

## 安全性評価法(代謝物分析系)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目的として基質特異性を検討した。

23 種の 4 置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか検討した。水酸基のパラ位に結合する炭素が 1 級または 2 級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が 3 級, 4 級またはベンゼン環である化合物は, 検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが 1 又は 2 の化合物は酸化が起きず, 3 以上の化合物は結合ペプチドを生成した。

### 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, 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) カテコールなど複数の化合物として検出された。

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, 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(I)」において, チロシナーゼによる酸化を検出する試験

法の検討を行った。Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(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、カテコールが結合したペプチドが生成した。白斑を誘導した4置換フェノール raspberry ketone, hydroquinone monobenzyl ether 及び 4-*tert*-butylphenol も同様であった。不安定な *o*-キノンがシステインペプチドと結合して安定化したと考えられた。

本研究では、さらに多くの4置換フェノールを基質として用い、基質特異性の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

4置換フェノールとして 4-methylphenol (MePI), *p*-cresol), 4-ethylphenol (EtPI), 4-propylphenol (PrPI), 4-butylphenol (BuPI), 4-amyphenol (AmPI), 4-hexylphenol (HxPI), 4-heptylphenol (HpPI), 4-benzylphenol (BzPI), rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-isopropylphenol (iPrPI), 4-*sec*-butylphenol (sBuPI), 4-cyclohexylphenol (cHxPI), 4-*tert*-amyphenol (tAmPI), 4-phenylphenol (PhPI), 4-methylthiophenol (MeSPI), 4-methoxyphenol (MOPI), 4-ethoxyphenol (EtOPI), 4-propoxyphenol (PrOPI), 4-butoxyphenol (BuOPI), 4-*tert*-butoxyphenol (tBuOPI), 4-amyloxyphenol (AmOPI), 4-hexyloxyphenol (HxOPI), 4-benzyloxyphenol (BzOPI, monobenzene)を用いた(Fig. 1)。RD はカネボウより提供いただいた。その他の4置換フェノールは和光純薬工業、東京化成工業又はシグマアルドリッチから購入した。マッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入し、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. 反応条件

60  $\mu$ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5)に 97  $\mu$ L の超純水を加え、9.0  $\mu$ L の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、13.5  $\mu$ L の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)を加えて混合した。0.5  $\mu$ 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°Cで 30 分間インキュベートした。120  $\mu$ L の 0.5%酢酸を加えて混合し、検液とした。

## 3. HPLC

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.  $\times$  50 mm; particle size, 1.7  $\mu$ m; Waters);カラム温度, 40°C;移動相 A, 0.1% TFA in water;移動相 B, 0.08% TFA in acetonitrile;流量, 0.35 mL/min. グラジエント 1: 0–2 min, 10%B; 2–20 min, 10–37%B; 20–21 min, 37–90%B; 21–23 min, 90%B; 23–23.5 min, 90–10%B; 23.5–28 min, 10%B. グラジエント 2: 0–2 min, 10%B; 2–32 min, 10–55%B; 32–33 min, 55–90%B; 33–35 min, 90%B; 35–35.5 min, 90–10%B; 35.5–40 min, 10%B.

保持時間の小さい基質にはグラジエント1を、保持時間の大きい基質にはグラジエント2を用いた。

## C. 研究結果

検液をHPLCで分析し、DPRA(Cys)単独で分析した結果と比較した(Fig. 2, 3)。基質の保持時間は基質溶液を単独で分析することにより求めた。

その結果、MePI, EtPI, PrPI, BuPI, AmPI, HxPI, HpPI, BzPI, RD, RK, PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI 及び BzOPI では DPRA(Cys)及び基質のピークが減少または消失し、結合ペプチドと考えられるピークが生成した。一方、iPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI, PhPI, MeSPI, MeOPI 及び EtOPI では DPRA(Cys)及び基質のピークの減少が見られなかった。

## 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(I)」において検討したチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合させる方法について基質特異性の検討を行った。

23種の4置換フェノールを基質として反応を行い、HPLCで検液を分析した。すると、15種の4置換フェノールでは、反応液中のDPRA(Cys)が減少して結合ペプチドと考えられるピークが出現した。これらのうちMePI, EtPI, PrPI, BuPI, AmPI, HxPI, HpPI, BzPI, RD及びRKは、フェノールの水酸基のパラ位に結合するのが1級又は2級の炭素である。また、PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI及びBzOPIはフェノールの水酸基のパラ位に結合するのが酸素でエーテル結合を形成しており、かつ酸素に結合するのが炭素3個以上からなる直鎖の炭素鎖である。

一方、8種の4置換フェノールでは反応液中のDPRA(Cys)が減少しなかった。基質のピークも明確に観察されていることから、チロシナーゼによる酸化反応が進行していないと考えられる。これらのうちiPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI及びPhPIは水酸基のパラ位に結合する炭素が3級又は4級である。また、MeSPI, MeOPI及びEtOPIは、水酸基のパラ位に結合するのがイオウまたは酸素で、かつこれらに結合するのがメチル基またはエチル基

である。

以上の結果から、置換基全体の大きさとベンゼン環に結合した原子に属する電子の状態がチロシナーゼの活性部位と複雑に相互作用していることが示唆された。

## E. 結論

23種の4置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか検討した。水酸基のパラ位に結合する炭素が1級または2級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が3級、4級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが1又は2の化合物は酸化が起きず、3以上の化合物は結合ペプチドを生成した。

## F. 健康危険情報

なし

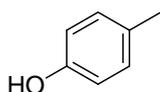
## G. 研究発表

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

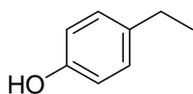
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

Phenol substituted with a primary carbon at position 4

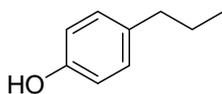


4-methylphenol (MePI, *p*-cresol)

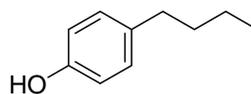
Phenols substituted with a secondary carbon at position 4



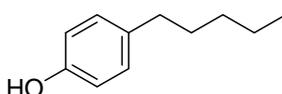
4-ethylphenol (EtPI)



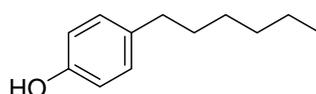
4-propylphenol (PrPI)



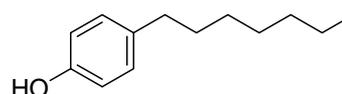
4-butylphenol (BuPI)



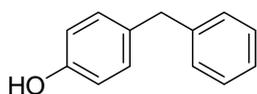
4-amylphenol (AmPI)



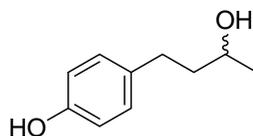
4-hexylphenol (HxPI)



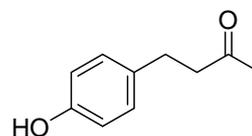
4-heptylphenol (HpPI)



4-benzylphenol (BzPI)

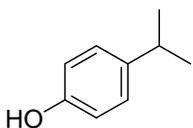


rhododendrol (RD)

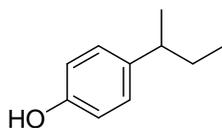


raspberry ketone (RK)

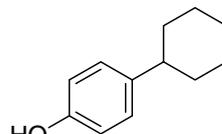
Phenols substituted with a tertiary carbon at position 4



4-isopropylphenol (iPrPI)

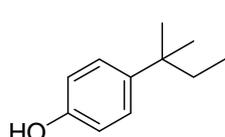


4-sec-butylphenol (sBuPI)

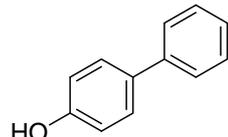


4-cyclohexylphenol (cHxPI)

Phenols substituted with a quaternary carbon at position 4

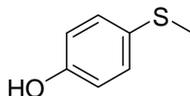


4-*tert*-amylphenol (tAmPI)

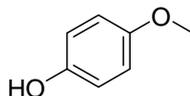


4-phenylphenol (PhPI)

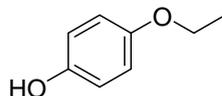
Phenols substituted with an ether group at position 4



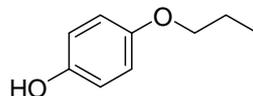
4-methylthiophenol (MeSPI)



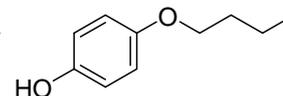
4-methoxyphenol (MeOPI)



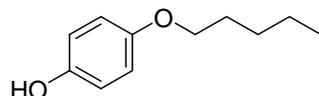
4-ethoxyphenol (EtOPI)



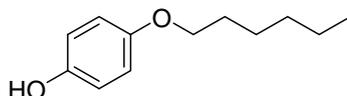
4-propoxyphenol (PrOPI)



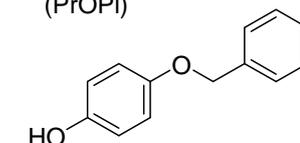
4-butoxyphenol (BuOPI)



4-amylloxyphenol (AmOPI)

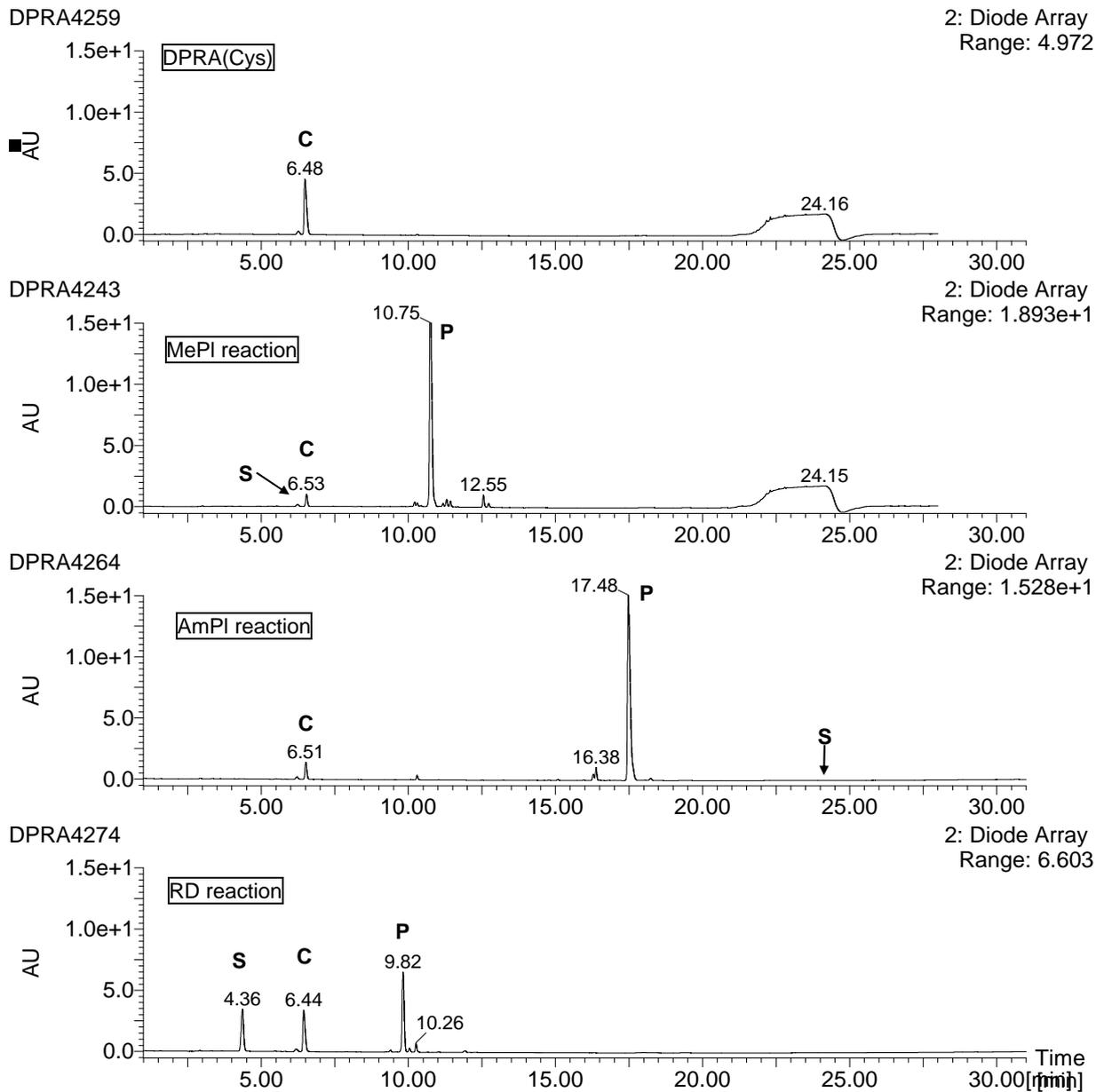


4-hexyloxyphenol (HxOPI)

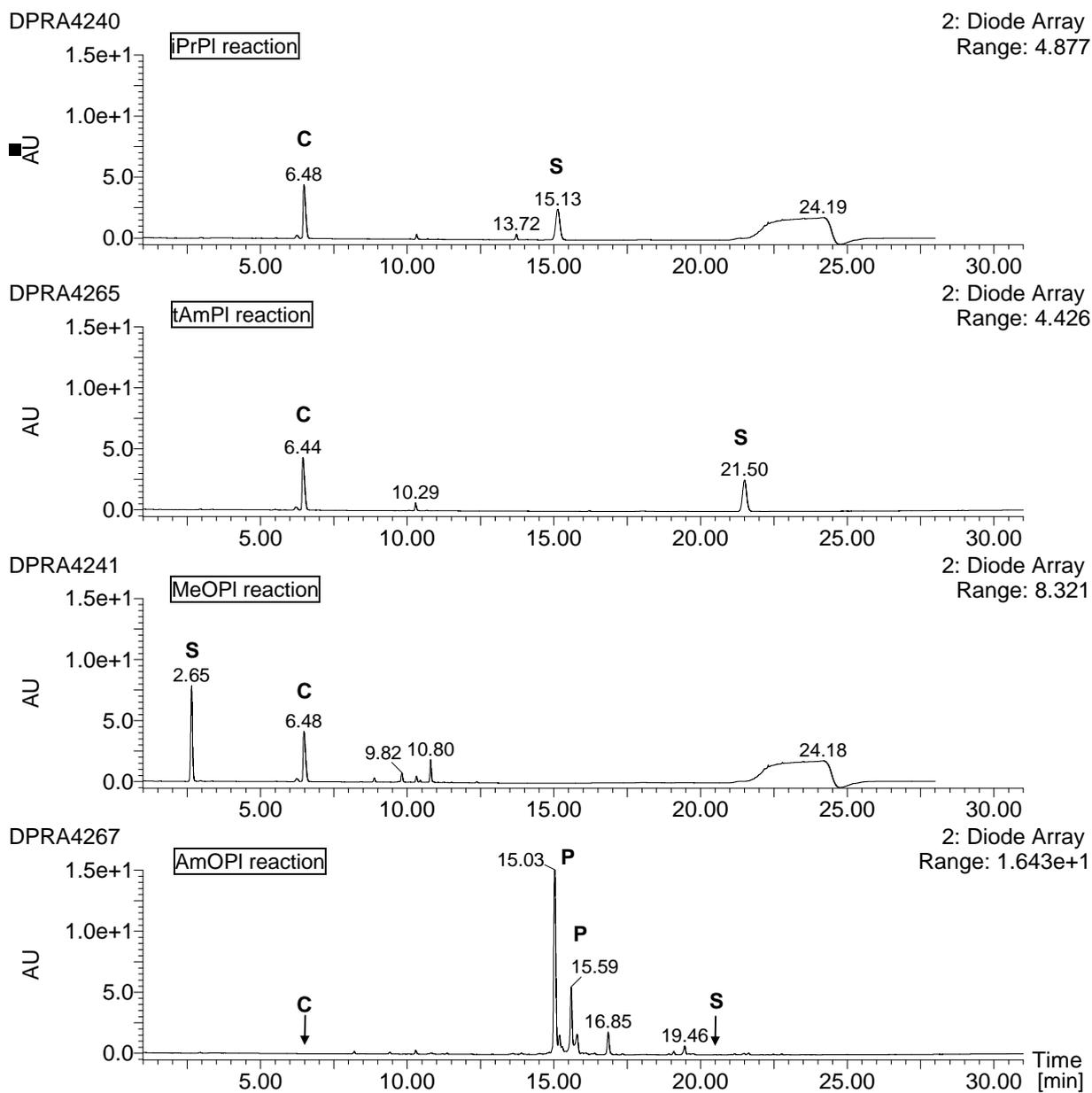


monobenzyl ether of hydroquinone (BzOPI, monobenzene)

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



**Fig. 2.** Reaction with MePI, AmPI and RD as substrates.



**Fig. 3.** Reaction with iPrPI, tAmPI, MeOPI and AmOPI as substrates.