

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3年度 総括・分担研究報告書
(21KC2003)

研究代表者 秋山 卓美

令和4(2022)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	5
秋山 卓美	
2. 安全性評価法（細胞系）の構築 (I)	8
最上 知子	
3. 安全性評価法（細胞系）の構築 (II)	11
伊藤 祥輔	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
---------------------	----

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ロドデノール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。

チロシナーゼによる酸化に続いてSHペプチドと結合させる試験系を水溶性の低い被験物質にも適用するために類似の実験系について調査を行い、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、DMSOやその混液、またリン酸溶液が溶媒として使用されていることがわかった。化学白斑発症の鍵と想定される「チロシナーゼによる代謝活性化」をヒトチロシナーゼ高発現細胞の代謝物分析により評価する方法を確立した。オルトキノン代謝物産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことが示された。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細胞での評価法を4-置換フェノール構造を有するが、白斑誘導の報告がないレスベラトロールならびにエクオールに適用したところ、両者から濃度依存的にオルトキノン体のチオール付加体が産生することが確認された。

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客員研究員

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

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、過去四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

トキノンを含む 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。

RD ならびに 4-*S*-システアミニルフェノール (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 HPLC を用いて測定する手法について条件を確立した。引き続き、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、白斑誘導性化合物であるラズベリーケトン (RK)、モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH)、4-*tert*-ブチルフェノール (4-TBP)、および 4-*tert*-ブチルカテコール (4-TBC) についても可能であること、一方、4SCAP の構造異性体 2-*S*-システアミニルフェノール (2SCAP) では検出されないことを示した。

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。

今年度は、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について、水溶性の低い物質に適用できる方法への改良を検討するため、調査を行う。

また、1) 白斑関連 *p*-クレゾール (CRE) および発症報告の無いルシノール (RUC) についてチロシナーゼによる代謝を受けるか、2) これまで調べた各種フェノール類について、オルトキノン代謝物産生が細胞内グルタチオン量の低下をもたらすか検証した。対象をさらに広げ、白斑誘導性について報告は無いが、4-置換フェノール類であり、サプリメントとして広範に使用されているレスベラトロール (RES) およびエクオール (EQ) について解析を進めた。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 及び

Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) を用いた近年の研究報告について調査した。続いて、マッシュルーム由来チロシナーゼについて BRENDA データベースにより調査を行った。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築 [最上][伊藤]

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。細胞生存率決定には ATP 含量を、細胞内グルタチオンはグルタチオン-*S*-トランスフェラーゼの基質となる含量を測定した。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 電気化学検出法により解析した。

C. 研究結果

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

チロシナーゼによる酸化に続いて SH ペプチドと結合させる試験系を水溶性の低い被験物質にも適用するため、同様のペプチドを用いる試験法において用いられる有機溶媒及びチロシナーゼの活性に対する有機溶媒の影響について調査を行った。その結果、DPRA 及び ADRA ではアセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、5% DMSO 含有アセトニトリルなどの溶媒が使用されていることがわかった。また、チロシナーゼを用いた研究においてリン酸溶液が使用されていることがわかった。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築 [最上][伊藤]

「フェノール性化合物のチロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化」を、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞での代謝物解析により評価する方法について、今年度は白斑関連 CRE および発症報告の無い RUC を追加して検討した。その結果、白斑誘導の知られる 7 種のフェノール/カテコール誘導体 (RD、RK、4SCAP、MBEH、4-TBP、TBC および CRE) については、オルトキ

ノン体がグルタチオンおよびシステイン付加体として検出された。一方、RUCや2SCAPについては、相当する代謝物は検出されなかった。さらに、オルトキノンへの代謝活性化は細胞内グルタチオン量への影響をもたらすことが判明した。

引き続き本法の汎用性を明らかにするために、白斑誘導性について報告は無いが、4-置換フェノール類であり、サプリメントとして広範に使用されているRESおよびEQについて解析を進めた。その結果、濃度依存的にオルトキノン体のチオール付加体が産生することが確認された。

D. 考察

1. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築 [秋山]

酸化を受けた被験物質のペプチドとの結合に関してはアセトニトリル、アセトン、DMSOなど水と混和する溶媒であれば影響は与えないと考えられた。また、チロシナーゼの活性については情報が得られなかったが、今後予備実験により有機溶媒存在下における活性が低下する場合には、有機溶媒でなくリン酸溶液を検討することも考慮すべきと考えられた。

2. 安全性評価法（細胞系）の構築 [最上][伊藤]

RDや類似構造の白斑誘導性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、ヒトチロシナーゼを高発現する細胞を用いて代謝物解析により評価する方法として、オルトキノン体のチオール付加体をHPLC電気化学検出法により定量する分析法を確立した。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、グルタチオンやシステインなどの細胞内SH基との反応性が高い。タンパクとの反応はタンパクの機能・抗原性を変化させ白斑誘導と関わる可能性が提唱されている。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、白斑誘導の知られる7種のフェノール/カテコール誘導体全てにつ

いてオルトキノン代謝物のチオール付加体が検出可能な条件を確立した。オルトキノン代謝物の産生は細胞内グルタチオン低下を伴っていた。本法の適用範囲を広げ、白斑誘導能の報告は無いが、4-置換フェノール構造を持つRESならびにEQからもオルトキノン体のチオール付加体の産生を確認した。

E. 結論

チロシナーゼによる酸化に続いてSHペプチドと結合させる試験系を水溶性の低い被験物質にも適用するため、同様のペプチドを用いる試験法において用いられる有機溶媒及びチロシナーゼの活性に対する有機溶媒の影響について調査を行ったところ、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、DMSOやその混液、またリン酸溶液が使用されていることがわかった。

化学白斑発症の鍵と想定される「チロシナーゼによる代謝活性化」をヒトチロシナーゼ高発現細胞の代謝物分析により評価する方法を確立した。オルトキノン代謝物産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことが示された。

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細胞での評価法の確立を受け、本法を同様な4-置換フェノール構造を有するが、白斑誘導の報告がないRESならびにEQに適用した。その結果、両者から濃度依存的にオルトキノン体のチオール付加体が産生することが確認され、皮膚への大量塗布の危険性が懸念された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka H, Ito S, Ojika M, Nishimaki-Mogami T, Kondo K, Wakamatsu K. The oxidation of equol by tyrosinase produces a unique di-

ortho-quinone: possible implications for melanocyte toxicity. International Journal of Molecular Sciences. 22, 9145, 2021.

- 2) Nishimaki-Mogami T, Ito S, Cui H, Akiyama T, Tamehiro N, Adachi R, Wakamatsu K, Ikarashi Y, Kondo K. A cell-based evaluation of human tyrosinase-mediated metabolic activation of leukoderma-inducing phenolic compounds. *Submitted*.
- 3) Matsunaga K, Suzuki K, Ito A, Tanemura A, Abe Y, Suzuki T, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Yagami A, Masui Y, Inoue S, Ito S, Katayama I. Rhododendrol-induced leukoderma update I: clinical findings and treatment. Journal of Dermatology. 48, 961-968, 2021.
- 4) Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, Sumikawa Y, Yoshikawa Y, Suzuki K, Yagami A, Masui Y, Ito A, Matsunaga K. Rhododendrol-induced leukoderma update II: pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanism-based treatments in comparison with vitiligo. Journal of Dermatology 48, 969-978, 2021.
- 5) Ito S, Tanaka H, Ojika M, Wakamatsu K,

Sugumaran M. Unique oxidative transformations of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde generates potentially reactive intermediates as causative agents for its neurotoxicity. International Journal of Molecular Sciences. 22, 11751, 2021.

- 6) Bjerke DL, Wu S, Wakamatsu K, Ito S, Wang, J, Laughlin T, Hakozaiki T. A framework to mitigate the risk of chemical leukoderma: consumer products. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 131, 105157, 2022.

2. 学会発表

- 1) 田中ひとみ, 伊藤祥輔, 小鹿一, 近藤一成, 最上知子, 若松一雅。エクオールのチロシナーゼ酸化はメラノサイトに細胞毒性を示す新奇なジオルトキノンを生成する。第30回日本色素細胞学会学術大会, 2021年10月23日仙台。

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

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 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おり、またシステインなど SH 基を持つ化合物と結合することが報告されている。この反応を捉える試験法として、チロシナーゼによる酸化後にペプチドへの結合を利用して検出する試験法の開発を行っている。

酵素反応を利用するため、有機溶媒の少ない系で検討していたが、有機溶媒を添加することにより水溶性の低い被験物質にも適用できる方法への改良を行う計画である。その方法を検討するにあたり、同様のペプチドを用いる試験法において用いられる有機溶媒及びチロシナーゼの活性に対する有機溶媒の影響について調査を行った。その結果、Direct Peptide Reactivity Assay 及び Amino Acid Derivative Reactivity Assay ではアセトニトリル、水、2-プロパノール、アセトン、5%DMSO 含有アセトニトリルなどの溶媒が使用されていることがわかった。また、チロシナーゼを用いた研究においてリン酸溶液が使用されていることがわかった。

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) 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 (DPRA) 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.

酵素反応を利用するため, 有機溶媒の少ない系で検討していたが, 有機溶媒を添加することにより水溶性の低い被験物質にも適用できると考え, 本研究では方法の改良を行う計画である. その方法を検討するにあたり, 同様のペプチドを用いる試験法において用いられる有機溶媒及びチロシナーゼの活性に対する有機溶媒の影響について調査を行った.

B. 研究方法

DPRA 及び Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) を用いた近年の研究報告について調査した. 続いて, マッシュルーム由来チロシナーゼについて BRENDA データベースにより調査を行った.

C. 研究結果

1. DPRA 及び ADRA

(1) Yamamoto et al., J Appl Toxicol. 2015;35(11):1348-60.: A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions.

DPRA で用いるペプチドではなく *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) と α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL) に対する結合を利用して感作性試験を行う ADRA の報告である. 82 種の被験物質を用いている. 水溶性の高い物質には溶媒として水を用いているが, 分子量の大きい物質, 疎水性部分の大きい物質などにはアセトニトリル, 2-プロパノール, アセトン, 又は 5%DMSO 含有アセトニトリルを用いている. 1

mmol/L になるように溶解し, 反応液ではこれをバッファーなどで 4 倍希釈 (0.25mmol/L) している.

(2) Yamamoto et al., J Toxicol Sci. 2019;44(9):585-600.: Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events.

ADRA の報告である. 90 種の被験物質を用いている. 水溶性が高い物質は水に, 水溶性が低いと考えられる物質はアセトニトリル, アセトン, 又は 5%DMSO 含有アセトニトリルに溶解している. 0.5mg/mL になるよう溶解し, 反応液ではこれをバッファーなどで 4 倍希釈 (0.125mg/mL) している.

(3) Wanibuchi et al., J Toxicol Sci. 2019;44(12):821-832.: The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances.

ADRA の改良法の報告である. 被験物質及び溶媒, 条件は(1)と同様.

(4) Patel et al., ALTEX. 2019;36(3):373-387.: Comparison of in chemico skin sensitization methods and development of an in chemico skin photosensitization assay.

開発中の試験法と比較するために DPRA と ADRA を行っている. 36 種の被験物質を用いている. 水溶性が低い被験物質の溶媒はアセトニトリル, アセトニトリル-水混液, DMSO であり, 4 倍希釈して反応を行っている.

(5) Omeragic et al., Sci Rep. 2022;12(1):7470.: Application of direct peptide reactivity assay for assessing the skin sensitization potential of essential oils.

DPRA を水溶性が極めて低い精油に応用した報告である。モノテルペンを中心とした組成を持つ 6 種の精油をそれらの成分ベースで 100 mmol/L になるようアセトニトリルに溶解し、反応液での溶媒は 20%アセトニトリルである。

2. mushroom tyrosinase

チロシナーゼは EC 1.14.18.1 の酵素である。本酵素は多くの生物に由来するものが知られている。BRENDA データベースの項目「Molecular Properties」内の細項目「Organic Solvent Stability」を調査すると、*Streptomyces* に由来するものは有機溶媒中での活性に関する情報がある。しかし、マッシュルーム(*Agaricus bisporus*)由来の酵素については情報がない。

項目「Enzyme-Ligand Interactions」内の細項目「Substrates/Products」にある化合物について Log K_{ow} を調べ、値が大きく脂溶性が高い物質に関する in vitro 酵素反応の報告を調査した。

・ Ortiz-Rioz et al., Bioorg Med Chem. 2015;23(13):3738-46.: Identification of p-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates

phloletin (water solubility: 0.13g/L, Log K_{ow} = 2.23), phloridzin (water solubility: 1.678g/L, Log K_{ow} = 0.452)を含む 4 種の物質がマッシュルームチロシナーゼの基質になることを報告している。被験物質のストック液は 0.15 mmol/L リン酸で調製している。

D. 考察

酸化を受けた被験物質のペプチドとの結合に関してはアセトニトリル、アセトン、DMSO など水と

混和する溶媒であれば影響は与えないと考えられた。また、チロシナーゼの活性については情報が得られなかったが、今後予備実験により有機溶媒存在下における活性が低下する場合には、有機溶媒でなくリン酸溶液を検討することも考慮すべきと考えられた。

E. 結論

チロシナーゼによる酸化に続いて SH ペプチドと結合させる試験系を水溶性の低い被験物質にも適用するため、同様のペプチドを用いる試験法において用いられる有機溶媒及びチロシナーゼの活性に対する有機溶媒の影響について調査を行った。その結果、Direct Peptide Reactivity Assay 及び Amino Acid Derivative Reactivity Assay ではアセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、5%DMSO 含有アセトニトリルなどの溶媒が使用されていることがわかった。また、チロシナーゼを用いた研究においてリン酸溶液が使用されていることがわかった。

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(細胞系)の構築 II

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 客員研究員

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:

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」は、白斑発症の鍵となる段階と考えられている。ヒトチロシナーゼを用いる評価法として、293T細胞に高発現してオルトキノン代謝物のグルタチオン・システイン付加体の産生を解析する方法の有用性を示した。さらにオルトキノン代謝物の産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことを確認した。

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、再発防止のためには医薬部外品成分などの化合物の白斑誘導能の評価が必要とされる。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の多くに、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝が報告されている。オルトキノン体はSH基との反応性が高く、細胞内SHプールの枯渇・タンパク修飾により、色素細胞特異的な毒性発現・免疫応答の誘導により白斑発症に強く関与することが示唆されている。そこで本研究においては、「チロシナーゼによる代謝活性化」に着目し、その評価系を構築することを目的とした。

従来、ほとんどの研究では市販のマッシュルームチロシナーゼが使用されてきたが、ヒトチロシナーゼとはタンパク構造ならびに有効な阻害剤の化学構造に大きな違いが報告され、ヒトチロシナーゼを用いた安全性評価が必要となる。そこで前研究班において、ヒトチロシナーゼを293T細胞に高発現させ、白斑誘導性フェノール類のオルトキノンへの代謝活性化を代謝物分析し評価する手法の検討を進めた(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」、令和元-2年厚生労働行政推進調査事業費補助金「医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究」)。RDならびに4-S-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、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、白斑誘導性化合物であるラズベリーケトン(RK)、モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-tert-ブチルフェノール(4-TBP)、および4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)についても可能であること、一方、4SCAPの構造異性体2SCAPでは検出されないことを示した。

今年度は、1) 白斑関連p-クレゾール(CRE)および発症報告の無いルシノール(RUC)についてチロシナーゼによる代謝を受けるか、2) これまで調べた各種フェノール類について、オルトキノン代謝物産生が細胞内グルタチオン量の低下をもたらすか検証した。

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 時間後に細胞および培地を回収した。オルトキノ代謝産物の HPLC 解析は協力研究者伊藤が担当した。細胞生存率は ATP 含量の測定により決定し、細胞内グルタチオンはグルタチオン-S-トランスフェラーゼの基質となる含量を測定した。

C. 研究結果

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

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞にヒトチロシナーゼを一過性に高発現させた細胞に、CRE (0.1, 0.3, 0.6 mM) を 2 時間暴露すると、オルトキノ代謝物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された。一方、RUC (0.1, 0.3, 0.6 mM) を暴露した場合においては、同様の代謝物は検出されなかった。

2. フェノール類の代謝活性化による細胞内グルタチオン量への影響

チロシナーゼによるオルトキノへの代謝活性化が細胞内グルタチオンの低下をもたらすかどうか、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞にフェノール類を 2 時間暴露し、空ベクター導入 (mock) 細胞の場合とグルタチオン量を比較して調べた。各種フェノール類は、代謝活性化の検討と同じ 3 段階の濃度を用いた。4SCAP や 4-TBC を暴露すると、グルタチオン量はチロシナーゼ発現細胞のみ著しく低下し、中・高濃度ではほぼ消失した。RK 処理の場合は濃度依存的に、CRE も中・高濃度で顕著なチロシナーゼ依存の低下を示した。RD, および TBP と MBEH では一部の濃度において、チロシナーゼ発現細胞のグルタチオンは mock 細胞に比較し有意に低下した。一方、2SCAP ならびに RUC の場合には、どの濃度においても、チロシナーゼ発現と mock 細胞間での差異は認められなかった。

D. 考察

RD や類似構造の白斑誘導性 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」は、白斑発症に決定的な段階と考えられている。この代謝活性化を、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いて代謝物解析により評価する方法を確立した。今年度までに、白斑誘導の知られる 7 種のフェノール/カテコール誘導体についてオルトキノ体への代謝活性化が検出可能であること、一方、白斑誘導の報告の無い RUC や 2SCAP については、相当する代謝物は検出されないことが判明し、本法が有用な評価法であることが示された。

オルトキノ代謝物は SH 基との反応性が高い。タンパクへの付加体は機能・抗原性を変化させ白斑誘導をもたらす機序が提唱されている。システインあるいはグルタチオン付加体は、タンパク付加体より分析が容易であり、タンパク修飾のサロゲートマーカーとなることが期待される。

オルトキノ体産生はまた、細胞内グルタチオン量の低下を引き起こし、メラノサイト選択的毒性を発揮して白斑発症に関わる可能性も提唱されている。今年度は各種フェノール類のチロシナーゼ代謝とグルタチオン低下の関わりを解析し、オルトキノへと代謝された 7 化合物について、チロシナーゼに依存した細胞内グルタチオン低下が検出されること、一方オルトキノ代謝物が検出されない 2 化合物については、グルタチオン量低下は認められないことを明らかにした。グルタチオン低下も白斑誘導能の指標となる可能性が示された。

E. 結論

化学白斑発症の鍵と想定される「チロシナーゼによる代謝活性化」をヒトチロシナーゼ高発現細胞の代謝物分析により評価する方法を確立した。オルトキノ代謝物産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka H, Ito S, Ojika M, Nishimaki-Mogami T, Kondo K, Wakamatsu K. The oxidation of equol by tyrosinase produces a unique di-*ortho*-quinone: possible implications for melanocyte toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 9145, 2021.
- 2) Nishimaki-Mogami T, Ito S, Cui H, Akiyama T, Tamehiro N, Adachi R, Wakamatsu

K, Ikarashi Y, Kondo K. A cell-based evaluation of human tyrosinase-mediated metabolic activation of leukoderma-inducing phenolic compounds. *Submitted*

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(細胞系)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
研究協力者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 客員研究員

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目指し、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・培地での代謝物解析により評価する方法を確立した。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を HPLC 電気化学検出法により解析した。本法は、感度、特異性ともに優れた方法と言える。

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を探索し、その評価系を確立することを目的とした。

RD ならびに類似の 4-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てきた。そこで前期研究班において、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 4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の代謝を調べた。その結果、細胞・培地中のオルトキノン体をグルタチオン・システイン付加体として HPLC を用いて測定する手法について条件を確立した。引き続き、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、白斑誘導性ラズベリーケトン(RK)、モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-tert-ブチルフェノール(4-TBP)、4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)、および p-クレゾール(CRE)について

も可能であることを示した。一方、4-置換フェノール構造を持たない、ルシノール(RUC)および 2-S-システアミルフェノールは代謝を受けなかったことから、本法がチロシナーゼ依存性であることが証明された。

今年度は、本法を用いての代謝活性化解析の汎用性を明らかにするために、対象をさらに広げ、白斑誘導性について報告は無いが、4-置換フェノール類であり、サプリメントとして広範に使用されているレスベラトロール(RES)およびエクオール(EQ)について解析を進めた。なお、EQ の代謝活性化については、論文として発表済みである(Tanaka et al., 2021)。

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(研究協力者最上知子実施)。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 電気化学検出法により解析した。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた RES 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 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された。ついで、4SCAP, RK, MBEH, TBP, TBC および CRE 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、白斑誘導の報告はないが、RD 同様に 4-置換フェノール構造を持つ RES について検討を加えた。その結果、RES (0.03, 0.06, 0.1 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に RES 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濃度依存的に培地・細胞で検出された。

2. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた EQ の代謝活性化の評価

RES 同様にサプリメントとして汎用されている EQ について、チロシナーゼによる代謝を多面的に検討した。EQ は 4-置換フェノール構造を 2 つ有し、その反応性に興味を持たれた。最初に、マッシュルームチロシナーゼを用いて代謝を調べ、2 種類のモノオルトキノン体、1 種類のジオルトキノン体、合わせて 3 種類の可能なオルトキノン体の産生を確認した。次に、*N*-アセチルシステイン、システイン、およびグルタチオン付加体についても、上記のオルトキノン体に対応する付加体の産生を認めた。オルトキノン体はタンパクであるウシ血清アルブミンとも結合できることを証明した。最後に、293T 細胞を用いた代謝を検討した。EQ (0.05, 0.1, 0.2 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に EQ ジョ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濃度依存的に培地・細胞で検出された。ジオルトキノン付加体のみが検出されたことは、EQ がヒトチロシナーゼの良好な基質として作用していることを示唆し

ていると言える。

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」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。その結果、オルトキノン体のチオール付加体を HPLC 電気化学検出法により定量する分析法を確立した。本法は感度および特異性において優れている。今年度は化合物に暴露した細胞中の残存グルタチオン量との相関を調べた(最上分担)。

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、グルタチオンやシステインなどの細胞内 SH 基との反応性が高い。タンパク中の SH 基と反応すると、機能変化あるいは変成・修飾による抗原性の獲得が白斑誘導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 4SCAP, RK, MBEH, 4-TBP, 4SCAP, CRE の暴露により、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た。

今年度は、本法の適用対象を広げ、白斑誘導能の報告は無いが、RD 同様に 4-置換フェノール構造を持つ RES ならびに EQ について検討を行った。その結果、いずれの化合物からもオルトキノン体のチオール付加体の産生を確認することができた。

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を受け、本法を同様な 4-置換フェノール構造を有するが、白斑誘導の報告がない RES ならびに EQ に適用した。

その結果、両者から濃度依存的にオルトキノンのチオール付加体が産生することが確認され、皮膚への大量塗布の危険性が懸念された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka H, Ito S, Ojika M, Nishimaki-Mogami T, Kondo K, Wakamatsu K. The oxidation of equol by tyrosinase produces a unique di-ortho-quinone: possible implications for melanocyte toxicity. International Journal of Molecular Sciences. 22, 9145, 2021.

2) Nishimaki-Mogami T, Ito S, Cui H, Akiyama T, Tamehiro N, Adachi R, Wakamatsu K, Ikarashi Y, Kondo K. A cell-based evaluation of human tyrosinase-mediated metabolic activation of leukoderma-inducing phenolic compounds. *Submitted*.

3) Matsunaga K, Suzuki K, Ito A, Tanemura A, Abe Y, Suzuki T, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Yagami A, Masui Y, Inoue S, Ito S, Katayama I. Rhododendrol-induced leukoderma update I: clinical findings and treatment. Journal of Dermatology. 48, 961-968, 2021.

4) Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, Sumikawa Y, Yoshikawa Y,

Suzuki K, Yagami A, Masui Y, Ito A, Matsunaga K. Rhododendrol-induced leukoderma update II: pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanism-based treatments in comparison with vitiligo. Journal of Dermatology 48, 969-978, 2021.

5) Ito S, Tanaka H, Ojika M, Wakamatsu K, Sugumaran M. Unique oxidative transformations of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde generates potentially reactive intermediates as causative agents for its neurotoxicity. International Journal of Molecular Sciences. 22, 11751, 2021.

6) Bjerke DL, Wu S, Wakamatsu K, Ito S, Wang, J, Laughlin T, Hakozaiki T. A framework to mitigate the risk of chemical leukoderma: consumer products. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 131, 105157, 2022.

2. 学会発表

1) 田中ひとみ, 伊藤祥輔, 小鹿一, 近藤一成, 最上知子, 若松一雅。エクオールのチロシナーゼ酸化はメラノサイトに細胞毒性を示す新奇なジオルトキノンを生成する。第30回日本色素細胞学会学術大会, 2021年10月23日仙台。

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

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
Tanaka H, Ito S, Ojika M, Nishimaki-Mogami T, Kondou K, Wakamatsu K	The oxidation of equol by tyrosinase produces a unique di-ortho-quinone: possible implications for melanocyte toxicity	International Journal of Molecular Science	22	9145 (14 pages)	2021
Matsunaga K, Suzuki K, Ito A, Tanemura A, Abe Y, Suzuki T, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Yagami A, Masui Y, Inoue S, Ito S, Katayama I	Rhododendrol-induced leukoderma update I: clinical findings and treatment.	Journal of Dermatology	48	961-968	2021
Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, Sumikawa Y, Yoshikawa Y, Suzuki K, Yagami A, Masui Y, Ito A, Matsunaga K	Rhododendrol-induced leukoderma update II: pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanisms-based treatments in comparison with vitiligo.	Journal of Dermatology	48	969-978	2021
Ito S, Tanaka H, Ojika M, Wakamatsu K, Sugumarman M	Unique oxidative transformations of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde generates potentially reactive intermediates as causative agents for its neurotoxicity	International Journal of Molecular Science	22	11751 (17 pages)	2021
Bjerke DL, Wu S, Wakamatsu K, Ito S, Wang, J, Laughlin T, Hakoizaki T	A framework to mitigate the risk of chemical leukoderma: consumer products.	Regulatory Toxicology and Pharmacology	131	105157 (9 pages)	2022

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 生化学部 客員研究員

(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 湯澤 由紀夫

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。