

Knadle, S. (1985) Synergistic interaction between hydroquinone and acetaldehyde in the induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes in vitro. *Cancer Res* 45, 4853-4857.

Krasavage, W.J., Blacker, A.M., English, J.C. and Murphy, S.J. (1992) Hydroquinone: a developmental toxicity study in rats. *Fundam Appl Toxicol* 18, 370-375.

Kurata, Y., Fukushima, S., Hasegawa, R., Hirose, M., Shibata, M., Shirai, T. and Ito, N. (1990) Structure-activity relations in promotion of rat urinary bladder carcinogenesis by phenolic antioxidants. *Jpn J Cancer Res* 81, 754-759.

Lau, S.S., Hill, B.A., Highet, R.J. and Monks, T.J. (1988) Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: correlation of toxicity with increased glutathione substitution. *Mol Pharmacol* 34, 829-836.

Lau, S.S., Monks, T.J., Everitt, J.I., Kleymenova, E. and Walker, C.L. (2001) Carcinogenicity of a nephrotoxic metabolite of the "nongenotoxic" carcinogen hydroquinone. *Chem Res Toxicol* 14, 25-33.

Lau, S.S., Peters, M.M., Kleiner, H.E., Canales, P.L. and Monks, T.J. (1996) Linking the metabolism of hydroquinone to its nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity. *Adv Exp Med Biol* 387, 267-273.

Leopardi, P., Zijno, A., Bassani, B. and Pacchierotti, F. (1993) In vivo studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutat Res* 287, 119-130.

Levay, G. and Bodell, W.J. (1996) Role of hydrogen peroxide in the formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with benzene metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 44-49.

Levay, G., Pongracz, K. and Bodell, W.J. (1991) Detection of DNA adducts in HL-60 cells treated with hydroquinone and p-benzoquinone by 32P-postlabeling. *Carcinogenesis* 12, 1181-1186.

Levay, G., Ross, D. and Bodell, W.J. (1993) Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow. *Carcinogenesis* 14, 2329-2334.

Li, Y. and Trush, M.A. (1993) Oxidation of hydroquinone by copper: chemical mechanism and biological effects. *Arch Biochem Biophys* 300, 346-355.

Liu, L., Ling, X., Liang, H., Gao, Y., Yang, H., Shao, J. and Tang, H. (2012) Hypomethylation mediated by decreased DNMTs involves in the activation of proto-oncogene MPL in TK6 cells treated with hydroquinone. *Toxicol Lett* 209, 239-245.

Luo, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J. and Zhong, L. (2008) Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 173, 1-8.

Marrazzini, A., Betti, C., Bernacchi, F., Barrai, I. and Barale, R. (1994a) Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis* 9, 505-515.

Marrazzini, A., Chelotti, L., Barrai, I., Loprieno, N. and Barale, R. (1994b) In vivo genotoxic interactions among three phenolic benzene metabolites. *Mutat Res* 341, 29-46.

Maruyama, H., Amanuma, T., Nakae, D., Tsutsumi, M., Kondo, S., Tsujiuchi, T., Denda, A. and Konishi, Y. (1991) Effects of catechol and its analogs on pancreatic carcinogenesis initiated by

N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian hamsters. *Carcinogenesis* 12, 1331-1334.

McGregor, D. (2007) Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Crit Rev Toxicol* 37, 887-914.

McGregor, D.B., Brown, A., Cattanaach, P., Edwards, I., McBride, D. and Caspary, W.J. (1988a) Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay. II: 18 coded chemicals. *Environ Mol Mutagen* 11, 91-118.

McGregor, D.B., Riach, C.G., Brown, A., Edwards, I., Reynolds, D., West, K. and Willington, S. (1988b) Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. *Environ Mol Mutagen* 11, 523-544.

Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991) Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis* 6, 297-302.

Mishra, S.N., Dhurat, R.S., Deshpande, D.J. and Nayak, C.S. (2012) Diagnostic utility of dermatoscopy in hydroquinone-induced exogenous ochronosis. *Int J Dermatol* 52, 413-417.

Miyata, Y., Fukushima, S., Hirose, M., Masui, T. and Ito, N. (1985) Short-term screening of promoters of bladder carcinogenesis in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-initiated, unilaterally ureter-ligated rats. *Jpn J Cancer Res* 76, 828-834.

Morimoto, K. and Wolff, S. (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res* 40, 1189-1193.

Morimoto, K., Wolff, S. and Koizumi, A. (1983) Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by microsomal activation of benzene metabolites. *Mutat Res* 119, 355-360.

Murphy, S.J., Schroeder, R.E., Blacker, A.M., Krasavage, W.J. and English, J.C. (1992) A study of developmental toxicity of hydroquinone in the rabbit. *Fundam Appl Toxicol* 19, 214-221.

Nakamura, S. (1982) The effects of oral administration of resorcin, hydroquinone and phenol on the hematopoietic system in mice (in Japanese). *Osaka-Furitsu Koshu Eisei Kenkyusho* 25, 45-49.

Nakamura, S.I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I. and Sugimoto, K. (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutat Res* 192, 239-246.

Nerland, D.E. and Pierce, W.M., Jr. (1990) Identification of N-acetyl-S-(2,5-dihydroxyphenyl)-L-cysteine as a urinary metabolite of benzene, phenol, and hydroquinone. *Drug Metab Dispos* 18, 958-961.

Nielsen, H., Henriksen, L. and Olsen, J.H. (1996) Malignant melanoma among lithographers. *Scand J Work Environ Health* 22, 108-111.

NTP. (1989) Toxicology and carcinogenesis studies of hydroquinone (CAS No. 123-31-9) in F344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice (gavage studies). National Toxicology Program Technical Report Series, No.366, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.

Okazaki, S., Hoshiya, T., Takahashi, S., Futakuchi, M., Saito, K. and Hirose, M. (1993) Modification of

hepato- and renal carcinogenesis by catechol and its isomers in rats pretreated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *Teratog Carcinog Mutagen* 13, 127-137.

Pacchierotti, F., Bassani, B., Leopardi, P. and Zijno, A. (1991) Origin of aneuploidy in relation to disturbances of cell-cycle progression. II: Cytogenetic analysis of various parameters in mouse bone marrow cells after colchicine or hydroquinone treatment. *Mutagenesis* 6, 307-311.

Pathak, D.N., Levay, G. and Bodell, W.J. (1995) DNA adduct formation in the bone marrow of B6C3F1 mice treated with benzene. *Carcinogenesis* 16, 1803-1808.

Pellack-Walker, P. and Blumer, J.L. (1986) DNA damage in L5178YS cells following exposure to benzene metabolites. *Mol Pharmacol* 30, 42-47.

Peng, D., Jiaying, W., Chunhui, H., Weiyi, P. and Xiaomin, W. (2012) Study on the cytogenetic changes induced by benzene and hydroquinone in human lymphocytes. *Hum Exp Toxicol* 31, 322-335.

Pifer, J.W., Hearne, F.T., Swanson, F.A. and O'Donoghue, J.L. (1995) Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone. *Int Arch Occup Environ Health* 67, 267-280.

Poet, T.S., Carlton, B.D., Deyo, J.A. and Hinderliter, P.M. (2010) Hydroquinone PBPK model refinement and application to dermal exposure. *Food Chem Toxicol* 48, 3085-3092.

Poet, T.S., Wu, H., English, J.C. and Corley, R.A. (2004) Metabolic rate constants for hydroquinone in F344 rat and human liver isolated hepatocytes: application to a PBPK model. *Toxicol Sci* 82, 9-25.

Rao, G.S. (1991) Hematin catalysed autooxidation of hydroquinone or 1,2,4-benzenetriol. *Chem Biol Interact* 80, 339-347.

Rao, G.S., Siddiqui, S.M., Pandya, K.P. and Shanker, R. (1988) Relative toxicity of metabolites of benzene in mice. *Vet Hum Toxicol* 30, 517-520.

Reddy, M.V., Bleicher, W.T., Blackburn, G.R. and Mackerer, C.R. (1990) DNA adduction by phenol, hydroquinone, or benzoquinone in vitro but not in vivo: nuclease P1-enhanced <sup>32</sup>P-postlabeling of adducts as labeled nucleoside bisphosphates, dinucleotides and nucleoside monophosphates. *Carcinogenesis* 11, 1349-1357.

Ribas, J., Schettini, A.P. and Cavalcante Mde, S. (2010) Exogenous ochronosis hydroquinone induced: a report of four cases. *An Bras Dermatol* 85, 699-703.

Ribeiro, A.L., Shimada, A.L., Hebeda, C.B., de Oliveira, T.F., de Melo Loureiro, A.P., Filho Wdos, R., Santos, A.M., de Lima, W.T. and Farsky, S.H. (2011) In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology* 288, 1-7.

Robertson, M.L., Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (1991) Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 249, 201-209.

Roe, F.J. and Salaman, M.H. (1955) Further studies on incomplete carcinogenesis: triethylene melamine (T.E.M.), 1,2-benzanthracene and beta-propiolactone, as initiators of skin tumour formation in the mouse. *Br J Cancer* 9, 177-203.

- Saito, T. and Takeichi, S. (1995) Experimental studies on the toxicity of lithographic developer solution. *J Toxicol Clin Toxicol* 33, 343-348.
- Sakai, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S. (1985) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat Res* 156, 61-67.
- Schlosser, M.J., Shurina, R.D. and Kalf, G.F. (1990) Prostaglandin H synthase catalyzed oxidation of hydroquinone to a sulfhydryl-binding and DNA-damaging metabolite. *Chem Res Toxicol* 3, 333-339.
- Seaton, M.J., Schlosser, P. and Medinsky, M.A. (1995) In vitro conjugation of benzene metabolites by human liver: potential influence of interindividual variability on benzene toxicity 要確認. *Carcinogenesis* 16, 1519-1527.
- Seelbach, A., Fissler, B. and Madle, S. (1993) Further evaluation of a modified micronucleus assay with V79 cells for detection of aneugenic effects. *Mutat Res* 303, 163-169.
- Seely, J.C., Haseman, J.K., Nyska, A., Wolf, D.C., Everitt, J.I. and Hailey, J.R. (2002) The effect of chronic progressive nephropathy on the incidence of renal tubule cell neoplasms in control male F344 rats. *Toxicol Pathol* 30, 681-686.
- Shibata, M.A., Hirose, M., Tanaka, H., Asakawa, E., Shirai, T. and Ito, N. (1991) Induction of renal cell tumors in rats and mice, and enhancement of hepatocellular tumor development in mice after long-term hydroquinone treatment. *Jpn J Cancer Res* 82, 1211-1219.
- Shibata, M.A., Yamada, M., Hirose, M., Asakawa, E., Tatematsu, M. and Ito, N. (1990) Early proliferative responses of forestomach and glandular stomach of rats treated with five different phenolic antioxidants. *Carcinogenesis* 11, 425-429.
- Shiga, T., Suzuki, H., Yamamoto, A., Yamamoto, H. and Yamamoto, K. (2012) Hydroquinone, a benzene metabolite, induces Hog1-dependent stress response signaling and causes aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Radiat Res* 51, 405-415.
- Shimada, A.L., Lino-Dos-Santos-Franco, A., Bolonheis, S.M., Nakasato, A., Damazo, A.S., Tavares-de-Lima, W. and Farsky, S.H. (2012a) In vivo hydroquinone exposure causes tracheal hyperresponsiveness due to TNF secretion by epithelial cells. *Toxicol Lett* 211, 10-17.
- Shimada, A.L., Ribeiro, A.L., Bolonheis, S.M., Ferraz-de-Paula, V., Hebeda, C.B. and Farsky, S.H. (2012b) In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. *Toxicology* 296, 20-26.
- Silva Mdo, C., Gaspar, J., Duarte Silva, I., Faber, A. and Rueff, J. (2004) GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes and the genotoxicity of hydroquinone in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 43, 258-264.
- Smith, M.T., Yager, J.W., Steinmetz, K.L. and Eastmond, D.A. (1989) Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. *Environ Health Perspect* 82, 23-29.
- Snyder, R., Dimitriadis, E., Guy, R., Hu, P., Cooper, K., Bauer, H., Witz, G. and Goldstein, B.D. (1989)

- Studies on the mechanism of benzene toxicity. *Environ Health Perspect* 82, 31-35.
- Stenius, U., Warholm, M., Rannug, A., Walles, S., Lundberg, I. and Hogberg, J. (1989) The role of GSH depletion and toxicity in hydroquinone-induced development of enzyme-altered foci. *Carcinogenesis* 10, 593-599.
- Subrahmanyam, V.V., Doane-Setzer, P., Steinmetz, K.L., Ross, D. and Smith, M.T. (1990) Phenol-induced stimulation of hydroquinone bioactivation in mouse bone marrow in vivo: possible implications in benzene myelotoxicity. *Toxicology* 62, 107-116.
- Subrahmanyam, V.V., Kolachana, P. and Smith, M.T. (1991) Metabolism of hydroquinone by human myeloperoxidase: mechanisms of stimulation by other phenolic compounds. *Arch Biochem Biophys* 286, 76-84.
- Suzuki, J., Inoue, Y. and Suzuki, S. (1995) Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 18, 431-436.
- Topping, D.C., Bernard, L.G., O'Donoghue, J.L. and English, J.C. (2007) Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects. *Food Chem Toxicol* 45, 70-78.
- Tsutsui, T., Hayashi, N., Maizumi, H., Huff, J. and Barrett, J.C. (1997) Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res* 373, 113-123.
- Tunek, A., Hogstedt, B. and Olofsson, T. (1982) Mechanism of benzene toxicity. Effects of benzene and benzene metabolites on bone marrow cellularity, number of granulopoietic stem cells and frequency of micronuclei in mice. *Chem Biol Interact* 39, 129-138.
- Tunek, A., Olofsson, T. and Berlin, M. (1981) Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 59, 149-156.
- Van Hummelen, P. and Kirsch-Volders, M. (1992) Analysis of eight known or suspected aneugens by the in vitro human lymphocyte micronucleus test. *Mutagenesis* 7, 447-455.
- Vian, L., Van Hummelen, P., Bichet, N., Gouy, D. and Kirsch-Volders, M. (1995) Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the in vitro micronucleus test on isolated lymphocytes. *Mutat Res* 334, 1-7.
- Walles, S.A. (1992) Mechanisms of DNA damage induced in rat hepatocytes by quinones. *Cancer Lett* 63, 47-52.
- Warr, T.J., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1993) A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. *Mutat Res* 287, 29-46.
- Wester, R.C., Melendres, J., Hui, X., Cox, R., Serranzana, S., Zhai, H., Quan, D. and Maibach, H.I. (1998) Human in vivo and in vitro hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition 要確

認. J Toxicol Environ Health A 54, 301-317.

Wierda, D. and Irons, R.D. (1982) Hydroquinone and catechol reduce the frequency of progenitor B lymphocytes in mouse spleen and bone marrow. Immunopharmacology 4, 41-54.

Xu, W. and Adler, I.D. (1990) Clastogenic effects of known and suspect spindle poisons studied by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. Mutagenesis 5, 371-374.

Yager, J.W., Eastmond, D.A., Robertson, M.L., Paradisin, W.M. and Smith, M.T. (1990) Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. Cancer Res 50, 393-399.

Yamaguchi, S., Hirose, M., Fukushima, S., Hasegawa, R. and Ito, N. (1989) Modification by catechol and resorcinol of upper digestive tract carcinogenesis in rats treated with methyl-N-amyl nitrosamine. Cancer Res 49, 6015-6018.

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

化粧品の自主的配合原料の安全性確認に必要とされるリスク評価情報の収集に関する研究（H24-特別-指定-028）

化粧品原料の体内動態に関する情報収集と解析手法に関する研究

研究分担者 杉林 堅次 城西大学 薬学部 教授

研究協力者 藤堂 浩明 城西大学 薬学部 助教

要旨

皮膚に塗布する薬物の安全性を評価するためには、薬物含有製剤からの薬物放出性や薬物の皮膚透過性を調査する必要がある。In vitro 放出試験や皮膚透過性試験より得られた値を用いて、拡散モデルや convolution 法などの数学的アプローチより皮膚に適用した薬物の皮内動態や全身循環系移行後の体内動態を予測することが出来る。本研究では、これら試験により市販ハイドロキノン（HQ）含有製剤の安全性評価のため経皮吸収について検討を行った。HQ の皮膚透過係数より HQ の安全性は、皮膚局所毒性だけでなく、全身毒性についても考える必要があることが示唆された。また、HQ 放出性が著しく高い製剤は、HQ の皮膚透過性も他の製剤と比較して高い値を示した。このことから、高い皮膚透過性を示した HQ2 は、HQ が全身循環系へ容易に移行する可能性が示唆された。HQ の安全性を保つためには、製剤からの HQ の皮膚透過性だけでなく、HQ 放出性についても試験する必要があると考えられた。

A. 目的

ハイドロキノン含有製剤からのハイドロキノンの放出性および皮膚透過性を調べ、ハイドロキノン含有製剤の安全性を評価する。また、皮膚透過性より得られたハイドロキノンの皮膚透過および静脈内投与後の体内動態パラメータよりハイドロキノン含有製剤塗布後もしくは塗布後のヒトでの AUC を予測する。

(HQ1、HQ2、HQ3、HQ4)を用いた。

その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。体重 220-260 g の雄性ヘアレスラット（WBN/ILA-Ht 系）は城西大学生命科学研究センター（埼玉、日本）から購入した。なお、すべての動物実験は、城西大学の倫理委員会の承諾を得たのち、倫理規定に従って行った。

B. 実験方法

B-1. 試薬及び実験材料

4 種のハイドロキノン含有製剤

B-2. 製剤からのハイドロキノン放出試験

製剤からのハイドロキノン放出性

は透析用セルロースチューブ (UC24-32-100、エーディア株式会社、東京、日本) を用いて評価した。透析用セルロースチューブをハサミで切り開いた後に、精製水で水和した。水和後、一方のセル (Fig.1 の左側) にヒドロキノン含有製剤を約 250 mg、もう一方のセル (同右側) に精製水を適用して放出試験を行った。実験中セル内は 32°C に保ち、レシーバーセル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーによって回転させることで攪拌した。経時的にレシーバー側セルから 0.5 mL サンプルングを行い、その都度、同量のレシーバー液を補充した。採取した溶液をサンプル溶液とした。

### B-3. *In vitro* 皮膚透過実験

ペントバルビタールナトリウム (50

mg/kg, *i.p.*) 麻酔下、剃毛処理を行った雄性ヘアレスラット腹部皮膚を正中線を挟んで左右 2 枚ずつ摘出した。皮膚摘出後、真皮側の脂肪と血液を丁寧に除去し、横型拡散セル (有効透過面積: 0.95 cm<sup>2</sup>) に装着した。角層側および真皮側に精製水を適用して 1 時間水和した。水和後、角層側に市販品のヒドロキノン製剤を約 250 mg 適用して透過試験を行った。実験中セル内は 32°C に保ち、セル内はマグネティックスターラーを用いてスターヘッド型攪拌子を攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL のサンプルングを行い、その都度同量の精製水を補充した。採取したサンプル中ヒドロキノン濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。Figure 1 に透過試験および放出試験で使用した拡散セルを示す。

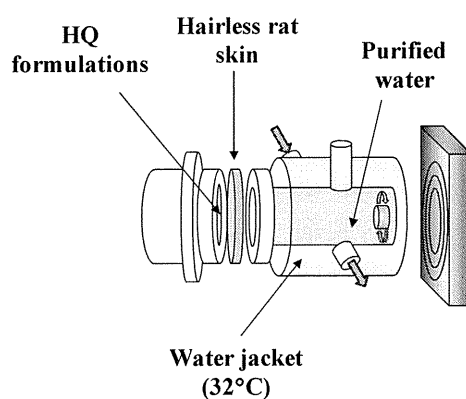


Fig. 1 Set-up of side-by-side diffusion cell for release or *in vitro* permeation experiment.

### B-4. ヒドロキノンの静脈内投与

ヘアレスラットにウレタン麻酔 (1.0



g/kg, i.p.) を施し、*In vivo* 実験を行った。実験中はホットカーペットを用いて動物の体温を維持した。生理食塩液を用いて調製した 0.1mL の 2% ハイドロキノン溶液を頸静脈内単回投与後、投与したのとは反対側の頸静脈より経時的 (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 min) に採血 (0.2 mL) した。得られた血液サンプルは直ちに遠心分離 (15,000 rpm、4°C、5 min) し、血漿 (0.1 mL) を 1.5

mL マイクロチューブに分取し、-30°C で冷凍保存した。

#### B-5. ハイドロキノンの定量法

放出試験および透過試験で得られたサンプル溶液はメタノールと 1 : 1 で混合した後に、遠心分離を行った (15,000 × g、5 min、4°C)。その後、得られた上清を HPLC を用いて測定した。Table 2 に HPLC システムを、Table 3 に HPLC 条件を示す。

Table 2 HPLC systems for determination of HQ

Pump	LC-20AD	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Degasser	DGU-20A <sub>3</sub>	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Column oven	CTO-20AC	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Fluorescence detector	RF-10A <sub>XL</sub>	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Auto sampler	SIL-20A	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Communication bus mobile	SBM-20A	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.
Analysis software	LC solution	Shimadzu Co., Kyoto, Japan.

Table 3 HPLC condition for determination of HQ

Mobile phase	Water : methanol = 75 : 25
Column	Inertsil <sup>®</sup> ODS-3 5μm 4.6 × 150 mm
Column temperature	40°C
Detection wavelength	Ex.280 nm, Em 310 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	5 μL

#### B-6. ハイドロキノンの経皮投与後の血中濃度推移の予測

B-3 より得られたハイドロキノンの経皮透過プロファイルより、皮膚透過パラメータ (皮膚透過速度 (flux)、拡散パラメータ ( $DL^2$ )、分配パラメータ ( $KL$ )) を算出し、0.5 g の 2%ハ

イドロキノン含有製剤を顔全体 (400 cm<sup>2</sup>) に塗布した時の血中濃度を計算した。塗布後 12 時間までの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を算出した。また、製剤は、塗布後 6 時間経過後にも 0.5 g を再塗布した。また、ここでは L を 0.06 cm とした。

## B-7. 皮膚透過パラメータの算出

ハイドロキノンの皮膚透過挙動から皮膚中濃度を解析するために、差分法を用いて解析を行った。まず、ヘアレスラット皮膚を均一な1層の膜から

成るモデルと仮定すると、物質の膜中拡散性は、次式に示す Fick の拡散第2法則で表すことができる。薬物濃度  $C_{skin}$ 、皮膚中の位置を表す  $x$  そして時間  $t$  は Fick の拡散第2法則から以下のようにになる。

$$\frac{\partial C_{skin}}{\partial t} = D_{skin} \frac{\partial^2 C_{skin}}{\partial x^2} \quad \dots (1)$$

$D_{skin}$  は皮膚中の薬物の有効拡散係数を表す。初期と境界条件は以下のようにした。

$$\begin{aligned} t=0 \quad 0 < x < L_{skin} \quad C_{skin} &= 0 \\ t > 0 \quad x=0 \quad C_{skin} &= K_{skin} \cdot C_d \quad \text{and} \quad \frac{dC_d}{dt} = D_{skin} \frac{dC_{skin}}{dx} \\ x=L_{skin} \quad C_{skin} &= 0 \end{aligned}$$

$L_{skin}$  は皮膚の厚さ、 $K_{skin}$  はドナー溶液から皮膚への薬物の分配係数そして  $C_d$  はドナー溶液中の薬物濃度である。薬物濃度  $C_{skin}$ 、皮膚中の位置を表す  $x$  そして時間  $t$  は初期条件と境界条件か

ら Fick の拡散第2法則を用いて計算できる。さらにレシーバー側への皮膚透過速度  $J$  は Eq. (2) より表せる。単位面積当たりに透過した薬物の累積透過量  $Q$  は Eq. (3) で表すことができる。

$$J = -D_{skin} \left( \frac{dC_{skin}}{dx} \right)_{x=L_{skin}} \quad \dots (2)$$

$$Q = -D_{skin} \int_0^t \left( \frac{dC_{skin}}{dx} \right)_{x=L_{skin}} dt \quad \dots (3)$$

Eq. (1) は次式に変換することができる。

$$\frac{dC_{i,j}}{dx} = \frac{1}{\Delta x} (C_{i,j+1} - C_{i,j}) \quad \dots (4)$$

$$\frac{d^2 C_{i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{i-1,j} - 2C_{i,j} + C_{i+1,j}) \quad \dots (5)$$

$C_{i,j}$ は*i*番目の位置の*j*時間目の薬物濃度を表す。 $\Delta x$ は $x_{i+1}-x_i$ を $\Delta t$ は $t_{j+1}-t_j$ を表す。Eq. (4)と Eq. (5)を Eq. (1)に代入すると次式が得られる。

$$C_{i,j+1} = rD_{skin}C_{i-1,j} + (1 - 2rD_{skin})C_{i,j} + rD_{skin}C_{i+1,j} \quad \dots (6)$$

$r$ は $\Delta t/\Delta x^2$ を表す。差分式を使うと Eq. (2)と Eq. (3)はそれぞれ Eq. (7)と Eq. (8)になる。

$$J_j = -D_{skin} \frac{C_{n+1,j} - C_{n,j}}{\Delta x} \quad \dots (7)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + J_j \cdot \Delta t \quad \dots (8)$$

$n$ は皮膚の区分数を表す。その後 $J_j$ は $n=10$ にセットしてMicrosoft® Excelを用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$ は $D_{skin} \Delta t/\Delta x^2$ に対して0.5未満になるようにセットした。 $Q_j$ はEq. (8)を使って $J_j$ から計算した。有効拡散係数 $D_{skin}$ と分配係数 $K_{skin}$ は最小二乗法を使って得たデータにフィッティングすることにより得られた。最小二乗法はMicrosoft® Excel Solverを使って行った。計算条件は制限時間100 s、反復回数100回、精度0.000001、基本公差5%、収束0.001とした。Pseudo-Newtonian methodはアルゴリズムとして用いた。

#### B-8. 全身消失パラメータの算出

静脈内投与後のハイドロキノンの動態は線形1-コンパートメントモデル式(9)で示される。得られた血中濃度を式(9)に当てはめ、非線形最小二乗法(algorithm : Damping Gauss-Newton 法)によりカーブフィッティングし、体内動態パラメータを算出した。

$$X = X_0 e^{-Kel t}$$

… (9)

ここで、 $X$ は体内化合物量、 $X_0$ は投与量、 $Kel$ は消失速度定数、 $t$ は時間を示す。

#### B-9. 全身消失パラメータの算出

薬物の消失速度が線形であり、*in vivo*と*in vitro*の透過性が等しいと仮定し、コンボリューション法により、*in vitro*実験と静脈内投与後の消失データから*in vivo*での皮膚透過後の血中濃度を予測した。

#### C. 結果・考察

Figure 1に2%ハイドロキノン水溶液を皮膚適用後のHQの皮膚透過プロファイルを示す。HQは角層を透過し、その透過係数は $1.6 \times 10^{-7}$  cm/sであることが分かった。この結果より、HQの安全性は、皮膚局所毒性だけでなく、全身毒性についても考える必要があることが示唆された。

Figure 2 にハイドロキノン含有製剤を皮膚に塗布した後の、HQ 透過率を示す。単位面積あたりの皮膚透過率は、 $HQ2 \gg HQ4 > HQ1 > HQ3$  の順であった。HQ2 からの HQ 透過率は、他の製剤と比較しても著しく高いことが分かった。これは、HQ の製剤からの高い放出率と関係していると考えられた。その他製剤の HQ 透過率の順は、製剤からの HQ 放出率の順と必ずしも一致しなかったが、HQ の製剤からの皮膚透過率を抑えるためには、HQ の製剤からの放出率を抑える必要があることが分かった。HQ の皮膚透過係数は、 $HQ2; 3.1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 、 $HQ4; 1.1 \times 10^{-8} \text{ cm/s} > HQ1; 7.0 \times 10^{-9} \text{ cm/s} > HQ3; 1.2 \times 10^{-9} \text{ cm/s}$  であった。HQ2 の透過性数は非常に高く、本製剤からは HQ が全身循環系へ容易に移行する可能性が示唆された。また、HQ2 以外の製剤は、製剤化により HQ の透過性が低下した。

Figure 3 にハイドロキノン含有製剤からのハイドロキノン (HQ) の単位面積あたりの放出率を示す。各製剤中の HQ 含有量が異なるため、放出率を求め比較した。Figure 1 から明らかなように、HQ2 からの HQ 放出率は、他の製剤と比較して 3-10 倍高値を示し、8 時間経過後には製剤中 HQ の約 30% が放出されていることが分かった。HQ2 の次に、HQ3 からの HQ の放出率が高く、HQ1 および HQ4 からの HQ 放出率はほぼ同程度であった。この結果より、HQ2 からは容易に HQ が放出されることが分かった。以上の

結果より、HQ の皮膚透過性と製剤からの放出性は関係していることがわかった。よって、HQ の製剤からの放出性を抑えることで、全身循環系への移行性も抑えることができると考えられた。

皮膚透過性試験から得られた HQ2 からのハイドロキノンの皮膚透過パラメータは、 $K$  が 0.32、 $D$  が  $2.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  であった。これらのパラメータを用いて、0.5 g の HQ2 を顔全体 ( $400 \text{ cm}^2$ ) に塗布したときのハイドロキノンの累積皮膚透過量を計算し、さらに各時間での透過速度を算出した。得られた皮膚透過速度と HQ の消失パラメータより、ヒトでの AUC を計算した結果、8 時間塗布後洗顔をした場合 (夜 1 回塗布し、朝洗顔した場合)、血中 HQ は約 30 時間後にほぼゼロとなり 24 時間までの AUC は  $0.183 \text{ mg} \cdot \text{h/l}$ 、30 時間までの AUC は  $0.186 \text{ mg} \cdot \text{h/l}$ 、と計算され (Fig. 4)、また、塗布後 8 時間後に洗顔し、一度製剤を取り除いた後再度塗布した場合 (夜朝各 1 回塗布した場合) は  $0.31 \text{ mg} \cdot \text{h/L}$  と計算された (Fig. 5)。一方、吸収速度定数を  $0.75 \text{ h}^{-1}$ 、消失速度定数を  $2.1 \text{ h}^{-1}$  とし経口投与にて  $5.95$  および  $9.78 \text{ mg/kg/day}$  をラットへ投与時の AUC を計算すると  $3.93 \text{ mg/L h}$  および  $6.46 \text{ mg/L h}$  となることがわかった。

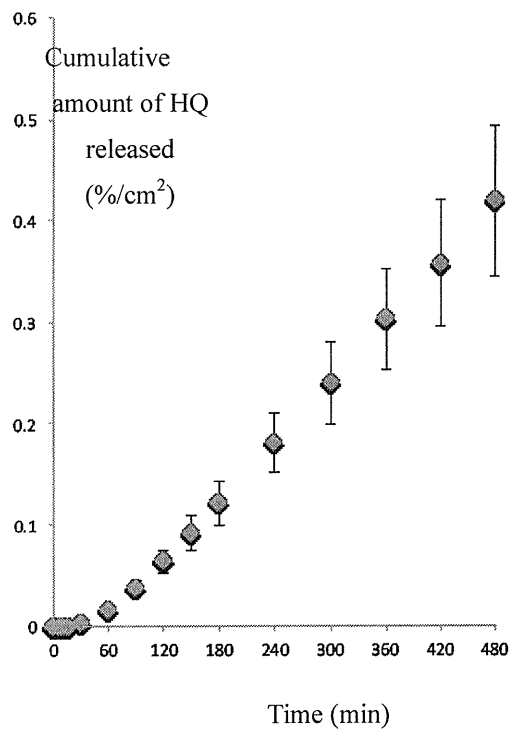
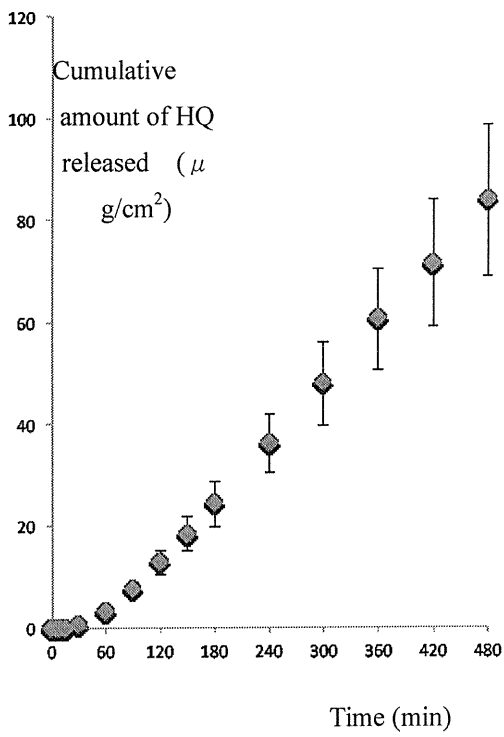


Fig. 1 Cumulative amount (a) or percentage (b) of hydroquinone permeated from 2 % its solution.

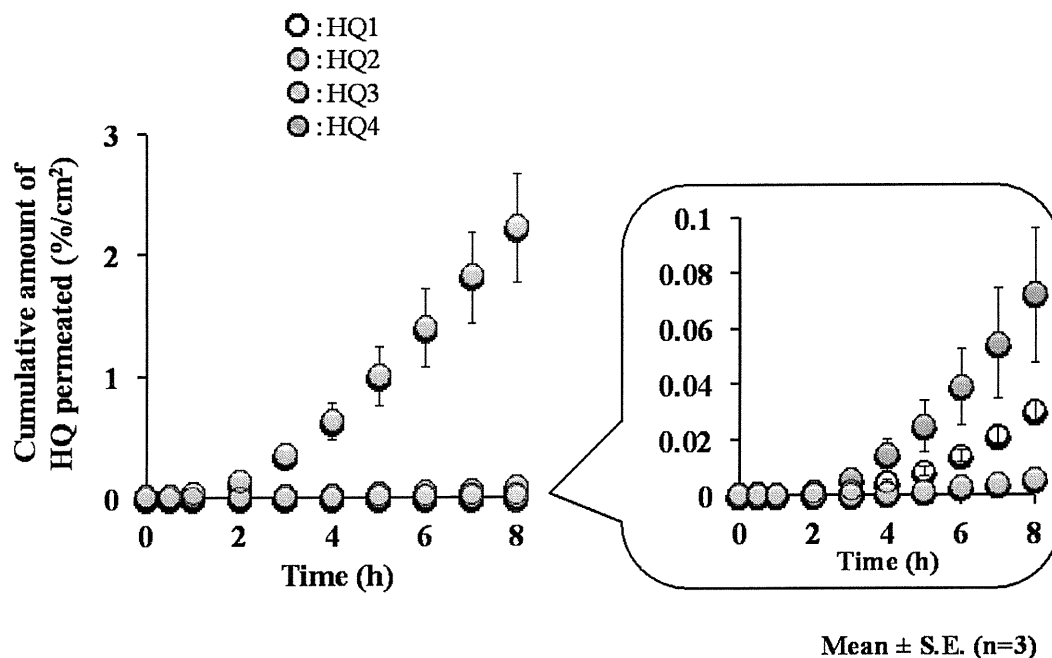


Fig. 2 Cumulative amount of hydroquinone permeated that through hairless rat skin.

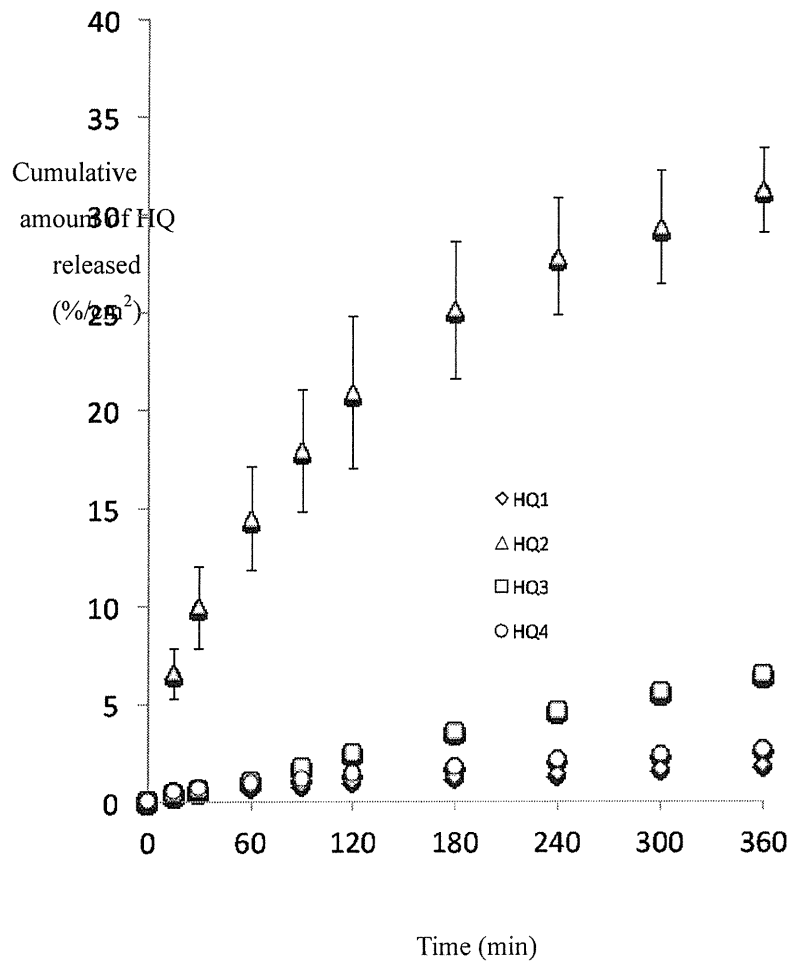


Fig. 3 Cumulative amount of hydroquinone released from each formulation

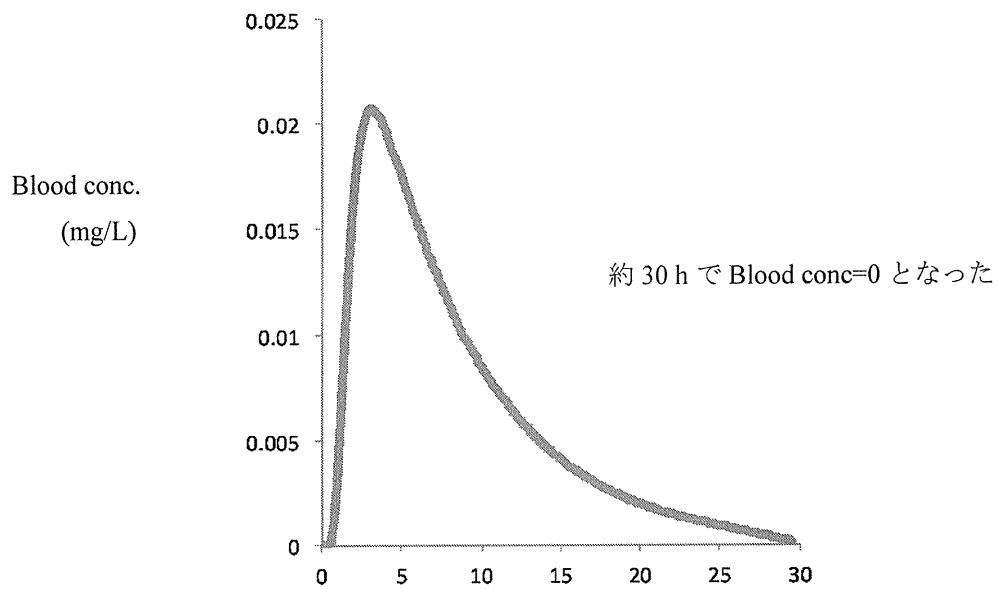


Fig.4 0.5 g の HQ2 製剤を顔面 (400cm<sup>2</sup>) に 8 時間塗布後のヒト血中濃度の予測

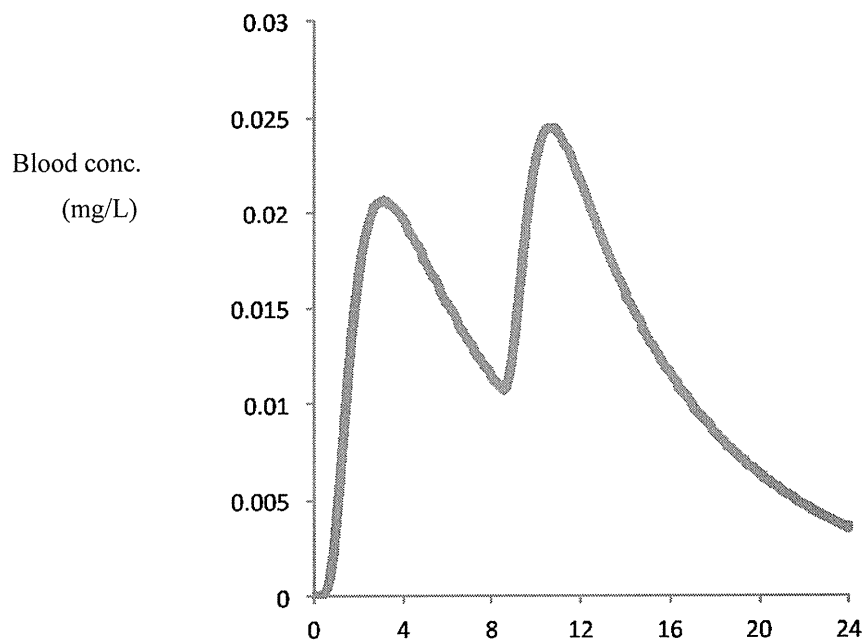


Fig.5 0.5 g の HQ2 製剤を顔面 (400cm<sup>2</sup>) に 8 時間毎に塗布後のヒト血中濃度の予測  
 : 顔面に繰り返し塗布する際には、洗顔を行い予め塗布した製剤を完全に皮膚表面より除去した。



## 化粧品原料の皮膚吸収性の評価手法に関する研究

研究分担者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

研究要旨:化粧品に自主的に配合されるハイドロキノン<sup>1</sup>の安全性確認に必要とされるリスク評価情報の収集を目的として、動物にハイドロキノン水溶液や配合製剤を投与した場合の血中濃度を継続的に測定することを試みた。まず製品をテトラヒドロフランに溶解した後に水を加えて抽出し、ODS カラムを用いた UPLC で定量することにより市販 4 製剤中のハイドロキノン含量を 1.0%、3.3%、2.6%、0.3%と定量出来た。2 製剤は米国で化粧品として使用できるハイドロキノン含量を超えていた。水溶液を静脈に単回投与した場合の血漿では、1 分後の血中濃度が最も高く、急速に低下することが観察された。この水溶液をテープストリッピングした腹部に塗布した場合、60 分後の 2.2ppm が最大であった。市販 4 製剤では、3 製剤の場合は血漿中にハイドロキノンが検出できなかったが、最も皮膚透過性の高い製剤 2 を塗布した場合も最大濃度は 60 分後の 4.6ppm であるなど、体内動態解析に利用するデータを収集できた。

キーワード:化粧品、ハイドロキノン、UPLC、ラット、血中濃度

### 協力研究者

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  
藤堂浩明 城西大学薬学部 薬粧品動態制御学教室 助教

本研究事業では、ハイドロキノンの有害性情報を収集・整理する共に、トランスジェニック動物を用いた試験による遺伝毒性を明らかにする一方で、化粧品原料料として使用した場合の暴露評価を行い、その結果推定されるリスクを定量的に評価する。最終的には製造・販売企業が製品の安全性に最大限配慮するために必要な有害性および暴露評価情報の収集および評価の実施に関する指針案を作成することを目的とする。

その分担研究として行う本研究では、ハイドロキノン<sup>1</sup>を簡便に感度よく定量する分析系を確立し、次にラットにハイドロキノンや配合製剤を数種類の方法で投与して血漿中濃度を測定することにより、体内動態を考察するための情報を得ることを目的とする。

### A. 研究目的

化粧品には企業の自己責任のもと自由に種々の成分を配合できるよう規制緩和されている。ところが、現在、店頭あるいはインターネットを通じて流通している多数の化粧品の原料における安全性について、企業がどのような安全性に関する資料に基づいて配合の適否を判断しているのかは、必ずしも明確でない場合も多い。特に、海外において厳しい規制下に置かれているハイドロキノン<sup>1</sup>については、その安全性評価がどのような情報に基づいているのかについては、必ずしも明らかにされていない。

### B. 研究方法

#### 1. 試料及び試薬

ハイドロキノン<sup>1</sup>は和光純薬工業製特級試薬を用い

た。テトラヒドロフランはシグマアルドリッチジャパン製 HPLC 用試薬を用いた。HPLC 溶媒は和光純薬工業製 HPLC 用メタノール及びミリポア社製超純粋製造装置で製造した水を用いて調製した。

## 2. 製剤

ハイドロキノンを含むと表示されている市販クリーム製剤 1, 2, 3, 4 を使用した。

## 3. 実験動物

雄性ヘアレスラット(WBN/ILA-Ht 系、8 週令)を城西大学生命科学研究センターより購入し、餌(オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本)および水は自由に摂取可能とした。

実験前日、ペントバルビタールナトリウム麻酔下(50.0 mg/kg, i.p.)のヘアレスラット腹部皮膚を剃毛した。12 時間絶食を行った後、ヘアレスラットにウレタン麻酔(1.0 g/kg, i.p.)を施し、In vivo 実験を行った。実験中はホットカーペットを用いて動物の体温を維持した。

## 4. 製剤中ハイドロキノン濃度の測定

精密に重量を測定したマイクロチューブに 50  $\mu$ L の製品を取り、重量を精密に測定し、製品重量の 4.5 倍量のテトラヒドロフランを加え、激しく攪拌して完全に溶解させた。さらに 4.5 倍量の水を加えて 5 分間超音波処理した後に遠心し、上清のうち下層を取り、水で正確に 10 倍に希釈して UPLC に供した。試薬のハイドロキノンに水を溶解して調製した標準溶液を用いた絶対検量線法により定量を行った。

## 5. 血漿中ハイドロキノン濃度の測定

### (1) 静脈内投与後の血中濃度の測定

生理食塩液を用いて調製した 2%、5%および 10% HQ を頸静脈内単回投与(10, 50 and 150 mg/kg, i.v.)後、投与したのとは反対側の頸静脈より経時的(1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 min)に採血(0.2 mL)した。

### (2) 皮膚表面へ適用後の血中濃度の測定

左腹部中央にアロンアルファを用いてセル(有効透過面積 1.77 cm<sup>2</sup>)を貼り付け、精製水を用いて調製した 2% HQ を 1 mL 適用した。(Intact)

セロハンテープ(ニチバン株式会社)を用いて腹部皮膚を 20 回テープストリッピング後、Intact と同様に 2% HQ を適用した。(Stripped)

セロハンテープ(ニチバン株式会社)を用いて腹部皮膚を 20 回テープストリッピング後、左腹部中央の有効透過面積部分(1.77 cm<sup>2</sup>)にゴム手袋をした人差し指で HQ 製剤(約 100 mg)を 30 秒間擦り込んだ。その後、皮膚表面に残った HQ 製剤を拭き取り、HQ 製剤を充填した軟膏用セルを適用した。(製剤)

適用後、経時的(0, 30, 60, 120, 180, 240 min)に頸静脈より採血(0.2 mL)した。

### (3) ハイドロキノン濃度の測定

得られた血液サンプルは直ちに遠心分離(15,000 rpm, 4°C, 5 min)し、血漿(0.1 mL)を 1.5 mL マイクロチューブに分取し、-30°C で冷凍保存した。

解凍後、そのまま、あるいは水で正確に 5 倍に希釈した後に UPLC に供した。試薬のハイドロキノンに水を溶解して調製した標準溶液を用いた絶対検量線法により定量を行った。

## 6. UPLC

装置は ACQUITY UPLC system H-CLASS (Waters)を用いた。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 (size, 2.1 mm i.d.  $\times$  50 mm; particle size, 1.7  $\mu$ m; Waters)を用いた。移動相は 5%アセトニトリルまたは 10%アセトニトリルとし、流量は 0.1 mL/min とした。検出器の測定波長は 210–400 nm とし、定量では 288–289 nm とした。

## C. 研究結果

### 1. 製剤中ハイドロキノン濃度

5%メタノールを溶媒として用いた場合、ハイドロキノン約 2.1 min で溶出された。製剤 1, 2, 3, 4 中のハイドロキノン含量はそれぞれ 1.0%、3.3%、2.6%、0.3%であった。

## 2. 血漿中ハイドロキノン濃度

血漿試料のUPLC分析では、保持時間約 1.1 min に巨大なピークが観察され、保持時間約 2.1 min のハイドロキノンテーリングの中で溶出されたが、定量は可能であった。Fig. 1 に標準溶液と典型的な血漿試料のクロマトグラムを示す。

ハイドロキノン水溶液を静脈に単回投与した場合の血漿中ハイドロキノン濃度を Table 1 に示す。投与 1 分後が最もハイドロキノン濃度が高く、また、投与濃度が高いほど血漿中濃度が高かった。投与後に時間が経過するとハイドロキノン濃度は減少し、10% 溶液を投与した場合でも 60 min までに検出限界以下となった。

2%水溶液を腹部に塗布した場合の結果を Table 2 に示す。テープストリッピングした腹部に塗布した場合、60 分後の 2.2ppm が最大であった。ストリッピングを行わなかった場合は、ハイドロキノンを検出できなかった。

製剤をテープストリッピングした腹部に塗布した場合の血漿中ハイドロキノン濃度を Table 3 に示す。In vitro 透過実験で最も皮膚透過性の高い製剤 2 を塗布した場合も最大濃度は 60 分後であり、4.6ppm であった。他の 3 製剤の場合は血漿中にハイドロキノンを検出できなかった。

## D. 考察

試験した製剤のうち 2 製剤は米国で化粧品として使用できる 2%未満のハイドロキノン含量であったが、2 製剤はこれを超えていた。血漿中のハイドロキノン含量については UPLC/MS による定量を試みたが、血漿成分によるイオン化の阻害が見られたため、製剤と同様に UV により検出と定量を行った。

静脈投与した場合には 1 分後の血中濃度が最も高く、急速に低下することが観察された。代謝過程が急速に進行することが示唆された。水溶液及びそれと同程度の皮膚透過性を持つ製品をテープストリッピング後に塗布した検液については体内動態解

析に利用するデータを収集できたが、他の製剤では血漿中からハイドロキノンを検出することができなかった。

## E. 結論

製品をテトラヒドロフランに溶解した後に水を加えて抽出して ODS カラムを用いた UPLC に供することによりハイドロキノン含量を定量することができた。水溶液を静脈に単回投与した場合の血漿では、投与直後の血中濃度が最も高く、代謝により急速に低下することが観察された。テープストリッピングしたヘアレスラット腹部に試料を塗布した場合、水溶液及びこれと同程度の皮膚透過性を持つ製剤では体内動態解析に利用するデータを収集できた。

## 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

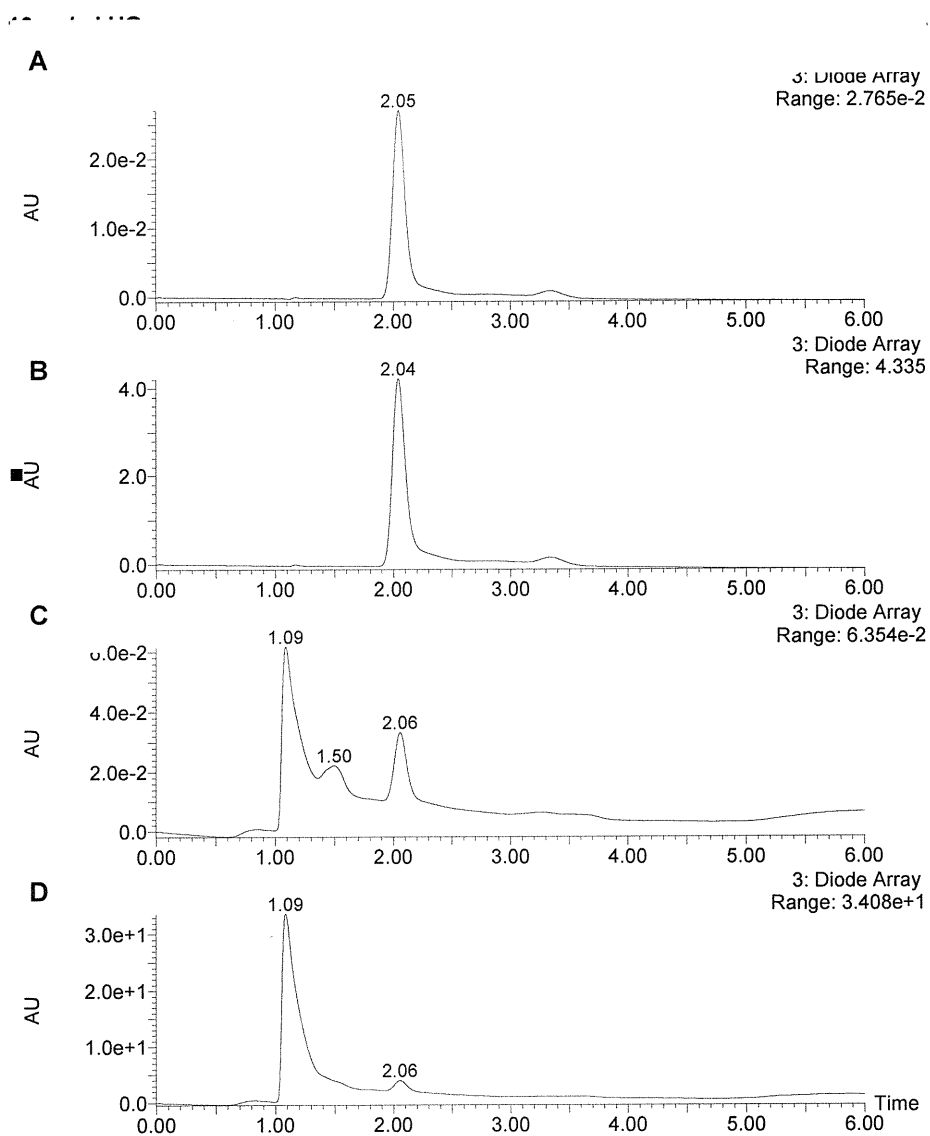


Fig. 1. UPLC analysis of rat plasma after hydroquinone administration. A, aqueous hydroquinone solution detected at 288–289 nm. B, aqueous hydroquinone solution detected at 210–400 nm. C, rat plasma taken at 1 min after administration of 10% hydroquinone solution detected at 288–289 nm. D, rat plasma taken at 1 min after administration of 10% hydroquinone solution detected at 210–400 nm.