

## 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。Asian-Caucasian 由来メラノサイトは昨年度用いた African American 由来メラノサイトと比較して細胞色が薄く、チロシナーゼ活性が低かったが、ロドデノールおよびラズベリーケトンの細胞毒性はメラニン非産生細胞と同程度である点およびこれらの水酸化体の細胞毒性が強く表れる点が共通していた。HaCaT 細胞に対する水酸化体の細胞毒性はアスコルビン酸の添加により抑制された。また、アスコルビン酸はマッシュルーム由来チロシナーゼにより生成した *o*-キノンをカテコールに還元した。細胞毒性への *o*-キノンの強い関与が示唆された。

### 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, HPBone, 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1万9千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。

そこで昨年度、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

るとの報告のあるラズベリーケトンが各種細胞に与える影響やこれら化合物の細胞内酵素による化学変化について検討した。その結果、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 African American 由来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。

今年度は、Asian-Caucasian 由来ヒトメラノサイトにおける細胞毒性、酸化防止剤による *o*-キノンの生成

抑制が細胞毒性に与える影響について検討した。また、試験管内酵素反応における酸化防止剤による *o*-キノンの還元の効果を検討した。

## 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 (DHPBoNe) 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 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。

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

ヒトメラノサイト細胞株 (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 Asian-Caucasian の新生児包皮表皮由来 (Cat No. KM-4009, No.01440) 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) で 1 週間培養した。

### 3. メラノサイト中のチロシナーゼ活性の測定

マイクロチューブに 2 × 10<sup>4</sup> 個の細胞を集めた。緩衝液 A (100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 (0.545 M DMF)) 20 μl および緩衝液 B (100 mM Tris pH7.5 (1% NP-40, 0.01% SDS)) 20 μl を加えて振り混ぜながら 4℃ で 2 時間インキュベートした。緩衝液 A 80 μl, 20 mM 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride 60 μl, 5 mM DOPA 40 μl を添加し、37℃ で色が変わるまで 0.5~1 時間インキュベートし、505

nm の吸光度をプレートリーダー SpectraMax M5 (Molecular Devices) で測定した。

### 4. 試験物質の細胞への曝露

培養した細胞を遠心分離により回収し、ヒトメラノサイトは 1.2 × 10<sup>5</sup> cells/ml, HaCaT 細胞は 1.0 × 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、終濃度 0, 1mM となるようアスコルビン酸を加えて検液を調製した。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。

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。

### 5. 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 秒間の相対発光強度 (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相対発光強度の平均を 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相対発光強度の平均をバックグラウンドとした。

### 6. チロシナーゼ反応

ロドデノール, ラズベリーケトン, DHPBoI 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, 0.25, 0.5, 1, 2mM となるようアスコルビン酸を加えた。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。その後、HPLC で分析した。

## 7. HPLC

装置は下記のコンポーネントからなる島津製作所製システムを用いた。システムコントローラー：SCL-10A VP、オートインジェクター：SIL-10AD VP、ポンプ：LC-10AD VP × 2、カラムオーブン：CTO-10AC VP、フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M20A。HPLC 条件は以下のとおり。

カラム：Hydrosphere C18 (4.6 mm i.d. × 50 mm; particle size, 3 μm; YMC)、カラム温度：40℃、移動相：20% methanol with 0.02% TFA、流量：0.6 mL/min、検出：275 nm。

## C. 研究結果

### 1. Asian-Caucasian 由来メラノサイトに対するロドデノールおよび水酸化体の細胞毒性

昨年度報告したように、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 2 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示された。ラズベリーケトンも同様に DHPBone に酸化される可能性が示された。そして、この水酸化体またはさらに酸化を受けた *o*-キノン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。

カネボウ化粧品の検討により、細胞の感受性には差があることが判明した。そこで、より感受性の高い細胞を探索するため、ロドデノールによる白斑が起きた日本人と共通点のある Asian-Caucasian 由来ヒトメラノサイトで検討を行った。

1 週間培養した細胞を遠心分離により回収した際、細胞ペレットの色を観察した。昨年度検討した African American 由来メラノサイトは黒色であったが、Asian-Caucasian 由来メラノサイトはわずかに褐色を帯びた白色であった。次にチロシナーゼ活性を測定した。昨年度検討した African American 由来メラノサイトは 0.708 units/2 × 10<sup>4</sup> cells であったのに対し、本メラノサイトは 0.391 units/2 × 10<sup>4</sup> cells であった。

続いて、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 3 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：11.2 mmol/L、ラズベリーケトン：9.2 mmol/L、DHPBol：0.051 mmol/L、DHPBone：0.052 mmol/L であり、昨年度検討した African American 由来メラノサイト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。

### 2. アスコルビン酸添加の影響

チロシナーゼによるチロシンの酸化反応において、1 段階の酸化の産物である DOPA は放出されず、2 段階目の酸化を受けた dopaquinone が放出される、というメカニズムが提唱されている。ロドデノールについても、チロシナーゼとの反応産物は主として *o*-キノンであり、これが細胞毒性を引き起こしている可能性が高いと考えられる。一方、HaCaT 細胞に DHPBol を添加した場合の細胞毒性は、DHPBol 自体が活性酸素種発生などにより毒性を表しているか、酸化酵素による *o*-キノンの生成を経由するのか不明である。

アスコルビン酸は dopaquinone と共存させるとこれを DOPA に還元することが知られている。DHPBol を培養細胞に添加する際、アスコルビン酸を共存させると *o*-キノンの蓄積が抑えられる可能性があると考えられる。そこで、HaCaT 細胞に対して 1 mM のアスコルビン酸(AA)、アスコルビン酸ナトリウム(AA-S)またはアスコルビン酸 2-グルコシド(AA-2G)をあらかじめ添加してから DHPBol を添加し、24 時間後の生存率を比較した。

図 4 に示すように、アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムは DHPBol による細胞毒性を低減させた。HaCaT 細胞においても酸化により *o*-キノンに変化した後に毒性を表している可能性が示唆された。

### 3. アスコルビン酸による試験管内チロシナーゼ反応への影響

メラノサイトに対するロドデノールの毒性を検討する際、細胞が持つチロシナーゼのロドデノール酸化活性を試験管内反応で評価できれば有用で

ある。昨年度の検討でロドデノールが試験管内反応でマッシュルーム由来チロシナーゼの基質となることが示された。しかし、DHPBol の生成量は少なかった。主生成物であるピーク A の構造は不明であり、単離生成を試みたが成功しなかった。また、ピーク A と DHPBol の他にも生成物が確認された。生成した *o*-キノンが非酵素的に化学変化した可能性がある。ロドデノール酸化活性の評価するアッセイ系としては不十分である。

そこで、アスコルビン酸の存在下でチロシナーゼ反応を行い、ロドデノールから生成した *o*-キノンを DHPBol に変換することを試みた。終濃度 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM および 2 mM のアスコルビン酸を添加してロドデノールを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、15 分後の反応液を LC/MS で分析した。図 5 に示すように、0.5 mM 添加時には主生成物はピーク A であるが、1 mM 添加時には DHPBol が主生成物で他のピークはほとんど見られなかった。

#### D. 考察

被害が確認されている患者の症状は様々であるが、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、申請時には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。

昨年度検討した African American 由来メラノサイトと同様、Asian-Caucasian 由来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て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 1 段階目の酸化を受けた水酸化体または 2 段階目の酸化を受けた *o*-キノンに変換されてから毒性を示すと推測できる。

アスコルビン酸を 1 mM 添加すると、HaCaT 細胞に対する DHPBol の毒性が減弱した。還元能のないアスコルビン酸 2-グルコシドでは効果がなく、試験

管内反応でアスコルビン酸は *o*-キノンを DHPBol に還元していることから、HaCaT 細胞においても細胞毒性は *o*-キノンが引き起こしており、添加したアスコルビン酸を添加した場合は還元されたために毒性がなくなった可能性が示唆された。HaCaT 細胞において DHPBol を酸化した酵素の詳細は不明である。今後メラノサイトを用いて同様の検討を行う。

マッシュルーム由来チロシナーゼを用いた試験管内反応において、高濃度のアスコルビン酸は生成した *o*-キノンをカテコールに還元し、生成物の定量が容易になった。細胞死のメカニズムを考える上で、ロドデノールに対する感受性と細胞が持つロドデノール酸化活性との関連を調査する必要があると考えられ、アッセイ法として有用と考えられる。

#### E. 結論

Asian-Caucasian 由来メラノサイトは昨年度用いた African American 由来メラノサイトと比較して細胞の呈する色が非常に薄く、チロシナーゼ活性が低かった。しかし、このメラノサイトに対するロドデノールおよびラズベリーケトンの細胞毒性を検討したところ、African American 由来メラノサイトと同様に HaCaT と差がない点、またこれらの水酸化体の細胞毒性が強く表れた点が共通していた。

HaCaT 細胞に対する水酸化体の細胞毒性はアスコルビン酸の添加により抑制された。また、アスコルビン酸はマッシュルーム由来チロシナーゼにより生成した *o*-キノンをカテコールに還元した。細胞毒性への *o*-キノンの強い関与が示唆された。

#### 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, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: ロドデノールの代謝とメラノサイトに対する細胞毒性. 第 41 回日本

毒性学会学術年会(2014年7月)

Takumi AKIYAMA, Kumiko SHIMIZU, Hideo FUJIMAKI, Tadashi UCHINO, Tomoko NISHIMAKI-MOGAMI, Yoshiaki IKARASHI: Metabolic oxidation of rhododendrol and enhanced cytotoxicity in melanocytes. SOT2015 (2015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

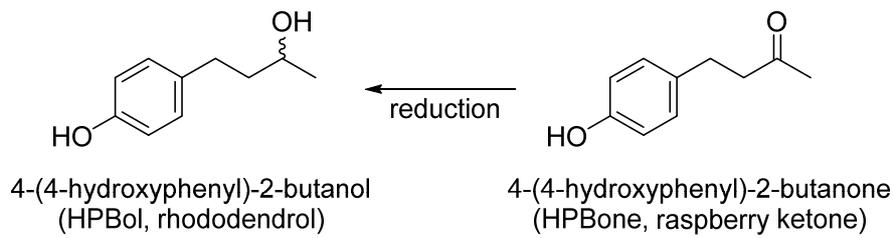


図1. ロドデノールおよびラズベリーケトンの構造.

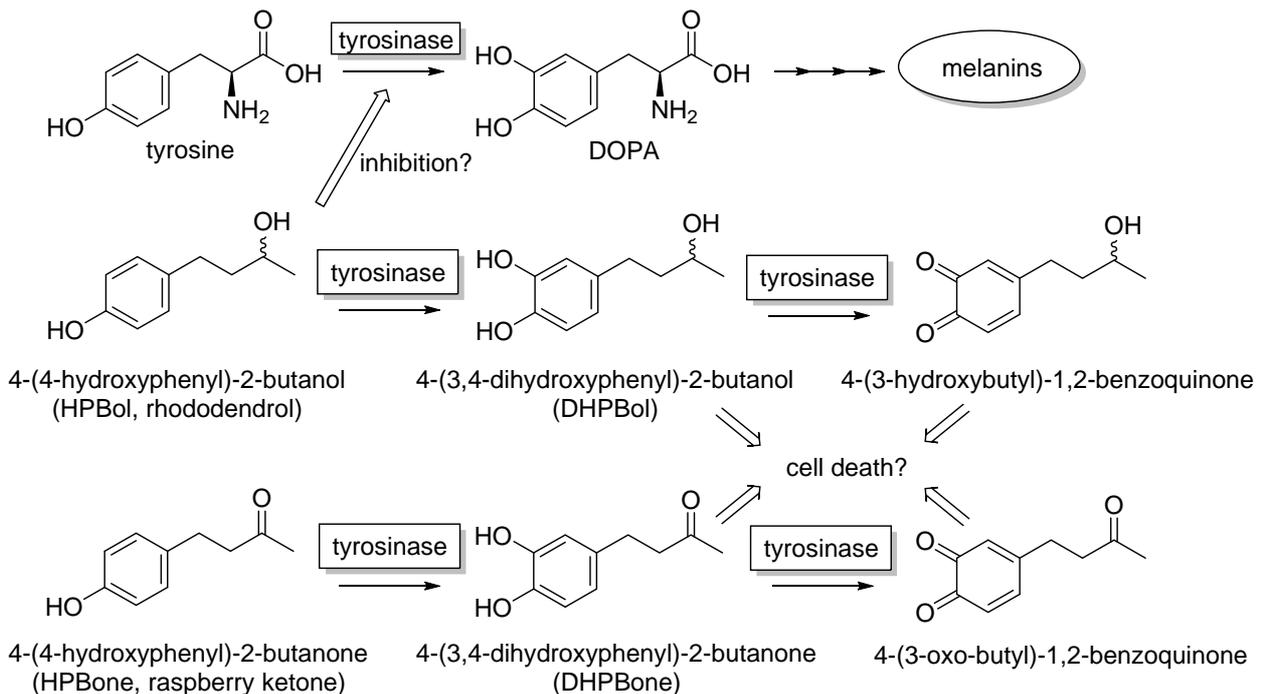


図2. ロドデノールとラズベリーケトンの細胞毒性発現メカニズムの仮説.

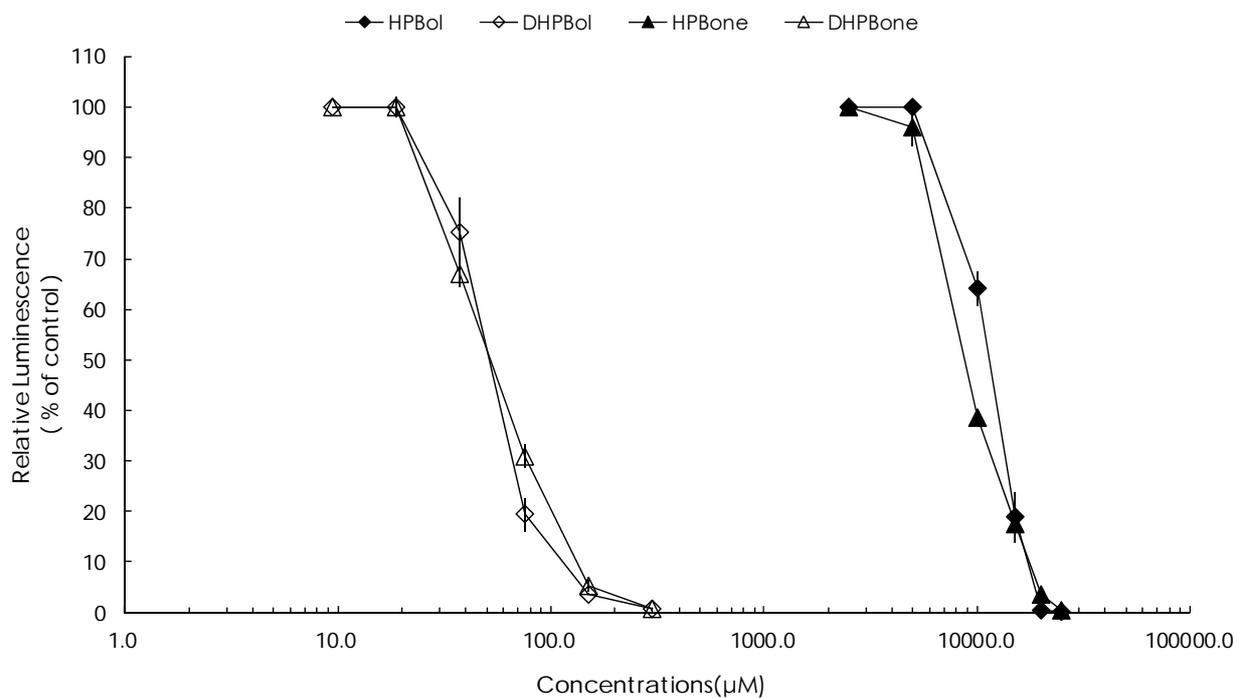


図 3. ロドデノール, ラズベリーケトンおよび水酸化体を適用した Asian-Caucasian 由来メラノサイトの生存率.

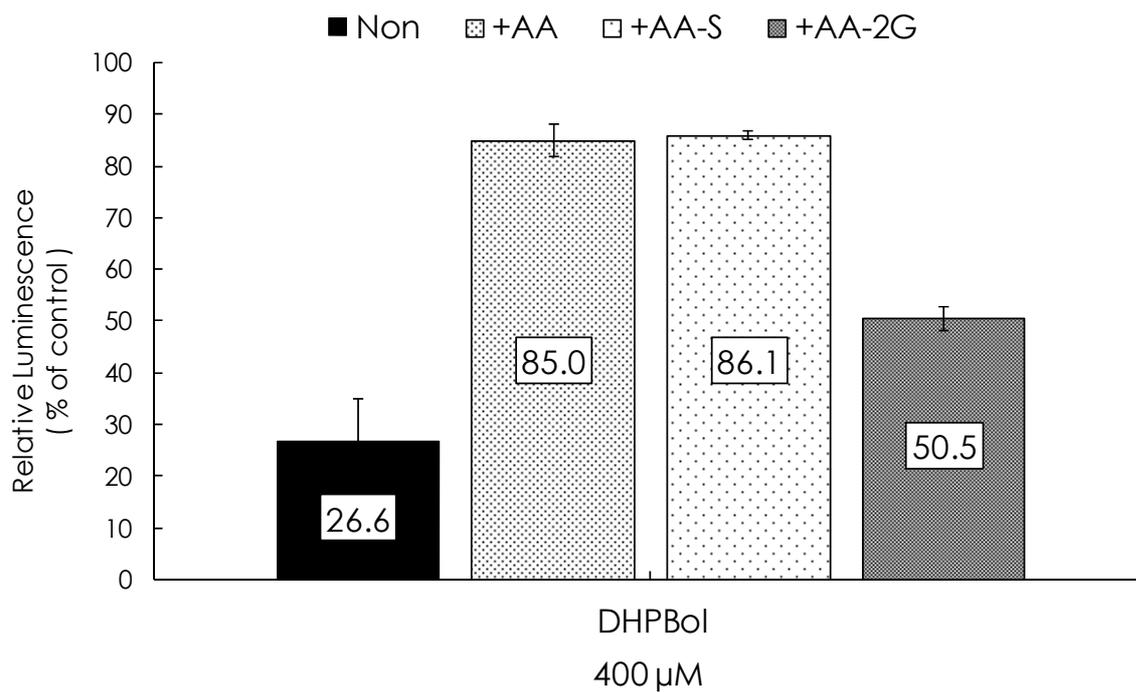


図 4. DHPBol の HaCaT 細胞に対する細胞毒性に与えるアスコルビン酸類の影響.

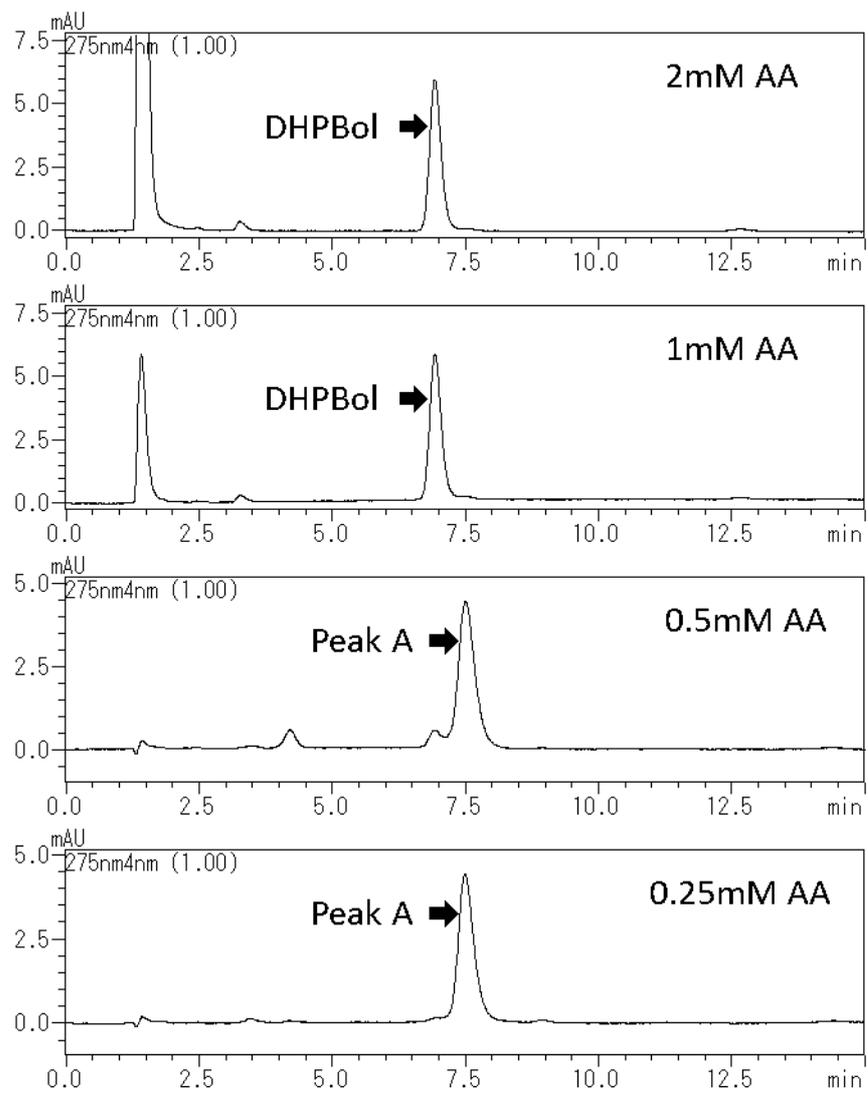


図 5. アスコルビン酸添加時のクロシナーゼ反応産物.