

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:

薬用化粧品に配合され、使用者の皮膚に白斑が生じる事例が多数発生した rhododendrol (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オルト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と生成物の構造解析を検討した。

25 種の 4 置換フェノールをチロシナーゼの基質とし、SH ペプチド存在下での生成物を LC-MS により分析した。4 位の置換基の構造により反応性が大きく異なった。また、生成物の構造に明らかな違いが見られ、4 位にメチル基又は第一級アルキル基を持つ基質の場合は SH ペプチドが 1 個付加したカテコールが生成した一方で、4 位にアルコキシ基を持つ基質の場合、その他に SH ペプチドが 2 個付加したカテコールが生成した。いずれもオルトキノンの生成と SH 基の結合というメカニズムは共通していると考えられた。

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オルトキノンになり、さらに還元反応により生じた 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) 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「美白成分の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(代謝物分析系)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 用に用いられる SH ペプチドをマッシュルーム由来チロシナーゼ及び RD などの 4 置換フェノールと混合して反応させたところ、RD を含む多くの基質からカテ

コールが結合したペプチドが生成したことが HPLC による分析で示された。不安定なオルト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。しかし、一部の 4 置換フェノールでは複数の生成物が見られた。

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、LC-MS を用いて生成物の構造解析を検討した。

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 (MeOPI), 4-ethoxyphenol (EtOPI), 4-propoxyphenol (PrOPI), 4-butoxyphenol (BuOPI), 4-*tert*-butoxyphenol (tBuOPI), 4-amyloxyphenol (AmOPI), 4-hexyloxyphenol (HxOPI), 4-phenoxyphenol (PhOPI), 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, 分子量 750)はスクラムより購入した。

2. 反応条件

30 μ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5)に 47 μ L の超純水を加え、4.5 μ L の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、6.8 μ L の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)を加えて混合した。1.5 μ L の 1.0×10^4 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。60 μ L の 0.5%酢酸を加えて混合し、検液とした。

3. LC/MS

(1) 装置

ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters)。

(2) 分離条件

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. \times 50 mm; particle size, 1.7 μ m; Waters); カラム温度, 40 ; 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。

(3) フォトダイオードアレイ検出器検出条件

波長, 210–400 nm。

(4) 質量分析器検出条件

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; 測定範囲, m/z 50–2000。

C. 研究結果

検液を LCMS で分析した。別に単独で分析した DPRA(Cys)及び基質の結果からこれらのピークを同定した。その他のピークについて、マススペクトル上のベースピークと考えられるピークの m/z から構造を推定することとした (Fig. 2–6)。

基質(S)が酸化された後に SH ペプチドと結合し、ペプチド付加カテコール(SO+Pe)となると、その分子量は、元の分子量を MW とすると、

MW+16+748 となる。分子量が 108 である MePI では 872 である。これがポジティブモードでのイオン化によりプロトン付加 1 価陽イオンとなり、その m/z は MW+16+749 となる。MePI では 873 である。SO+Pe の検出イオンは、EtPI では 887、PrPI では 901 と炭素鎖が長くなるほど CH_2 一つの 14 ずつ大きくなる。

HpPI では、 m/z が 957 の SO+Pe の他に生成物のピークがあり、ベースピークと考えられるピークの m/z は 955 であった。MW+16+749-2 と表せるイオンを与えた分子の分子量が 954 であるのか、分子量は 956 でイオン化後の rearrangement により水素 2 個が脱離したのか不明であるが、便宜的に SO+Pe-2H とした。

MeOPI では、最も大きいピークは m/z が 889 の SO+Pe ではなく、ベースピークと考えられるピークの m/z は 819 であった。EtOPI 及び PrOPI では最も大きいピークの m/z はそれぞれ 826、833 であり、炭素鎖が長くなるほど CH_2 の半分に当たる 7 ずつ大きくなる。これらは、基質の酸化後に SH ペプチドが 2 個結合した分子量が MW+16+748 \times 2 の分子 SO+2Pe にプロトンが 2 個付加した 2 価陽イオンと考えられる。その m/z は (MW+16+749 \times 2)/2 であり、分子量が 124 である MeOPI では観測値と等しい 819 である。

SO+2Pe より m/z が 1 小さいピークも見られ、 m/z が (MW+16+749 \times 2-2)/2 であるイオンを与える分子の表記として SO+2Pe-2H とした。生成物の Table 1 にまとめた。

4 位にメチル基を持つ MePI 及び第一級アルキル基を持つ EtPI, PrPI, BuPI, AmPI, HxPI, BzPI, RD 及び RK では、基質とペプチドのピークはほとんど見られず、SO+Pe の大きいピークが観察された。同じく第一級アルキル基を持つ HpPI でも SO+Pe の大きいピークが見られ、他に SO+Pe-2H が見られた。

4 位が第二級アルキル基である iPrPI, sBuPI 及び cHxPI では基質と SH ペプチド以外のピークは非常に小さかったが、SO+Pe のピーク

が検出された。第三級アルキル基である tAmPI 及びアリール基である PhPI の場合、基質と SH ペプチドのみが検出された。

4 位に酸素を介してアルキル基やアリール基が結合した基質、すなわちアルコキシ基又はアリールオキシ基を持つ基質の場合、またメチルチオ基を持つ場合、SO+2Pe など SH ペプチドが 2 個結合した生成物が見られるものが多かった。SO+2Pe は MeSPI, MeOPI, EtOPI, PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI, PhOPI 及び BzOPI で、SO+2Pe-2H は MeOPI, BuOPI, AmOPI 及び HxOPI で観察された。基質及び SH ペプチドのピークの大きさは基質によって異なり、tBuOPI では基質と SH ペプチドのみが検出された。

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と生成物の検討を行った。

4 位の置換基の構造により基質の減少と生成物の有無に明らかな差が見られた。メチル基、第一級アルキル基又は一部のアルコキシ基が結合した基質ではチロシナーゼによる酸化が起きてオルトキノンが生成したが、第二級アルキル基、第三級アルキル基、アリール基及び一部のアルコキシ基では酸化反応が起きにくいと考えられる。置換基全体の大きさと芳香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る。

アルコキシ基の場合には SH ペプチドが 2 個付加したカテコールも見られた。付加は 2 つともカテ

コールの芳香環上で起きたと考えられ、オルトキノンの生成と SH 基の結合というメカニズムは共通している。

E. 結論

SH ペプチドを共存させて 4-置換フェノールのチロシナーゼによる酸化を行わせたとき、4位の置換基の構造により反応性及び生成物の構造に明らかな違いが見られたが、オルトキノンの生成と SH 基の結合というメカニズムは共通していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

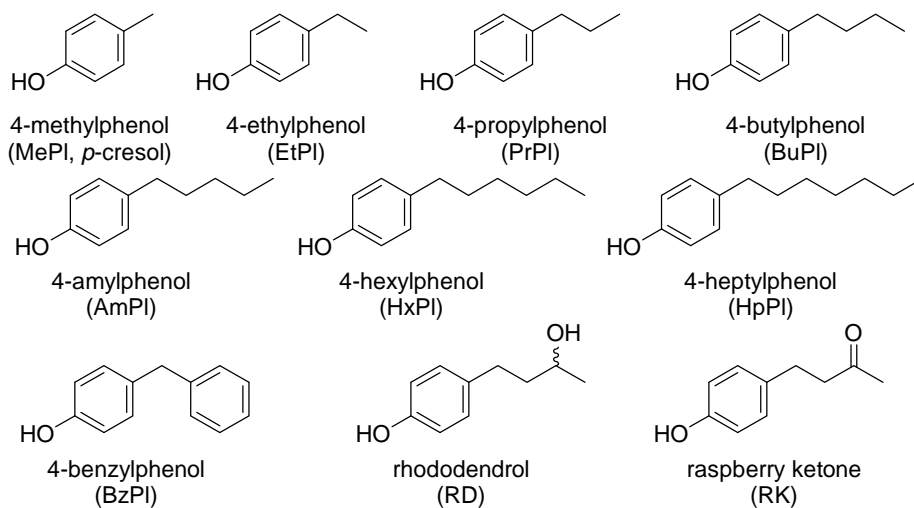
2. 学会発表

なし

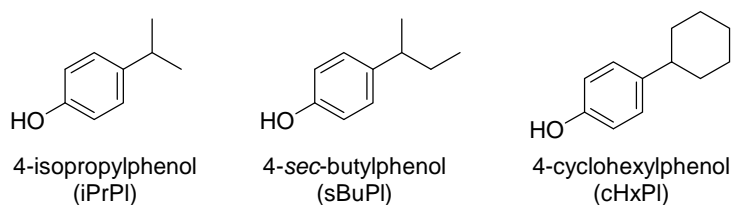
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし

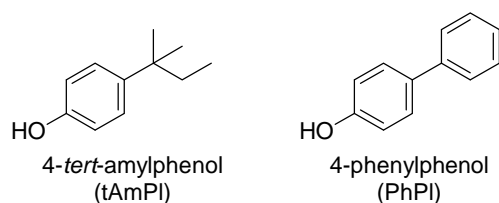
Phenols substituted with methyl group or a primary alkyl group at position 4



Phenols substituted with a secondary alkyl group at position 4



Phenols substituted with a tertiary alkyl group or aryl group at position 4



Phenols substituted with an ether group at position 4

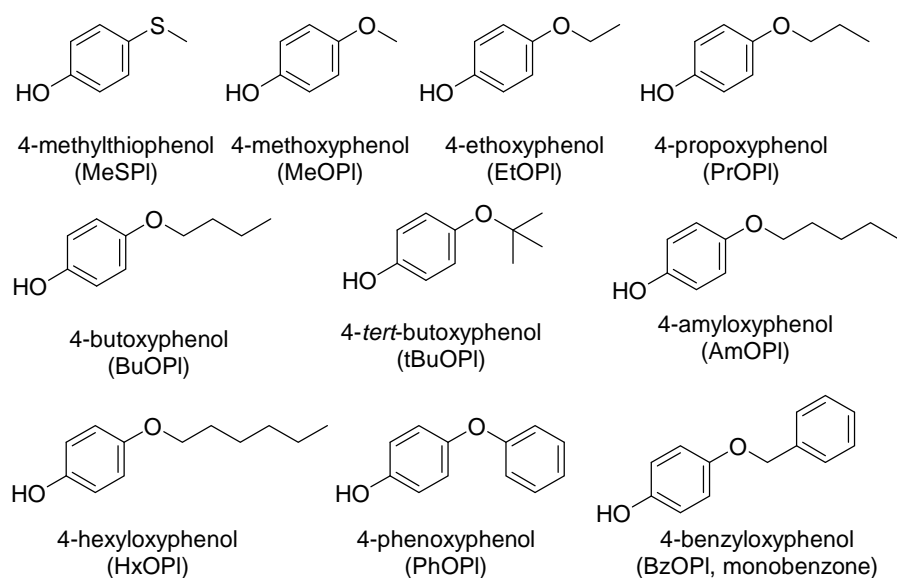


Fig. 1. Structures of 4-substituted phenols.

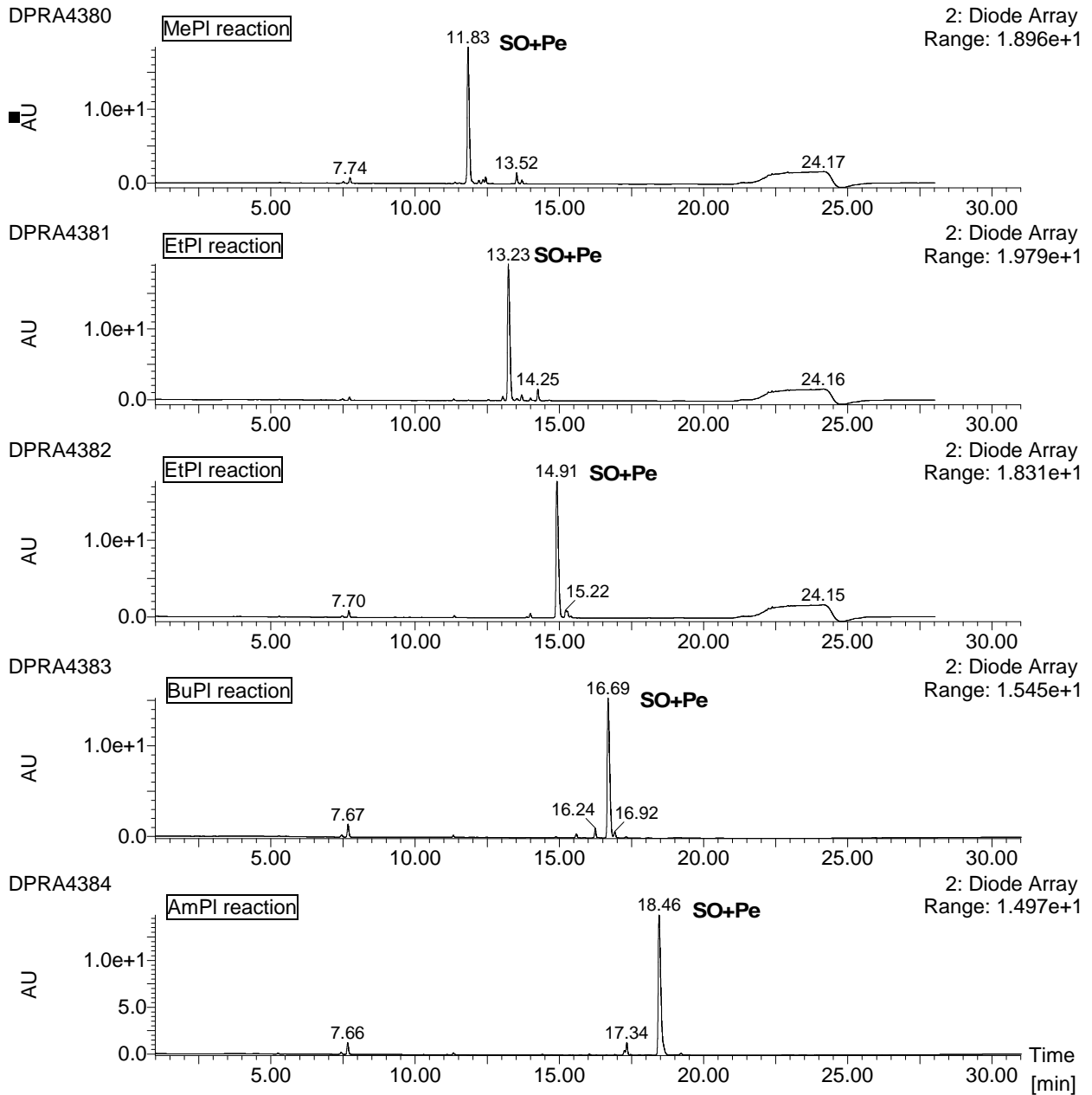


Fig. 2. Reaction with MePI, EtPI, PrPI, BuPI and AmPI as substrates.

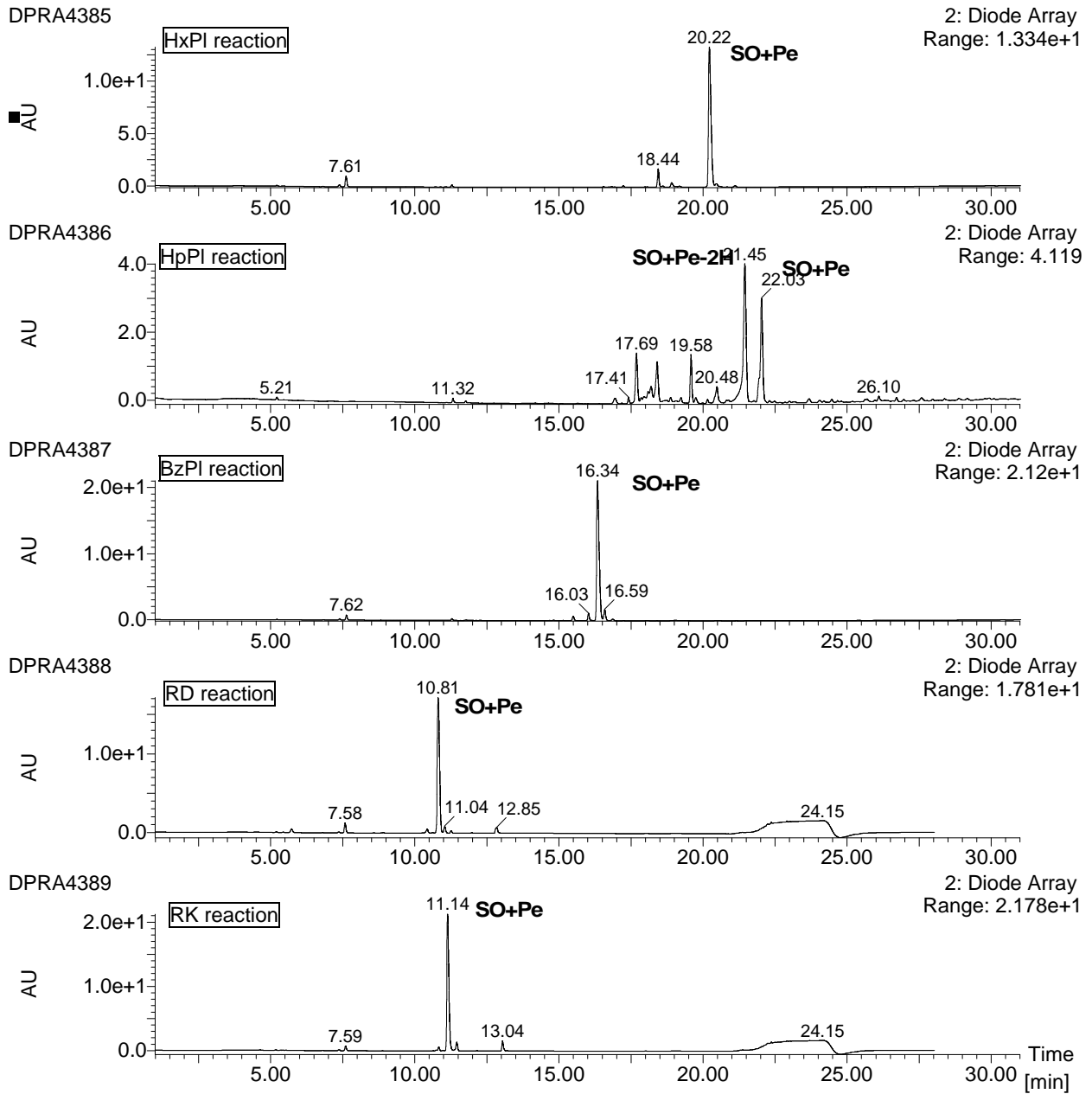


Fig. 3. Reaction with HxPI, HpPI, BzPI, RD and RK as substrates.

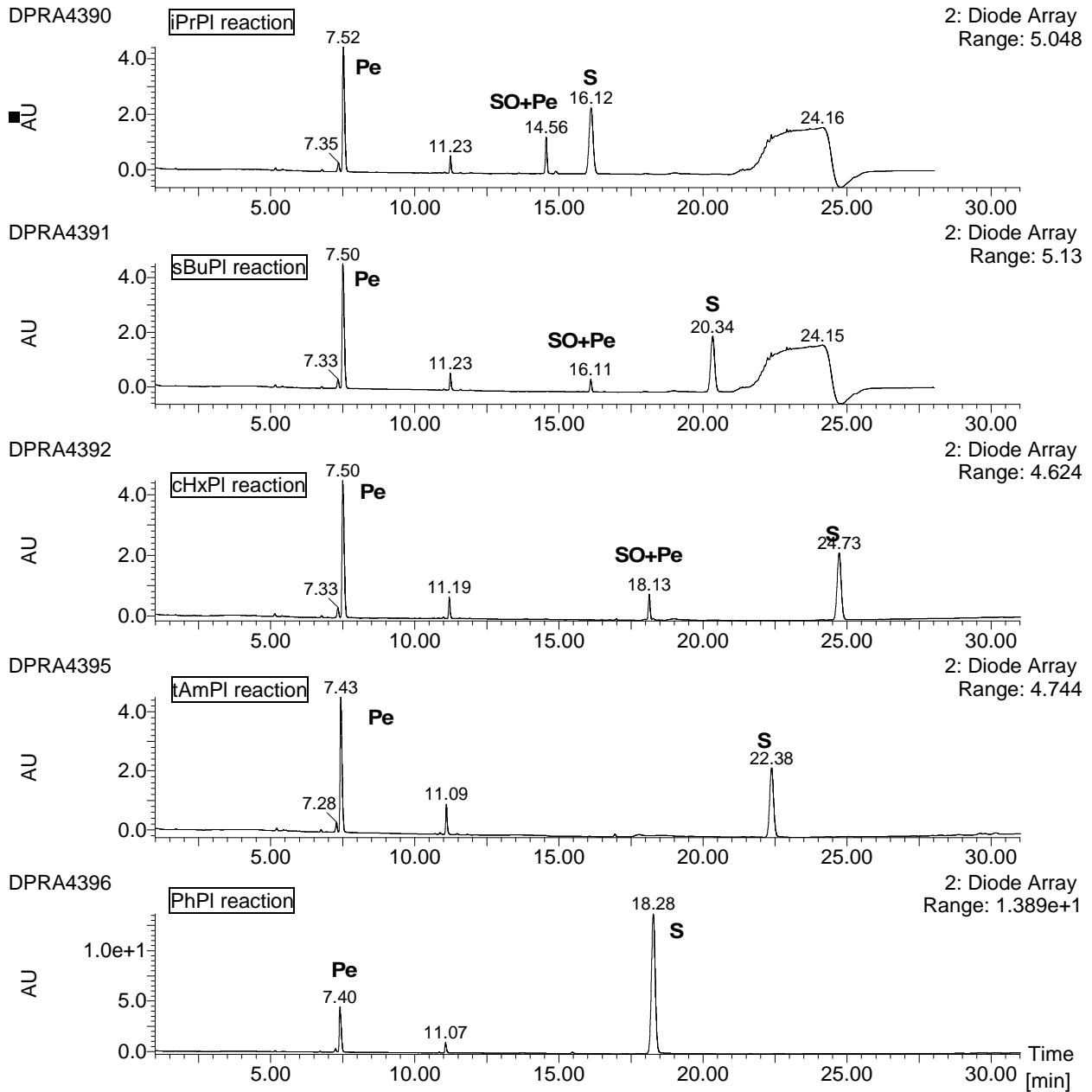


Fig. 4. Reaction with iPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI and PhPI as substrates.

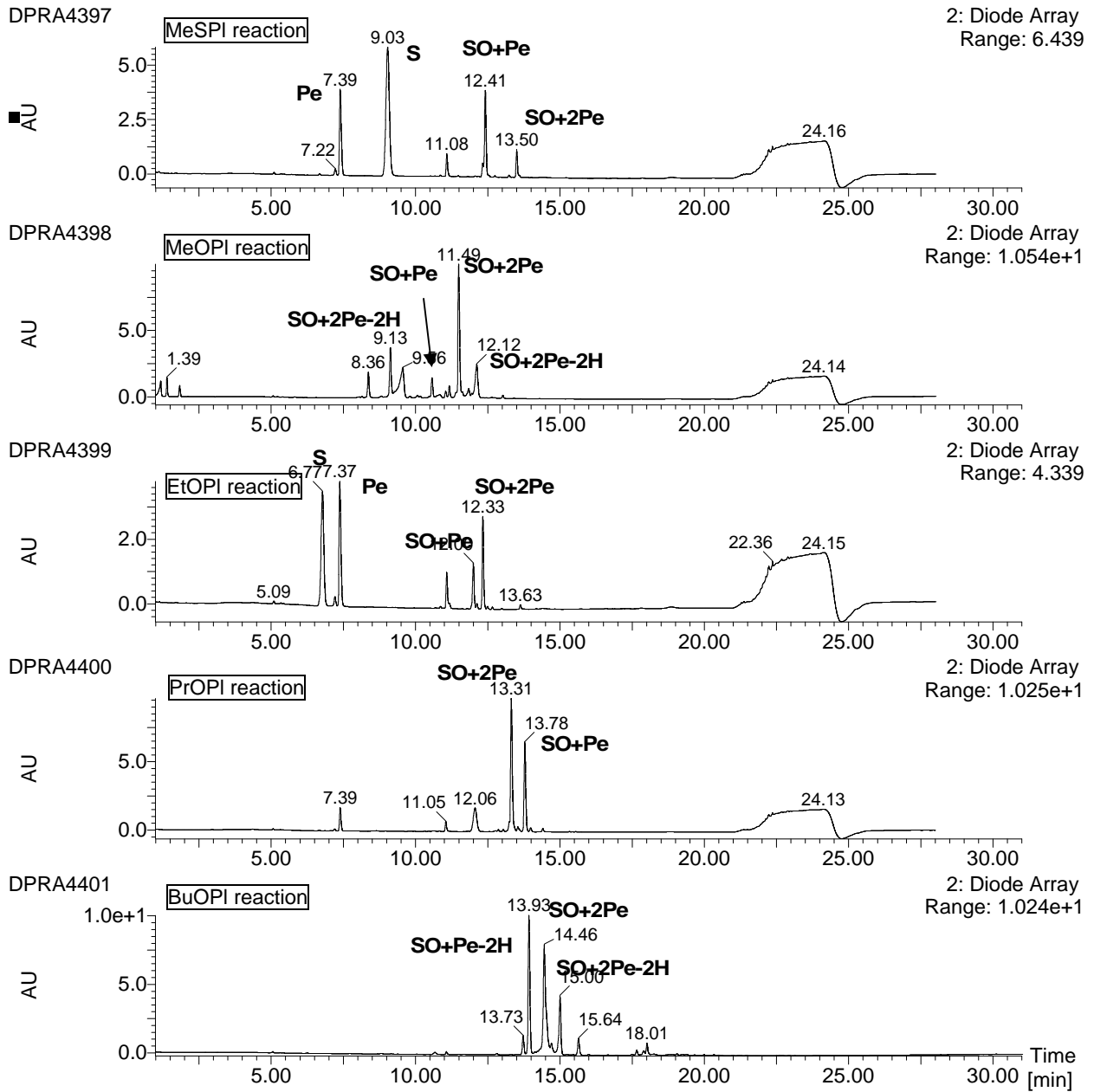


Fig. 5. Reaction with MeSPI, MeOPI, EtOPI, PrOPI and BuOPI as substrates.

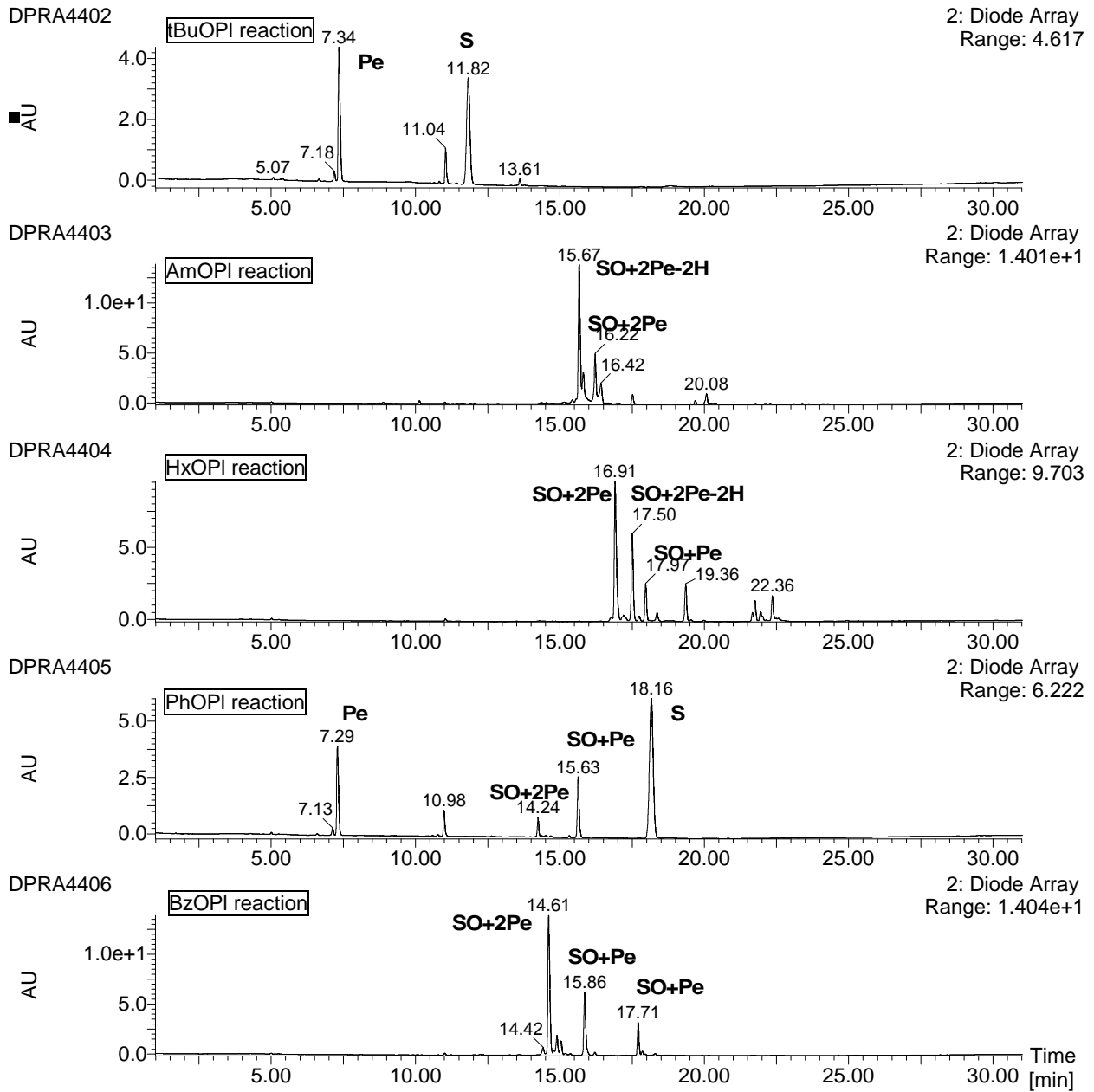


Fig. 6. Reaction with EtOPI, PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI and BzOPI as substrates.

Table 1. Reaction products and their m/z s of protonated or diprotonated ions.

| Substrate | MW | SO+Pe | SO+Pe-2H | SO+2Pe | SO+2Pe-2H |
|-----------|-----|-------------|---------------|-------------------|---------------------|
| | | [MW+16+749] | [MW+16+749-2] | [(MW+16+749x2)/2] | [(MW+16+749x2-2)/2] |
| MePI | 108 | 873 | - | - | - |
| EtPI | 122 | 887 | - | - | - |
| PrPI | 136 | 901 | - | - | - |
| BuPI | 150 | 915 | - | - | - |
| AmPI | 164 | 929 | - | - | - |
| HxPI | 178 | 943 | - | - | - |
| HpPI | 192 | 957 | 955 | - | - |
| BzPI | 184 | 949 | - | - | - |
| RD | 166 | 931 | - | - | - |
| RK | 164 | 929 | - | - | - |
| iPrPI | 136 | 901 | - | - | - |
| sBuPI | 150 | 915 | - | - | - |
| cHxPI | 176 | 941 | - | - | - |
| tAmPI | 164 | - | - | - | - |
| PhPI | 170 | - | - | - | - |
| MeSPI | 140 | 905 | - | 827 | - |
| MeOPI | 124 | 889 | 887 | 819 | 818 |
| EtOPI | 138 | 903 | - | 826 | - |
| PrOPI | 152 | 917 | - | 833 | - |
| BuOPI | 166 | - | 929 | 840 | 839 |
| tBuOPI | 166 | - | - | - | - |
| AmOPI | 180 | - | - | 847 | 846 |
| HxOPI | 194 | 959 | 957 | 854 | - |
| PhOPI | 186 | 951 | - | 850 | - |
| BzOPI | 200 | 965 | - | 857 | - |