亡率、生存胎児数、生存胎児の性比、雌雄別胎児体重、骨化進行度、外表異常、骨格異常、骨格変異及び内部器官異常の各出現率に本成分の投与による影響は認められなかった。

500mg/kg/日群では、生存胎児が得られなかった母動物が 1 例にみられ、着床後死亡数及び着床後死亡率の高値傾向、生存胎児数の低値傾向が認められた。しかし、同群でも、生存胎児の性比、雌雄別胎児体重、骨化進行度、外表異常、骨格異常、骨格変異及び内部器官異常の各出現率に本成分の投与による影響は認められなかった。

これらの結果から、本成分の無毒性量は母動物、胚・胎児発生とも 150 mg/kg/日と判断された。

(4) 抗原性試験

① 感作性試験

モルモット感作性試験 (■%、■%オリーブ油懸濁液) において、陽性対照群に 2, 4-ジニトロクロロベンゼン 0.1%エタノール溶液 (0.1%DNCB 溶液) を用い、感作群、非感作群について Maximization 法により実施された結果、いずれの惹起部位においても非感作群の各惹起部位と同様に、惹起後の皮膚反応は認められなかった。なお、陽性対照被験物質の感作群では、明らかに陽性の皮膚反応が認められたことから、本成分の感作性はないと考えられる。

② 光感作性試験

モルモット光感作性試験 (■%オリーブ油溶液、■%オリーブ油懸濁液) において、陽性対照群に 3,3',4',5-テトラクロロサリチルアニリド 2%エタノール溶液 (2%TCSA

溶液)を用い、照射線量 10J/cm²-UV-A での試験の結果、本成分の各光感作群では、紫外線照射部位 (UV(+)) あるいは紫外線非照射部位 (UV(-)) のいずれの惹起部位においても光非感作群の各惹起部位と同様に、惹起後の皮膚反応は認められなかった。なお、陽性対照群の光感作群では、全例とも UV(+)惹起部位に明らかな陽性の皮膚反応が認められたことから、本成分は光感作性を有しないと考えられる。

(5) 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が実施された結果、いずれも陰性であった。

(6) 局所刺激性試験

皮膚一次刺激性及び連続皮膚刺激性が Draize の評価・判定基準により、眼粘膜刺激性が Draize 法に準じて実施され、Kay の判定基準により評価された。

① 皮膚一次刺激性試験

ウサギ皮膚一次刺激性試験 (■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液、■%オリブ油懸濁液) が実施された結果、本成分の ■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液及び ■%オリブ油懸濁液は未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも極く軽度の紅斑が認められた。なお、対照被験物質として用いたオリブ油は、未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも刺激反応は認められなかった。

本成分は軽度の皮膚一次刺激性を有すると考えられる。

② 連続皮膚刺激性試験

ウサギ 10 日間連続皮膚刺激性試験 (■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液、■%オリブ油懸濁液) において未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位について実施された結果、本成分の ■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液及び ■%オリブ油懸濁液は、未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも投与開始後 1~3 日の観察において軽度の紅斑が認められた。

なお、対照被験物質として用いたオリブ油においても、未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも投与開始後 1~3 日の観察において軽度の紅斑が認められ、本成分の連続皮膚刺激性は軽度であると考えられる。

③ 眼刺激性試験

ウサギ眼刺激性試験 (■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液、■%オリブ油懸濁液) において、Draize 法に準じて行なわれた結果、いずれにおいても試験期間中に刺激反応は認められなかった。なお、対照被験物質のオリブ油においても刺激反応は認められず、本成分は眼に対して無刺激性と判断された。

(7) 光毒性試験

モルモット光毒性試験 (■%オリブ油溶液、■%オリブ油懸濁液) において、陽性対照群に 0.1%8-MOP エタノール溶液を用い、Morikawa 法に準じて実施された結果、本成分の ■%オリブ油溶液及び ■%オリブ油懸濁液は、UV(+)及び UV(-)ともに皮膚の

変化はみられなかった。また、溶媒であるオリブ油においても全例陰性であった。なお、陽性対照群は、UV(+)のみに全例陽性反応を認め、溶媒であるエタノールは全例陰性であった。

以上の結果から、本成分は光毒性を有しないと判断された。

(8) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテスト (■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液、■%オリブ油懸濁液) において、健康な男性 14 名、女性 26 名の背部皮膚に、試料 0.015mL を 24 時間閉塞貼付し、パッチ除去 1 時間及び 24 時間後の皮膚反応を観察した結果、本成分の ■%オリブ油溶液、■%オリブ油溶液及び ■%オリブ油懸濁液貼付部位では、いずれも除去 1 時間後及び 24 時間後共に皮膚反応は認められなかった。なお、対照被験物質であるオリブ油貼付部位では、除去 1 時間後 1 名に軽い紅斑が認められたが、24 時間後には反応は消失した。

これらの結果から、本成分はヒト皮膚に対して刺激反応を惹起する可能性は少ないと考えられる。

(9) 吸収・分布・代謝・排泄

ラット経皮投与による吸収・分布・代謝・排泄 (体内動態試験) (血漿中放射能濃度、組織内放射能濃度、尿及び糞中放射能排泄、雄 15 匹(各 3 匹、9 匹、3 匹)) が実施された。

① 血漿中放射能濃度

3 匹の正常皮膚ラットに ^{14}C で標識した本成分を 2.5 mg/kg 単回経皮投与し、投与後 15、30 分、1、2、3、4、6、8、24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に尾静脈より採血した。血液は遠心分離して血漿を分取し、その 50 μL について放射能を測定した。

その結果、血漿中放射能濃度は、投与後 4.3 時間に最高濃度 C_{max} (12.1ng eq/mL) を示し、以後 48 時間まで 24.7 時間の $t_{1/2}$ で消失した。このことから、本化合物は比較的速やかに経皮吸収され、その消失は緩徐であることが考えられた。 $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ 及び $\text{AUC}_{0-\infty}$ はそれぞれ 314.4 及び 464.3ng eq/h/mL であった。

② 組織内放射能濃度

1 群 3 匹の正常皮膚ラットに ^{14}C で標識した本成分を 2.5 mg/kg 単回経皮投与し、投与後 4、8 及び 48 時間にエーテル麻酔下で後大静脈腹部より全採血した。血液及び血漿の 100 μL について放射能を測定した。各組織については、組織重量測定後、全量又は細切して均一化し、約 100mg について放射能を測定した。

その結果、組織内放射能濃度は、投与後 4、8 及び 48 時間いずれの時点においても投与部位皮膚が最も高い濃度を示した。また、投与後 24 時間の投与部位皮膚は、8 時間値と同等の濃度を示し、4 時間値の約 49% であった。このことから、投与部位皮膚からの放射能の消失は緩徐であることが示唆された。また、腎臓、膀胱、前立腺、精巣、精囊、白色脂肪 (腎臓周辺) 及び大腸では投与後 8 時間、それ以外の組織についてはいずれも 4 時間で最も高い濃度を示したことから、本化合物は比較的速やかに体内に分布することが示唆された。下垂体、甲状腺、骨髄及び大腿骨については、い

ずれの時点でも検出限界以下であった。放射能の組織分布率は、投与後 4、8 及び 48 時間の投与部位皮膚でそれぞれ 7.3、4.1 及び 3.2%であった。また、いずれの時点も投与部位皮膚以外では、肝臓、腎臓、小腸及び大腸で血漿よりも高濃度を示したが、それ以外の組織は、血漿中濃度と同等又はそれ以下であった。以上の結果から、本化合物は投与部位皮膚からの消失は緩徐であるものの、それ以外の組織において放射能が残留する可能性は少ないものと考えられる。

③ 尿及び糞中放射能排泄

3 匹の正常皮膚ラットに ^{14}C で標識した本成分を 2.5 mg/kg 単回経皮投与し、開放型代謝ケージに 1 匹ずつ収容した。尿は投与後 0～8、8～24 時間及びそれ以降は 24 時間毎に 168 時間までの自然排泄尿を採取し、全重量測定後、その 0.2 g について放射能を測定した。糞については投与後 24 時間毎に 168 時間まで採取し、全重量測定後、その 0.2 g について放射能を測定した。

^{14}C —本成分の放射科学的純度は、98.5%であった。

その結果、尿及び糞中排泄率は、投与後 168 時間でそれぞれ 0.4 及び 4.3%を示した。また、投与後 168 時間の投与部位皮膚には投与量の 0.5%の放射能が検出されたが、屍体中に放射能は検出されなかった。なお、リント布、粘着性包帯及び投与部位拭き取り綿にそれぞれ投与量の 75.6、17.3 及び 4.2%の放射能が検出された。投与後 168 時間における放射能の総回収率は 102.3%であった。したがって、 ^{14}C で標識した本成分を正常皮膚ラットに単回経皮投与した際の経皮吸収率は 5.2%と算出され、経皮吸収された ^{14}C で標識した本成分の主排泄経路は糞中であると考えられる。

(本製剤の安全性について)

(1) 単回投与毒性試験

マウス単回経口投与毒性試験において、本製剤 10w/v%溶液群（本成分 2000 mg/kg 相当）及び対照群（本成分無配合クリーム溶液）について実施された結果、死亡動物はなく、一般症状、体重変動及び剖検所見に異常は認められなかったことから、概略の致死量は 2000 mg/kg 以上と判断される。

(2) 抗原性試験

① 感作性試験

モルモット感作性試験（本製剤、本成分無配合クリーム）において、陽性対照群に 0.1%DNCB (dinitrochlorobenzene) エタノール溶液を用い、感作群、非感作群について Maximization 法に準じて実施された結果、本製剤及び本成分無配合クリームの各感作群では、いずれの惹起部位においても非感作群の各惹起部位と同様に、惹起後の皮膚反応は認められなかった。なお、陽性対照被験物質の DNCB の感作群では、明らかに陽性の皮膚反応が認められたことから、本製剤は感作性を有しないと判断された。

② 光感作性試験

モルモット光感作性試験（本製剤、本成分無配合クリーム）において、陽性対照群に 2%3,3',4',5-テトラクロロサリチルアニリド（TCSA）溶液を用い、照射線量 10J/cm²-UV-A での紫外線照射で、AdjUVant-strip 法に準じて実施した結果、本製剤及び本成分無配合クリームの各光感作群では、紫外線照射部位（UV(+)）あるいは紫外線非照射部位（UV(-)）のいずれの惹起部位においても光非感作群の各惹起部位と同様に、惹起後の皮膚反応は認められなかった。

なお、陽性対照被験物質とした 2%TCSA 溶液の光感作群では、全例とも UV(+)惹起部位に明らかな陽性の皮膚反応が認められた。

以上のことから、本製剤は光感作性を有しないと判断された。

(3) 局所刺激性試験

皮膚一次刺激性試験、連続皮膚刺激性試験及び眼粘膜刺激性試験が本成分と同一の試験方法で実施され評価された。

① 皮膚一次刺激性試験

ウサギ皮膚一次刺激性（本製剤、本成分無配合クリーム）が実施された結果、本製剤は、未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも極く軽度の紅斑が認められた。対照群の本成分無配合クリームでは、損傷皮膚部位に極く軽度の紅斑が認められたが、未処置皮膚部位には刺激反応はみられなかった。

本製剤は軽度の皮膚一次刺激性を有すると考えられる。

② 連続皮膚刺激性試験

ウサギ 10 日間連続皮膚刺激性試験（本製剤、本成分無配合クリーム）が実施された結果、本製剤は、未処置皮膚部位及び損傷皮膚部位とも観察期間を通じて極く軽度あるいは軽度の紅斑が全例に、極く軽度の浮腫が 3 例中 1 例に認められた。

なお、対照群の本成分無配合クリームにおいても、本製剤と同程度の反応が認められた。

本製剤は軽度の連続皮膚刺激性を有すると考えられる。

③ 眼刺激性試験

ウサギ眼刺激性試験（本製剤、本成分無配合クリーム）が実施された結果、本製剤及び対照群のいずれも、観察期間を通じて刺激反応は認められなかった。

(4) 光毒性試験

モルモット光毒性試験（本製剤、本成分無配合クリーム）において、陽性対照群に 8-メトキシソラレン（8-MOP）0.1%エタノール溶液を用い、Morikawa 法に準じて実施された結果、本製剤及び本成分無配合クリームは、いずれも照射 24 時間後の UV(+)にごく軽度の紅斑が 1 例に認められた。

しかし、両群とも同じ動物の UV(-)に同程度の反応がみられたことから、これらの皮膚の変化は刺激反応によるものと推察された。なお、陽性対照被験物質では、UV(+)のみに全例陽性反応が認められ、溶媒であるエタノールは全例陰性であった。

これらの結果から、本製剤は光毒性を有しないと考えられる。

(5) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテスト（本製剤、本成分無配合クリーム）について、本成分の試験と同一の被験者及び試験方法で実施された結果、本製剤貼付部位では、除去1時間後3名に軽い紅斑（±）、1名に明らかな紅斑(+)が認められたが、24時間後には反応は消失した。また、対照群である本成分無配合クリーム貼付部位でも、除去1時間後3名に軽い紅斑（±）、1名に明らかな紅斑(+)が認められたが、24時間後には消失した。

これらの結果から、本製剤は、ヒト皮膚に対する影響はあっても軽微であり刺激反応を惹起する可能性は少ないと考えられる。

(安全係数について)

本成分の ■■■%配合した製品をヒトに塗布した時の安全性について、実使用を想定し、反復投与毒性試験や生殖発生毒性試験における無毒性量に対する安全係数について、次のように算出し検討されている。

- ・ 製品中の本成分の配合量 : ■■■%
- ・ 本成分の経皮吸収率 : 5.2%
- ・ 本成分の皮膚吸収量 : ■■■ × 5.2/100 = ■■■%
- ・ 1cm² の皮膚への製品塗布量 : ■■■ mg
- ・ 製品の皮膚への塗布範囲（顔面 15×20cm） : 300cm²
- ・ 1回の製品塗布量 : ■■■ mg/cm² × 300cm² = ■■■ mg
- ・ 1回製品塗布時の本成分吸収量 : ■■■ mg × ■■■ = 0.156mg
- ・ 体重 1kg 当たりの本成分の吸収量 : 0.156mg ÷ 50kg = 0.00312 mg/kg

1日2回製品を塗布（0.00624 mg/kg/日）した場合

ラット反復経皮投与毒性試験の無毒性量の雌雄とも 1000 mg/kg/日に対し、160,256倍、ウサギ生殖発生毒性試験の無毒性量（母動物、胚・胎児発生とも 150 mg/kg/日）に対し、24,038倍であり、本成分の安全性は高く、ヒト皮膚塗布による毒性惹起の可能性は少ないと考えられる。

ホ. 効能又は効果に関する資料

(1) メラニン生成抑制作用

試験方法は、本成分と既承認のメラニン生成抑制剤として知られているハイドロキノン、アルブチン、コウジ酸、リノール酸、4-*n*-ブチルレゾルシン、エラグ酸、アスコルビン酸を B16F0 メラノーマ細胞に添加し、3日間培養後、細胞に含まれるメラニンを測定。同時に細胞数の指標として溶解した細胞の総タンパク質量を測定し、タンパク質量当たりのメラニン含有量を算出した。得られた結果からメラニン生成を50%抑制する濃度 IC₅₀ を求める方法で行われた。

その結果、本成分のメラニン生成における IC₅₀ は 5.4 μg/mL であった。この値は、4-*n*-ブチルレゾルシン、リノール酸と同程度であった。また、コウジ酸、アスコルビン酸、アルブチン、エラグ酸よりも 1~2 オーダー低い値であり、より低濃度においてメラニン生成を低下させた。

(2) チロシナーゼ活性阻害作用

本試験は、本成分の直接的なチロシナーゼ活性阻害作用を、メラニン生成抑制剤として知られているハイドロキノン、アルブチン、コウジ酸、リノール酸、4-*n*-ブチルレゾルシン、エラグ酸、アスコルビン酸と比較する目的で実施された。マッシュルーム由来チロシナーゼあるいはヒト由来チロシナーゼ（正常ヒト色素細胞のメラノソーム抽出画分）を基質となるチロシンと被験物質とを一定時間反応させ、生成したドーパクロームの 475nm の吸光度を測定してチロシナーゼ活性を求め、得られた結果からチロシナーゼ活性を 50%抑制する濃度 IC₅₀ を求める方法で行われた。

その結果、ハイドロキノンや他の有効成分（リノール酸を除く）は、マッシュルーム由来チロシナーゼ活性を阻害したが、リノール酸及び本成分は 330 μ g/mL まで添加してもマッシュルーム由来チロシナーゼ活性を阻害しなかった。また、ヒト由来チロシナーゼの活性も 10 μ g/mL までの添加で阻害しなかった。このことから、本成分のメラニン生成抑制作用はチロシナーゼ活性の直接的な阻害によるものではないことが示された。

(3) 培養細胞におけるチロシナーゼ活性低下作用

本試験は、培養中の色素細胞において本成分がチロシナーゼ活性に及ぼす影響を調べる目的で実施された。培養正常ヒト色素細胞中に被験物質を添加 24 時間後[³H]チロシンを添加し、さらに 24 時間培養後、生成したトリチウム水の放射活性を測定することにより、チロシナーゼ活性を求め、培養正常ヒト色素細胞中に被験物質を添加 24 時間後[³H]ロイシンを添加し、24 時間培養後、NaOH により細胞を溶解させ、放射活性を測定することにより、細胞毒性を評価する方法で行われた。

その結果、本成分は細胞内チロシナーゼ活性を濃度依存的に低下させた。また、同濃度域のロイシンの取り込みには有意な低下は認められず、細胞毒性がみられないことを確認した。このことから、本成分はチロシナーゼ活性を直接阻害しないが、細胞内チロシナーゼ活性を低下させることにより、メラニン生成を抑制することが示された。

(4) チロシナーゼタンパク質量に与える影響

本試験は、本成分による培養中の色素細胞におけるチロシナーゼ活性の低下が、チロシナーゼタンパク質量の減少によるものであるか調べる目的で実施された。

正常ヒト色素細胞に被験物質を添加し 2 日間培養後、回収したサンプルについて、チロシナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法によりチロシナーゼタンパク質を検出する方法で実施された。

その結果、チロシナーゼタンパク質は約 75kDa の位置に検出され、本成分の濃度に依存して減少した。この減少は、培養中の色素細胞におけるチロシナーゼ活性の低下と対応するものであった。このことから、本成分はチロシナーゼタンパク質量を減少させることにより、細胞全体のチロシナーゼ活性を低下させ、メラニン生成を抑制するものと考えられる。

(5) チロシナーゼmRNA量に与える影響

本試験は、本成分によるチロシナーゼタンパク質量の減少が、チロシナーゼの転写

に影響し、mRNA量を低下させた結果引き起こされるものであるか調べる目的で実施された。正常ヒト色素細胞に被験物質を添加し2日間培養後、回収したサンプルについて、チロシナーゼ、 β -アクトチンプロンプを用いたノザンブロッティング法によりこれらのmRNAを検出する方法で実施された。

その結果、本成分は一般的な細胞構成タンパク質である β -アクトチン、チロシナーゼ共にmRNA量に影響を与えなかった。このことから、本成分はmRNA転写後に作用することによりチロシナーゼタンパク質量を低下させるものと考えられる。

(6) チロシナーゼタンパク質の合成と分解に与える影響

本試験は、本成分によるチロシナーゼタンパク質量の減少が、チロシナーゼタンパク質の*de novo*合成を低下させたためであるか、又は、チロシナーゼタンパク質の分解を促進したためであるか調べる目的で実施された。

^{35}S で標識されたメチオニンを正常ヒト色素細胞の培地中に加え30分間培養することで、この間に新しく合成されたタンパク質を標識し(Pulse)、その後通常の培地に戻し、2、4、24時間培養、標識されたタンパク質のその後の変化を追跡した(Chase)。また、チロシナーゼ抗体により免疫沈降し、 ^{35}S 標識チロシナーゼを検出することで、チロシナーゼの合成、成熟、分解等に関する情報を得るとともにバンドの濃さを解析する方法で実施された。

その結果、本成分には、新しく合成されたチロシナーゼ量を減少させる作用は認められなかった。これらのことから、本成分によるチロシナーゼタンパク質量の減少は、チロシナーゼタンパク質の*de novo*合成を阻害するためではないことが示された。Chase 24時間後には、本成分により無添加と比べて成熟体は約半分まで減少した。新しく合成される量には影響を与えず、最終的な成熟型の量が減るということから、K270はその途中過程に影響を与えていることが示唆された。また、Chase 2~4時間後では本成分の添加により2倍弱未成熟体が残ったことから、チロシナーゼの成熟を本成分が抑制したものと考えられる。

(7) チロシナーゼタンパク質の成熟に与える影響

本試験は、未成熟体を切断するEndoH酵素を用いて、本成分によりチロシナーゼタンパク質の成熟が抑制されることを確認する目的で実施された。

正常ヒト色素細胞を、被験物質を含む培地中にて30分間 ^{35}S メチオニン標識した後、被験物質を含む非標識培地に交換し、2時間培養した。タンパクを抽出後、チロシナーゼ抗体により免疫沈降した。さらにEndoHを加えて反応させ、反応後の ^{35}S 標識チロシナーゼを検出、本成分添加時のチロシナーゼのEndoH耐性、感受性を調べることにより、チロシナーゼの成熟、未成熟を評価するとともにバンドの濃さを解析する方法で行われた。

その結果、EndoH反応後、本成分を添加した場合には、感受性のバンドが2倍程度増え、耐性のチロシナーゼは減少した。したがって、本成分添加時には、未成熟のチロシナーゼが増え、成熟体が減少したと考えられる。このことから、本成分はチロシナーゼの成熟を抑制していると考えられる。

(8) チロシナーゼのメラノソーム移行に与える影響

本試験は、*de novo* 合成されたチロシナーゼがメラノソームに移行する数時間後以降のメラノソームに存在するチロシナーゼ量を調べる目的で実施された。

正常ヒト色素細胞を、被験物質を含む培地中にて 30 分間^[35S]メチオニン標識した後、被験物質を含む非標識培地に交換し、4 時間、24 時間培養した。メラノソームを抽出後、チロシナーゼ抗体により免疫沈降し、^[35S]標識チロシナーゼを検出し、バンドの濃さを解析する方法で行われた。

その結果、メラノソームに移行したチロシナーゼの量は、4 時間後、24 時間後共に本成分を添加した場合、無添加時に比較して減少が観察され、24 時間後に半分程度になっていた。このことから、本成分によりチロシナーゼのメラノソームへの移行量が減少することが示された。

(9) タンパク質量減少作用のチロシナーゼ特異性

本試験は、本成分のタンパク質量減少作用に関して、チロシナーゼに対する特異性を調べる目的で実施された。正常ヒト色素細胞に被験物質を添加し 2 日間培養後、回収したサンプルについて、メラノソームタンパク質である TRP-1 (tyrosinase related protein-1)、TRP-2 (tyrosinase related protein-2)、GP-100 (glycoprotein-100)、LAMP-1 (lysosome associated membrane protein-1) の各種抗体を用いたウエスタンブロット法により、各種タンパク質を検出する方法で行われた。

本成分は、色素細胞のメラノソームに関連するタンパク質の中で、チロシナーゼと類似の構造を持ち、同じメラニン生成系酵素である TRP-2 に対してもチロシナーゼ同様に減少させたが、それ以外のタンパク質 (TRP-1、GP-100、LAMP-1) には影響を与えなかった。このことから、本成分の作用の特異性は高いと考えられる。

(10) 濃度依存性に関する資料 (用量設定根拠)

本試験は、A-1 系モルモットを用いた紫外線色素沈着抑制試験を用いて、本成分について塗布による有効性の確認と有効濃度を設定する目的で実施された。

被験物質はグリセリン、エタノール、水混合液(2:7:1)を基剤として、本成分を溶解し調製して用いた。塗布部位はローテーションして振り分け、試験その 1 では ■、■、■% について、試験その 2 では ■、■、■% について比較、皮膚色を色彩色差計を用いて測定し、皮膚明度を表す知覚色度指数を指標とし、試験開始時及び試験 15 日目の試験終了時に皮膚色の測定を行なう方法で実施された。

その結果、試験その 1 の試験開始時の明度と終了時の明度の差 (ΔL 値) は、0 から 3% にかけて濃度依存的な抑制傾向を示し、特に ■% 以上の被験物質では有意な抑制効果を示した。そこで試験その 2 において ■% 以下の被験物質についてさらに効果を調べたところ、■及び ■% 被験物質では有意な抑制効果を示した。これらの結果から、本成分は ■% 以上の濃度で紫外線色素沈着抑制効果を表すことが示された。

(11) 作用部位への到達性に関する資料

本試験は、マイクロラジオオートグラフィーによる皮膚透過試験を用い、本成分の皮膚からの吸収を検討して作用部位への到達性を調べる目的で実施された。

¹⁴C 標識した本成分(以下 [¹⁴C] - 本成分)を ■% 含有するクリーム製剤を A-1 系モルモット (雌) に塗布し、マイクロラジオオートグラフィー技術を用いて皮膚における

分布変動を調べた。塗布後 2 時間、6 時間、24 時間の $[^{14}\text{C}]$ ー本成分の分布を塗布後 2 時間、6 時間、24 時間において評価する方法で行われた。

その結果、本成分の分布は、24 時間後では時間による拡散消失はみられるものの、すべての被験物質において、基底層に局在する色素細胞（メラノサイト）上に本成分の分布を示す銀粒子の存在が観察された。このことから、表皮に塗布した本成分が色素細胞に到達することが示された。

(12) 正常ヒトメラノサイトの増殖性に与える影響

本試験は、本成分の正常ヒトメラノサイトの増殖性に与える影響を統計学的な観点から調べる目的で実施された。

正常ヒトメラノサイトに被験物質を添加して、0、1、2、3 日間培養後、細胞増殖測定用試薬アラマブルーを用いて、被験物質添加時の正常ヒトメラノサイトの増殖性を測定した。正常ヒトメラノサイトにおいてチロシナーゼ活性を約半分に低下させる濃度が $5\mu\text{g/mL}$ であることから、0、5、10、 $20\mu\text{g/mL}$ の濃度において試験する方法で行われた。

その結果、本成分添加時の細胞増殖性は、対照と比較して、1 日目、2 日目、3 日目の全ての試験濃度（5、10、 $20\mu\text{g/mL}$ ）で有意差がなかった。このことから、統計学的な観点から、本成分は培養正常ヒトメラノサイトの増殖性に影響を与える可能性が低いことが示された。

(13) 動物における細胞毒性試験

本試験は、本成分の塗布によりメラノサイトに対する細胞毒性を示す可能性がないことを確認する目的で実施された。

A-1 系モルモット（雌）背部を毛刈りし、各動物に試験部位を 4 カ所設定し、これらの試験部位に 1 日 1 回 $100\mu\text{L}$ ずつ、4 週間連続して被験物質塗布した。塗布被験物質は、1. ハイドロキノン被験物質：ハイドロキノン用基剤にハイドロキノンを ■% になるように溶解調製したもの、2. ハイドロキノン用基剤（グリセリン、蒸留水混合液(9:1)）、3. 本成分被験物質：本成分用基剤に本成分を ■% になるように溶解調製したもの、4. 本成分用基剤（プロピレングリコール、エタノール、蒸留水混合液(2:7:1)）の 4 種類とし、塗布部位はローテーションして振り分け、被験物質塗布終了後、各試験部位の皮膚を採取し、これらの採取した皮膚から表皮部分を剥離、得られた各表皮被験物質についてメラノサイトの特異的なタンパク質である抗 HMB-45 抗体を用いて染色し、顕微鏡を用いてメラノサイト数を計数、比較する方法で行われた。

その結果、陽性対照として用いたハイドロキノンの連続塗布はメラノサイトに対して細胞毒性がありその数が著しく減少するのに対して、本成分では ■% の ■ という高濃度の有効成分量累積塗布によっても細胞毒性は認められないことが確認された。

(14) 動物における白斑非形成確認試験

本試験は、本成分被験物質の塗布により白斑が形成される可能性がないことを確認する目的で実施された。

A-1 系モルモット（雌）背部を毛刈りし、各動物に試験部位を 4 カ所設定した。試

験1から8日目の毎日試験部位に紫外線を照射した。照射線量は各 $\blacksquare$ mJ/cm² とした。初回紫外線照射の直後から試験28日目まで各試験部位に1日1回、各100 μ L ずつ被験物質を塗布した。塗布被験物質は1. ハイドロキノン用基剤（グリセリン、蒸留水混合液(9:1)）、2. ハイドロキノン被験物質：ハイドロキノン用基剤にハイドロキノンを $\blacksquare$ %になるように溶解調製したもの、3. 本成分用基剤（グリセリン、エタノール、蒸留水混合液(2:7:1)）、4. 本成分被験物質：本成分用基剤に本成分を $\blacksquare$ %になるように溶解調製したものの4種類とし、塗布部位はローテーションして振り分けた。被験物質塗布の終了した後の試験29日目から試験34日目までの毎日、試験部位に再度紫外線を照射、皮膚色を色彩色差計を用いて測定、皮膚明度を表す知覚色度指数を指標とし、皮膚色の測定は試験開始時、試験9日目、被験物質塗布終了後の試験29日目、及び試験終了となる試験38日目に行う方法で実施された。

その結果、対照薬剤のハイドロキノン塗布部位では被験物質塗布終了後の紫外線照射によっても色素沈着は亢進されなかった。一方、本成分塗布部位では再び色素沈着が亢進された。このことから、ハイドロキノンとは異なり、本成分の作用は、本成分が除かれると解消される可逆的なものであることが確認された。

(15) ヒトにおける使用成績

① 紫外線色素沈着に対する本製剤の使用試験

本試験は、本成分を $\blacksquare$ %配合した本製剤の紫外線色素沈着に対する抑制効果を評価する目的で実施された。

試験群：本製剤、対照被験物質：本成分無配合クリーム、被験対象は健常である成人男女43名とし、二重盲検群間比較法で行われた。被験対象上腕内側に2.0 cm×2.0 cmを2箇所設定し、紫外線0.8 MEDを3日間連続照射し、色素沈着を作製した。1日3回3週間被験物質塗布、皮膚科専門医により、被験部位の観察及び被験者との問診を行い、色素沈着の程度、副作用の有無をケースカードに記載し、客観的改善効果の指標として、経時的に分光測色計を用いて照射部位の皮膚色の明度差を求め、皮膚科専門医により有効性の比較が行なわれた。

その結果、皮膚所見判定において本製剤塗布部位の方が有意 ($p<1\%$) に色素沈着程度が低いことが確認された。3週間後の明度差において、本製剤塗布部に、対照被験物質部と比較して有意な ($p<5\%$) 色素沈着抑制効果が認められた。皮膚所見と副作用の有無をもとに総合的に判定した結果、本製剤に有意な有効性が確認された。

② 紫外線照射色素沈着に対する本製剤の既承認品との比較使用試験

本試験は、本製剤と既承認品である「 $\blacksquare$ 」との紫外線色素沈着の抑制効果を比較する目的で実施された。

試験群：本製剤、対照被験物質：「 $\blacksquare$ 」(4-*n*-ブチルレゾルシンを $\blacksquare$ %配合) について、健康な成人男子15名を対象とし、上腕内側に2.0 cm×2.0 cmを2箇所設定し、紫外線0.8 MEDを3日間連続照射し、色素沈着を作製した。1日3回3週間試験被験物質を塗布、皮膚科専門医により、被験部位の観察及び被験者との問診を行い、色素沈着の程度、副作用の有無をケースカードに記載し、客観的改善効果の指標として、経時的に分光

測色計を用いて照射部位の皮膚色の明度差を求めた。皮膚科専門医が有効性の比較を行う方法で実施された。

その結果、皮膚所見判定において本製剤塗布部位の方が既承認品塗布部に比べ色素沈着程度が低いことが確認されたが、有意な差ではなかった。3週間後の明度差において、本製剤塗布部に、既承認品塗布部と比較して色素沈着を抑制する傾向が伺われ、皮膚所見と副作用の有無をもとに総合的に判定した結果、本製剤は、既承認有効成分 4-*n*-ブチルレゾルシンを配合した製品と同等もしくはそれ以上の効果が確認された。

③ 本製剤の長期使用による肝斑等の色素沈着に対する改善試験

本試験は、本製剤の長期使用による顔面の色素沈着に対する改善効果を評価する目的で実施された。

顔面部にしみ、そばかす等の色素沈着に悩みを持つ成人女性 14 名の当該色素沈着部位に本製剤を 1 日 2 回 6 カ月間被験物質塗布を行った。皮膚科専門医は、被験部位の観察及び被験者との問診を行い、色素沈着の程度、副作用の有無をケースカードに記載、皮膚科専門医により有効性の判定が行われた。

その結果、皮膚所見判定において、本製剤を塗布した 13 名中 12 名について、被験者の肝斑に、経時的な改善効果が有意に認められた。また、雀卵斑に悩みを持つ全例（5 名）においても改善効果が認められた。一方、色素脱失、皮膚刺激などを含め副作用は全く認められなかった。

④ 本製剤の顔面使用試験

本試験は、本製剤の使用症例数を拡大し、顔面使用における安全性及び有用性を評価する目的で実施された。

健康な女性 317 名を対象とし、被験者の顔面に本製剤を 1 日 2 回 1 カ月間被験物質塗布し、有用性に関する評価はアンケートにより自己申告とした結果、「肌状態の改善効果があった」と回答した者は、全体の 81.2%以上であった。一方、全試験期間を通して、紅斑、かゆみ等の症状が被験者総数 317 名中 3 例出現した（発現率 0.95%）。

総合機構は、紅斑、かゆみ等が発現した症例について、その症状の程度及び本成分との因果関係について申請者に説明を求めた。

申請者から、本試験において紅斑、かゆみ等の症状が発現した 3 名のアンケート用紙には、「ヒリヒリ感、部分的な紅斑、かゆみ、肌にブツブツができた後に乾燥した状態となった」との記載があり、いずれも症状は一過性で軽度であり、また、使用中止 1 カ月～1 カ月半後に、この 3 名に対し本製剤及び本製剤から本成分のみを除いた製剤のヒトパッチテストを実施したところ、いずれも皮膚反応は観察されなかった。これらのことから、発現した紅斑、かゆみについては本成分が直接の原因ではないこと、また、症状は軽度であり一過性であることから、実使用においてこれらの症状が発現した場合、使用を中止するあるいは経過を見ながら使用継続することで問題はないとの回答がなされ、総合機構はこれを了承した。

⑤ 高濃度本成分配合美容液の長期使用による白斑、色素脱失非形成確認試験

本試験は、本成分を ■%配合した製剤について、メラノサイトの数を減少、消失させないことを確認する目的で実施された。健康成人男子 10 名の手の甲に 1 日 1 回、6 カ月間被験物質を塗布し、皮膚科専門医により被験部位の観察及び被験者との問診を行い、白斑及び色素脱失等の色素異常の有無、副作用の有無をケースカードに記載した。

その結果、白斑及び色素脱失等の色素異常は確認されず、申請製剤における本成分配合量の 3 倍の濃度においても皮膚刺激等の副作用が発現しないことが確認された。

総合機構は申請者に対し、本製剤が薬用化粧品であることから、市販後の使用者の主体は女性と考えられるが、②の紫外線照射色素沈着に対する本製剤の既承認品との比較使用試験及び⑤の高濃度 K270 配合美容液の長期使用による白斑、色素脱失非形成確認試験については、被験者を男子とした理由を求めた。申請者から、とくに男子に限定したわけではないが、女性の参加希望者がいなかったこと、女性に対する安全性評価は前項の 317 名に対する製剤使用試験の結果で補完しようと考えた旨の回答がなされ、総合機構はこれを了承した。

3. 効能・効果、用法・用量、添付文書（案）及びその設定根拠

効能・効果、用法・用量及び添付文書（案）に関しては、効力試験の結果及び同種同効品の記載を参考に設定され、総合機構はいずれも妥当であると判断した。

4. 総合評価

以上のような審査の結果、総合機構は提出された申請内容について、本品目を医薬部外品として承認して差し支えないと判断し、化粧品・医薬部外品部会において審議されることが妥当であると判断した。

なお、本申請品目の 5, 5'-ジプロピルービフェニル-2, 2'-ジオールが医薬部外品として新規有効成分であることから、承認後、少なくとも 2 年間の安全性に関する市販後調査を実施することが適当と判断する。