

## 安全性評価法(代謝物分析系)の構築

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

研究協力者 伊藤祥輔 藤田保健衛生大学 医療科学部 名誉教授

研究協力者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

### 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検出する試験法の開発を検討した。

ヒトチロシナーゼを用いて RD 等の 4 置換フェノールの *in vitro* 酸化が起こるか検討した。rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-benzyloxyphenol (BzP, monobenzene), 4-methylphenol (MeP, *p*-cresol), resveratrol (RES), 4-methoxyphenol (MoP), 4-*tert*-butylphenol (TBP), 4-*S*-cysteaminyphenol (CAP) 及び 4-chlorophenol (CIP) について酸化が起きたことが確認された。rucinol (RUS, 4-butylresorcinol) 及び methyl 4-hydroxybenzoate (MOB, methylparaben) は酸化が確認されなかった。マッシュルームチロシナーゼの基質となるフェノール体は、いずれもヒトチロシナーゼによっても酸化された。

### 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。

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代謝を受けることを、平成 25 年から開始した厚生労働科学研究費補助金「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。RD はマッシュルーム由来チロシナーゼに酸化されて *o*-キノンになり、さらに還元反応により生じた 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) カテコールとして検出された。一方、Raspberry ketone (RK) 等の 4 置換フェノールでも同様に酸化されるものがあった。

白斑誘導が知られる 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼで酸化され、白斑発症との関連が強く示唆される。薬用化粧品の安全性確保のため、

試験方法の開発が望まれることから、協力研究者伊藤は厚生労働行政推進調査事業費補助金「機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」の分担研究「安全性評価法の構築(II)」において、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。マッシュルームチロシナーゼによるRDの酸化をRDの減少とRD catecholの検出により確認し、また、フェノールの構造による酸化の有無を判別できる方法を開発した(Ito and Wakamatsu, J Dermatol Sci 2015; 80:18-24)。さらに、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)を用いたところ、ペプチドと結合したRD catecholがLC/MSにより検出された。

これまでの白斑誘導性フェノール類の研究には入手の容易なマッシュルームチロシナーゼが主に使用されてきた。しかし、ヒトの安全性評価の目的にはヒトチロシナーゼを用いる方法が望ましい。

ヒトチロシナーゼは膜貫通型のタンパクであるが、膜貫通ドメインを切断しても活性を維持した可能性タンパクとして動物細胞に発現できることがCordesらにより報告されている(Biol Chem 2013; 394:685-693)ため、「機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」分担研究「安全性評価法の構築(III)」(最上知子)において、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞におけるヒトチロシナーゼの一過性発現を検討した。

本研究では、このヒトチロシナーゼを用いてRD等の4置換フェノールの*in vitro*酸化が起こるか検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

フェノールとして rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-benzyloxyphenol (BzP, monobenzene), 4-methoxyphenol (MoP), 4-*tert*-butylphenol (TBP), 4-*S*-cysteaminyphenol (CAP),

4-methylphenol (MeP, *p*-cresol), 4-chlorophenol (ClP), resveratrol (RES), rucinol (RUS, 4-butylresorcinol), methyl 4-hydroxybenzoate (MOB, methylparaben)及びapigeninを用いた(Fig. 1)。

RD-catechol, RK-catechol, benzyloxycatechol, methoxycatechol, *tert*-butylcatechol, Me-catechol及びCl-catecholは市販品あるいはマッシュルームチロシナーゼで酸化して調製した。

ヒトチロシナーゼは、膜貫通ドメインを欠くアミノ酸残基 1-438 に相当する cDNA と His タグをベクターに組み込み、293T 細胞に一過性に発現させ調製した。培地に分泌された可溶性ヒトチロシナーゼを回収・精製・脱塩を行った。詳細は平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」分担研究報告書「安全性評価法の構築(III)」(最上知子)に記載した。

### 2. ヒトチロシナーゼによる酸化

フェノール体 100  $\mu$ M を L-ドーパ 10  $\mu$ M の存在下、pH 7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液 100  $\mu$ L 中でヒトチロシナーゼ 10  $\mu$ L 又は 20  $\mu$ L により 37  $^{\circ}$ C で酸化した。反応は、30 分後に反応液 20  $\mu$ L に、5 mM アスコルビン酸 5  $\mu$ L、ついで 0.8M HClO<sub>4</sub> 25  $\mu$ L を加えて停止した。この 25  $\mu$ L を HPLC に注入し、分析した。HPLC 条件は、Ito and Wakamatsu の方法に準拠しフェノール及びカテコールを定量した。

## C. 研究結果

11 種のフェノールをヒトチロシナーゼと 30 分間反応させた。RD, RK, BzP, MeP, RES, MoP, TBP, CAP 及び ClP についてはフェノールの減少が見られた。このうち、RD, RK, BzP, MoP, MeP, TBP 及び ClP については同時に対応するカテコールである RD-catechol, RK-catechol, benzyloxycatechol, methoxycatechol, *tert*-butylcatechol, Me-catechol 及び Cl-catechol が検出された。CAP からはベンゾキノン体が検

出され、RES については 2 つの生成物が見られた。RUS はフェノールの減少が見られず、MOB はわずかに減少したものの生成物が検出されなかった。

難溶性の apigenin は 5% DMSO の存在下では溶解するが、マッシュルームチロシナーゼによっても酸化されないことから本実験の基質としては用いなかった。

Fig. 2 に 30 分間に消費されたフェノールと生成したカテコールの量を 3 回の実験の平均値  $\pm$  SEM として示した。反応性が高いのは、RD, RK, BzP, MeP, RES であり、MoP, TBP, CAP, CIP はやや低かった。

以上の結果、マッシュルームチロシナーゼの基質となるフェノール体は、いずれもヒトチロシナーゼによっても酸化された。主たる生成物は、*o*-キノン体あるいはカテコール体であった。

#### 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発症と関連していることが強く示唆される。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方法の開発が望まれる。そこで「機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」の分担研究「安全性評価法の構築 (II)」において、伊藤はフェノール類のチロシナーゼに対する反応性を検討した。チロシナーゼとしては試薬として入手が容易なマッシュルームチロシナーゼを用いた。その結果、RD, RK, BzP, MoP 及び TBP について基質が減少し、対応するカテコールが検出され、酸化が起これを確認した (Ito and Wakamatsu (2015))。また、MeP, RES, CAP 及び CIP についても酸化が起これを確認した。

ヒトの安全性評価の目的にはヒトチロシナーゼを用いる方法が望ましい。チロシナーゼの阻害剤

に関しては、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼに特異性に違いがあることが最近 Kolbe らにより報告され (Mann *et al.* J Inv Dermatol 2018; in press) たことから、安全性評価についてヒトチロシナーゼを用いる必要性が支持される。そこで、この手法によりフェノールの酸化を観察することが可能であることが示されたため、ヒトチロシナーゼを用いた反応を検討することとした。

RD はマッシュルームチロシナーゼの場合と同様に RD-catechol が検出され、今回用いたリコンビナントヒトチロシナーゼが *in vitro* 系で RD を酸化できることが示された。

他の 4 置換フェノールでは、RK, BzP, MeP, RES, MoP, TBP, CAP 及び CIP は RD と同様に酸化された。しかし、RUS 及び MOB は酸化が見られなかった。以上の結果はマッシュルームチロシナーゼの場合と同様であった。

#### E. 結論

マッシュルームチロシナーゼの基質となるフェノール体は、いずれもヒトチロシナーゼによっても酸化された。主たる生成物は、*o*-キノン体あるいはカテコール体であった。チロシナーゼによる代謝活性化を用い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

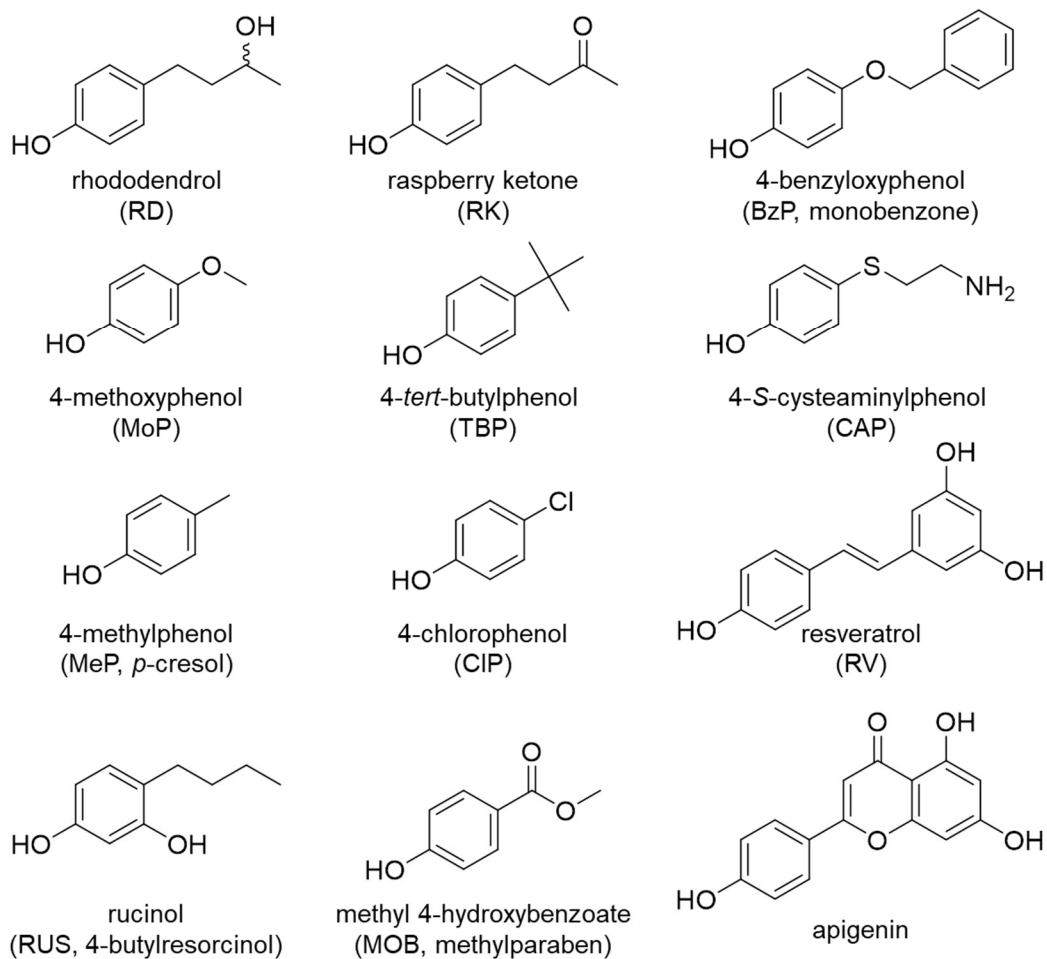
なし

##### 2. 学会発表

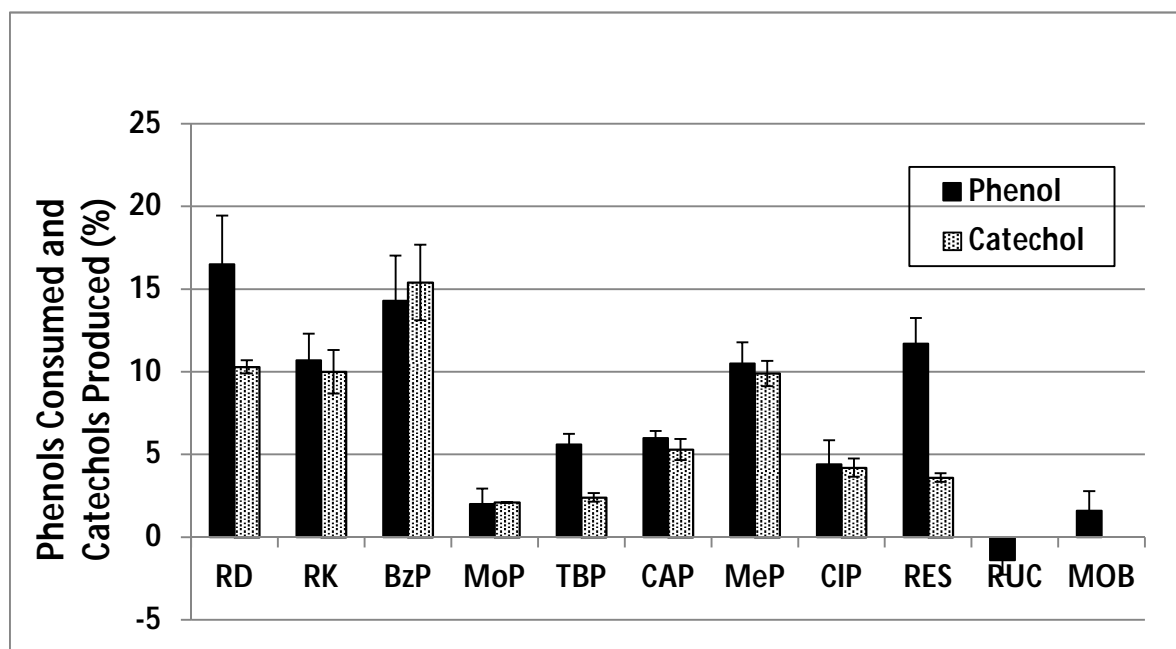
なし

#### 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



**Fig. 1.** Structures of 4-substituted phenols.



**Fig. 2.** Effects of Human Tyrosinase on Various Phenols.