

## 基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(II)

研究分担者 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:

メラノサイト中のチロシナーゼを阻害することによるメラニン生成抑制を唱って薬用化粧品に配合された rhododendrol により化粧品の使用者の皮膚に白斑が生じる事例が多数発生した。薬用化粧品の安全性確保のため、配合成分の白斑誘導能を評価する方法が望まれている。一方、rhododendrol による白斑誘導の過程で、チロシナーゼにより酸化されて生じた *o*-キノンが細胞内分子のチオール基と結合した可能性が報告されている。そこで、システイン含有ペプチドを用いてチロシナーゼ依存的なペプチドへの結合を検出する試験法の開発を検討した。

Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))を入手し、rhododendrol が酸化されて生じるカテコールと混合したところ、DPRA(Cys)のピークが消失し、新たなピークが検出された。マスペクトルから、カテコールがシステイン残基に結合したペプチドと考えられた。職業性白斑を引き起こすとの報告のある raspberry ketone が酸化されて生じるカテコールでも同様にカテコールが結合したペプチドが生成した。

DPRA(Cys)をリン酸緩衝液(pH6.5)中でマッシュルーム由来チロシナーゼおよび rhododendrol と混合して 25℃ で反応させたところ、カテコールが結合したペプチドが生成し、チロシナーゼを除いた場合には見られなかった。反応を大スケールで行い、調製的 HPLC により生成物を精製して定量用標準物質として定量したところ、基質 rhododendrol の約 60% がペプチドと結合していた。

研究協力者 伊藤祥輔 藤田保健衛生大学  
医療科学部名誉教授

因究明が強く求められているのに加えて、薬用化粧品の安全性確保のため、配合成分の白斑誘導能を評価できる試験方法の開発が望まれている。

### A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売した rhododendrol(ロドデノール, 図1)を配合した薬用化粧品は、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。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

一方、rhododendrol は、メラノサイトにおいて tyrosine の酸化を触媒するチロシナーゼを競合的に阻害してメラニン生合成を抑制するとされているが、tyrosine と同様の 4-置換フェノールの構造を持つ rhododendrol 自身もチロシナーゼによる酸化的代謝を受けることを、本研究に先だって行った厚生労働科学研究(「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」)の分担研究「原因究明に関する調査研究」で明らかにした。試験管内反応とメラノサイトへの投与により rhododendrol からカテコールである

4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol への変換が確認された。チロシナーゼにより *o*-キノンに酸化され、還元によりカテコールが生成したと考えられた(図1)。さらに、白斑誘導の過程で、rhododendrol がチロシナーゼにより酸化されて生じた *o*-キノンが細胞内のタンパク質システイン残基等のチオール基と結合した可能性が高いことが伊藤らにより報告されている(Ito *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 27, 744 and 28, 295)。この反応を応用し、システイン含有ペプチドを用いてチロシナーゼ依存的なペプチドへの結合を検出する試験法の開発を検討した。システイン含有ペプチドとして、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)法で用いられるペプチド DPRA(Cys)を用いた。また、同じく DPRA 法で用いられるリジン含有ペプチド DPRA(Lys)も用いた。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol ( rhododendrol , RD , HPBol ) , 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol ( DHPBol ) , 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanone ( DHPBol ) はカネボウより提供頂いた。4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone (raspberry ketone , HPBone) 及び cinnamaldehyde (CA) は和光純薬工業より購入した。

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。

システインペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) および DPRA(Lys) (Ac-RFAAKAA) はスクラムより購入した。

### 2. ペプチドとの反応

100  $\mu$ L の DMSO-アセトニトリル混液(1 : 9)に 375  $\mu$ L の 0.667 mmol/L DPRA(Cys)を加え、さらに 25  $\mu$ L の 100 mmol/L 被検物質を加えて混和し、暗所 25 で 24 時間置いた。また、375  $\mu$ L の 0.667 mmol/L DPRA(Lys)に 125  $\mu$ L の 100 mmol/L 被検物質を加えて混和し、暗所 25 で

24 時間置いた。いずれも超純水で 5 倍に希釈し、0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過して UPLC/MS に供した。

### 3. チロシナーゼを用いたペプチドとの反応

100  $\mu$ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5)と酵素量に応じた超純水を混合し、22.5  $\mu$ L の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)及び 100 mmol/L rhododendrol を加えた後、マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5)を加えて 300  $\mu$ L とし、暗所 25 で 18 時間置いた。200  $\mu$ L の 62.5%アセトニトリルを加え、0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過して UPLC/MS に供した。

### 4. 結合ペプチドの合成

Rhododendrol 3.3 mg (20 mmol) と DPRA(Cys) 16.5 mg (22 mmol) を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) 20 mL に溶かし、37 で激しく攪拌した。ここにマッシュルームチロシナーゼ (1715 U/mg) 2.3 mg (4000 units)を 0.5 mL 緩衝液に溶かした液を加えた。10 分後に赤紫色になった溶液に NaBH<sub>4</sub> 20 mg と HCOOH 0.2 mL を加えて反応を停止した。

この無色の溶液を 40 で減圧乾固し、残渣を調製的 HPLC 溶離液 2 mL に溶かして条件 2 の調製的 HPLC に供し、主たる生成物を分取し、凍結乾燥した。

### 5. HPLC および LC/MS

#### (1) 条件 1 (UPLC/UV 及び UPLC/MS)

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters)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.  $\times$  100 mm; particle size, 1.7  $\mu$ m; Waters); カラム温度, 30 ; 移動相 A, 0.02% TFA in water; 移動相 B, 0.02% TFA in acetonitrile; 流量, 0.35 mL/min . Gradient: 0-2min , 10%B ; 2-12min , 25%B ;

12-13min; , 90%B; 13-15min , 90%B; 15-15.5min , 10%B ; 15.5-20min , 10%B . イオン化 , ESI positive; キャピラリー電圧 , 3.0 kV; コーン電圧 , 30-70 V; ソース温度 , 150 ; 脱溶媒温度 , 400 ; 脱溶媒ガス流量 , 800 L/hr; コーンガス流量 , 50 L/hr; 検出 , SCAN mode ( $m/z$  50-2000).

## (2) 条件 2 (調製的 HPLC)

HPLC ポンプ , JASCO-2080 PLUS (日本分光); カラム , Capcell Pak C18 MG (20 mm i.d. × 250 mm; particle size, 5  $\mu$ m; 資生堂); UV 検出器 , JASCO-UV (280 nm); 溶離液 , 0.4 M HCOOH:メタノール (60:40, v/v); 流 , 7.0 mL/分; 温度 , 45 .

## C. 研究結果

### 1. カテコールと DPRA(Cys)ペプチドの反応

まず , カテコールとペプチドを反応させて結合が起こるかどうか検討した . 終濃度 5 mmol/L の DHPBol または DHPBone を終濃度 0.5 mmol/L の DPRA(Cys)と混合し , 暗所で 25 でインキュベートした . 混合モル比は DPRA 法の常法通り 10 : 1 であり , 反応時間も DPRA 法の常法通り 24 時間とした . 対照として rhododendrol および raspberry ketone についても同様に処理した . また , 陽性対照として cinnamaldehyde を用いた .

反応液を希釈し , UPLC/MS により分析した . 図 2 に 220 nm で検出した UV クロマトグラムを示す . 陽性対照の CA の反応液ではペプチドのみの陰性対照と比較して DPRA(Cys)のピーク面積が減少している . 一方 , DHPBol および DHPBone では , DPRA(Cys)のピークが消失している . これに対し , HPBol ではペプチドピークの減少はほとんど見られなかった .

UV 検出では DPRA(Cys)が HPBone と重なって観察できなかったため , MS で検出した . DPRA(Cys)の  $[M+H]^+$  である  $m/z$ 751 のマスキロマトグラムを図 3 に示す . HPBone の反応液に見られる DPRA(Cys)のピーク面積は陰性対照とほとんど変わらなかった .

DPRA(Cys) のピークが見られなかった

DHPBol の反応液では , UV クロマトグラムで保持時間 12.3 分に , 陰性対照には見られないピークが観察された (図 2) . DHPBone では 12.6 分と 12.9 分に観察された (図 2) .

これらのピークはトータルイオンクロマトグラム (TIC) でも確認された (図 4) . DHPBol に見られた 12.3 分のピークの UV スペクトルを図 5A に示す . 254 nm および 292 nm に極大吸収があり , システニルドーパと類似のスペクトルであった . また , 図 5B に示したマスペクトルで  $m/z$ 931 のマスピークが得られ , 分子量は 930 であることが示唆された . これらのことから , このピークは DPRA(Cys)のシステイン残基に DHPBol が結合した図 6A のような構造と考えられた . この結合ペプチドの生成機構として , DHPBol の自動酸化により生じた *o*-キノンと DPRA(Cys)の間での Michael 付加反応が考えられる .

DHPBone の 12.6 分のピークはこれより分子量が 2 小さく , UV スペクトルが類似していたことから , 図 6B のような構造と考えられた . 12.9 分のピークの構造は現在検討中である .

### 2. カテコールと DPRA(Lys)ペプチドの反応

DPRA(Lys)でも同様に検討した . DPRA 法の常法通りの混合比 50 : 1 となるよう , DHPBol または DHPBone の終濃度は 25 mmol/L , DPRA(Lys)の終濃度は 0.5 mmol/L とした . DPRA(Lys)で強く検出される  $[M+2H]^{2+}$  である  $m/z$ 389 のマスキロマトグラムでは , HPBol と HPBone の反応液で DPRA(Lys)のピーク面積が CA と同程度の減少を示した (図 7) が , 新たなピークは検出できなかった .

### 3. チロシナーゼとのカップリング反応

以上より , *o*-キノンは DPRA(Cys)との結合ペプチドを生成することがわかったため , チロシナーゼにより 4-置換フェノールから *o*-キノンを生成させて DPRA(Cys)と結合させるカップリング反応が可能と考えられた . そこで , マッシュルームチ

ロシナーゼを用いた反応を検討した。

マッシュルームチロシナーゼで HPBoI を酸化させるのに適した条件とするため、反応は 50 mmol/L KPB (pH6.5)中で行い、HPBoI の終濃度は 0.1 mmol/L とした。DPRA(Cys)の終濃度は DPRA 常法の 0.5 mmol/L とした。終濃度  $10^2$  units/mL マッシュルームチロシナーゼを加えて暗所 25 °C で 18 時間インキュベートした。HPBoI, チロシナーゼのいずれかまたは両方を除いた反応液を対照として用いた。

UPLC/MS で反応液を分析した。UV クロマトグラムを図 8 に示した。チロシナーゼを除いた反応液の DPRA(Cys)のピークの大きさはペプチドのみの反応液と変わらず、HPBoI のピークが確認できた。チロシナーゼのある反応液では、ペプチドと HPBoI のいずれのピークも検出されず、新たなピークが確認された。マスペクトルでは  $m/z$ 931 のマスピークが得られたことから、カテコールと DPRA(Cys)との反応で生成した結合ペプチドと考えられた。チロシナーゼの有無による差は HPBoI, DPRA(Cys)および結合ペプチドのベースピークであるそれぞれ  $m/z$ 107,  $m/z$ 751 および  $m/z$ 931 におけるマスキロマトグラムでも確認できた(図 9)。

#### 4. 標準試料の合成

結合ペプチドの生成量を定量するため、標準物質として用いる結合ペプチドの合成を行った。方法は RDQ と N-アセチルシステイン付加物の合成法(Ito *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 27, 744) に準拠した。rhododendrol (RD) 20 mmol と DPRA(Cys) 22 mmol を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) 20 mL に溶かし、37 °C で激しく攪拌した。ここにマッシュルームチロシナーゼ 4000 units を 0.5 mL 緩衝液に溶かした液を加えた。溶液は 10 分で赤紫色になったので、 $\text{NaBH}_4$  20 mg と  $\text{HCOOH}$  0.2 mL を加えて反応を停止した。この溶液を HPLC で分析すると、RD および DPRA(Cys)はほぼ消失し、2 つの生成物

のピークが出現した。この無色の溶液を 40 °C で減圧乾固し、残渣を下記の HPLC 溶離液 2 mL に溶かし、資生堂製 Capcell Pak C18 MG (20 x 250 mm, 粒子径 5 mm) カラムおよび溶離液 0.4 M  $\text{HCOOH}$ :メタノール(60:40, v/v)を用いた調製的 HPLC により RDQ-DPRA-Cys 付加体を単離した。主たる生成物を分取し、凍結乾燥して、11.1 mg (60%; 吸光度に基づく)の付加体を得た(HPLC による純度 91%)。本化合物は 5-S-システイニルドーパ(d'Ischia *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 26, 616)と同様な UV 吸収スペクトル(吸収極大 254 nm および 292 nm)を示し、RD の 5 位に DPRA-Cys が結合していることが推定された。

#### 5. チロシナーゼ量の影響

結合ペプチド(RDQ-DPRA-Cys 付加体)による定量が可能となったため、チロシナーゼカップリング反応の生成物量に対するチロシナーゼ量の影響を検討した。反応液中のチロシナーゼ量を 0, 3.75, 7.5, 15 または 30 units として行い、rhododendrol, DPRA(Cys)および結合ペプチドの標準試料を用いた絶対検量線法で定量した。表 1 に示すように、rhododendrol の残存量はチロシナーゼを加えなかったもの以外は 0 であった。DPRA(Cys)の残存量はチロシナーゼが多いほど少なかったが、rhododendrol の消費量より多くの DPRA(Cys)が消費されていた。一方、結合ペプチド(product)の生成量はチロシナーゼが 3.75 units の反応液が最も多く、加えた rhododendrol の約 60%であった。

#### D. 考察

Rhododendrol がメラノサイト内でチロシナーゼにより酸化を受けた代謝物に変換されることが白斑の原因となったことには疑いがないと思われる。それに続く発症メカニズムは明らかになっていないが、Ito らにより実証されたキノンと SH 基との結合が関与している可能性が高い。グルタチオンと

の結合は保護的に働く可能性がある一方で、システインとの結合が発端となるロドデノールフェオメラニンの生成やタンパク質のシステイン残基との結合により自己免疫を引き起こす可能性が示唆されている。

すなわち、チロシナーゼにより酸化を受けること、その代謝物が SH 基と結合することの両条件が満たされる場合に白斑を誘導する可能性があると考えられる。そこで、チロシナーゼ、SH 基供与体、被検物質の 3 者を共存させる試験管内反応を白斑誘導能のスクリーニング法として利用することを検討した。

SH 基供与体として、OECD により感作性試験代替法 TG442C として認められている Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) で使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys) を検討した。物性および分析法が明確なことから、供給体制が十分であることが理由である。

まず、カテコールと DPRA(Cys) との反応を検討したところ、結合ペプチドの生成が確認された。生成した結合ペプチドは、図 6 に示すように部分構造がカテコールそのものであり、1 段階酸化が進んだ構造である。生成するメカニズムは図 6 に示したようにキノンに酸化されてからの Michael 付加か、あるいは酸化カップリングと考えられる。反応液に三価の鉄イオンなど酸化力を持つ物質が混在していた可能性がある。

Rhododendrol の代謝物が DPRA(Cys) と結合することが確認されたため、チロシナーゼとのカップリング反応を検討した。同一の結合ペプチドが生成し、添加した rhododendrol の最大で約 60% が結合ペプチドとなったことが確認できた。しかし、チロシナーゼ量を増やすとむしろ結合ペプチド生成量が低下したことから、使用したマッシュルームチロシナーゼの作用によりペプチド部分の分解もしくはカテコール部分の変換が起きる可能性が示唆された。今後、反応時間や酵素量の最適化、阻害剤の使用などを検討し、試験条件の検討を進める。

## E. 結論

システイン含有ペプチド DPRA(Cys) を rhododendrol が酸化されて生じるカテコール DHPBoI と混合したところ、DPRA(Cys) のピークが消失し、DHPBoI がシステイン残基に結合したペプチドが生成した。Raspberry ketone が酸化されて生じるカテコール DHPBoI でも同様にカテコールが結合したペプチドが生成した。一方、rhododendrol および raspberry ketone では結合ペプチドは生成しなかった。

DPRA(Cys) をリン酸緩衝液 (pH6.5) 中でマッシュルーム由来チロシナーゼおよび rhododendrol と混合して反応させたところ、DHPBoI が結合したペプチドが生成し、チロシナーゼを除いた場合には見られなかった。反応を大スケールで行い、調製的 HPLC により生成物を精製して定量用標準物質として定量したところ、基質 rhododendrol の約 60% がペプチドと結合していた。

## 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

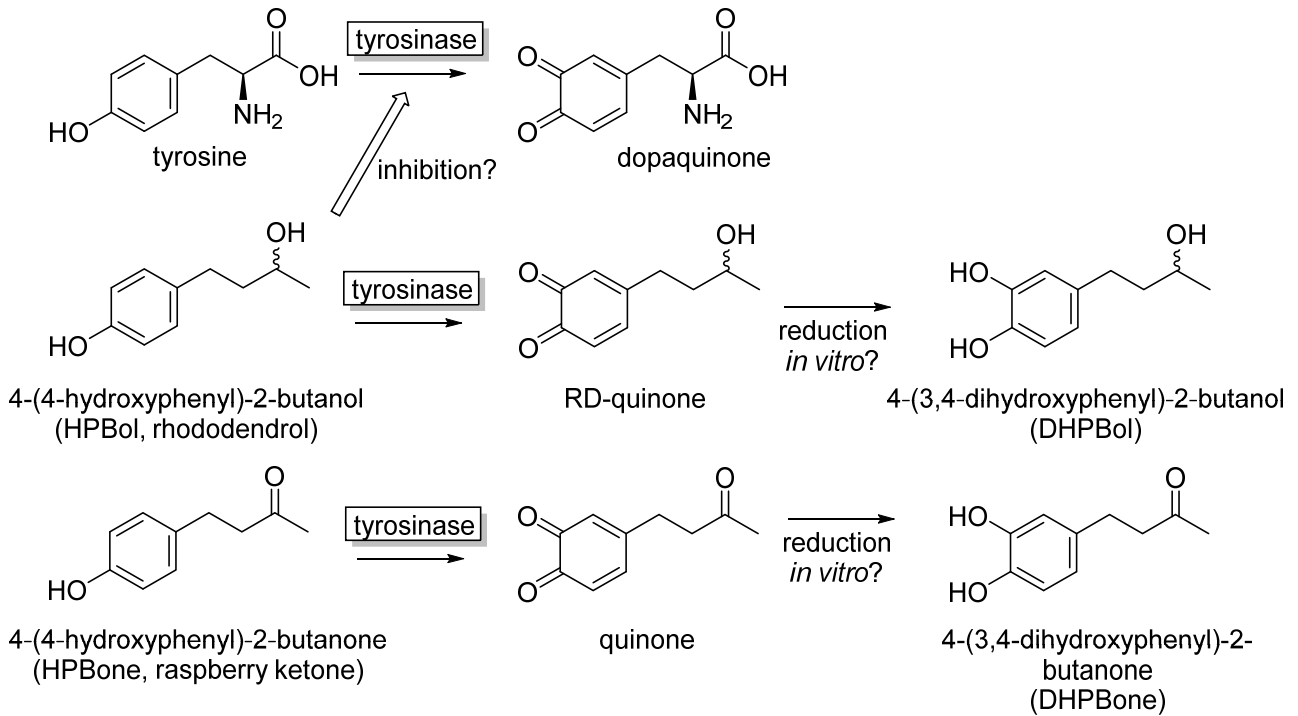


図 1 . Rhododendrol のチロシナーゼによる酸化 .

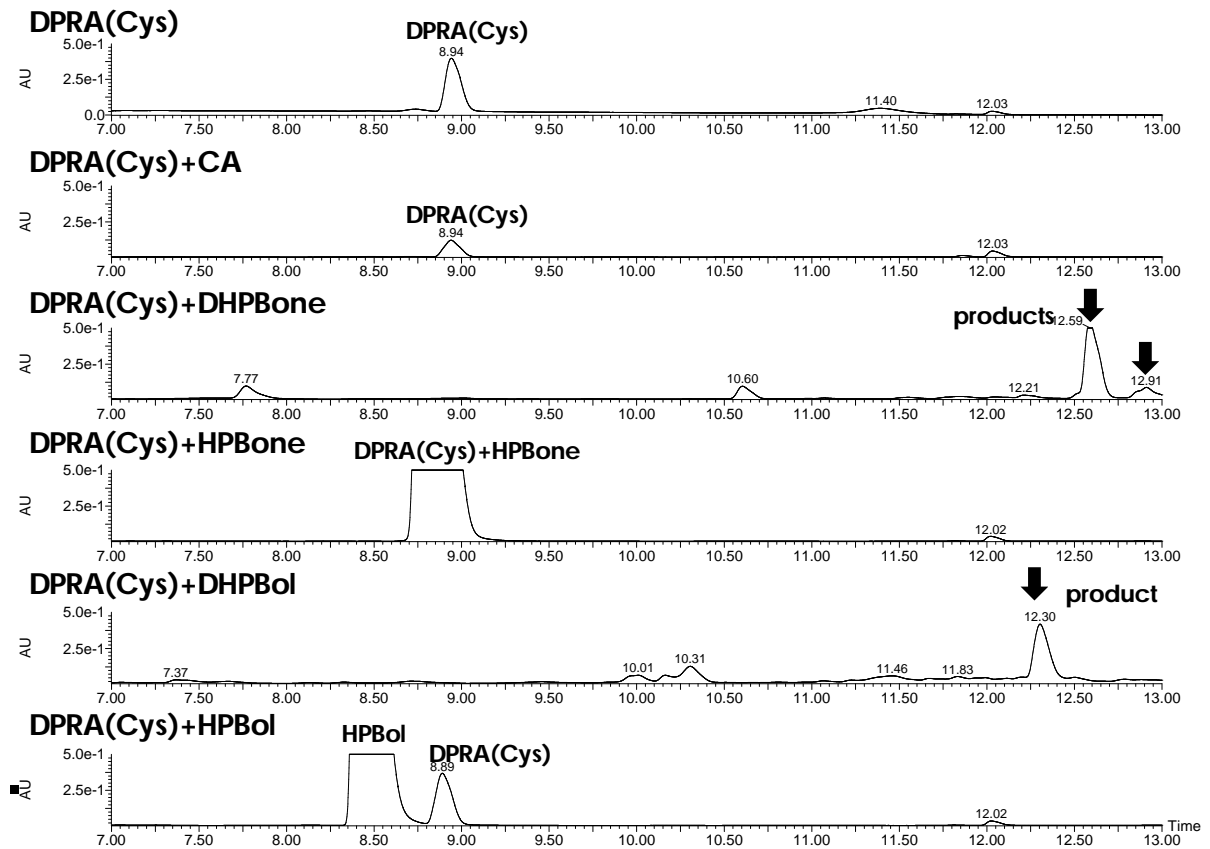


図 2 . チロシナーゼを用いない DPRA(Cys)反応液の UV クロマトグラム (検出波長: 220 nm) . DHPBol および DHPBone は 7 分より早く溶出する .



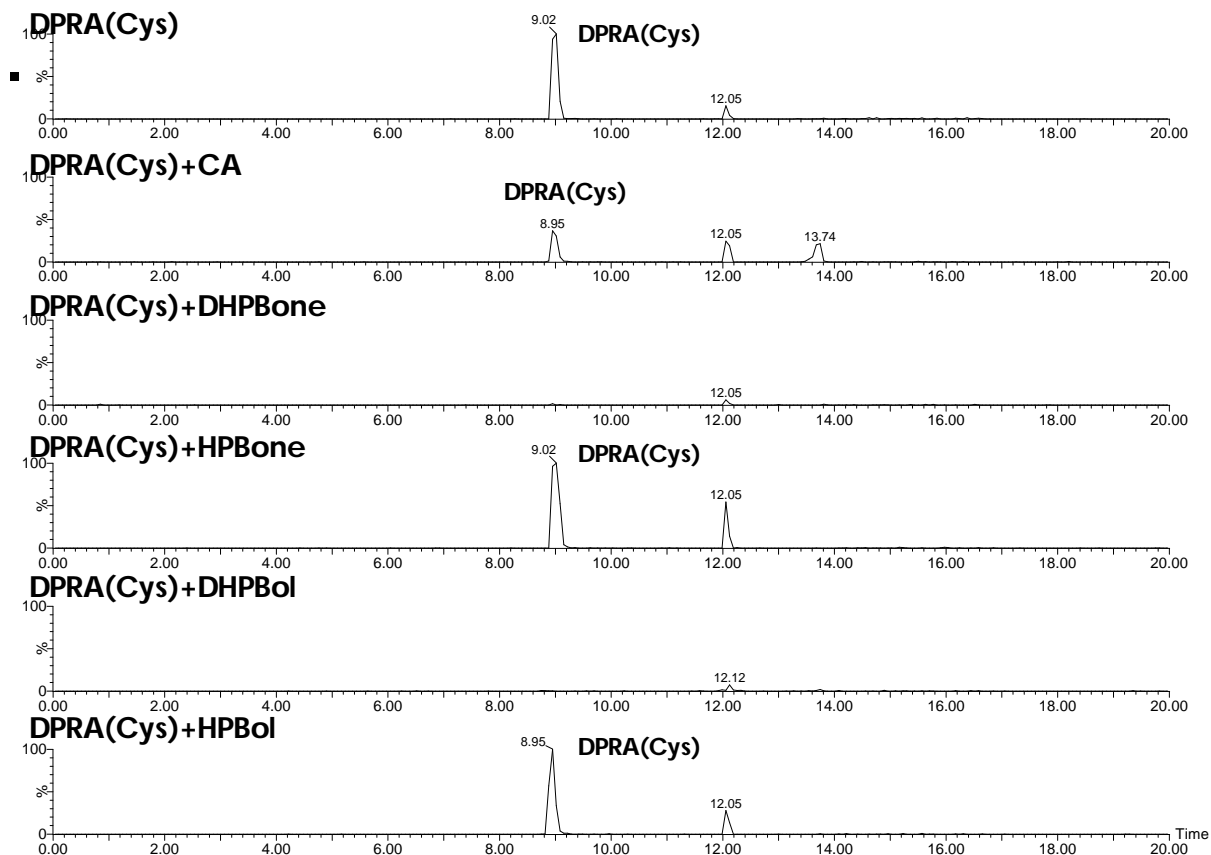


図 3. チロシナーゼを用いない DPRA(Cys) 反応液のマスクロマトグラム ( $m/z751$ ) .

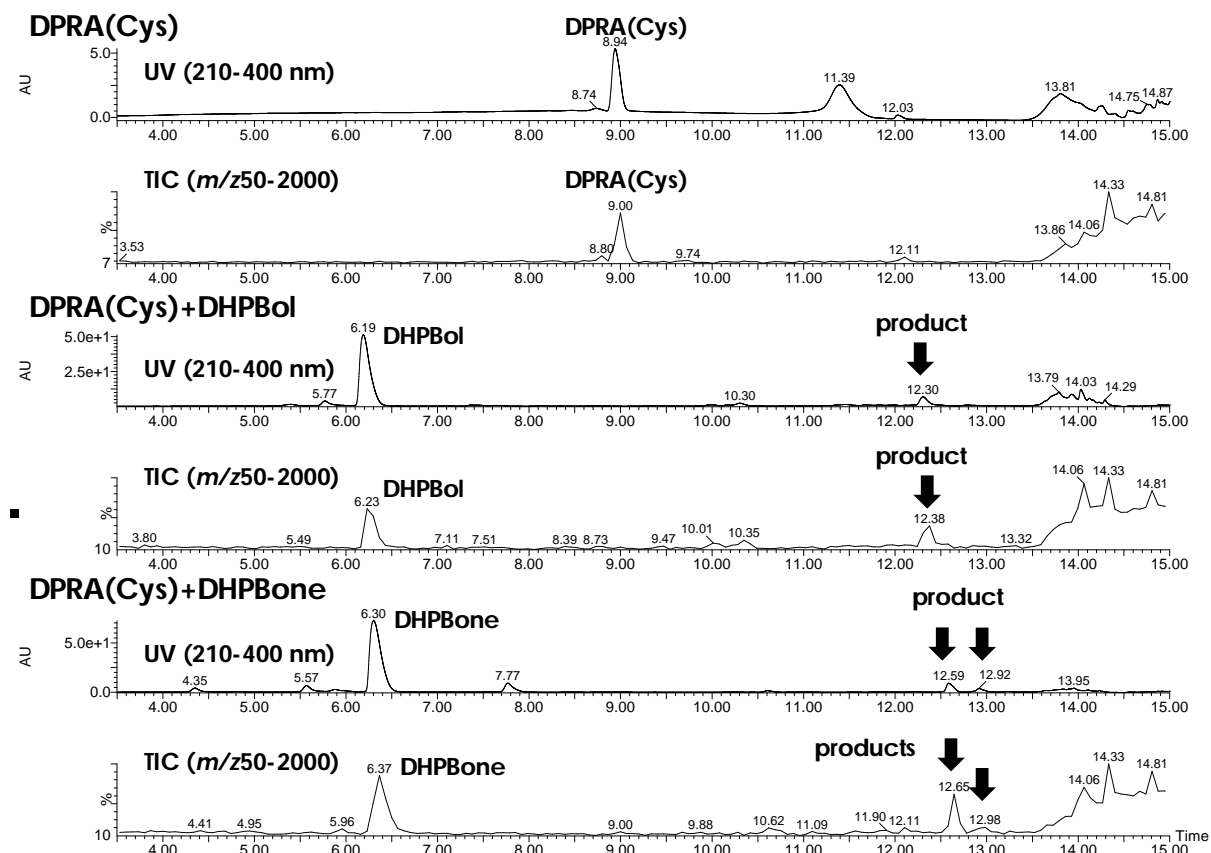




図 4. チロシナーゼを用いない DPRA(Cys)反応液の全波長クロマトグラムおよび TIC .

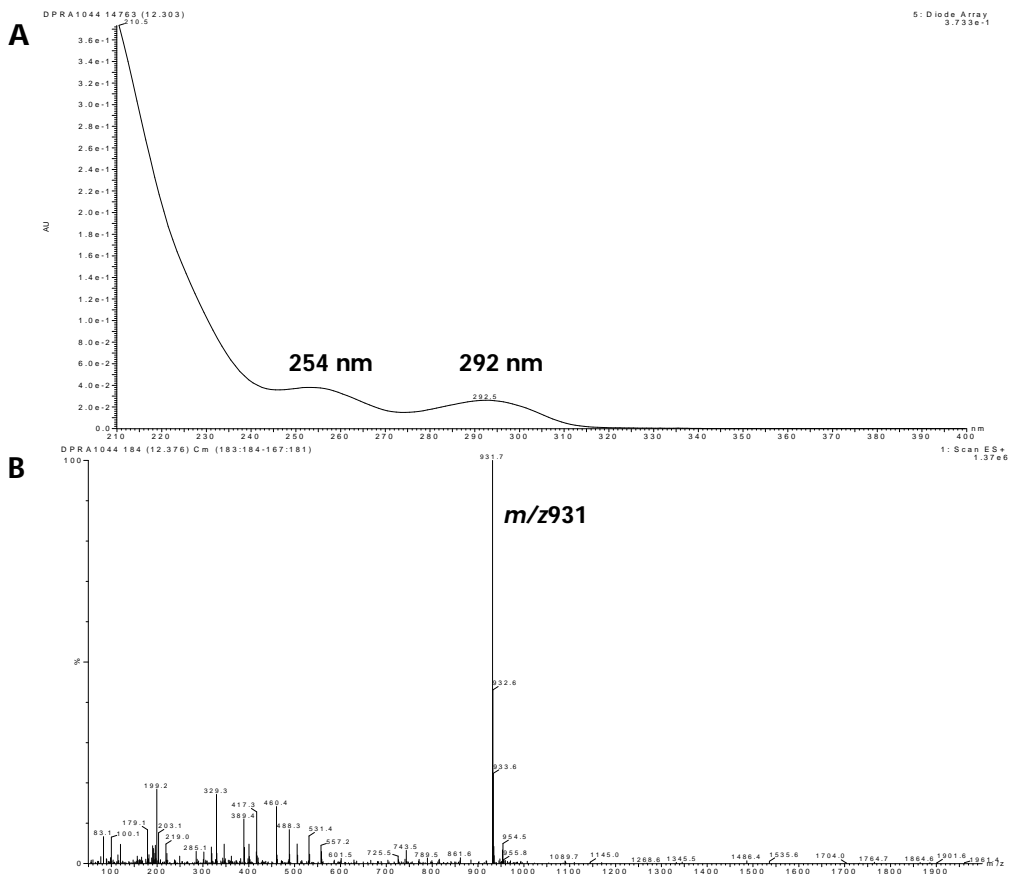


図 5. DHPBol 反応液に見られた 12.3 分のピークのスペクトル. A. UV スペクトル. B. マススペクトル.

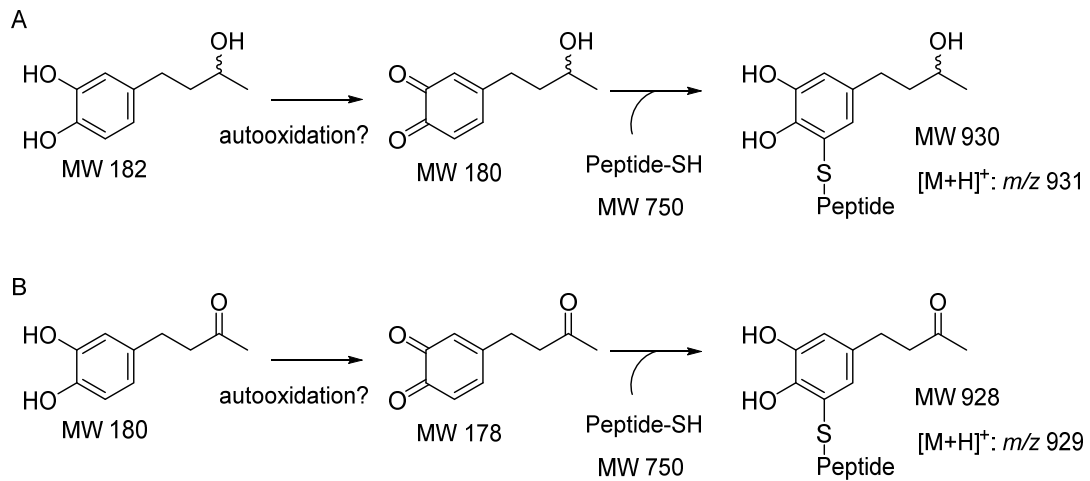


図 6. 結合ペプチドの構造とその生成機構. A. DHPBol 反応液. B. DHPBone 反応液.

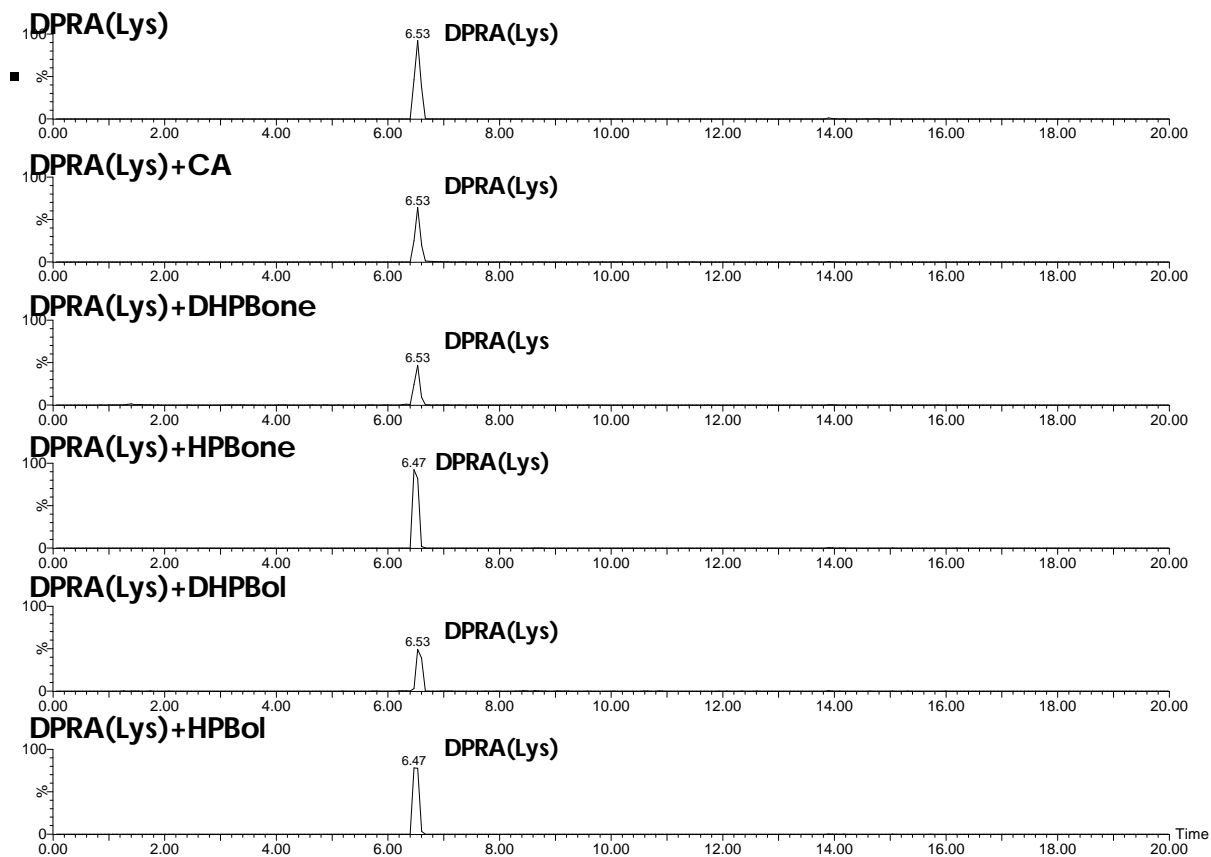


図 7. チロシナーゼを用いない DPRA(Lys)反応液のマスクロマトグラム ( $m/z$ 389) .

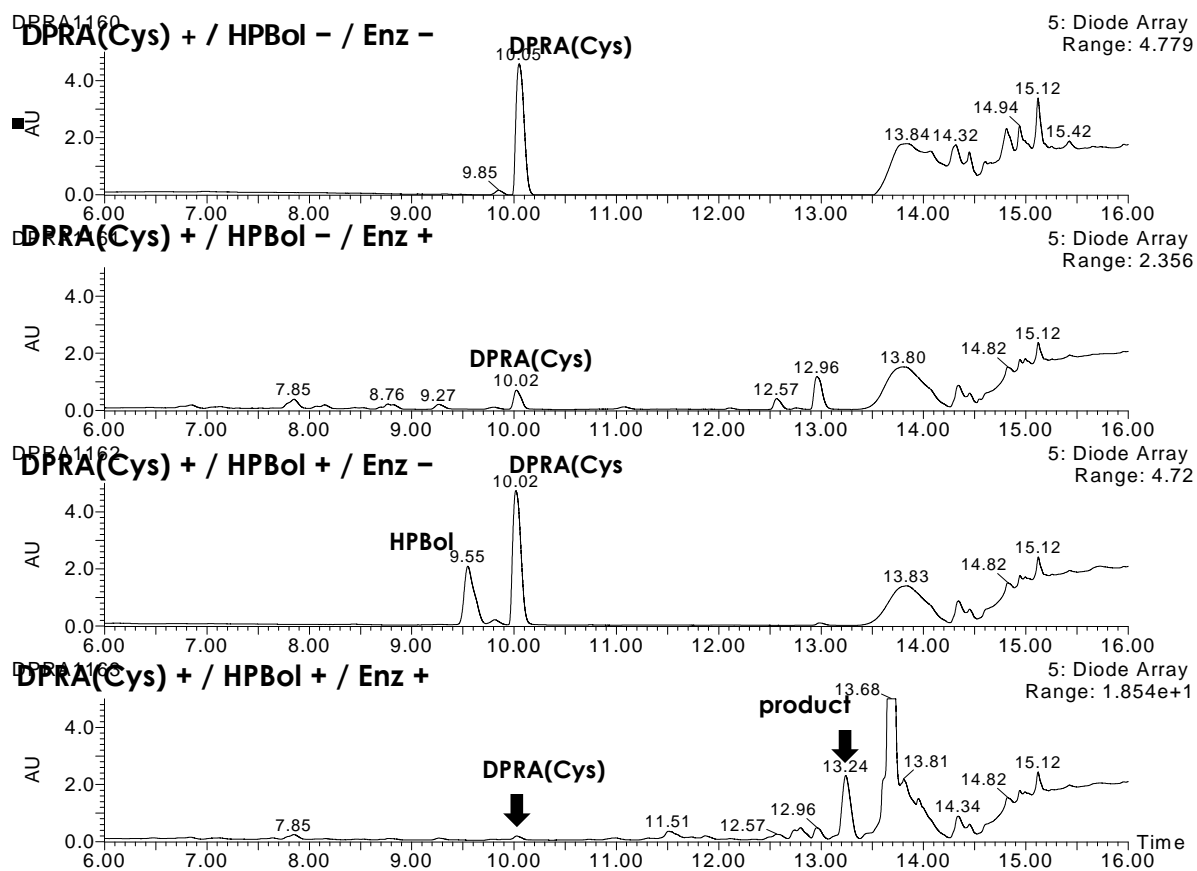


図 8. チロシナーゼカップリング反応の全波長クロマトグラム.

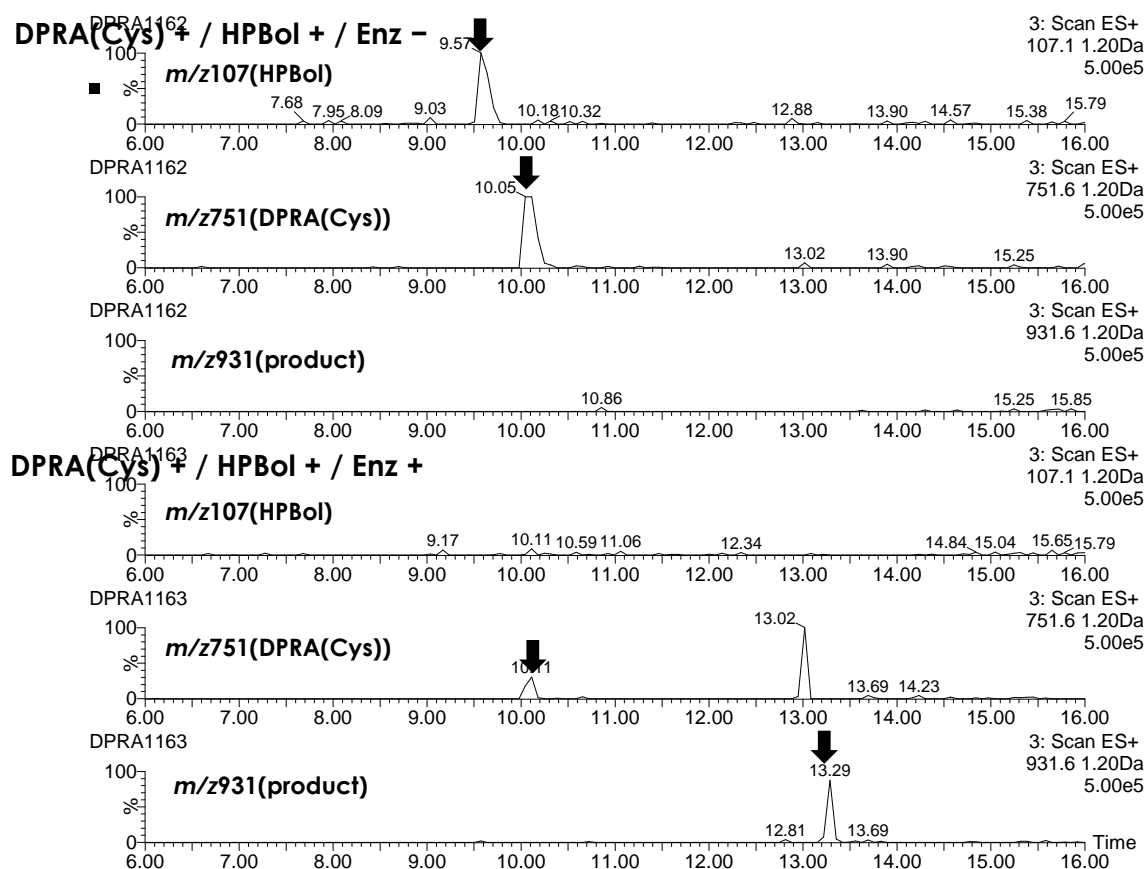


図 9. チロシナーゼカップリング反応のマスクロマトグラム.

表 1. チロシナーゼ量が基質残存量と結合ペプチド生成量に与える影響.

Tyrosinase (units)	HPBol ( $\mu\text{M}$ )	DPRACys ( $\mu\text{M}$ )	product ( $\mu\text{M}$ )
0	100	500	0.0
3.75	0	154	59.5
7.5	0	109	49.6
15	0	68	35.3
30	0	16	20.3