

厚生労働行政推進調査事業費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
政策研究事業

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究

令和元年度 総括・分担研究報告書
(19KC2005)

研究代表者 秋山 卓美

令和 2 (2020) 年 3 月

目 次

I．総括研究報告

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究	1
秋山 卓美	

II．分担研究報告

1．安全性評価法（代謝物分析系）の構築（I）	5
秋山 卓美	
2．安全性評価法（細胞系）の構築	16
最上 知子	
3．安全性評価法（代謝物分析系）の構築（II）	19
伊藤 祥輔	

III．研究成果の刊行に関する一覧表	21
--------------------	----

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究

研究代表者 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

ロドデノール (RD) 配合薬用化粧品 (医薬部外品) による白斑の発症に関しては、チロシンと共通の 4-置換フェノールの構造を持ち、チロシナーゼの阻害活性を期待された RD がチロシナーゼにより代謝され、オルトキノン体に変換されることが判明しており、この代謝と白斑発症との関連が示唆されている。本研究では、*in vitro* でのチロシナーゼとの反応性、チロシナーゼを発現させた細胞での代謝物の解析、医薬部外品に使用される可能性のある物質のチロシナーゼによる代謝物の構造と性質の解析を行って評価法の確立を目指す。

25 種類の 4-置換フェノールについて SH ペプチドを共存させて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。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いた代謝物解析において、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生解析が、白斑誘導性モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) および 4-tert ブチルフェノール (4-TBP) につき可能であることを示した。エクオール (EQ) はチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノン体を生成した。オルトキノン体は SH 化合物と反応して、一付加体、二付加体を形成した。EQ オリゴマーは GSH を GSSG に酸化し、また H₂O₂ を産生する、プロオキダント活性をもつことが示された。

研究分担者

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

伊藤祥輔 藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

研究協力者

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部長

A. 研究目的

ロドデノール (RD) 配合薬用化粧品による白斑発症問題 (平成 25 年 7 月) に関しては、過去三期の厚生労働科学研究において再発防止策の検討と臨床・基礎からの原因究明の研究が行われた。その中で、RD や白斑誘導性の 4-置換フェノール

類はチロシナーゼにより代謝され、オルトキノン体に変換されることが判明しており、この代謝と白斑発症との関連が示唆されている。チロシナーゼによる代謝の詳細な解析により、RD ユーメラニンやその前駆体など、多くの代謝物の構造と性質を明らかにした。また、感受性の増強を図った各種細胞の代謝物による細胞応答を指標とする方法を検討し、白斑誘導性化合物の代謝は必ずしも細胞毒性の増強をもたらさないことが判明した一方で、ヒトチロシナーゼ強制発現細胞を用いて代謝物の解析を検討し、細胞レベルにおいてヒトチロシナーゼによる RD の代謝とグルタチオン付加体の産生を追跡することができた。更に、各種 4-置換フェノール類の代謝物を、生成するオルトキノンと SH 含有ペプチドを共存させて、*in*

vitro でペプチドと結合したカテコール体として検出することができた。

本研究ではこれらの性質を利用した医薬部外品成分の白斑誘導能の評価法を構築し、更に他の生物学的あるいは物理化学的性質を指標に加えた評価体系を検討する。

本年度は、フェノール類をチロシナーゼで酸化した後共存させた SH ペプチドと結合させ、ペプチド付加物として生成物を検出する方法について、様々な置換基を持つ 4-置換フェノール類を基質として用い、LC-MS により反応生成物を検出して同定することにより、基質の反応性と基質による反応機構の違いの有無を検討する。

白斑発症と強く相関する細胞応答に着目し、その評価系を構築する。ロドデノール(RD)や構造類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通して認められる「チロシナーゼによる代謝活性化」を、[1]代謝物解析、[2]細胞毒性増強により評価する方法の検討を進める。

RD と同様に 4-置換フェノール構造を有する物質で、医薬部外品の有効成分として配合される可能性のあるものについて、チロシナーゼの基質となってオルトキノンを産生するかどうか検討している。サプリメントとして広範に摂取され、皮膚適用時のシミに対する効果が期待されているエクオール(EQ)について検討する。

B. 研究方法

1. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[秋山]

25 種類の 4-置換フェノール類をマッシュルーム由来チロシナーゼ、及び Direct Peptide Reactivity Assay で用いる SH ペプチドと反応させ、酢酸酸性にして反応を止めた後、LC-MS で分析を行った。

2. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

代謝物解析による評価は、ヒトチロシナーゼを

一過性に発現させた 293T 細胞に、薬物を 2 時間暴露し、細胞・培地の代謝物を解析した。メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 を、siRNA を用いてノックダウンし、薬物の細胞毒性に及ぼす影響を解析した。

3. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[伊藤]

EQ100 μ M を pH 6.8 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは *N*-アセチルシステイン(NAC)など SH 化合物を加えた。

C. 研究結果

1. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[秋山]

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、基質量が大きく減少し、SH ペプチドが 1 個付加したカテコールが生成した。4 位に酸素を介してアルキル基が結合した基質、すなわちアルコキシ基を持つ基質の場合、SH ペプチドが 1 個付加したカテコールの他、2 個付加したカテコールが生成した。4 位が第二級アルキル基、第三級アルキル基又はアリアル基の場合、生成物は非常に少ないか、あるいは基質と SH ペプチドのみが検出された。

2. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

[1]代謝物解析については、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いると、MBEH ならびに 4-TBP のオルトキノンのグルタチオンあるいはシステイン付加体の検出が可能であることを示した。[2]メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 のノックダウンにより細胞感受性増強を試みたが、TYRP1 低下は 4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の細胞毒性発現に全く影響を与えないことが判明した。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[伊藤]

EQ はチロシナーゼにより酸化されてオルトキノンになることが、400 nm に吸収極大を持つスペクトルが得られたこと及び還元したときに2種類のモノカテコールと1種類のジカテコールが精製したことから判明した。さらに、N-アセチルシステイン(NAC)あるいはグルタチオン(GSH)と反応して5位又は5'位にSH化合物が付加した一付加体及び二付加体が生成した。更に、酸化により生成させたEQオリゴマーはGSHをGSSGに酸化させるプロオキシダント活性を持つことが判明した。

D. 考察

1. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[秋山]

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、第三級アルキル基又はアリアル基では酸化反応が起きにくいと考えられる。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。

2. 安全性評価法（細胞系）の構築 [最上]

白斑誘導性フェノール類の評価方法として、ヒトチロシナーゼ発現293T細胞を用いた代謝活性化の解析について有用性が示された。今後さらに対象を広げ、構造と白斑誘導能との関連を解明する。細胞毒性増強の試みについては、メラノーマ細胞のメラニン合成系下流遺伝子TYRP1は4SCAPの細胞毒性に関与しないことが判明した。今後は他遺伝子を標的に細胞感受性増強を検討する。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[伊藤]

EQ はチロシナーゼにより酸化されて極めて反応性の高いオルトキノンを産生する。EQの持つ2個のフェノール性OH基がいずれも酸化され、2種類のモノカテコール体及びジカテコール体が生成したことは興味深い。モノカテコール体の一つ6-hydroxy-EQがRDの酸化により生成するRD-環状カテコールと同じクロマン骨格を持つことから、同様に細胞毒性をもたらす可能性が示唆される。EQオリゴマーは、先行研究で検討したRESオリゴマーよりも高いプロオキシダント活性をもつことも興味深い。

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。

白斑誘導性4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の評価方法として、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた代謝物解析の有用性を示した。メラノーマ細胞のチロシナーゼ下流遺伝子発現を低下させての細胞感受性増強を試みた。

EQのチロシナーゼ酸化はEQキノン、次いでEQオリゴマーを産生し、前者は細胞内タンパクと結合することにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化(枯渇)することにより細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell*

Melanoma Res. 32: 766-776, 2019. DOI:
10.1111/pcmr.12808.

2. 学会発表

秋山卓美, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: 薬用化粧品成分のチロシナーゼ反応性評価法の検討. 第

56 回全国衛生化学技術協議会年会. 広島. 2019
年 12 月 6 日.

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

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 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5)に 47 μL の超純水を加え、4.5 μL の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、6.8 μL の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)を加えて混合した。1.5 μL 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 μL 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 μm ; 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るとき、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

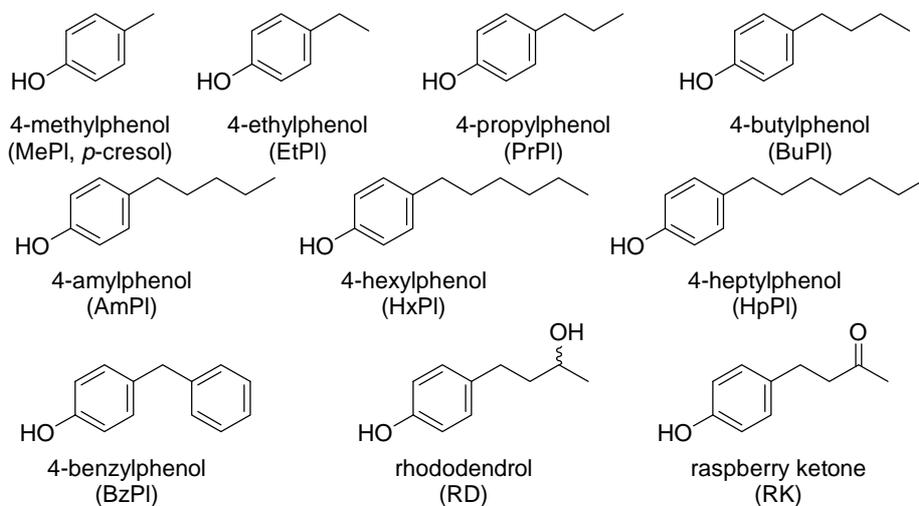
2. 学会発表

なし

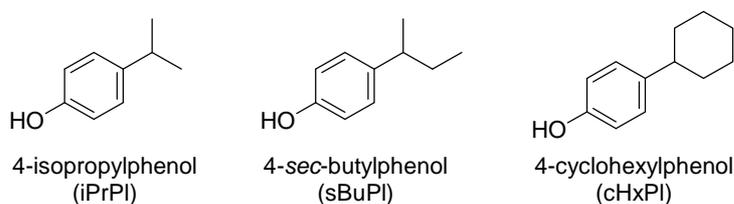
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし

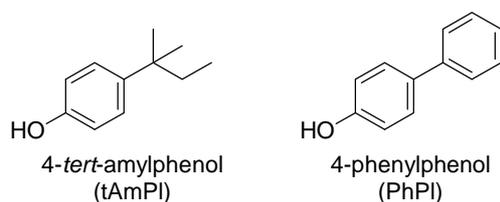
Phenols substituted with methyl group or a primary alkyl group at position 4



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

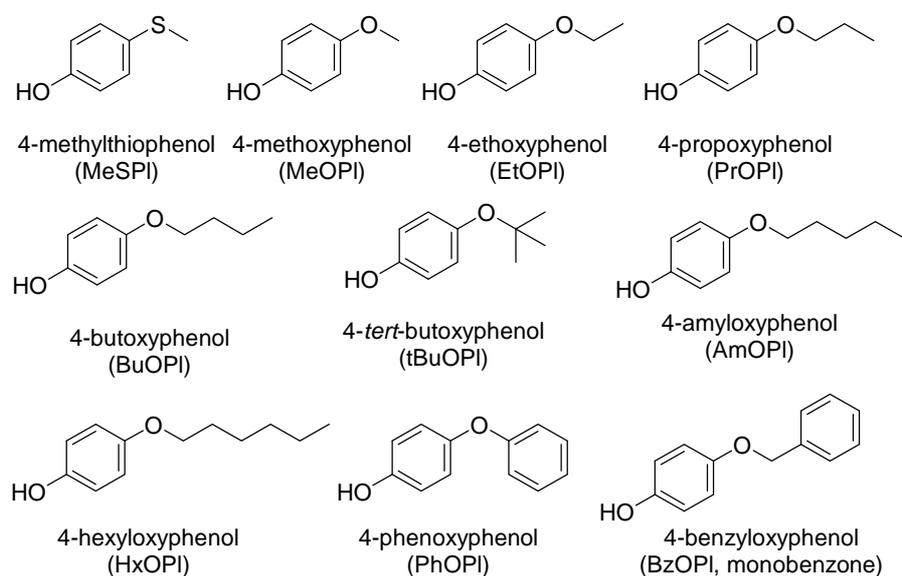


Fig. 1. Structures of 4-substituted phenols.

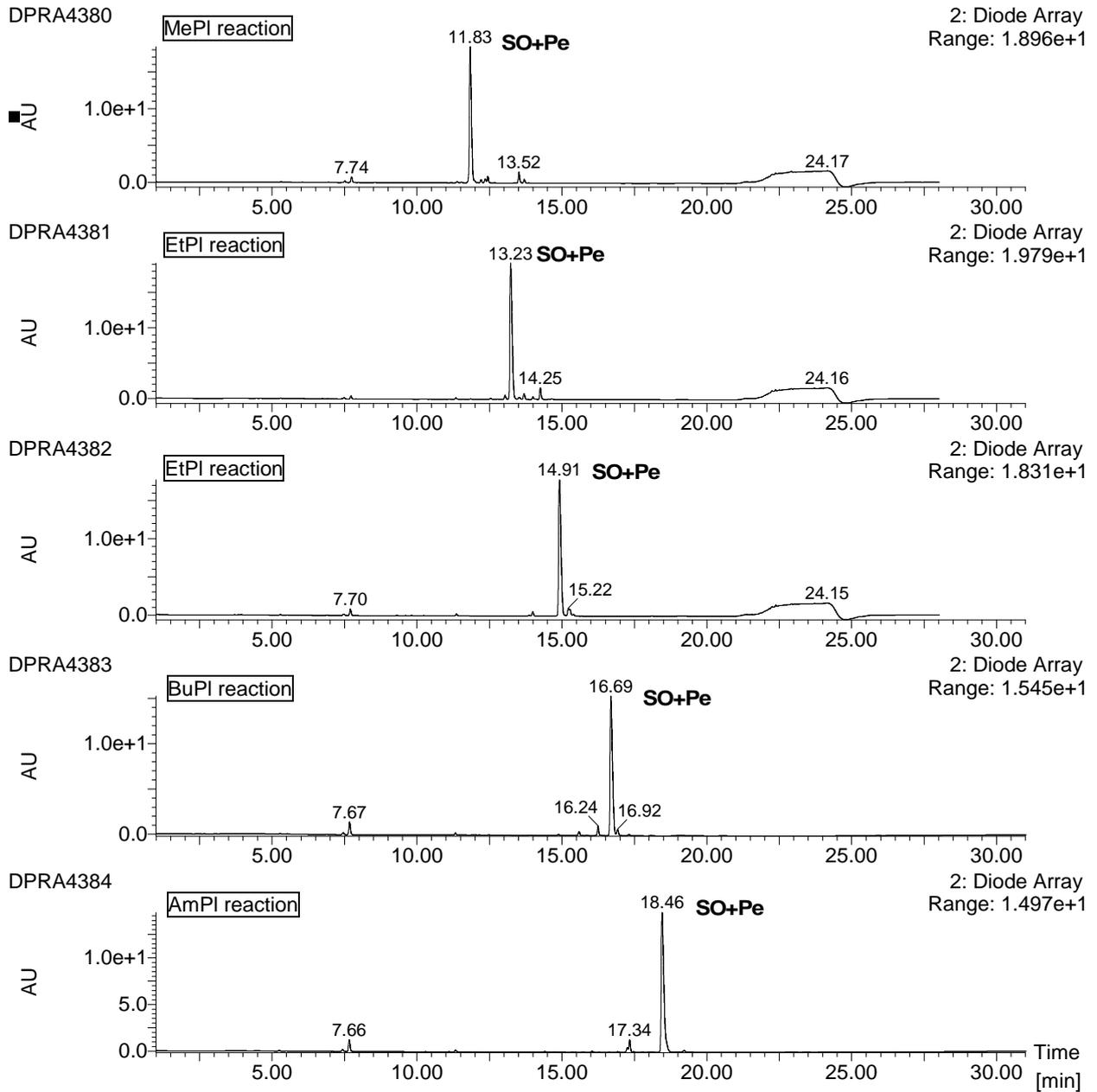


Fig. 2. Reaction with MePI, EtPI, PrPI, BuPI and AmPI as substrates.

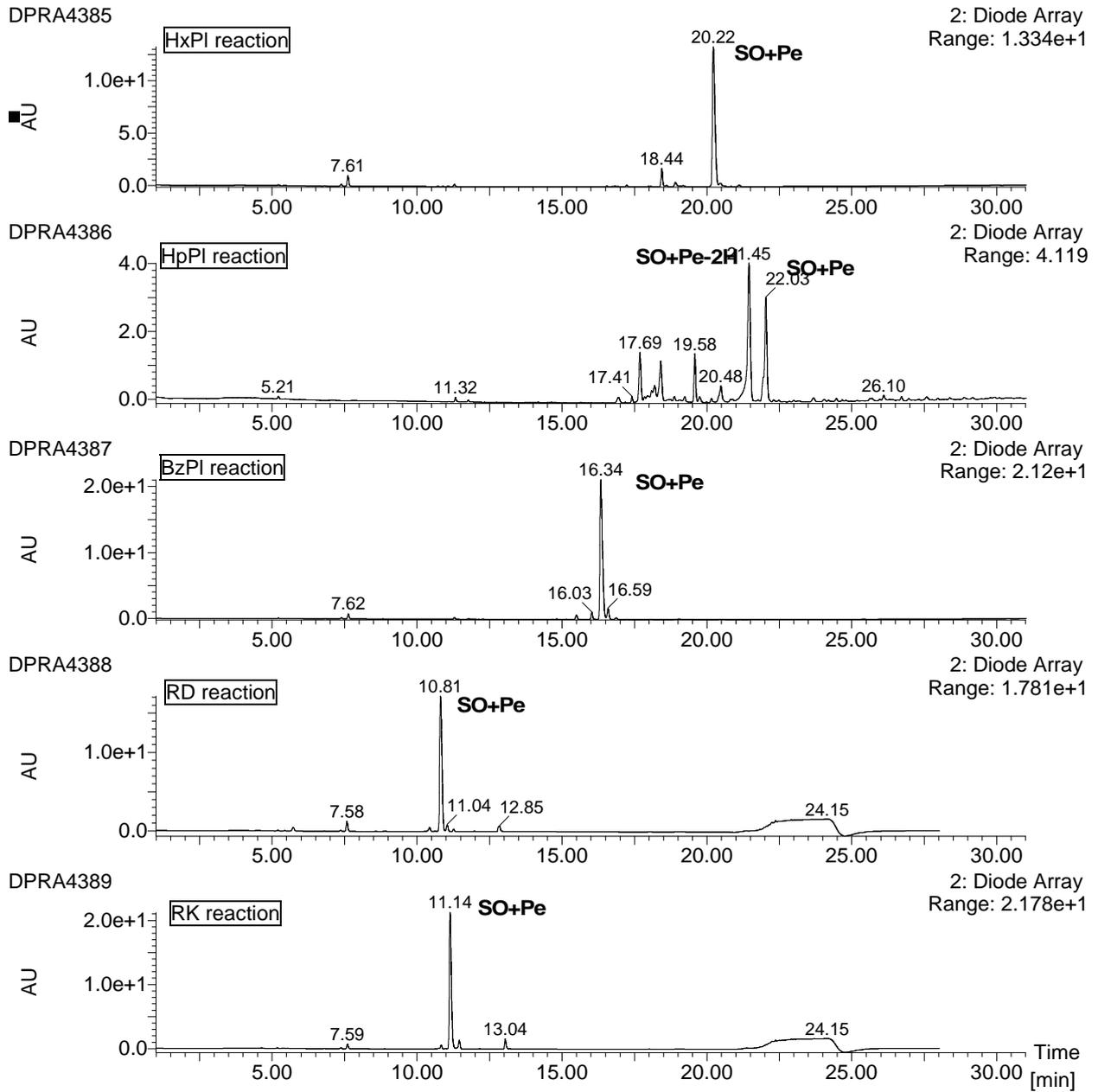


Fig. 3. Reaction with HxPI, HpPI, BzPI, RD and RK as substrates.

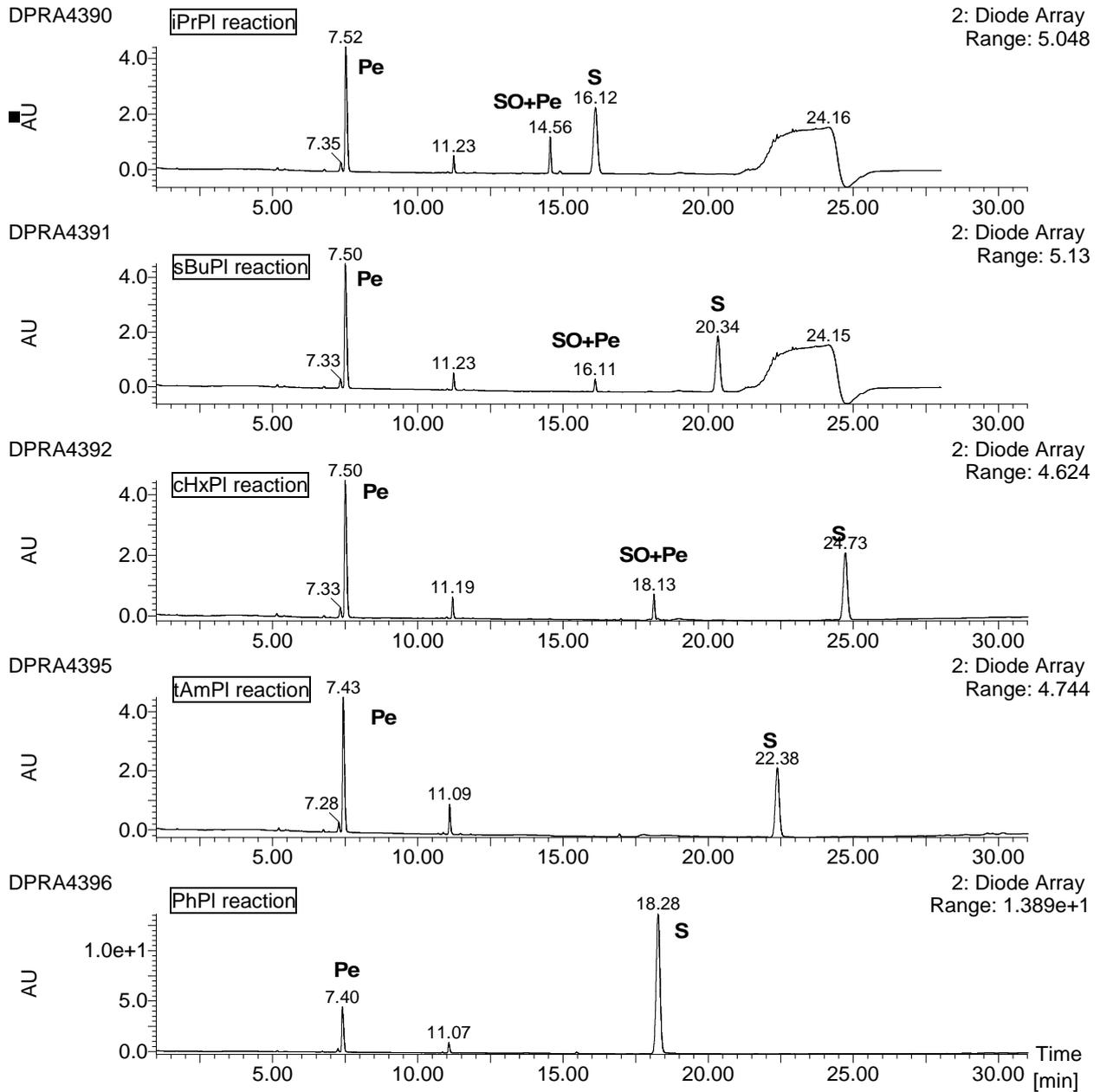


Fig. 4. Reaction with iPrPI, sBuPI, cHxPI, tAmPI and PhPI as substrates.

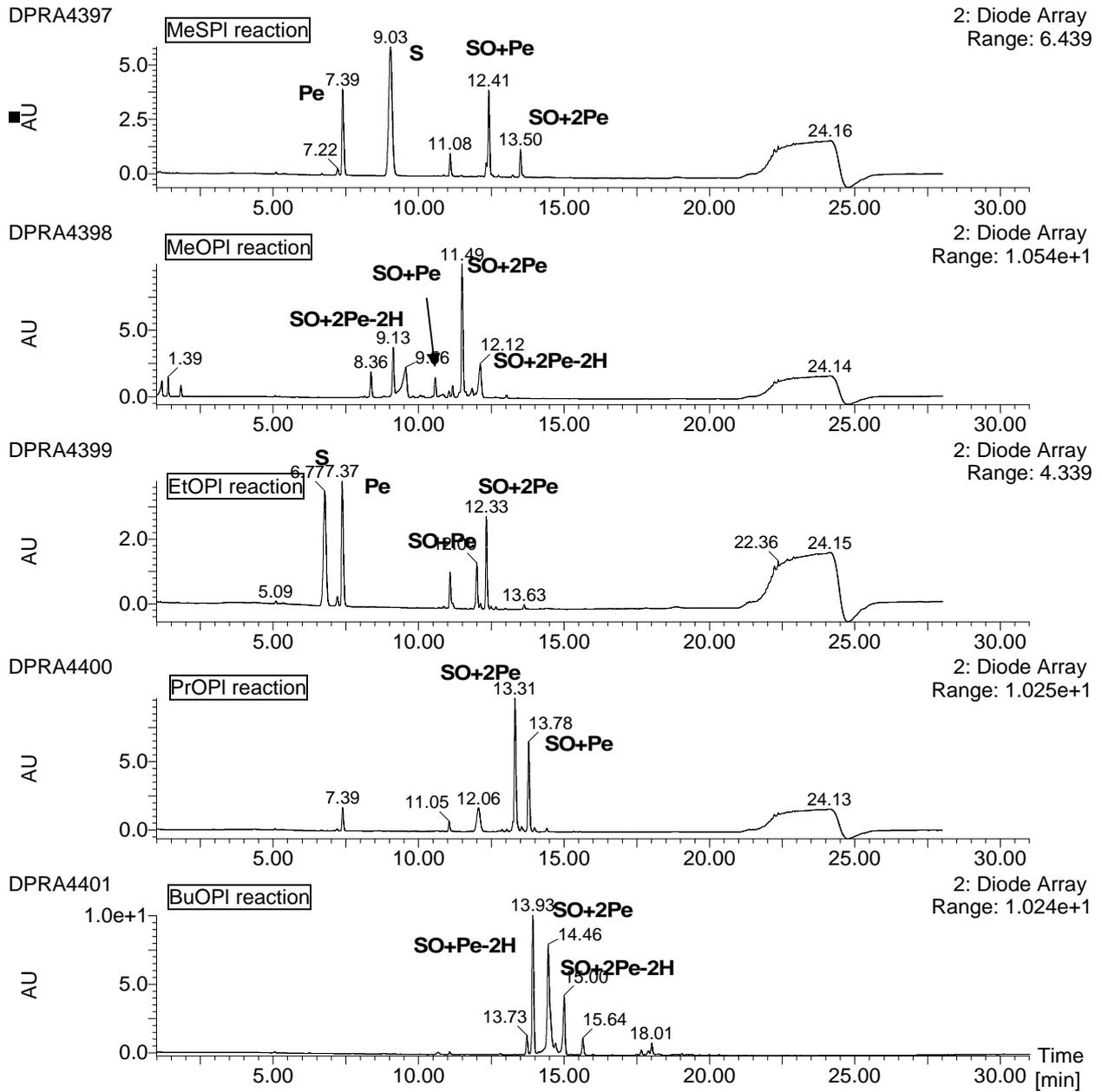


Fig. 5. Reaction with MeSPI, MeOPI, EtOPI, PrOPI and BuOPI as substrates.

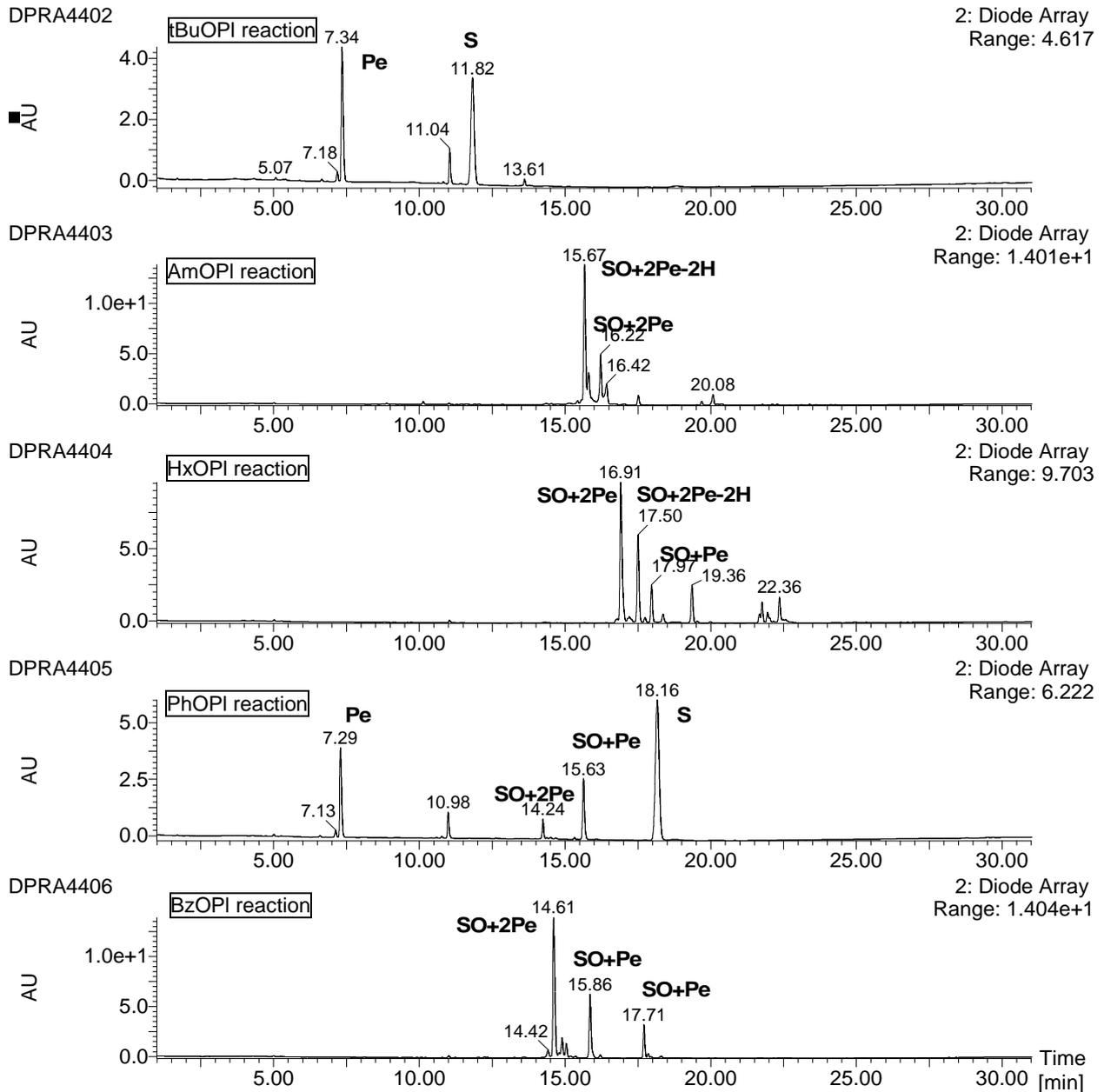


Fig. 6. Reaction with EtOPI, PrOPI, BuOPI, AmOPI, HxOPI and BzOPI as substrates.

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	-

安全性評価法(細胞系)の構築

研究分担者 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

研究協力者 伊藤祥輔 藤田医科大学 医療科学部 名誉教授

研究要旨:

白斑発症と強く相関する細胞応答の評価系確立をめざし、ロドデノール(RD)や構造類似の白斑誘導性4-置換フェノール類に共通して認められる「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化」を、[1]代謝物解析、[2]細胞毒性増強により評価する方法の検討を進めた。[1]代謝物解析:ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を用いると、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生解析が、白斑誘導性モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)および4-tert ブチルフェノール(4-TBP)につき可能であることを示した。[2]細胞毒性評価:B16BLメラノーマ細胞の細胞感受性増強をめざしチロシナーゼ下流遺伝子発現低下を試みたが、TYRP1ノックダウンは4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の毒性発現に全く影響を与えないことが判明した。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症事象に関し、本研究においては、白斑発症と強く相関する細胞応答に着目し、その評価系を構築することを目的とする。

RDならびに類似構造(4-アルキル/アリル置換フェノール構造)を有する白斑誘導性化合物は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることが報告され、白斑発症において、化合物のチロシナーゼによる代謝活性化の関与が強く示唆される。そこで前期研究班(平成29-30年度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」)においては、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化を[1]代謝物産生 [2]細胞毒性により評価する手法について検討を行った。[2]チロシナーゼ依存の細胞毒性については、個体差の大きいヒトメラノサイトに代替する細胞モデルとしてヒトチロシナーゼ発現293T細胞を構築し、あるいはメラノーマ細胞のチロシナーゼ発現量を変化させて評価する

方法を検討した。しかしながら、化合物により毒性の発現が大きく異なり、RD等はむしろ内因性チロシン(代謝物ドーパキノン)由来の細胞毒性を抑制する効果が示唆された。一方、[1]代謝物解析によりチロシナーゼ代謝活性化を直接測定する方法については、ヒトチロシナーゼ発現293T細胞を用い、RDオルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体を細胞・培地より測定する手法の有用性が示された。

今年度は、[1]ヒトチロシナーゼ発現293細胞を用いての代謝活性化の解析を、対象を広げて各種白斑誘導性フェノール類について進める。[2]細胞毒性評価については、メラノーマ細胞のメラニン合成系遺伝子発現を変化させ、白斑誘導性フェノール類および代謝物に対する感受性の増強を図る。

B. 研究方法

293T細胞にヒトチロシナーゼを一過性に発現させ、24時間後に薬物処理を開始し、2時間後の細

胞および培地を回収し、代謝産物を既報(Ito et al., Pigment Cell Melanoma Res., 28, 295-306, 2015) に従い、HPLC で解析した。細胞生存率は ATP 含量の測定により決定した。

メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 を、siRNA を用いてノックダウンし、薬物の細胞毒性に及ぼす影響を解析した。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた白斑誘導性フェノール類の代謝活性化の評価

昨年度の研究において、ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に高発現させた細胞に RD (0.1, 0.3, 1 mM) を 2 時間暴露すると、RD キノンのグルタチオンおよびシステイン付加体の濃度依存的な産生が培地および細胞で確認可能であること、4-S-システアミニルフェノール (4SCAP) についても同様であることを示した。

今年度は構造類似フェノール類についてさらに検討を行った。白斑誘導が知られるモノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) (0.1, 0.2, 0.3 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に MBEH オルトキノンのシステイン付加体が培地・細胞で、グルタチオン付加体は細胞でのみ検出された。また、職業性白斑の原因として知られる 4-tert ブチルフェノール (4-TBP) (0.1, 0.3, 0.6 mM) の場合には、グルタチオン付加体が培地・細胞に検出された。システイン付加体の検出はごく低レベルであった。MBEH、4-TBP のいずれもチロシナーゼ依存的な細胞毒性増強は認められなかった。

2. メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系改変による細胞毒性評価

前期の研究において、高いレベルのチロシナーゼを発現するメラノーマ細胞 B16BL を阻害剤あるいは siRNA 処理し検討したが、チロシナーゼ依存の細胞毒性は 4SCAP のみ認められ、RD や MBEH、4-TBP については認められなかった。

今年度はメラニン合成系のチロシナーゼ下流遺伝子である TYRP1 をノックダウンし、チロシナーゼ代謝産物蓄積による細胞毒感受性の増強を試みた。

配列の異なる三種類の TYRP1 の siRNA で B16BL 細胞を処理したところ、いずれの場合にも 84-97% の効率的なノックダウンが達成された。4SCAP の細胞毒性に及ぼす影響は各 siRNA により異なっていた。siRNA#3 では中程度の毒性軽減 (45%) が観察されたが、TYR (チロシナーゼ)、TYRP2 発現もそれぞれ 70%、80% 低下していた。一方、siRNA#1 は TYR ならびに TYRP2 に影響せず、4SCAP の細胞毒性には全く影響を与えなかった。したがって、TYR の場合とは異なり、TYRP1 ノックダウンは 4SCAP の細胞毒性に影響しないと結論した。

D. 考察

今年度は、RD や類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する「チロシナーゼによる代謝活性化」化を細胞で評価する方法として、[1]代謝物解析、[2]細胞毒性の評価に着目し、検討を進めた。

[1]代謝物解析: 白斑誘導性 4-置換フェノール類がチロシナーゼにより代謝され生じるオルトキノンは、細胞内 SH 基と反応性が高い。タンパク修飾は機能変化や抗原性付与により白斑との関連が予想されるが、分析は困難である。そこで代替マーカーとして非タンパク性のシステイン、グルタチオン付加体の分析を検討してきた。チロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる方法について、昨年度は RD および 4SCAP で条件を確立し、今年度は白斑誘導性フェノール類 MBEH ならびに 4-TBP の検討を進め、オルトキノン代謝物のチオール付加体が検出可能であることを確認した。今後はさらに対象を広げ、化合物構造と白斑誘導能との相関を検討する予定である。

[2]細胞毒性評価については、オルトキノン体蓄積による細胞感受性の増強を期待し、メラノーマ細胞のチロシナーゼ下流遺伝子 TYRP1 のノックダウ

ンを試みた。しかしながら TYRP1 ノックダウンは 4SCAP の毒性発現に何の影響も与えないことが判明した。今後は TYRP2 や酸化ストレス関連遺伝子のノックダウンにより、細胞感受性の増強を試みる予定である。

E. 結論

白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の評価方法として、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた代謝物解析の有用性を示した。メラノーマ細胞のチロシナーゼ下流遺伝子発現を低下させての細胞感受性増強を試みた。

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

安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田医科大学医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを産生する。エクオール(EQ)は健康、美容によいとされ、広範に摂取されている。しかし、EQはRDと同様に4-置換フェノール構造を有するので、チロシナーゼによる代謝を調べた。その結果、EQはチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノンを生成した。オルトキノンはN-アセチルシステイン(NAC)と反応して、一付加体、二付加体を形成した。一方、EQのチロシナーゼ酸化により調製したEQオリゴマーはGSHをGSSGに酸化し、またH₂O₂を産生する、プロオキダント活性をもつことが示された。これらの結果から、EQのチロシナーゼ酸化は細胞障害性をもたらす可能性が示唆された。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示す。前年度は、健康によいとされるレスベラトエオール(RES)がチロシナーゼの良好な基質となり、美白剤としては適切ではない可能性を報告した(PCMR, 2019)。エクオール(EQ)は、大豆イソフラボンであるダイゼニンから腸内細菌の作用により生成するが、健康、美容によいとされ、サプリメントとして広範に摂取されている。皮膚におけるその作用についても、シミに対する効果が期待されている。しかし、EQ(7,4'-ジヒドロキシイソフラボン)はRDと同様に4-置換フェノール構造を有し、チロシナーゼにより反応性の高いオルトキノンを酸化され、メラニン産生細胞に対して毒性を発揮する可能性が懸念される。また、EQには2個のフェノール性OH基があり、両者の反応性の違いにも興味を持たれる。そこで今年度は、EQのチロシナーゼ酸化によるオルトキノンの生成とそのチオール化合物との結合形成などを調べた。

B. 研究方法

EQ100 μMをpH 6.8でチロシナーゼにより酸化し、反応をUV-VisスペクトルあるいはHPLCで追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいはN-アセチルシステイン(NAC)などSH化合物を加えた。

C. 研究結果

EQはチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物はpH 6.8において400 nmに吸収極大をもつオルトキノンの生成が確認された。オルトキノンは還元してカテコール体として、HPLCにより精製した。NMRおよびMS分析により、2種類のモノカテコール体(6-hydroxy-EQ, 3'-hydroxy-EQ)および1種類のジカテコール体(6,3'-dihydroxy-EQ)が同定された。

オルトキノンは、SH化合物であるNACあるいはグルタチオン(GSH)と反応して、一付加体および二付加体を生成した。これらの付

加体の構造は、NMR および MS により確認され、結合位置は 5 位と 5' 位であった。システインの付加体は酸化されやすく、単離には至らなかった。

なお、EQ キノンがタンパクと SH 基を介して結合するかどうか、牛血清アルブミン(BSA)および SH 基を保護した NEM-BSA を用いて調べることを計画している。

次に、EQ のチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。pH 7.4 で 120 分間酸化して EQ オリゴマーを調製し、そこへ GSH を加えて GSH の減少と GSSG への酸化を追跡した。その結果、60 分後には GSH は 60% 減少し、その大部分は GSSG に酸化された。また、EQ オリゴマーは、 H_2O_2 の産生を有意に促進した。

D. 考察

EQ はチロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを産生する。オルトキノンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオンなどの非タンパク性 SH 化合物と反応し、付加体を形成する。EQ の 2 個の OH 基がいずれも酸化され、ジカテコール体が生成することは興味深い。また、生成したカテコール基のうちの 1 つが、RD の酸化により生成するクロマン骨格(RD-環状カテコール)を持つことから、RD と同様に細胞毒性をもたらす可能性が示唆される。

また、EQ オリゴマーは RD オリゴマーほどではないが、RES オリゴマーよりも高いプロオキシダント活性をもつことも興味深い。

E. 結論

EQ のチロシナーゼ酸化は EQ-キノン、次いで EQ-オリゴマーを産生し、前者は細胞内タンパクと結合することにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化(枯渇)することにより細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32, 766-776, 2019. DOI: 10.1111/pcmr.12808.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M Wakamatsu K	Tyrosinase-catalyzed oxidation of resvera- trol produces a highly reactive ortho -quinone: implica- tions for melanocytet oxicity	Pigment Cell Melanoma Research	32	766-776	2019

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴生

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活衛生化学部 第二室 室長
(氏名・フリガナ) 秋山 卓美 (アキヤマ タクミ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 最上 知子 (モガミ トモコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口[○]にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年 3 月 31 日

厚生労働大臣 殿

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 才藤 栄一

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

2. 研究課題名 医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 藤田医科大学・名誉教授

(氏名・フリガナ) 伊藤 祥輔 ・ イトウショウスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 審査中)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。