

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2年度 総括・分担研究報告書
(19KC2005)

研究代表者 秋山 卓美

令和3(2021)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	14
最上 知子	
3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（II）	16
伊藤 祥輔	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
---------------------	----

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。

4 位がアルコキシ基に置換されたフェノール類を用いたチロシナーゼによる酸化反応において、SH ペプチド濃度を高くすることにより、分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少し、生成物が単純化された。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、白斑誘導性ラズベリーケトン (RK) および 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) 暴露によりオルトキノン体グルタチオン・システイン付加体が顕著に産生されるのに対し、置換基を 2 位に有する 2-S-システアミニルフェノール (2SCAP) では認められないことを示した。293T 細胞において、エクオール (EQ) はチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノン体を経て、グルタチオン・システイン二付加体を形成した。また、白斑形成能を持つラズベリーケトンについて、その活性代謝物である DBL-カテコールの代謝を調べ、Diels-Alder 型反応による二量体、三量体の生成を証明した。

研究分担者

最上知子 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部主任研究官
伊藤祥輔 藤田医科大学医療科学部名誉教授

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

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

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。

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を 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。

フェノール類をチロシナーゼで酸化した後に共存させた 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の条件検討を行う。昨年度の検討で複数の生成物が得られた 4 位にアルコキシを持つ基質について、反応条件を調整することで生成物の単純化ができるかどうか検討する。

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。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、細胞を用いて代謝物(オルトキノンのシステイン/グルタチオン付加体)の解析により評価する方法の検討を引き続き進める。

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。昨年度に引き続きエクオール (EQ) について、また新たにラズベリーケトンについて検討する。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[秋山]

4 位がアルコキシ基に置換された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においては、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。

3. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (II)

[伊藤]

ヒトチロシナーゼを強制発現させた 293T 細胞に EQ50, 100, 200 μ M を 2 時間作用させ、細胞中および培地中の代謝物を HPLC-電気化学検出法により解析した。

DBL-キノンの代謝物は、LC-MS により解析した。

C. 研究結果

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[秋山]

ブトキシ基以上の分子量を持つ置換基を持つ基質の場合、SH ペプチド濃度が低い場合はペプチドが 1 個付加したカテコール、2 個付加したカテコールの他、これらそれぞれより分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物の 4 種の生成物が検出されたが、SH ペプチド濃度が低い場合は 1 個付加したカテコール、2 個付加したカテコールの 2 種のみが検出された。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築 [最上]

細胞を用いた代謝物解析において化合物構造との関係を検討した。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞に白斑誘導性の 4-置換フェノールであるラズベリーケトン (RK) および 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) を暴露すると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が顕著に産生されたが、2-S-システアミニルフェノール (2SCAP) の場合には検出されなかった。

3. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (II)

[伊藤]

EQ の細胞内代謝については、システインおよびグルタチオンの二付加体 DiCys-EQ-ジカテコール(diC)および DiGS-EQ-ジカテコールが EQ 濃度依存的に細胞中で生成し、培地に放出されることが示された。100 μ M EQ のうち 30 μ M が消費され、0.60 μ M の DiCys-EQ-diC と 0.66 μ M の DiGS-EQ-diC が培地中に検出されたことから、約 4% が代謝されて付加体を形成したことになる。この代謝率は他の白斑形成フェノール体に比べてやや高値であった。

DBL-キノンの試験管内での代謝については、反応は極めて速く進行するが、LC-MS により解析し、二量体、三量体の生成が示された。

D. 考察

1. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（I）

[秋山]

SH ペプチドの濃度を高くすることで、1 個付加したカテコールが減少して 2 個付加したカテコールが増加すると予測したが、実際には SO+Pe-2H 及び SO+2Pe-2H が著しく減少した。仮説として、これらのピークは分子量がそれぞれ SO+Pe 及び SO+2Pe と等しいそれぞれ MW+16+748 及び MW+16+748 \times 2 であるが rearrangement が起きやすい構造であり、SH ペプチドの濃度が高い場合にこれらの分子ができにくいことが考えられる。SH ペプチドの濃度が高いと生成物が単純化される利点があると言える。

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代謝活性化を細胞で評価する方法を確立するために、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用い、化合物の構造との関係を解析した。白斑誘導性 4-置換フェノール・カテコールでのオルトキノン体チオール付加代謝物の顕著な産生に比較し、2-置換フェノールでは代謝物産生は認められず、本方法の有用性を支持する結果が得られた。今後さらに対象を広げ、白

斑誘導能との関連を解明し、本法の有用性を明らかにする。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（II）

[伊藤]

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、di-キノン体を経て二付加体が生成することは、EQ オルトキノンの高い反応性を示している。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。

DBL-キノンの二量体、三量体の形成は、オルトキノンと共役二重結合との間のイオン型 Diels-Alder 反応によるものと考えられる。

E. 結論

SH ペプチド濃度を高くすることにより、分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少した。生成物の単純化ができたと考えられた。

白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する代謝活性化について、細胞を用いた評価法の確立に向けて、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いて化合物構造と代謝物生成の関係を解析し、本法の有用性を示した。

EQ が細胞内でチロシナーゼにより酸化され、EQ-di-キノンを生成し、チオール類と結合することが示された。これにより EQ は細胞内タンパクと結合して細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

RK のチロシナーゼによる活性代謝物である DBL-キノンは速やか二量体、三量体を形成することから、RK による白斑形成の原因物質であ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, Sugumaran M, Wakamatsu K. Chemical reactivities of *ortho*-quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols. *Int J Mol Sci*. 21: E6080 (36 pages), 2020.

Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K. Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic

compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions. *Int J Mol Sci* 21: E6774 (11 pages), 2020.

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(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反応条件を検討した。

4 位にアルコキシ基を置換基として持つフェノールチロシナーゼの基質とし、2 通りの濃度の SH ペプチド存在下での生成物を LC-MS により分析した。低濃度では SH ペプチドが 1 個付加したカテコール、2 個付加したカテコール及びそれぞれより分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物の 4 種が検出されたが、高濃度では SH ペプチドが 1 個又は 2 個付加したカテコールの 2 種のみとなった。生成物の単純化ができたと考えられた。

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 9 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 SH ペプチドと結合して安定化したと考えられた。

先行研究及び初年度の検討において、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-amylphenol (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*-amylphenol (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) (Fig. 1)を用いた検討により、基質が酸化された後にペプチドが 1 個又は 2 個結合した分子の生成が確認された。しかし、いくつかの基質では 4 本程度のピークが見られ、生成物の単純化という点で問題があった。

本年度は、反応条件の調整により生成物の種類に影響があるかどうか検討した。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

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、SH 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 又は 13.6 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°C 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。それぞれ 2 本又は 3 本の反応を行った。

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°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。

(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°C; 脱溶媒温度, 400°C; 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 から構造を推定した。

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200であるBzOPIでは964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。BzOPIでは965である。初年度も報告したように、SO+Peの他にベースピークの m/z はが2だけ小さいピークも検出された。BzOPIでは963である。MW+16+749-2と表せるイオンを与えた分子の分子量がMW+16+746であるのか、分子量はMW+16+748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としている。また、 m/z が(MW+16+749×2)/2であるベースピークを持つピークも検出された。質の酸化後にSHペプチドが2個結合した分子量がMW+16+748×2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。BzOPIでは857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+749×2-2)/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。BzOPIでは856である。

4位にアルコキシ基を持つ基質ではこれらの4通りのピークが検出される傾向にあり、反応条件によりピークの数減らすことができるか検討した。基質濃度は0.3mmol/L、酵素濃度は167U/Lとし、SHペプチド濃度を0.5 mmol/Lと1.0 mmol/Lの2通りとして比較した(Fig. 2-8)。検出されたピークをTable 1に示した。

MeOPI, EtOPI及びPrOPIでは、ペプチド濃度による差はなく、SO+Pe及びSO+2Peが検出された。

BuOPIでは、ペプチド濃度が0.5 mmol/Lの場合SO+Pe-2H, SO+Pe, SO+2Pe-2H及びSO+2Peが検出された。ペプチド濃度が1.0 mmol/Lの場合SO+Pe及びSO+2Peのみが検出された。

AmOPI, HxOPI及びBzOPIにおいても、ペプ

チド濃度が0.5 mmol/Lの場合にSO+Pe-2H, SO+Pe, SO+2Pe-2H及びSO+2Peが検出され、ペプチド濃度が1.0 mmol/Lの場合SO+Pe及びSO+2Pe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SHペプチドと結合させる方法について生成物の検討を行った。

昨年度の検討において、4位の置換基の構造により生成物の有無や種類に明らかな差が見られた。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。

SHペプチドの濃度を高くすることで、1個付加したカテコールが減少して2個付加したカテコールが増加すると予測したが、実際にはSO+Pe-2H及びSO+2Pe-2Hが著しく減少した。仮説として、これらのピークは分子量がそれぞれSO+Pe及びSO+2Peと等しいそれぞれMW+16+748及びMW+16+748×2であるがrearrangementが起きやすい構造であり、SHペプチドの濃度が高い場合にこれらの分子ができにくいことが考えられる。SHペプチドの濃度が高いと生成物が単純化される利点があると言える。

E. 結論

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にペプチドが2個付加した生成物や分子量が2だけ小さいイオンとして検出される4-置換フェノールの反応条件を検討した。SHペプチド濃度を高くすることにより、分子量が2だ

け小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少した。生成物の単純化ができたと考えられた。

なし
2. 学会発表
なし

F. 健康危険情報

なし

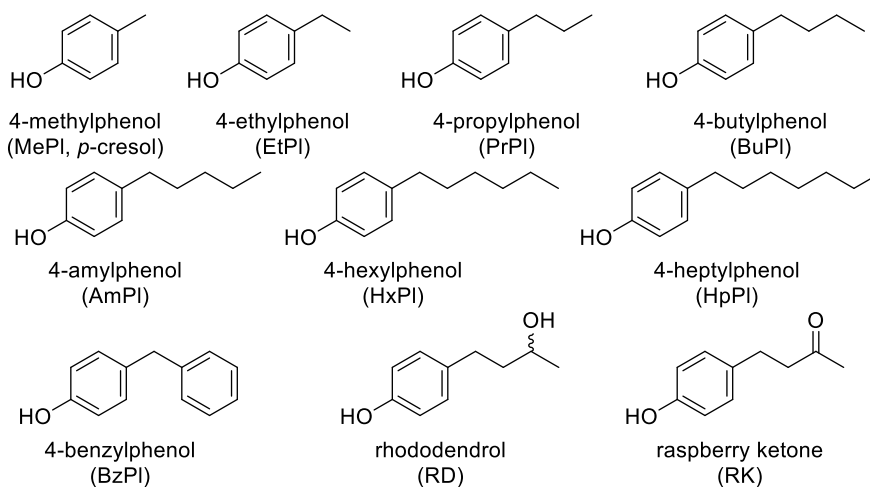
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし

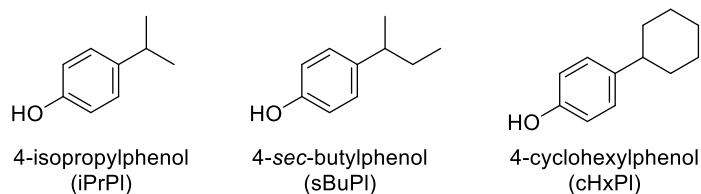
G. 研究発表

1. 論文発表

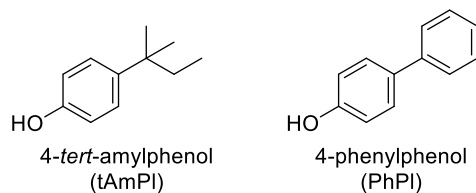
Phenols substituted with methyl group or a primary alkyl group at position 4



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

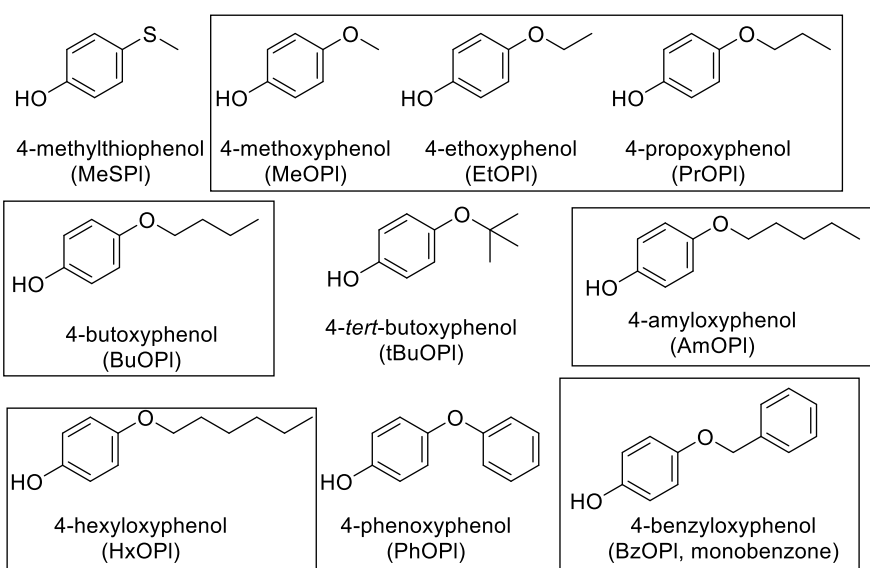


Fig. 1. Structures of 4-substituted phenols.

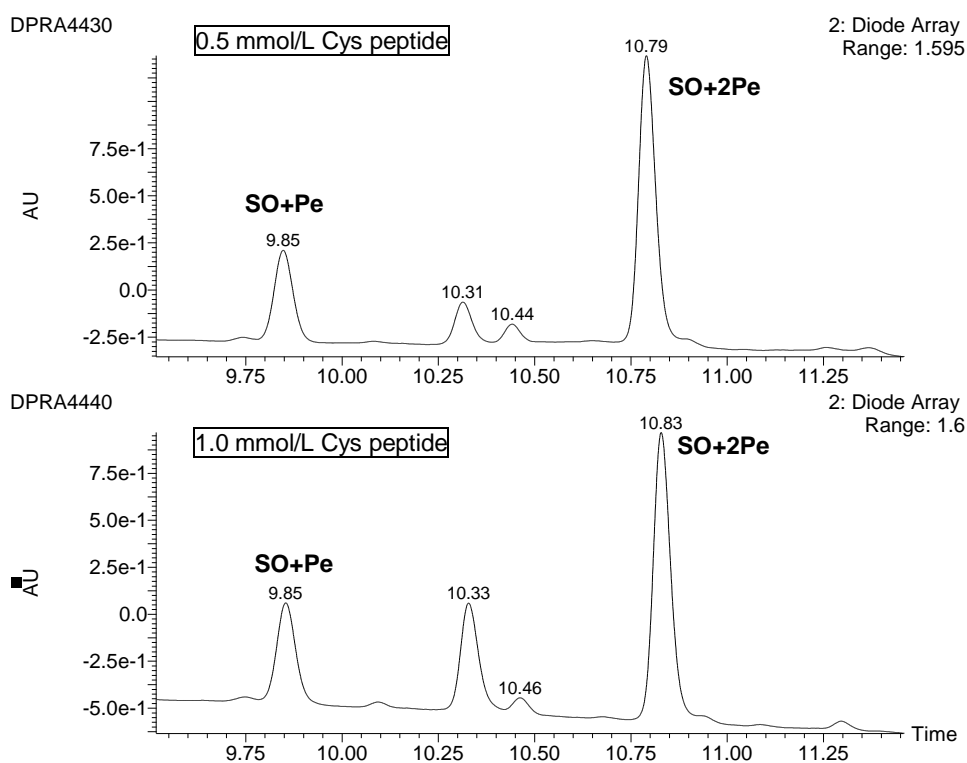


Fig. 2. Reaction with MeOPI as a substrate.

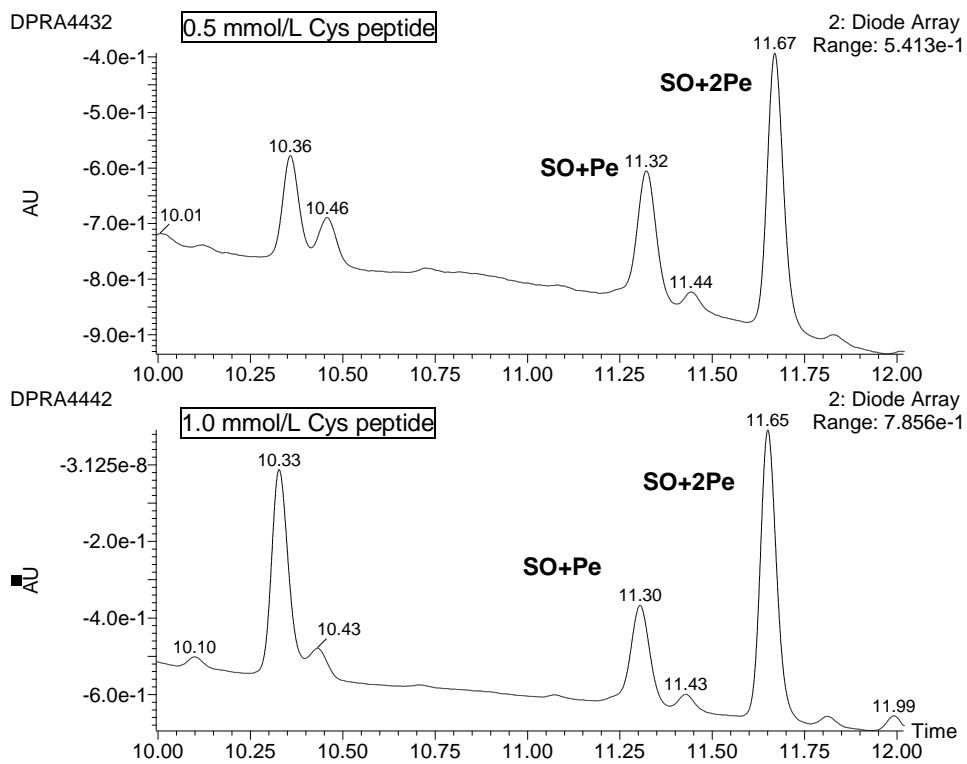


Fig. 3. Reaction with EtOPI as a substrate.

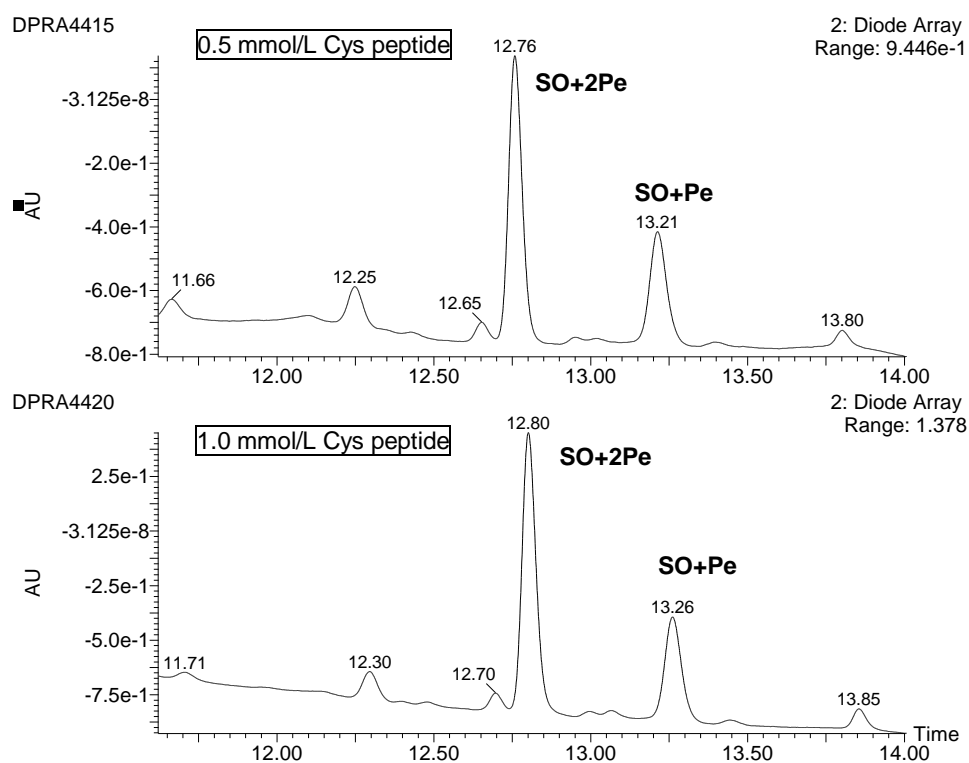


Fig. 4. Reaction with PrOPI as a substrate.

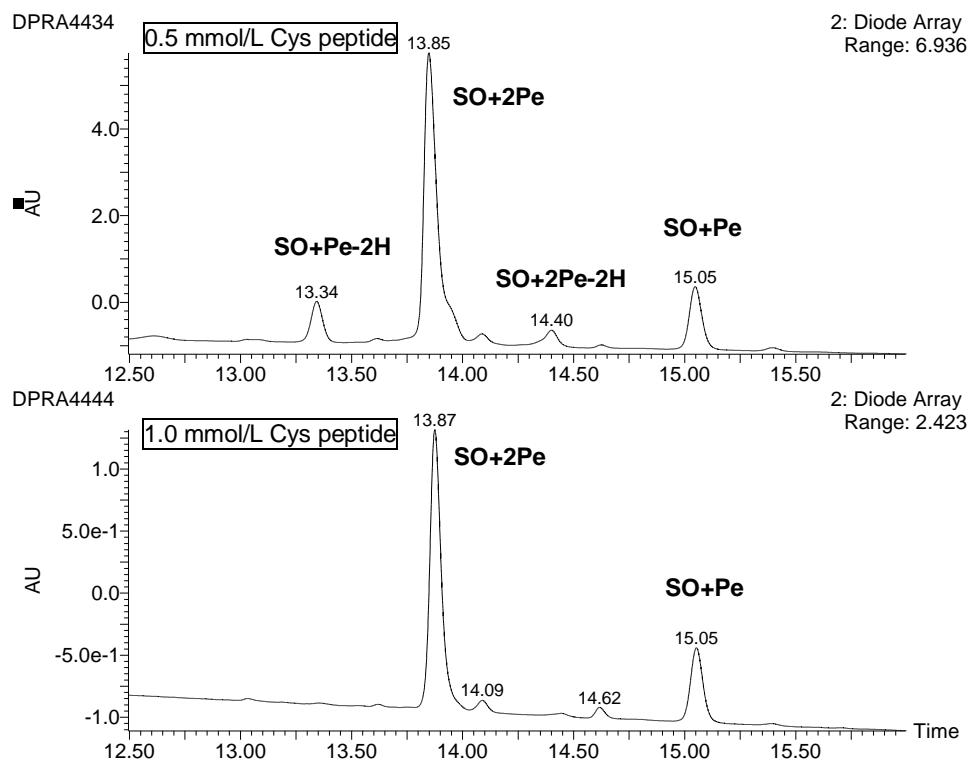


Fig. 5. Reaction with BuOPI as a substrate.

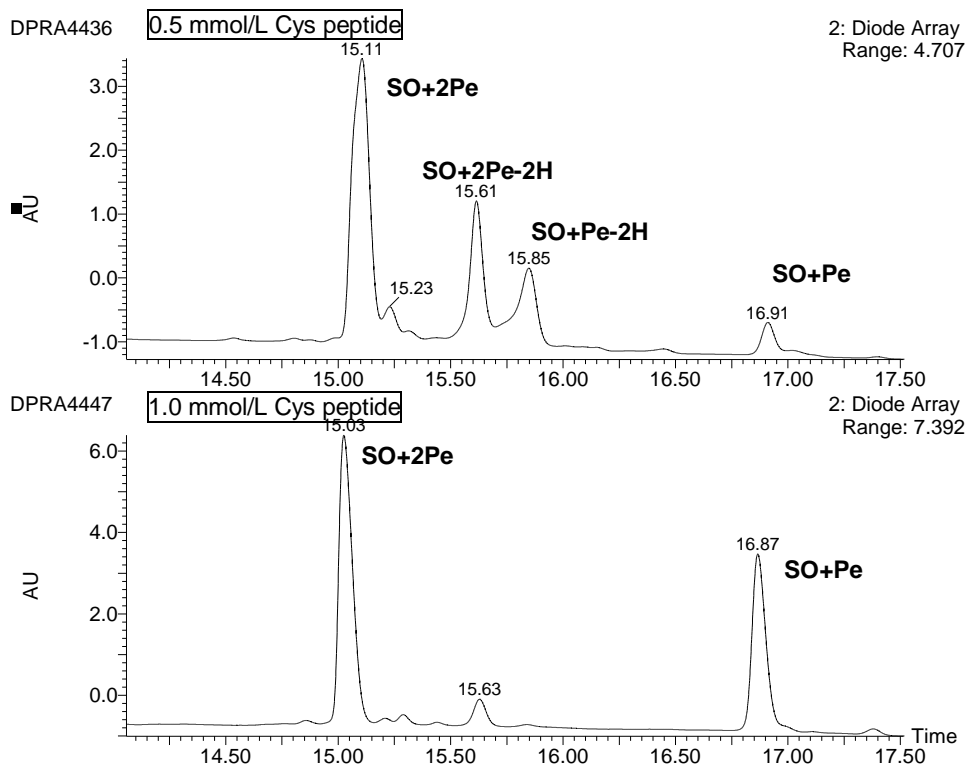


Fig. 6. Reaction with AmOPI as a substrate.

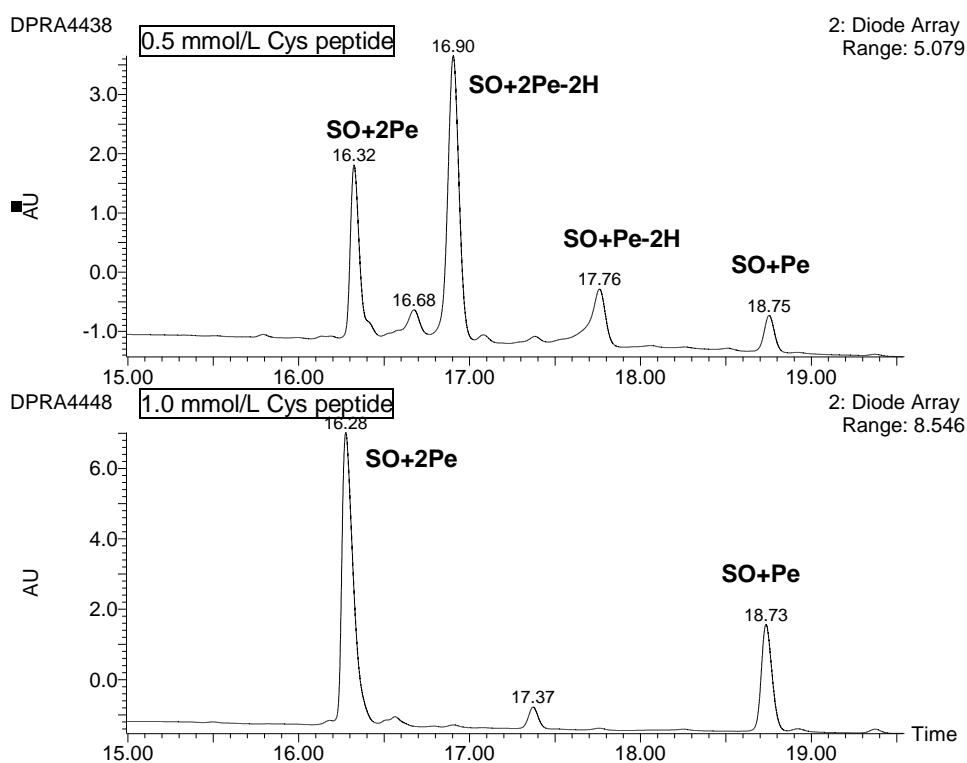


Fig. 7. Reaction with HxOPI as a substrate.

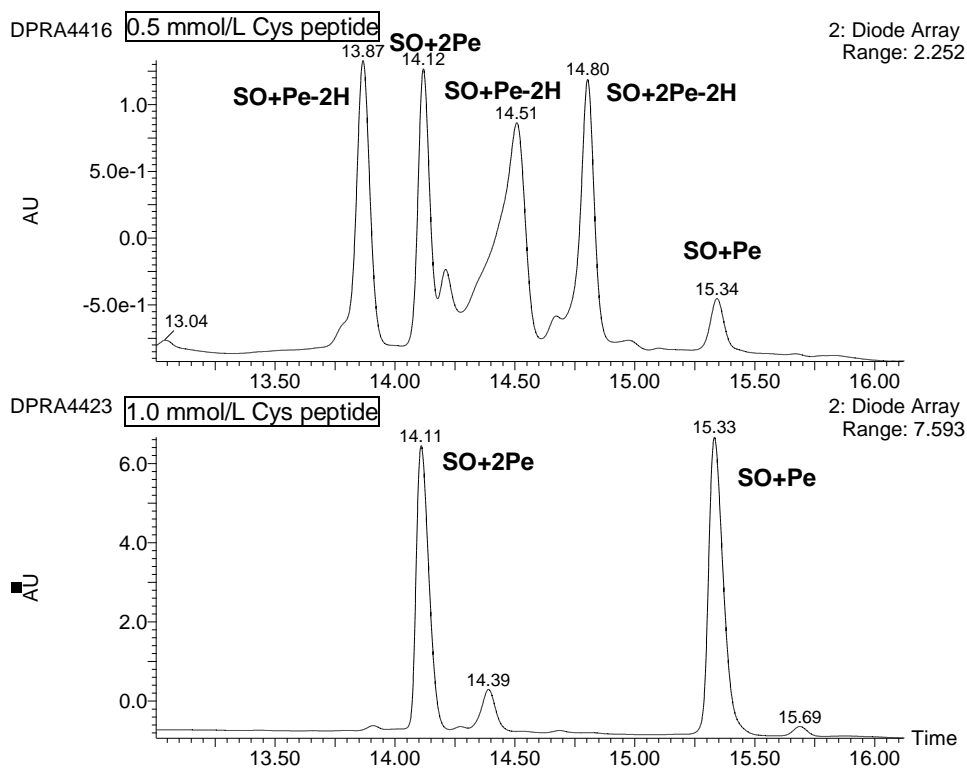


Fig. 8. Reaction with BzOPI as a substrate.

Table 1. Detected 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]
MeOPI	124	889	—	819	—
EtOPI	138	903	—	826	—
PrOPI	152	917	—	833	—
BuOPI	166	931	929	840	839
AmOPI	180	945	943	847	846
HxOPI	194	959	957	854	853
BzOPI	200	965	963	857	856

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、細胞での代謝物解析により評価する方法の検討を進めた。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用い、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生とフェノール類の構造との関係を解析し、本手法の有用性を支持する知見を集積した。

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、本分担研究においては、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ており、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、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化を代謝物産生により評価する手法について検討を開始した。293T 細胞にヒトチロシナーゼを高発現させ、RD ならびに 4S-システアミルフェノール(4SCAP)の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について条件を確立した。引き続き昨年度の研究において、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)についても可能であることを示した。

今年度は、本法を用いての代謝活性化解析の有用性を明らかにするために、対象をさらに広げて白斑誘導性フェノール類および報告の無いフェノール類について解析を進めた。

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た。細胞および培地の代謝産物は既報(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。

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

昨年度までの研究において、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、白斑誘導性の 4-S-システアミル

フェノール(4SCAP)、4-tert ブチルフェノール(4-TBP) (0.1, 0.3, 0.6 mM)、モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH) (0.1, 0.2, 0.3 mM)についても同様のオルトキノン体チオール付加体の産生を認めた。

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ラズベリーケトン(RK) (0.1, 0.3, 1.0 mM)を本細胞に曝露すると2時間後にRK オルトキノンのシステイン付加体ならびにグルタチオン付加体が培地・細胞で検出された。また、4-tert ブチルカテコール(4-TBC) (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、システイン付加体が培地に検出された。4SCAP については、H30年度に大量のオルトキノン体ならびにグルタチオン付加体の産生を明らかにしている。その構造異性体である 2SCAP を同一濃度(0.1, 0.3, 1.0 mM) 曝露した場合においては、同様の代謝物は検出されないことを確認した。

D. 考察

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」化を細胞で評価する方法の確立に向け、これまで、ヒトチロシナーゼを高発現した細胞を用いて代謝物解析を行う方法について検討を行ってきた。今年度は化合物をさらに追加して検討を進めた。

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。タンパクと反応すると、機能変化、あるいは変成・修飾による抗原性の生成が白斑と関連する可能性が推定されるが、修飾タンパクの分析は困難である。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。これまでの研究において、ヒトチロシナーゼを高発現する 293T 細胞を用いる方法に

ついて条件検討を進め、RD ならびに白斑誘導性フェノール類 MBEH、4-TBP、4SCAP の曝露により、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ている。今年度はさらに対象を広げ、RD に構造が類似する白斑誘導性フェノール類 RK、ならびにすでにオルト・パラ位に水酸基を有するカテコール体 4-TBC において、オルトキノン体のチオール付加物の著しい産生が認められること、一方、4SCAP の構造異性体で 2-置換フェノール構造を有する 2SCAP を曝露すると、4SCAP の場合のような代謝物は検出され無いことを確認した。今後さらに化合物を追加し、チオール付加体への代謝と化合物構造、白斑誘導能との関係を検討する予定である。

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細胞での評価法の確立に向けて、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いて化合物構造とチオール付加体産生の関係を解析し、本法の有用性を示した。

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

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について、昨年度に引き続き調べてきた。今年度は、ヒトチロシナーゼを強制発現したT293細胞を用いてEQの代謝を解析した。その結果、EQは細胞内でヒトチロシナーゼの良好な基質となり、濃度依存的にシステインおよびグルタチオンの二付加体を形成した。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。また、白斑形成能を持つラズベリーケトンについて、その活性代謝物であるDBL-カテコールの代謝を調べ、Diels-Alder型反応による二量体、三量体の生成を証明した。

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。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。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体に酸化され、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。そこで、前年度は、EQの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、オルトキノン体を生成し、N-アセチルシステインと反応して、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オリゴマーはプロオキシ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。そこ

で今年度は、ヒトチロシナーゼを強制発現させたT293細胞を用いて、チロシナーゼ依存性の代謝が細胞内で起こるかどうかを調べた。なお、この研究は、研究分担者最上知子博士との共同研究による。

また、RDのケトン体であるラズベリーケトン(RK)は、チロシナーゼにより酸化されて(E)-4-(3-オキソ-1-ブテニル)-1,2-ベンゾキノン(DBL-キノンを生成する(Itoら、Chem. Res. Toxicol., 2017)。このキノンは構造的に高い反応性を持ち、RKによる白斑形成能の原因物質と考えられる。今年度は、その代謝物の構造を調べた。この研究は、ボストン大学 Sugumaran 教授との国際共同研究により達成された。(Sugumaranら、IJMS, 2020)。

B. 研究方法

ヒトチロシナーゼを強制発現させた293T細胞にEQ50, 100, 200 μ Mを2時間作用させ、細胞中および培地中の代謝物をHPLC-電気化学検

出法により解析した。

DBL-キノンの代謝物は、LC-MS により解析した。

C. 研究結果

EQ の細胞内代謝については、システインおよびグルタチオンの二付加体 DiCys-EQ-ジカテコール(diC)およびDiGS-EQ-ジカテコールがEQ濃度依存的に細胞中で生成し、培地に放出されることが示された。100 μ M EQ のうち 30 μ M が消費され、0.60 μ M の DiCys-EQ-diC と 0.66 μ M の DiGS-EQ-diC が培地中に検出されたことから、約 4%が代謝されて付加体を形成したことになる。この代謝率は他の白斑形成フェノール体に比べてやや高値であった。

DBL-キノンの試験管内での代謝については、反応は極めて速く進行するが、LC-MS により解析し、二量体、三量体の生成が示された。

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、di-キノン体を経て二付加体が生成することは、EQ オルトキノンの高い反応性を示している。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。

DBL-キノンの二量体、三量体の形成は、オルトキノンと共役二重結合との間のイオン型 Diels-Alder 反応によるものと考えられる。

E. 結論

EQ が細胞内でチロシナーゼにより酸化され、

EQ-di-キノンを生成し、チオール類と結合することが示された。これにより EQ は細胞内タンパクと結合して細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

RK のチロシナーゼによる活性代謝物である DBL-キノンは速やか二量体、三量体を形成することから、RK による白斑形成の原因物質であ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, Sugumaran M, Wakamatsu K. Chemical reactivities of *ortho*-quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols. *Int J Mol Sci.* 21: E6080 (36 pages), 2020.

Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K. Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions. *Int J Mol Sci* 21: E6774 (11 pages), 2020.

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, Sugumaran M, Wakamatsu K.	Chemical reactivities of <i>ortho</i> -quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols.	International Journal of Molecular Science	21	6080 (36 pages)	2020
Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K.	Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions.	International Journal of Molecular Science	21	6774 (11 pages)	2020

令和3年 3 月 29 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 合田 幸

次の職員の令和2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・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□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3年 3 月 29 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 合田 幸

次の職員の令和2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□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。

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

次の職員の令和2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:)
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。