

## 安全性評価法の構築(I)

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 (RD) 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。RD をはじめとする白斑誘導性 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼにより酸化されて *o*-キノンを生じることが報告されている。チロシナーゼによる酸化をペプチドへの結合を利用して検出する試験法の開発を検討した。

4 置換フェノールを基質として Direct Peptide Reactivity Assay 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) 及びマッシュルーム由来チロシナーゼと混合しインキュベートしたところ, raspberry ketone (RK), hydroquinone monobenzyl ether (BzP) 及び 4-*tert*-butylphenol (TBP) はいずれも RD と同様に減少し, ペプチドと結合したカテコール又はそのフラグメントが検出された。

終濃度 0.1–0.5 mmol/L の RD を基質とした反応において, RD の減少速度は初期 RD 濃度に比例し, また DPRA(Cys) の減少速度もほぼ同じであることから, この濃度範囲でチロシナーゼによる酸化を評価できると考えられた。基質濃度を 0.3 mmol/L とした反応において RD 及び RK はいずれも反応開始後 30 分まで経時的に減少した。

白斑症例の原因物質として報告がある 4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し, RD と DPRA(Cys) の減少に濃度依存性と時間依存性が見られたことから, チロシナーゼによる代謝活性化を検出する試験法としての条件の一部が満たされた。

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

### 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, RD, 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。

一方, RD 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 RD 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<sup>1)</sup>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RDからカテコールである 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) 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。このチロシナーゼによる酸化を検出する試験法の開発を検討した。不安定な *o*-キノンにシステイン含有ペプチドを結合させて安定化する方法を検討した。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。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

rhododendrol (RD) はカネボウより提供頂いた。raspberry ketone (RK) は和光純薬工業より、hydroquinone monobenzyl ether (BzP) は Fluka より、4-*tert*-butylphenol (TBP) 及び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) はスクラムより購入した。

### 2. 反応生成物の検出

112  $\mu\text{L}$  の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 166.5  $\mu\text{L}$  の超純水を加え、1.0  $\mu\text{L}$  の 30 mmol/L 基質溶液を加えた後、22.5  $\mu\text{L}$  の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。3.0  $\mu\text{L}$  の  $2.0 \times 10^3$  units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 で 0–360 分間インキュベートした。200  $\mu\text{L}$  の 0.5% 酢酸を加えて 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。

### 3. 基質濃度依存性の検討

109  $\mu\text{L}$  の 50 mmol/L KPB (pH6.5) に基質溶液との合計が 167.5  $\mu\text{L}$  となる量の超純水を加え、5.0, 10.0, 15.0, 20.0 又は 25.0  $\mu\text{L}$  の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、22.5  $\mu\text{L}$  の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。1.0  $\mu\text{L}$  の  $1.0 \times 10^4$

units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 で 30 分間インキュベートした。200  $\mu\text{L}$  の 0.5% 酢酸を加えて 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。

### 4. 時間依存性の検討

300  $\mu\text{L}$  の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 484.5  $\mu\text{L}$  の超純水を混合し、45  $\mu\text{L}$  の 6 mmol/L 基質溶液及び 67.5  $\mu\text{L}$  の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。179  $\mu\text{L}$  を採取し、0.6  $\mu\text{L}$  の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 120  $\mu\text{L}$  の 0.5% 酢酸を加えて 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。残った反応液に 2.4  $\mu\text{L}$  の  $1.0 \times 10^4$  units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 でインキュベートした。10, 20, 及び 30 分後に 180  $\mu\text{L}$  を採取し、120  $\mu\text{L}$  の 0.5% 酢酸を加えて 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。

### 4. LC/MS

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters) を用いた。LC/MS 条件は以下の通り。

#### (1) 条件 1

カラム, ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d.  $\times$  100 mm; particle size, 1.7  $\mu\text{m}$ ; 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: 0–2 min, 10%B; 2–12 min, 10–25%B; 12–13 min, 25–90%B; 13–15 min, 90%B; 15–15.5 min, 90–10%B; 15.5–20 min, 10%B. イオン化, ESI positive; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 10 又は 30 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) 又は SIR ( $m/z$  751.5 for DPRA(Cys), 857.5 for BzP product, 915.0 for TBP product, 929.6 for RK product, 931.6 for RD product).

#### (2) 条件 2

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.  $\times$

50 mm; particle size, 1.7  $\mu\text{m}$ ; Waters); カラム温度, 40 ; 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: 0–2 min, 10%B; 2–42 min, 10–70%B; 42–43 min, 70–90%B; 43–45 min, 90%B; 45–45.5 min, 90–10%B; 45.5–50 min, 10%B. イオン化, ESI positive; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 10 又は 30 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, SIR ( $m/z$  751.5 for DPRA(Cys), 929.6 for RK product, 931.6 for RD product).

## C. 研究結果

### 1. 反応生成物の検出

RD, RK, BzP 及び TBP を DPRA(Cys) 及びチロシナーゼと混合して 30 で 360 分間インキュベートした. 酢酸を加えて反応を止め, LC/MS により分析した. PDA クロマトグラムにおいていずれの反応についても基質及び DPRA(Cys) のピーク面積が減少した. また, PDA クロマトグラム, SCAN 分析における TIC, SIR 分析における TIC のいずれかにおいて新たなピークの出現が確認された. SCAN 分析の結果から, これらの新たなピークのマススペクトルのベースピークは, RD, RK, BzP, TBP の反応液について, それぞれ  $m/z$  931, 929, 857, 915 であると判明した.

RD, RK 及び TBP について検出されたイオンは対応するカテコールが結合したペプチドの  $[M + H]^+$  と考えられた (図 1A, B, D). BzP は図 1C に示すようなフラグメントと考えられる.

### 2. Rhododendrol の反応条件

DPRA 法と同様に単一の基質濃度で行うことが望ましいため, 適切な基質濃度の設定を目的として, 反応に与える基質濃度の影響を検討した.

DPRA 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) は終濃度 0.5 mmol/L (150 nmol), 終濃度 0.1–0.5 mmol/L (30–150 nmol) の RD と

混合し, 終濃度 33 units/mL マッシュルーム由来チロシナーゼを加えて反応液量を 0.3 mL として 25 で 30 分間インキュベートし, 0.2 mL の 0.5% 酢酸を加えて反応を止め, ろ過して検液とした.

検液を HPLC で分析して RD と DPRA(Cys) の残存濃度を求め, 図 2A に示した. 初期濃度から残存濃度を引いた値から減少速度 ( $\text{mol/L}\cdot\text{s}$ ) を求め, 図 2B に示した. RD の減少速度は RD 初期濃度に比例していることから, 基質濃度は酵素濃度に対して十分低いと言える. また, DPRA(Cys) の減少速度もほぼ同じであることから, 生成した *o*-キノンが速やかにペプチドと結合していることがわかる.

以上より, 終濃度 0.1–0.5 mmol/L の範囲であればチロシナーゼによる酸化とペプチドへの結合を評価できると考えられた. この範囲の中央の基質濃度 0.3 mmol/L, DPRA(Cys) 濃度 0.5 mmol/L, チロシナーゼ量 33 units/mL を反応条件と設定した.

### 2. Rhododendrol の反応性及び時間依存性

次に rhododendrol の反応性を検討した. rhododendrol を DPRA 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) およびマッシュルーム由来チロシナーゼと混合してインキュベートし, チロシナーゼ添加前 (0 分), 添加後 10, 20, 30 分に一部を取り, ODS カラムを用いた LC/MS により分析した.

0 分と 30 分の PDA クロマトグラムを図 3A に示す. 30 分では 0 分と比較して RD 及び DPRA(Cys) のピークの減少が見られ, 結合ペプチドの生成が見られている.

0, 10, 20, 30 分の反応液を分析し, RD 及び DPRA(Cys) の残存率と反応時間の関係を図 3B のグラフに示した. 時間依存的に減少していることがわかる.

### 3. Raspberry ketone の反応性

raspberry ketone について同様の検討を行っ

た。DPRA(Cys)を用いない場合、30分のPDAクロマトグラムでは、0分のものと比較してRK及びDPRA(Cys)のピークの減少が見られ、新たなピークの生成が見られている(図4A)。

0, 10, 20, 30分の反応液を分析し、RK及びDPRA(Cys)の残存率と反応時間の関係を図4Bのグラフに示した。時間依存的に減少していることがわかる。

#### D. 考察

Rhododendrol (RD) 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、チロシナーゼにより酸化を受けることを検出可能な試験法は白斑誘導能のスクリーニング法として利用できる可能性がある。しかし、チロシナーゼ酸化により生じる *o*-キノン是不安定である。

昨年度の検討において、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)で使用するヘプタペプチドDPRA(Cys)を共存させてRDのチロシナーゼによる酸化反応を行うと、RDが酸化されたカテコールがCys残基に結合したペプチドの生成が確認された。このペプチドを、*o*-キノンの安定化と反応系からの除去に利用できると考えた。

raspberry ketone (RK), hydroquinone monobenzyl ether (BzP) 及び 4-*tert*-butylphenol (TBP) はRDの場合と同様にカテコールが結合したペプチドが検出され、DPRA(Cys)がRD以外の *o*-キノンの安定化に利用できると示唆された。

次に反応に与える基質濃度の影響を検討した。終濃度0.1–0.5 mmol/Lの範囲ではRDの減少速度は初期濃度に比例していることから、基質濃度は酵素濃度に対して十分低いと言え、また、DPRA(Cys)が同様の速度で減少していることは、*o*-キノンの安定化が効率良く進んでいることを意味している。

RDの終濃度を0.3 mmol/Lとして30分間に渡り反応を行い、その減少を観察したところ、時間依存的に減少していることが判明した。RKも同様であった。

以上のように濃度依存性と時間依存性が見られた。今後、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法として確立させるため、再現性の検討を行う。

#### E. 結論

白斑症例の原因物質として報告がある4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し、RDを基質とした反応でRD及びDPRA(Cys)の減少速度がRDの初期濃度及び時間に依存していたことから、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法としての条件の一部が満たされた。

#### 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, 伊藤祥輔, 内野正, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol のシステイン含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年7月)

秋山卓美, 清水久美子, 富田由花, 伊藤祥輔, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol 及び構造類似化合物のCys含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 日本薬学会第137年会(2017年3月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし

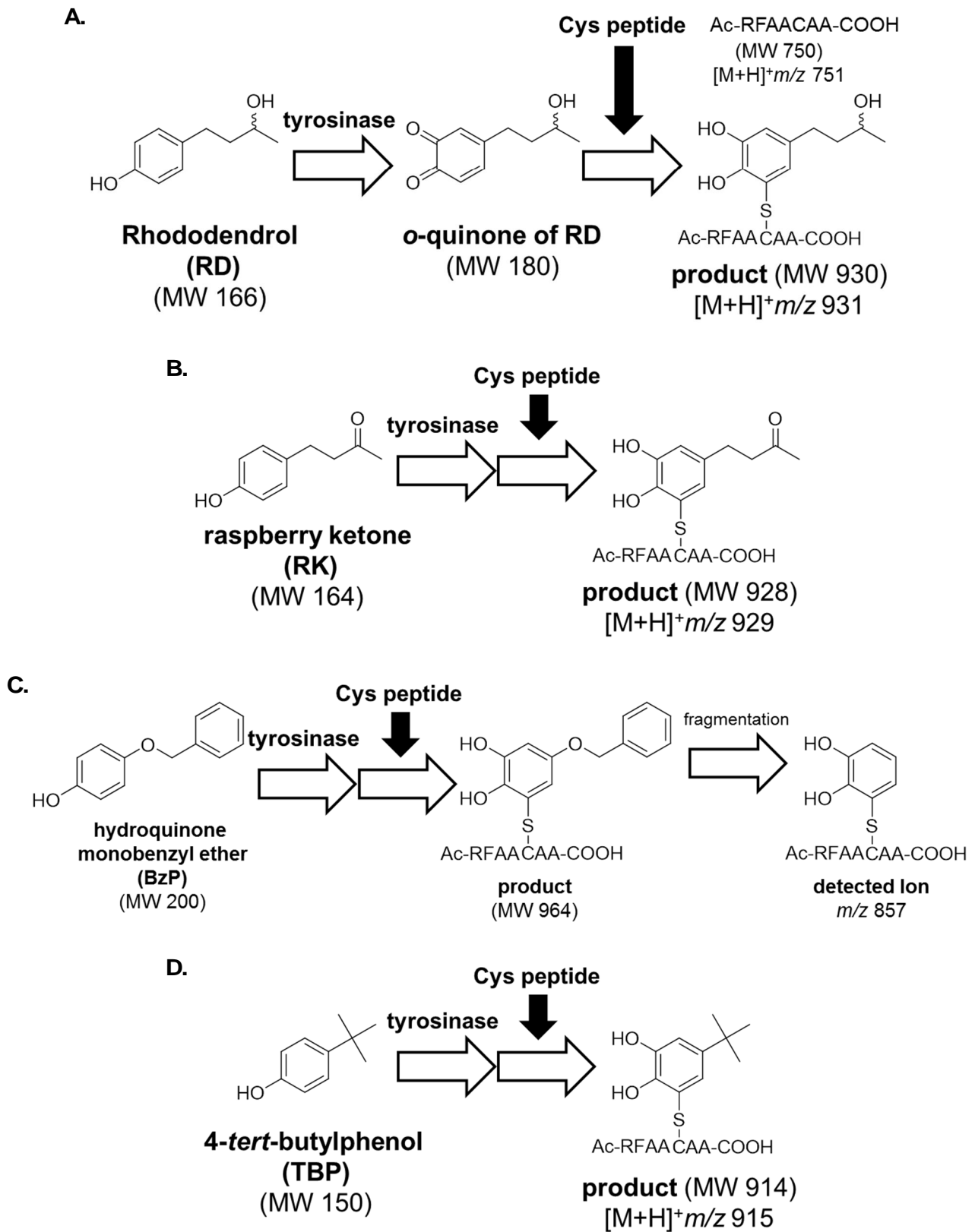


図 1. チロシナーゼによる酸化とペプチドとの結合. **A:** rhododendrol を基質とした反応. **B:** raspberry ketone を基質とした反応. **C:** hydroquinone monobenzyl ether を基質とした反応. **D:** 4-tert-butylphenol を基質とした反応.

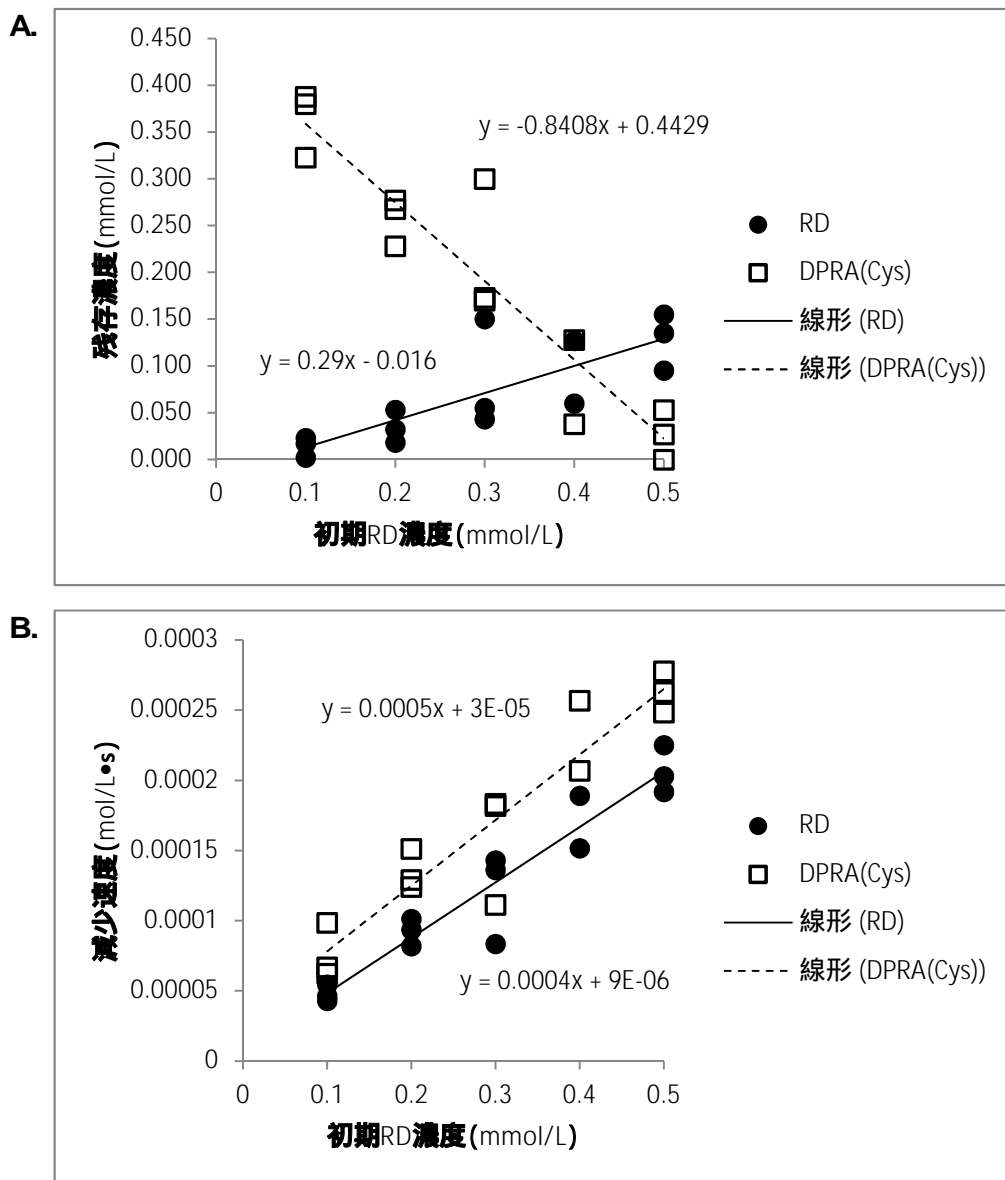


図 2. Rhododendrol を基質とした反応に対する基質濃度の影響 . A: 残存濃度に対する影響 . B: 減少速度に対する影響 .

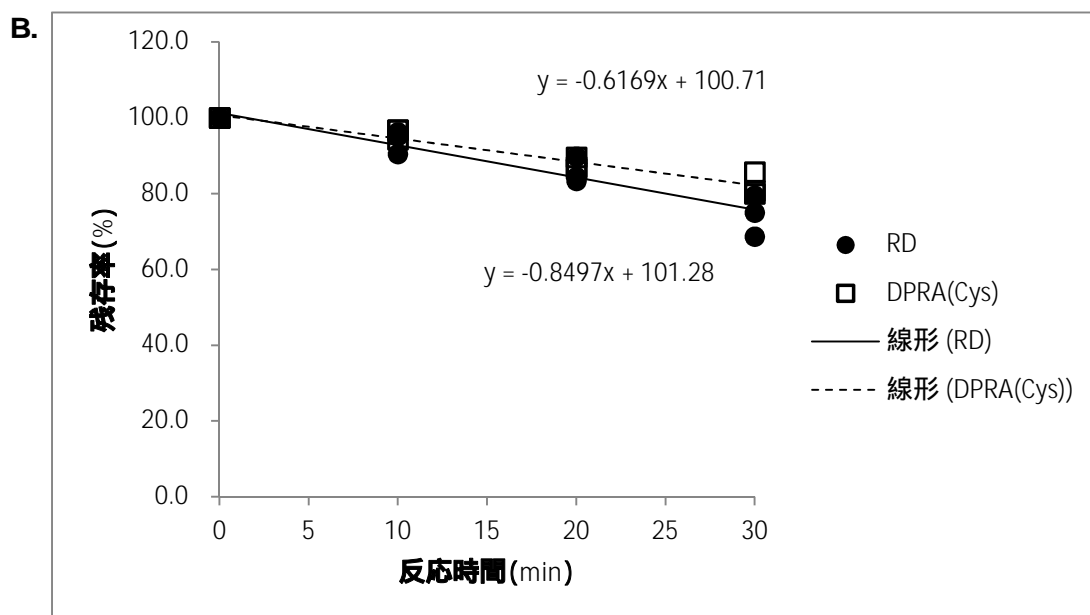
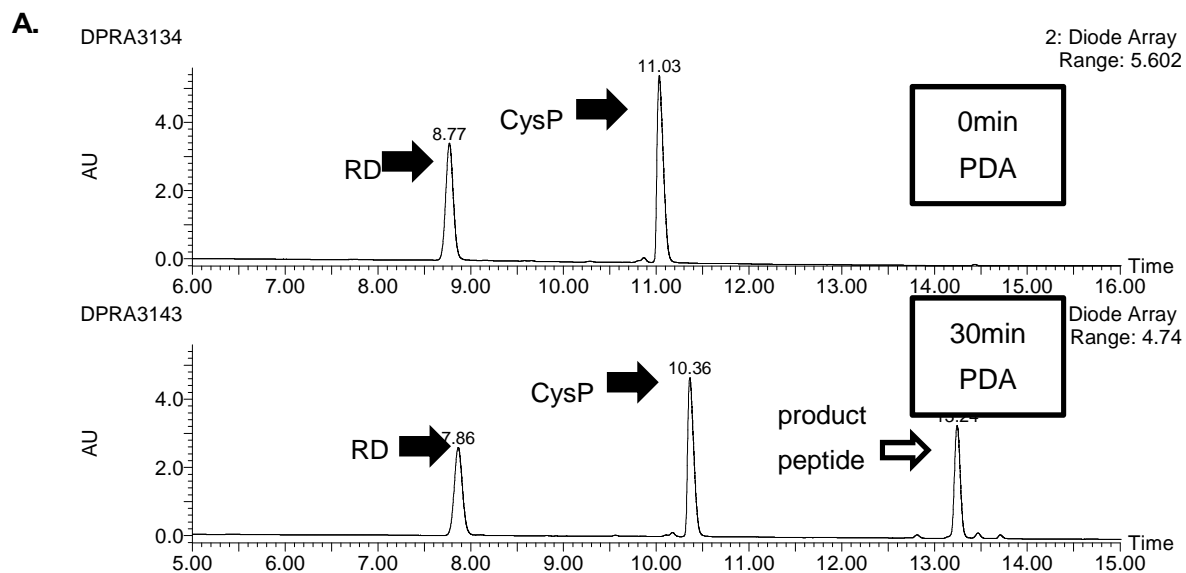
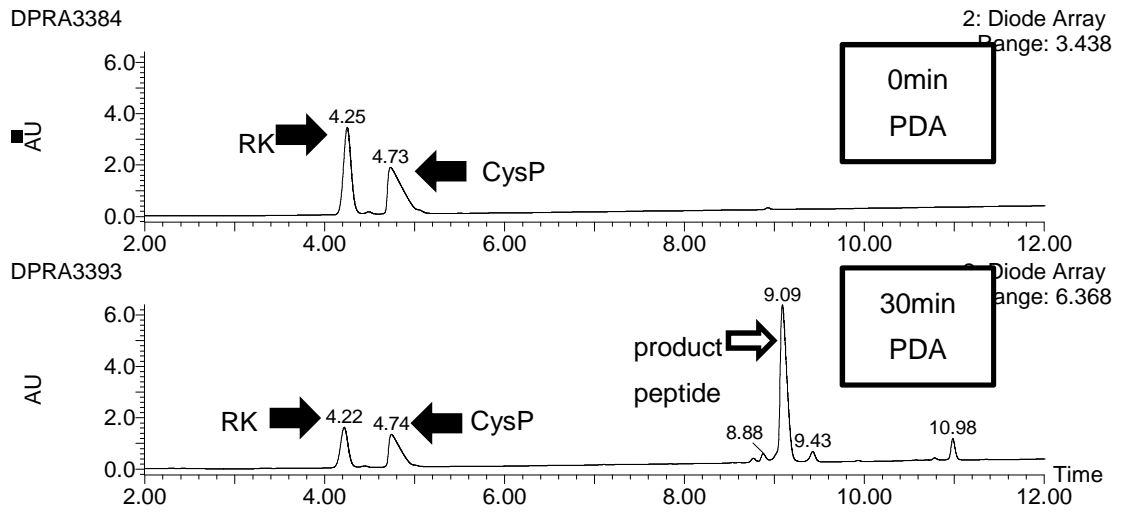


図 3. rhododendrol を基質とした反応 . A: PDA クロマトグラム . B: 残存率の変化 .

A.



B.

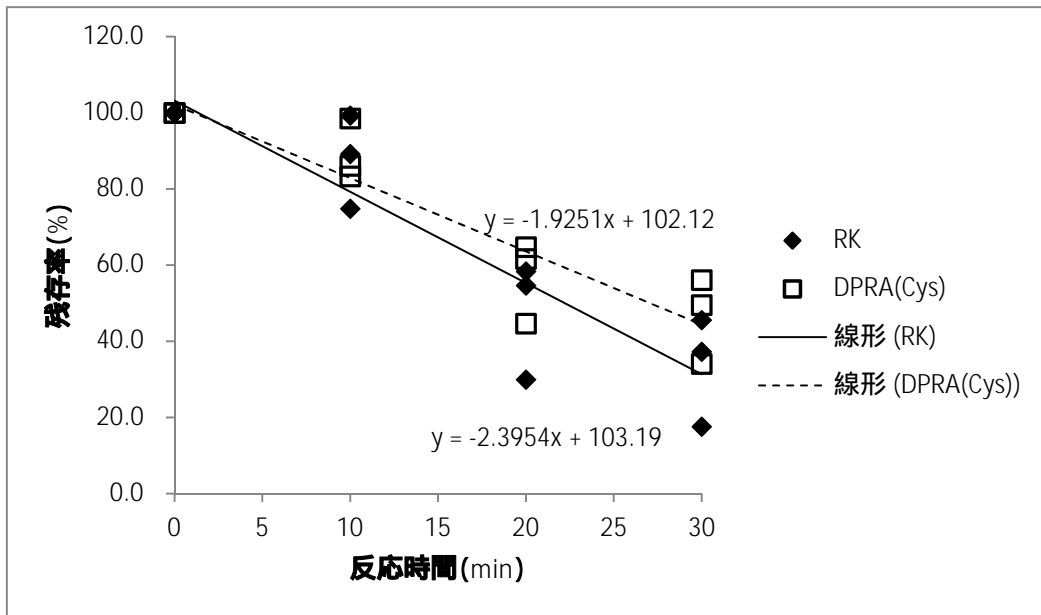


図 4. Raspberry ketone を基質とした反応 . A: PDA クロマトグラム . B: 残存率の変化 .