

## 原因究明に関する調査研究 ・ロドデノールの細胞毒性に関する研究

研究協力者 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:

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(ロドデノール)を配合した美白化粧品の使用者に白斑が生じる事例が多数発生し、大きな問題になった。我々はロドデノールが皮膚のメラノサイトやケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび製造原料である 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン)が各種細胞に与える影響を調べた。また、これら化合物の細胞内酵素による化学変化についても検討した。キラルカラムおよび ODS カラムを装着した HPLC により、製品に配合されていたロドデノールは光学異性体混合物であり、*R:S* 存在比はほぼ 1:1 であること、ロドデノール中のラズベリーケトン、製品へのラズベリーケトンの混入はごくわずかであることがわかった。ロドデノールの水酸化体はヒトメラノサイトおよびヒトケラチノサイト(HaCaT 細胞)のいずれに対してもロドデノールおよびラズベリーケトンに比べて強い細胞毒性が認められた。ロドデノールおよびラズベリーケトンを添加した細胞の培養上清中にはそれぞれの水酸化体が検出された。またこれらの化合物はチロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代謝されることを確認した。以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等により水酸化体に代謝され、これらがメラノサイトの細胞死に強く関与することが示唆された。

### A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売するロドデノール(4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール, HPBoI, 図1)を配合した薬用化粧品は、医薬部外品として、平成18年7月に申請され、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。4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(ラズベリーケトン, HPBoII, 図1)から合成されて製品に配合される。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ことから、原因究明が急務となっている。

本研究では、ロドデノールが皮膚のメラノサイトや

ケラチノサイトを傷害している可能性があると考え、ロドデノールおよび合成原料であり白斑の原因となるとの報告(Fukuda *et al.*, *J. Occup. Health*, **40**, 118 (1998))のあるラズベリーケトンが各種細胞に与える影響を調べる。また、これら化合物の細胞内酵素による化学変化についても検討する。

### B. 研究方法

#### 1. 試料および試薬

ロドデノール, 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノール(DHPBoI), 4-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-ブタノン(DHPBoII)はカネボウより提供頂いた。ラズベリーケトンは和光純薬工業より購入した。HPLC および LC/MS 分析では、メタノールに溶解して使用した。細胞への曝露実験では、500 mg/ml となるように DMSO で溶解したものを、使用時まで 4 で保存し

た。

ロドデノールを配合した医薬部外品はカネボウより提供いただいた。

マッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入した。50 mmol/L KPB (pH6.5) で 10,000U/mL になるよう希釈して使用した。

## 2. 細胞および培地

ヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) は、東北大学農学研究科仲川清隆准教授よりご提供頂いた。培地は DMEM (Sigma-Aldrich 社) に 10% FBS (Gibco), 抗菌剤 (Gibco, Cat. No. ;15240-062) を添加した培地を用いた。1 × 10<sup>6</sup> cells/75 cm<sup>2</sup> Flask の細胞密度で播種し、約 3~4 日毎に継代した。

ヒト正常メラノサイトは、クラボウより購入した African American の新生児包皮表皮由来 (Cat No. KM-4009, No.01392) を用いた。細胞は抗菌剤ゲンタマイシン・アンフォテリシン B (クラボウ) を添加した推奨培地 (DermaLife M, クラボウ) に培地で培養した。

## 3. 医薬部外品製品中からの抽出

試料 0.4 g に 15 mL のメタノールを加え、5 分間の超音波処理を 2 回施し、20 mL に定容した。これを 0.2 μm のフィルターでろ過して HPLC または LC/MS に供した。

## 4. キラルカラムを用いた HPLC

装置は 1100 システム (Agilent 社) を用いた。HPLC 条件は以下のとおり。

カラム: Chiral CD-Ph (2.0 mm i.d. × 250 mm; particle size, 5 μm; Shiseido), カラム温度: 40 , 移動相: 25% acetonitrile, 流量: 0.2 mL/min, 検出: 280 nm。

## 5. 逆相カラムを用いた HPLC および LC/MS

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters 社) を用いた。HPLC および MS 条件は以下のとおり。

カラム: ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d. ×

100 mm; particle size, 1.7 μm; Waters 社), カラム温度: 40 , 移動相: 40%メタノール, 0.02% TFA, 流量: 0.2 mL/min, イオン化: ESI positive, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 120 , 脱溶媒温度: 350 , 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, コーンガス流量: 50 L/hr, 検出: SCAN mode (m/z 50-600)。

## 6. 試験物質の細胞への曝露

HaCaT細胞は 1.0 × 10<sup>5</sup> cells/ml, ヒトメラノサイトは 1.2 × 10<sup>5</sup> cells/ml となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴プレートに 100 μl/well 播種して約 24 時間前培養した。試験物質の DMSO 溶液を培地で 100 倍に希釈して検液を調製した。各 well から上清を取り除き、検液 100 μl/well を加え (DMSO 最終濃度は 1.0%), CO<sub>2</sub> インキュベータ内でさらに約 24 時間培養した。

ヒトメラノサイトに対する DHPBoI および DHPBone の曝露実験では、2.4 × 10<sup>5</sup> cells/ml の細胞懸濁液 50 μl/well を 24 時間前培養し、培養上清を取り除かずに 50 μl/well の検液を加えた。検液は、最終曝露濃度の 500 倍濃度の試験物質の DMSO 溶液を培地で 250 倍に希釈して調製した (DMSO 最終濃度は、0.2%)。

細胞に同濃度の DMSO を曝露した well をポジティブコントロール、無細胞の DMSO を曝露した well をネガティブコントロールとした。

## 7. 細胞毒性試験

細胞毒性は、ATP 量を測定する CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて測定した。各 well の細胞培養液に等量 (100 μl) のキット付属の Reagent を加え、120 秒間振盪後、10 分間室温で静置した。各 well の 1 秒間の蛍光強度 (RLU, relative light units) をプレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices 社) で測定した。ポジティブコントロールの蛍光強度の平均を 100 % として、各サンプルの生存率を換算した。また、ネガティブコントロールの蛍光強度の平均をバックグラウンドとした。

## 8. 培養上清の LC/MS 分析

細胞培養後 3well 分の培養上清をまとめ、遠心分離を行って上清を得た。適宜培地で希釈して LC/MS 分析に供した。

## 9. チロシナーゼ反応

ロドデノール、ラズベリーケトン、DHPBol または DHPBone を試験物質とし、以下の条件で行った。

50 mmol/L KPB (pH6.5)に終濃度 0.33 mmol/L となるよう試験物質を加え、酸素ガスを 1 分間バブリングした。終濃度 30 U/mL となるようマッシュルームチロシナーゼを加え、25℃ で一定時間インキュベートした。

## C. 研究結果

### 1. ロドデノールの光学異性体存在比

ロドデノールは 2 位に不斉炭素を持ち、鏡像異性体 (*R* 体と *S* 体) が存在する (図 2)。そこで、両異性体の原料中および製品中の存在比を検討した。キラルカラムを装着した HPLC により分離したところ、図 3 に示すように分離した。ピーク面積から *R* 体と *S* 体の存在比がほぼ 1:1 であることが判明した (表 1)。

### 2. ロドデノールの純度

ロドデノールの合成原料であるラズベリーケトンの残留が考えられるため、原料のメタノール溶液と製品のメタノール抽出液を逆相 HPLC で分析した。図 4 に示すように、ラズベリーケトンのピークはロドデノールと比較してごく小さく、絶対検量線法により定量したところ、表 2 に示すように、ロドデノールに対する重量比は 0.04% 以下であった。製品に配合されるロドデノールの純度は非常に高いことが示された。また、製品へのロドデノール配合量は約 2% であることが確認された。

### 3. ロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性および化学変化

ロドデノールはチロシンを酸化して DOPA に変換するチロシナーゼの阻害剤として開発されたものであるが、図 5 に示したように、自らがチロシナー

ゼの作用により水酸化体 DHPBol に変換される可能性が考えられた。ラズベリーケトンも同様に DHPBone に酸化される可能性がある。そして、この水酸化体が表皮中のメラノサイトやケラチノサイトの細胞死を引き起こした可能性がある。

そこで、ロドデノール、ラズベリーケトンおよび両者の水酸化体をヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) と正常ヒトメラノサイトに適用し、細胞の生存率および培養上清中の化合物の分析を行った。

図 6 に示すようにいずれの化合物も HaCaT 細胞に対し濃度依存的な毒性を示した。LC<sub>50</sub> はロドデノール: 12.7 mmol/L、ラズベリーケトン: 10.5 mmol/L、DHPBol: 0.52 mmol/L、DHPBone: 0.39 mmol/L であり、水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。一方、2 位の官能基の違いは細胞毒性に大きな影響は与えていないが、ケトンの方がわずかに毒性が強い傾向にあった。

メラノサイトとしてはチロシナーゼ活性が高いと考えられる African American の新生児包皮表皮由来のものを用いた。図 7 に示すようにいずれの化合物も濃度依存的な毒性を示した。LC<sub>50</sub> はロドデノール: 16.5 mmol/L、ラズベリーケトン: 15.5 mmol/L、DHPBol: 0.072 mmol/L、DHPBone: 0.049 mmol/L であった。水酸化体は HaCaT に対してよりも低い濃度で毒性を示した。また、HaCaT の場合と同様に水酸化体においてより強い細胞毒性が見られた。

ロドデノールまたはラズベリーケトンを 2.5 mmol/L の濃度で 24 時間適用したメラノサイトの培養上清を LC/MS により分析した。クロマトグラム上のピークの同定は PDA で得られた波長スペクトルと MS で得られたマススペクトルにより行った。図 8 に示した PDA クロマトグラムで、ロドデノールを適用した培養上清中に DHPBol が検出され、ラズベリーケトンを適用した培養上清中に DHPBone が検出された。これらは培地のみの場合には検出されず、ロドデノールとラズベリーケトンが細胞内に取り込まれてチロシナーゼなどの酵素により水酸化体に代謝されることが示唆された。また、ロドデノールを適用した培養上清中にラズベリーケトンが、ラズベリ

ーケトンを用いた培養上清中にロドデノールが、培地の場合よりも多く検出され、水酸化体の生成以外の代謝も起きていることが示唆された。

#### 4. チロシナーゼによる酸化

ロドデノールがチロシナーゼの基質となるかどうか試験管内反応によって検討した。ロドデノールまたはラズベリーケトンマッシュルーム由来チロシナーゼと25℃でインキュベートし、0, 5, 10, 15, 20分後の反応液をLC/MSで分析した。0分と10分の比較を図9に示す。ロドデノールを用いた反応液にはDHPBolが検出され、チロシナーゼによってチロシンと同様の酸化反応の基質となることが確認された。ラズベリーケトンからも同様の酸化反応を経てDHPBoneが生成した。また、ロドデノールの反応液にはピークA, BおよびEが、ラズベリーケトンの反応液にはピークCおよびDが検出された。

DHPBolとDHPBoneについても同様にチロシナーゼとともにインキュベートし、生成物を分析した。DHPBolからはピークA, BおよびEが、DHPBoneからはピークCおよびDが検出され(図10)、これらの未同定化合物はロドデノールおよびラズベリーケトンの反応液においてもそれぞれDHPBolとDHPBoneを経て生成していることが示された。

#### D. 考察

被害が確認されている患者の症状は、白斑のみのケース、周辺に黒ずみが出たケース、紅斑を生じたケース、メラノサイトの減少が確認されたケースとそうでないケース、使用後に改善したケースと変化が見られないケースなど様々で、原因は一様でない可能性が高い。しかしながら、メラノサイトが減少するケースが特に重篤と考えられるため、表皮を形成する細胞に対する傷害性に着目し、細胞死のきっかけとなる事象や細胞死に至るまでのメカニズム解明を目的に研究を行った。

また、申請時に動物における白斑非形成の確認および高濃度配合製剤をヒトが長期使用した時の白斑や色素脱失非形成の確認が行われていたが、市販製品による白斑形成を予測できなかった。発症率

が低いためである。発症した人と発症しない人の差がどこにあったのか、という点も興味を持たれる。

カネボウより供与された製造原料のロドデノール、異なる5製品中のロドデノールとも、鏡像異性体の存在比はすべて約1:1であった。R体とS体が細胞に与える各種の影響に差があるかどうかの情報はまだないが、発症の有無が使用製品中のロット間で鏡像異性体存在比の差があることにより生じた可能性は低いと思われる。

主に香料として用いられるラズベリーケトンは、製造従事者に白斑が生じたケースの原因と考えられている。ロドデノールの合成原料であり、その混入が疑われたが、製造原料のロドデノール、製品中のロドデノールとも、ラズベリーケトンの残留はごくわずかであり、白斑を生じるほどの曝露があったとは考えにくい。

HaCaT細胞およびメラノサイトにおいても、ロドデノールやラズベリーケトンに比べ、それぞれの水酸化体ははるかに低いLC<sub>50</sub>値を示した。ロドデノールおよびラズベリーケトンはいったん水酸化体に変換されてから毒性を示すと推測できる。ただし、チロシナーゼ活性を有するメラノサイトとメラニン合成を行わないHaCaT細胞の間でロドデノールやラズベリーケトンの細胞毒性に差がなかったことは、この推測と矛盾するように思われる。一方で水酸化体の毒性はHaCaT細胞よりもメラノサイトで強く表れたため、細胞毒性の本体は水酸化体がさらにチロシナーゼによる化学変化を受けた化合物であると推測することもできるが、さらなる検討が必要である。

入手が容易でチロシナーゼ阻害剤の探索研究でもよく使用されるマッシュルーム由来チロシナーゼを用いて、ロドデノール、ラズベリーケトンおよびそれぞれの水酸化体が本酵素の基質として働くかどうか検討した。その結果、ロドデノールおよびラズベリーケトンからそれぞれの水酸化体DHPBolおよびDHPBoneが生成し、本来の基質とは側鎖部分の構造が異なるこれらの化合物も基質として認識され、酸化反応を受けることが示された。さらに、水酸化体もチロシナーゼにより化学変化を受けることも示された。メラニン生合成において、チロシナーゼは

DOPA を dopaquinone に酸化する反応を触媒し、さらに後の段階にも関与していることが知られている。今後、生成物の構造決定もしくは推定を行う予定である。

#### E. 結論

キラルカラムを装着した HPLC により、製品に配合されたロドデノールは光学異性体混合物であり、*R:S* 存在比はほぼ 1:1 であることが示された。

ODS カラムを装着した HPLC により、製品に使用されていた、ロドデノール中のラズベリーケトン、製品へのラズベリーケトンの混入はごくわずかであることがわかった。

ロドデノールおよびラズベリーケトンの水酸化体はメラノサイトおよび HaCaT 細胞のいずれに対してもロドデノールおよびラズベリーケトンに比べて強い細胞毒性が認められた。ロドデノールおよびラズベリーケトンを添加した細胞の培養上清中にはそれぞれの水酸化体が検出された。

ロドデノールおよびラズベリーケトンはマッシュルーム由来チロシナーゼを直接処理すると水酸化体に代謝されることを確認した。また、水酸化体がチロシナーゼによりさらに化学変化を受けることが示された。

以上の結果より、ロドデノールはチロシナーゼ等に

より水酸化体に代謝され、これらがメラノサイトの細胞死に強く関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

秋山卓美, 清水久美子, 藤巻日出夫, 内野正, 五十嵐良明: Rhododendrol および raspberry ketone の細胞毒性発現機構. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月)

#### 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

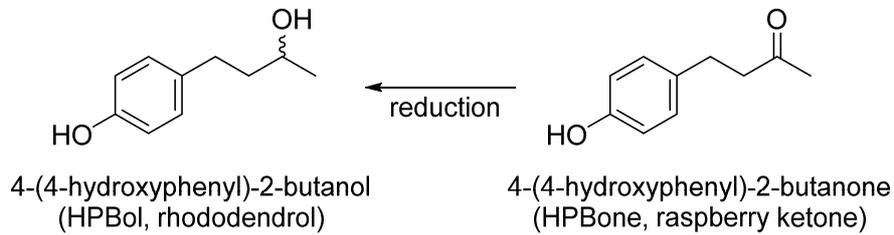


図1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

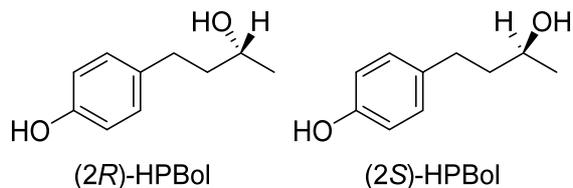


図2. ロドデノールの光学異性体.

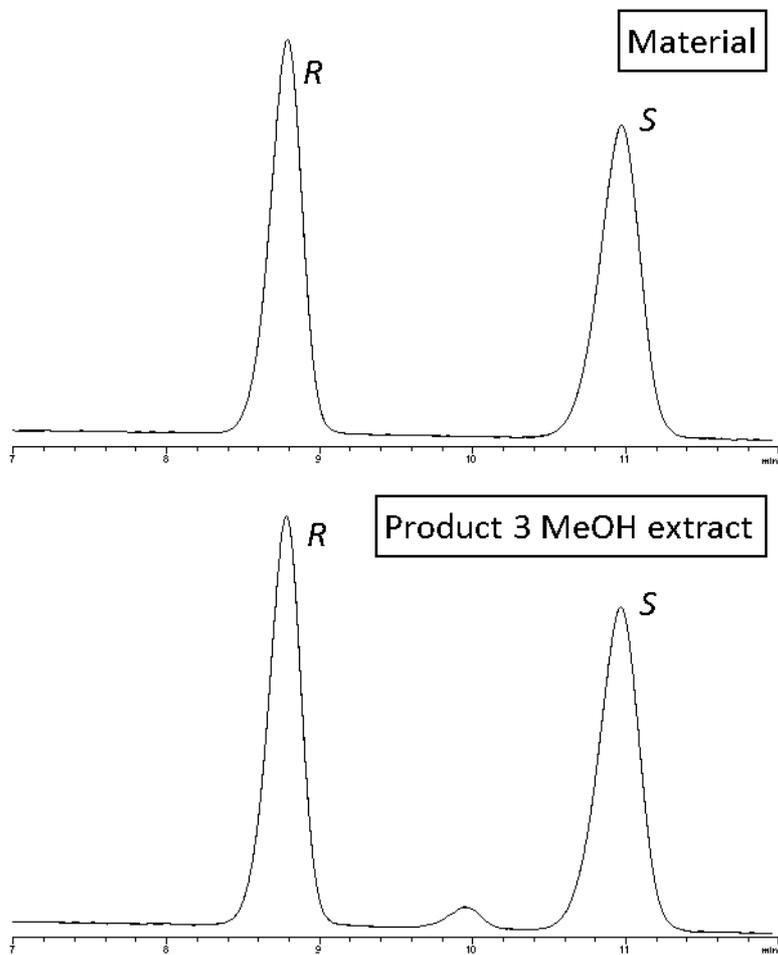


図3. 原料および製品に含まれるロドデノールのキラルカラムによる分析. 上段:原料. 下段:製品.

表 1. 原料および製品に含まれるロドデノール

試料	R 体	S 体
原料	49.8%	50.2%
製品 1	50.0%	50.0%
製品 2	50.0%	50.0%
製品 3	50.2%	49.8%
製品 4	50.0%	50.0%
製品 5	50.0%	50.0%

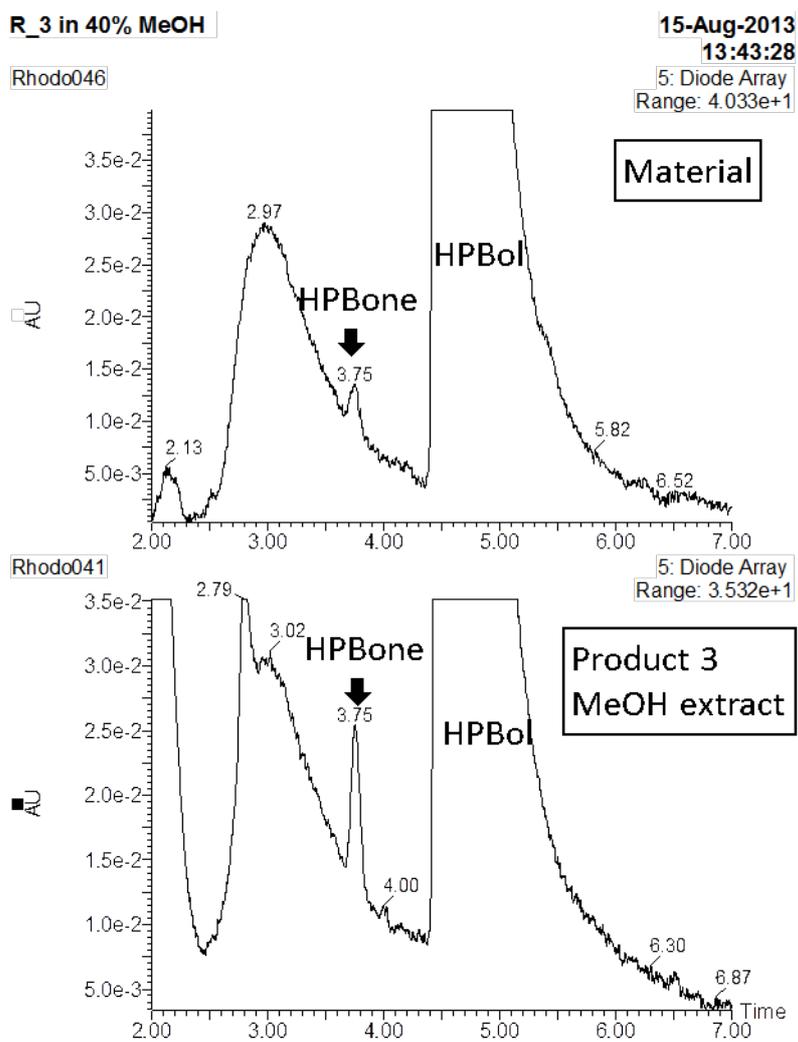


図 4. 原料および製品に含まれるロドデノールとラズベリーケトン.

表 2. 製品中ロドデノール含量とロドデノールに対するラズベリーケトンの重量比.

試料	製品中 HPBol 含量	HPBone 中 HPBone 含量
原料	-	0.008%
製品 1	1.9%	0.018%
製品 2	2.1%	0.011%
製品 3	2.2%	0.027%
製品 4	2.1%	0.027%
製品 5	1.9%	0.031%

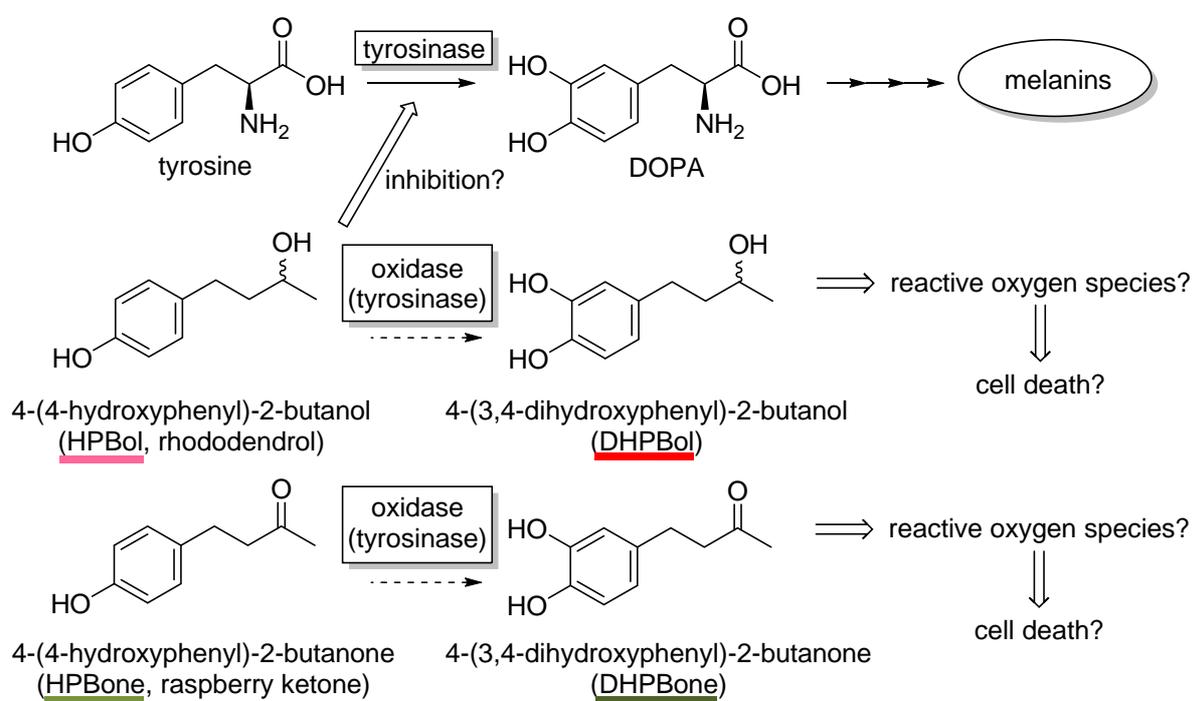


図 5. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

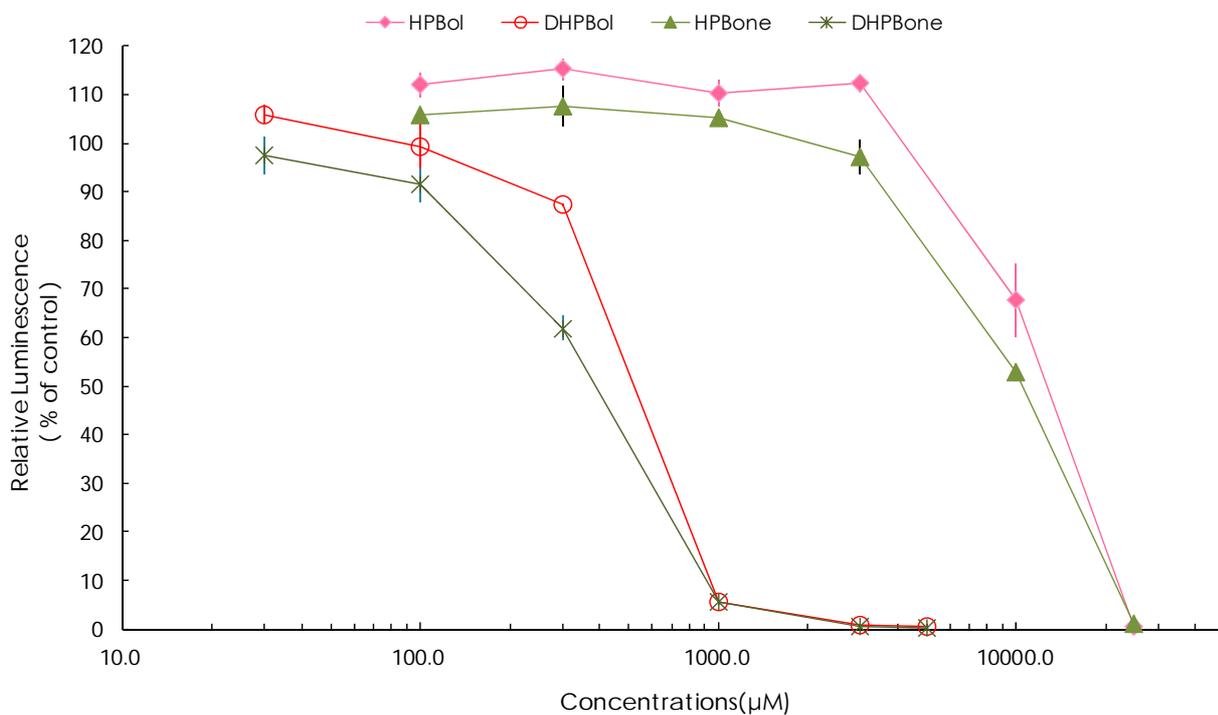


図 6. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した HaCaT 細胞の生存率.

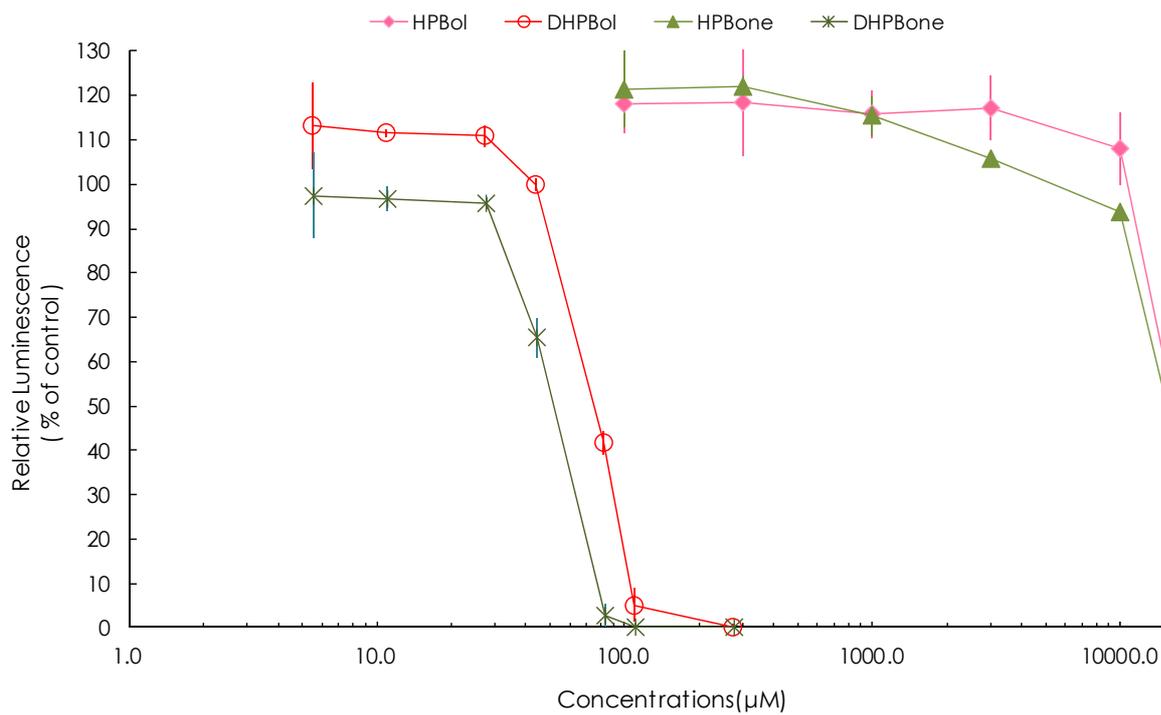


図 7. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用したメラノサイトの生存率.

Cell+OL 131128

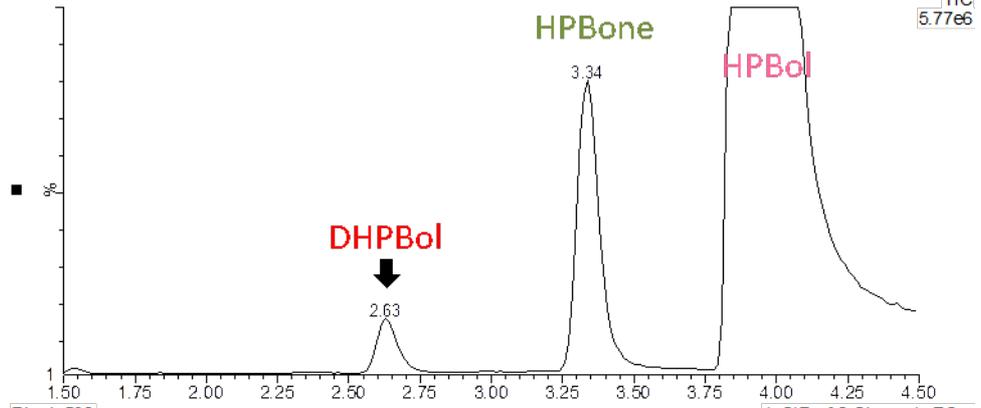
28-Nov-2013

16:32:02

Rhodo508

1: SIR of 2 Channels ES+

TIC  
5.77e6



Rhodo509

1: SIR of 2 Channels ES+

TIC  
1.15e7

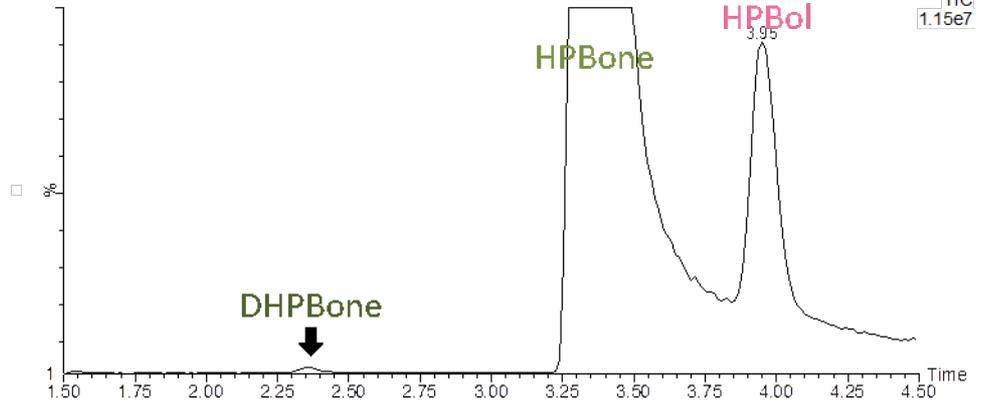


図 8. ロドデノールおよびラズベリーゲトンを適用したメラノサイトの培養上清中の化学変化体.

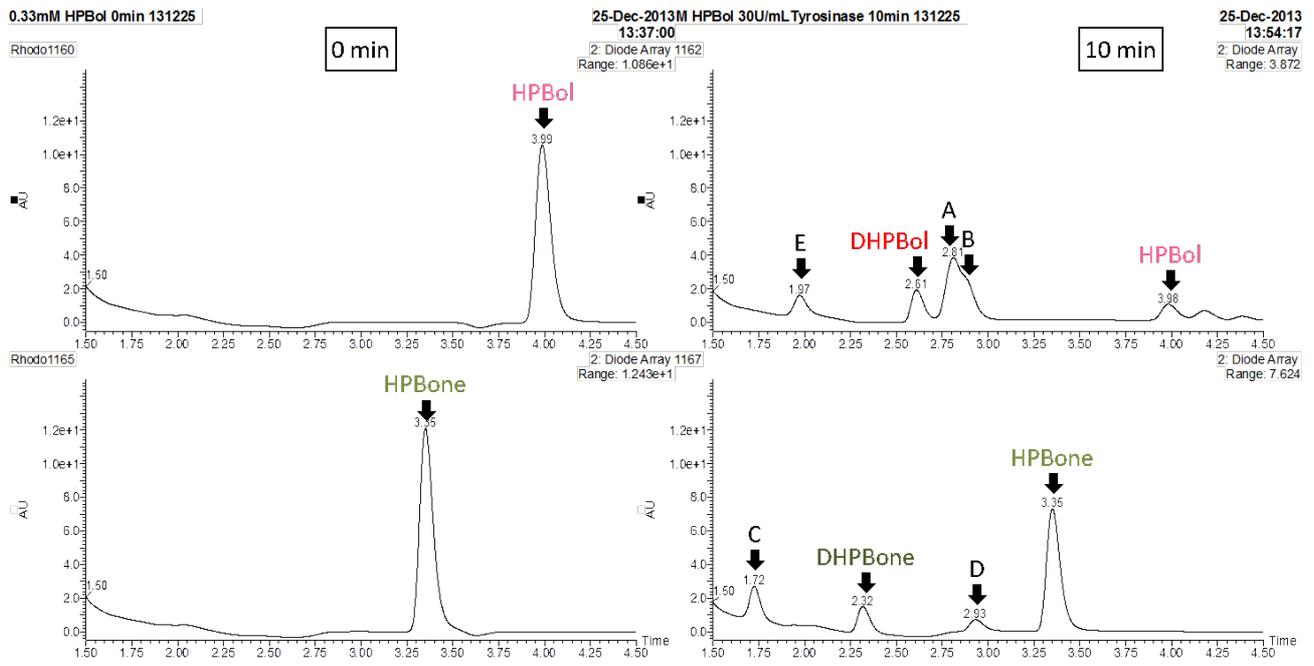


図9. ロドノールおよびラズベリーケトンのマッシュルームチロシナーゼとの反応産物.

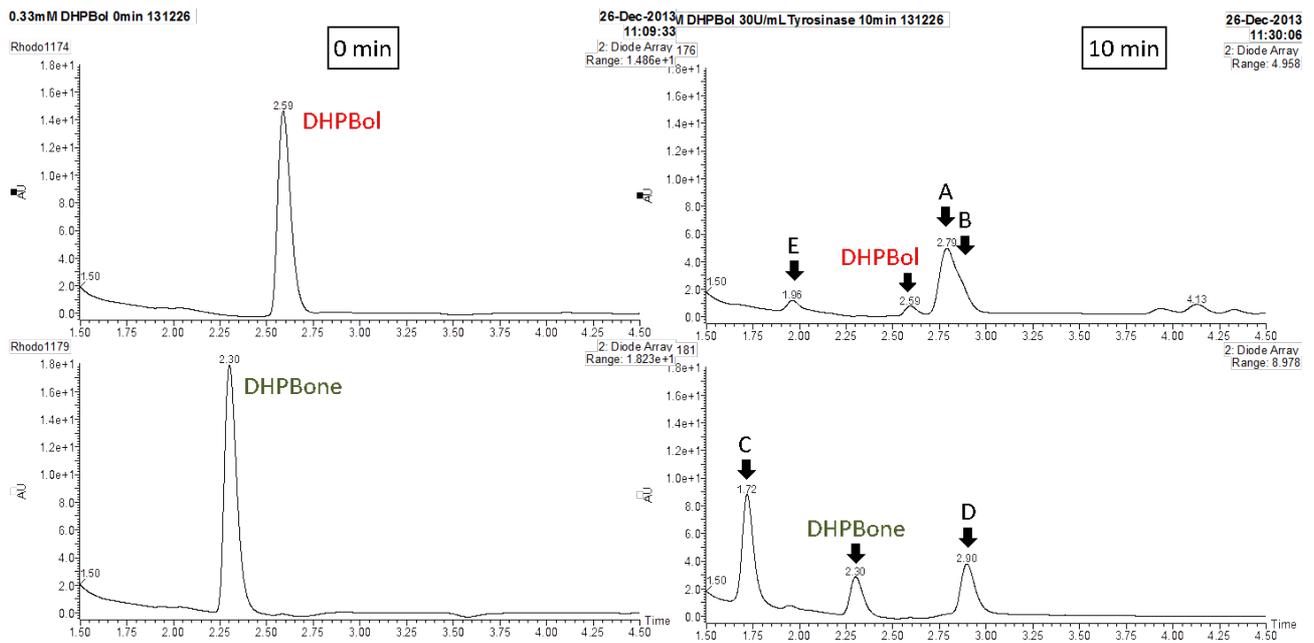


図10. DHPBol および DHPBone のマッシュルームチロシナーゼとの反応産物.