

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5年度 総括・分担研究報告書
(21KC2003)

研究代表者 秋山 卓美

令和6(2024)年5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)	11
最上 知子	
3. 安全性評価法（細胞系）の構築 (II)	14
伊藤 祥輔	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
---------------------	----

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 客員研究員

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において、DMSO濃度20%で水溶性の低いアピゲニンの反応が認められ、SHペプチド付加体として検出された。本条件により水溶性の低いフェノールのチロシナーゼ反応性が評価できると考えられる。オルトキノン代謝物への細胞感受性の増強をめざして一連の抗酸化遺伝子発現を制御する転写因子Nrf2をB16BL6細胞においてノックダウンし、白斑誘導性フェノール類5化合物の細胞毒性を増強することに成功した。チロシナーゼの基質とならない位置異性体での増強は認められず、細胞毒性の増強効果がオルトキノン体の産生に関連することが示唆された。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、4-置換フェノール類に広範囲に応用でき、感度、特異性ともに優れた方法と言える。

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

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、色素細胞の

直接傷害あるいは免疫応答を介して白斑発症をもたらす機序が提唱されている。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 含有ペプチドが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*-システアミルフェノール (4SCAP) のオルトキノンのグルタチオン・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、オルトキノンのグルタチオン・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*-システアミルフェノール (2SCAP) では検出されないことを示した。

本研究は、「代謝活性化」に着目し、代謝物解析あるいは細胞毒性の発現により検出する方法の構築を目的とする。

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に有機溶媒ジメチルスルホキシド (DMSO) の酵素活性への影響を検討し、また、定量分析を行うための手法を検討した。

また、昨年度はメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」を評価する手法を検討したが、毒性発現は白斑誘導性フェノール類の一部に限定された。そこで今年度は抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 をノックダウンし、オルトキノンの代謝物産生に対する細胞の感受性増強を試みた。

更に、PTS のチロシナーゼによる代謝活性化について、RES との比較検討を行った。最後に、チロシナーゼ依存性の代謝が明確でないヒドロキノン (HQ) について、同様に解析を行った。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

アピゲニン、SH ペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) 及びマッシュルームチロシナーゼを、濃度の異なる DMSO を含んだリン酸バッファー (pH6.5) 中で反応させ、生成物を LCMS で分析した。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

B16BL6 細胞の Nrf2 を特異的 siRNA のトランスフェクションによりノックダウンし、24 時間後に各種フェノール類を暴露し、24 および 48 時間の細胞生存率を ATP 含量の測定により決定した。ノックダウン効率は、mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [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 (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. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

水溶性が低く、DMSO 濃度が 5% (90 μ L 中 4.5 μ L) である条件では反応生成物が検出されないアピゲニンを最終濃度 20% の DMSO を含む反応液中で反応させたところ、DPRA(Cys) のピークが減少し、apigenin や DPRA(Cys) と異なるピークが検出された。マススペクトルではいずれにも m/z 510 のマスピークが観察された。アピゲニンの分子量は 270 であるから、(MW+749)/2 であり、プロトンが 2 個付加した 2 価陽イオンと考えられる。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

抗酸化転写因子 Nrf2 のノックダウンにより、オルトキノンの代謝物への細胞感受性の増強を試みた。B16BL6 細胞の Nrf2 mRNA レベルを 90%

低下させると、白斑誘導性フェノール類 4-S-システアミルフェノール (4SCAP)、モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) および p-クレゾール (CRE) による細胞生存率低下が顕著に増強された。ロドデノール (RD)、ラズベリーケトン (RK) については処理時間の 48 時間への延長により細胞毒性が劇的に増強された。一方、2SCAP および白斑誘導性 4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) の毒性増強は認められなかった。

3. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [伊藤]

PTS が RES と同様の代謝を受ける可能性について比較検討を行った。その結果、PTS はチロシナーゼ酸化によりオルトキノン体を形成し、N-アセチルシステインなどのチオール類と反応して付加体を形成した。また、ヒトチロシナーゼ発現細胞において、細胞内には PTS が RES よりも 8 倍多く取り込まれ、システインおよびグルタチオン付加体が 3 倍多く産生されることを確認した。加えて、B16BL6 細胞において、チロシナーゼ依存性の細胞毒性を示した。この結果は親油性基である PTS の二つのメチル基により膜透過性が向上して細胞内タンパクと結合しやすくなり、メラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性を示唆している。

D. 考察

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

昨年度までの調査と研究により、酸化を受けた被験物質のペプチドとの結合に関しては水と混和する溶媒であれば影響は与えないと考えられ、また、チロシナーゼの活性に与える影響については、DMSO 濃度 20% までは酵素活性に影響はなく、50% でもある程度の活性があることが判明した。

そこで、水溶性の低い 4 置換フェノールとしてアピゲニンを用いて検討した。その結果、結合ペプチドの生成が確認された。

20% DMSO の反応では m/z510 のマスピークを持つクロマトピークが 2 本観察された。

昨年度の研究により 50% DMSO ではチロシナ

ーゼの活性がやや小さくなることが確認されており、50% DMSO 中で生成物のピークが小さくなった理由と考えられた。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

白斑誘導性フェノール類の「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化」は細胞毒性をもたらすことが期待される。細胞のオルトキノン感受性を増大させるために、一連の抗酸化遺伝子発現を制御する転写因子 Nrf2 のノックダウンを B16BL6 細胞において試み、白斑誘導性フェノール類 5 化合物の細胞毒性を増強することに成功した。チロシナーゼの基質とならない位置異性体 2SCAP の増強は認められず、細胞毒性増強がオルトキノン体産生に関連することが示唆された。一方、4-TBP は代表的な白斑誘導性フェノールであり、ヒトチロシナーゼによるオルトキノン体への代謝を検出しているが、Nrf2 ノックダウンによる毒性増強は認められなかった。したがって、チロシナーゼによる代謝活性化の評価には代謝物解析が優れており、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる手法は、細胞毒性による評価より感度と特異性に優れることが判明した。

3. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [伊藤]

PTS の in vitro でのチロシナーゼによる代謝活性化について、ヒトチロシナーゼ強制発現 293 細胞を用いて、チオール付加体への代謝活性化を確認した。

さらに、HQ について、これまで明確でなかったチロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。

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。本法は細胞生存率を用いる細胞毒性評価法に比べ、感度および特異性において優れている。

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したところ、20% DMSO 存在下においてアピゲニンの結合ペプチドが生成することが確認できた。

次のような条件による試験を提案する。

0.3 mol/L substrate

0.5 mol/L DPRA (Cys)

167,000 U/L mushroom tyrosinase

in 50 mmol/L KPB pH6.5, 20% DMSO

25°C, 30 min

final 0.2% acetic acid

白斑誘導性フェノール類の「チロシナーゼによりオルトキノン体への代謝」を効率良く検出するために、B16BL6 細胞の抗酸化転写因子 Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝物への細胞感受性を増強することに成功した。

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、同様な4-置換フェノール構造を有し、RES のジメチル体である PTS についてチロシナーゼによる代謝活性化を調べた。その結果、RES 同様に PTS についてもメラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性が示唆された。

HQ は色素沈着症の治療に汎用されている化合物であるが、まれに色素過形成（外因性

ochronosis) を起こすことが知られている。しかし、その機序は明らかではない。今回、チロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。Ochronosis 機序解明につながることを期待したい。

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

1) 最上(西巻) 知子, 伊藤祥輔, 崔紅艶, 秋山卓美, 為廣紀正, 安達玲子, 柴田識人, 若松一雅, 五十嵐良明, 近藤一成. 白斑誘発性フェノール類のヒトチロシナーゼによる代謝活性化の評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20, 横浜)

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 客員研究員

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。

水溶性の低い被験物質にも適用したところ、20% DMSO 存在下においてアピゲニンの結合ペプチドが生成することが確認できた。この方法により、チロシナーゼによって酸化を受けて SH 基と結合する性質を持つ物質の評価ができることが示唆された。

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) 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、ジメチルスルホキシド (DMSO) 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っている。水溶性の低い物質として、先行研究で反応が見られなかったアピゲニン (Fig. 1) を用いて検討する。

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。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。アピゲニンはフナコシより購入した。

2. 反応条件

基質は DMSO に溶かして 6 mmol/溶液として用いた。

30 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5) に 47 μL の超純水又は超純水と DMSO 混液を加え、4.5 μL の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、6.8 μL 又は 13.6 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°C 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°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

ラジェント: 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.

(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; コリジョンガス, アルゴン. コリジョンガス流量, 0.10 L/hr.

C. 研究結果

・水溶性の低い物質の反応

Apigenin は水溶性が低く、DMSO 濃度が 5% (90 μL 中 4.5 μL) である条件では反応生成物が検出されない。

最終濃度 20% の DMSO を含む反応液中では DPRA(Cys) のピークが減少し、apigenin や DPRA(Cys) と異なるピークが保持時間 13 分及び 14 分に検出された (Fig. 2)。

これらやいずれも UV スペクトルでは DPRA(Cys) とアピゲニンのスペクトルの両方の特徴を持っていた (Fig. 3)。

マスペクトルではいずれにも m/z 510 のマスペークが観察された (Fig. 4)。アピゲニンの分子量は 270 であるから、 $(MW+749)/2$ であり、プロトンが 2 個付加した 2 価陽イオンと考えられる。

最終濃度 50% の DMSO を含む反応液中では保持時間 14 分のピークは小さく、DPRA(Cys) のピークが大きかった (Fig. 2)。

D. 考察

昨年度までの調査と研究により、酸化を受けた被験物質のペプチドとの結合に関しては水と混和する溶媒であれば影響は与えないと考えられ、また、チロシナーゼの活性に与える影響については、DMSO 濃度 20% までは酵素活性に影響はなく、

50%でもある程度の活性があることが判明した。

そこで、水溶性の低い4置換フェノールとしてアピゲニンを用いて検討した。その結果、結合ペプチドの生成が確認された。

20% DMSO の反応では m/z 510 のマスピークを持つクロマトピークが2本観察された。

昨年度の研究により 50% DMSO ではチロシナーゼの活性がやや小さくなることが確認されており、50% DMSO 中で生成物のピークが小さくなった理由と考えられた。

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したところ、20% DMSO 存在下においてアピゲニンの結合ペプチドが生成することが確認できた。

次のような条件による試験を提案する。

0.3 mol/L substrate

0.5 mol/L DPRA (Cys)

167,000 U/L mushroom tyrosinase

in 50 mmol/L KPB pH6.5, 20% DMSO

25°C, 30 min

final 0.2% acetic acid

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

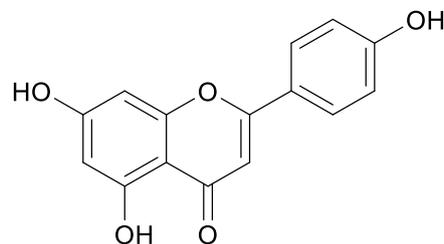


Fig. 1. Apigenin.

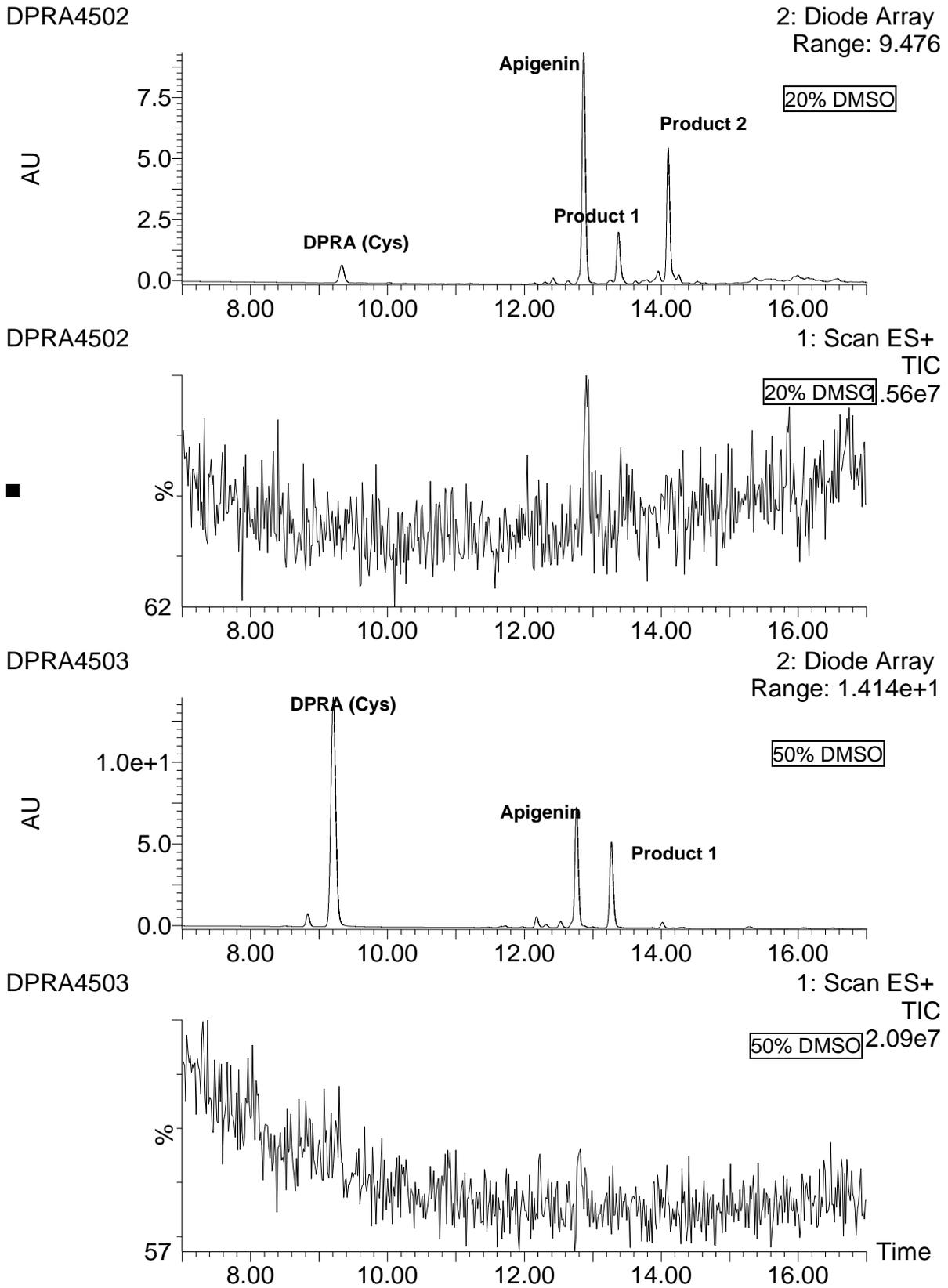


Fig. 2. Apigenin reactions in 20% or 50% DMSO.

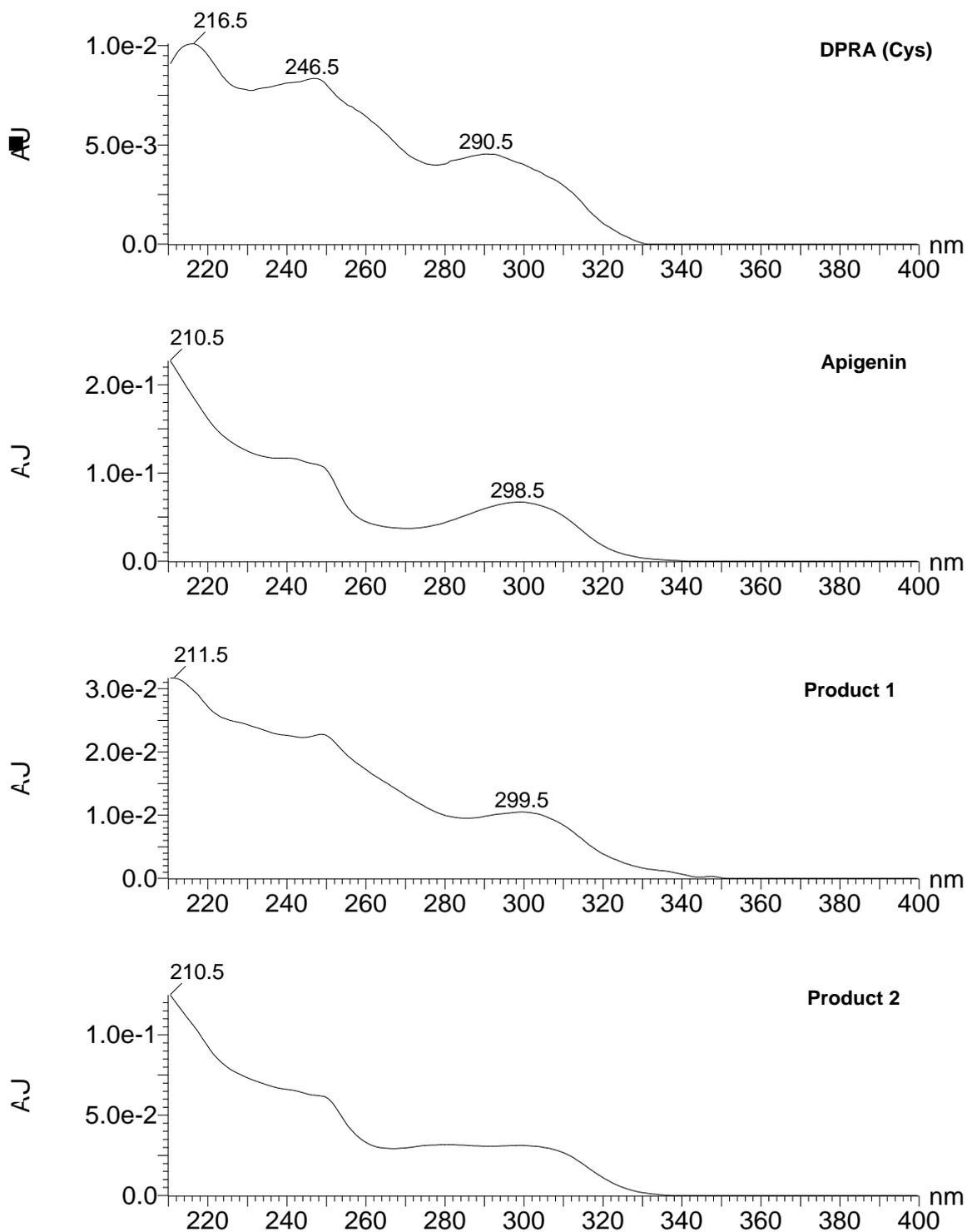


Fig. 3. UV spectra of peaks in the chromatogram of the reaction in 20% DMSO.

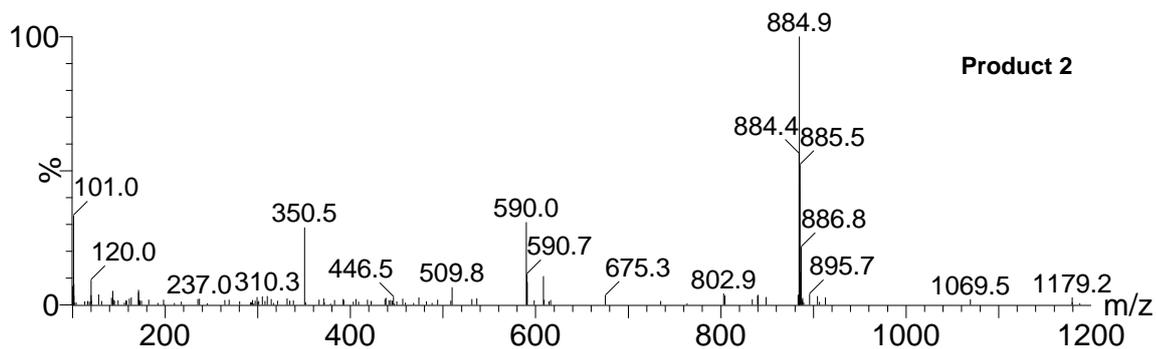
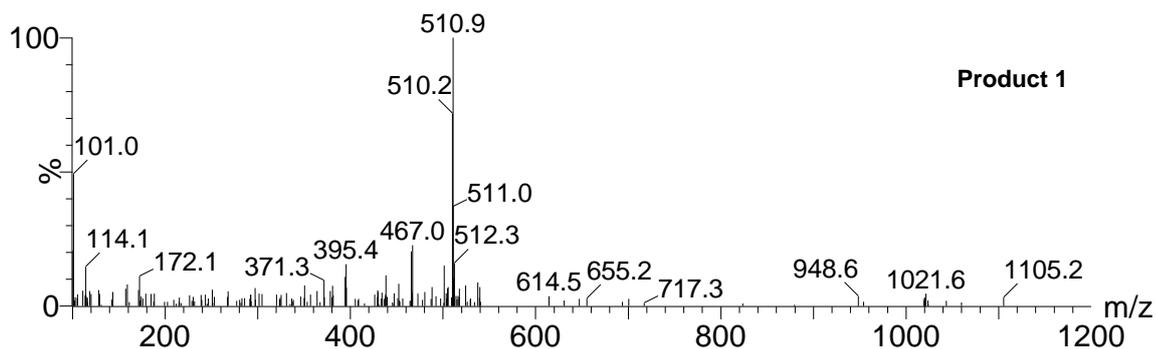
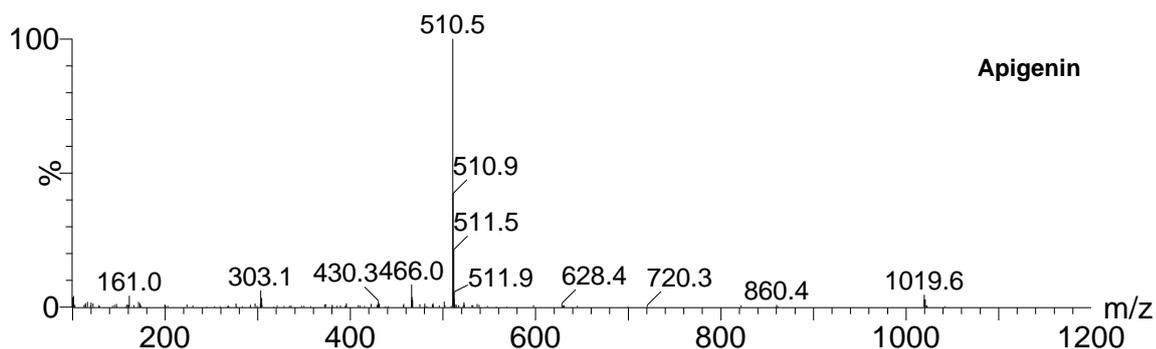
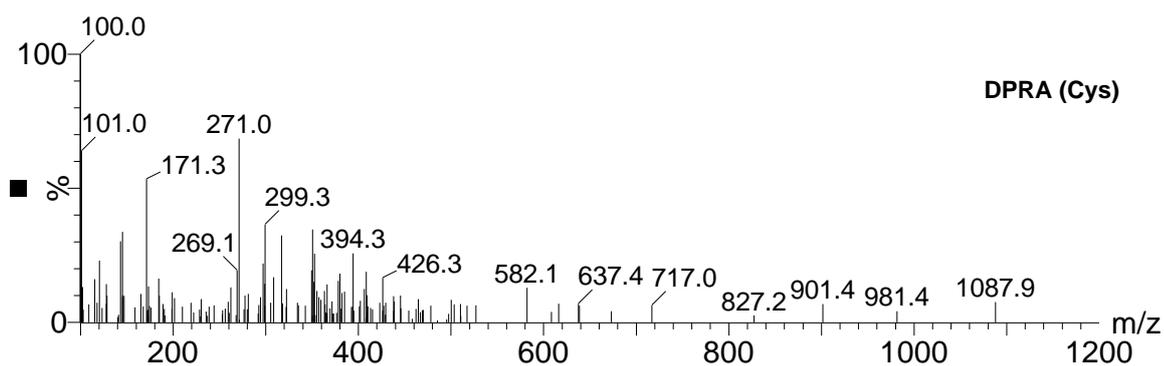


Fig. 4. Mass spectra of peaks in the chromatogram of the reaction in 20% DMSO.

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-置換フェノール類は色素細胞内でチロシナーゼにより「オルトキノン体への代謝活性化」を受け、白斑発症をもたらす機序が提唱されている。本研究はこの「代謝活性化」に着目し、代謝物解析あるいは細胞毒性の発現を検出する方法の構築を目的とする。「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」の出現は白斑誘導性フェノール類の一部に限定されたことから、今年度はオルトキノン代謝物への細胞感受性の増強をめざして一連の抗酸化遺伝子発現を制御する転写因子 Nrf2 を B16BL6 細胞においてノックダウンし、白斑誘導性フェノール類 5 化合物の細胞毒性を増強することに成功した。チロシナーゼの基質とならない位置異性体での増強は認められず、細胞毒性の増強効果がオルトキノン体の産生に関連することが示唆された。一方、毒性増強効果の認められない化合物も存在しており、白斑誘導性フェノール化合物のチロシナーゼによる代謝活性化の評価には代謝物解析が優れることが判明した。

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連し、再発防止のため医薬部外品成分等化合物の白斑誘導能の評価が必要とされている。RD およびその類似構造(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への代謝を受ける。オルトキノン体は SH 基との反応性が高く、細胞内 SH プールの枯渇やタンパク修飾を介して色素細胞を傷害し、あるいは免疫応答を介して白斑発症をもたらす機序が提唱されている。本研究では決定的過程である「チロシナーゼによる代謝活性化」に着目し、その評価法を構築することを目的とする。

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する手法を確立した。本法により、白斑誘導性の

RD、4-S-システアミニルフェノール(4SCAP)、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) の 7 化合物について、オルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体が濃度依存的に産生され、細胞・培地より検出されることを示した。一方、白斑発症報告の無いルシノール(RUC)および 4SCAP の構造異性体 2SCAP では検出されない。

オルトキノン体は毒性が高く、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化は細胞生存率の低下をもたらすことが予想される。昨年度はメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」を評価する手法を検討したが、毒性発現は白斑誘導性フェノール類の一部に限定された。そこで今年度は抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝

物産生に対する細胞の感受性増強を試みた。

B. 研究方法

B16BL6 細胞に Nrf2 の特異的 siRNA をトランスフェクションしてノックダウンした。24 時間後に各種フェノール類を暴露し、24 および 48 時間後の細胞生存率を ATP 含量の測定により決定した。Nrf2 のノックダウン効率は、mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

C. 研究結果

1. B16BL6 細胞の白斑誘導性フェノール類に対する感受性の Nrf2 ノックダウンによる増強

白斑誘導性フェノール化合物代謝物に対する B16BL6 細胞の感受性増強を目的に、抗酸化因子 Nrf2 のノックダウンを試みた。Nrf2 の特異的 siRNA をトランスフェクションすると、24 時間後の Nrf2 mRNA レベルはコントロール siRNA 処理細胞の $9.2 \pm 0.4\%$ に低下した。

細胞に 4SCAP を暴露すると、24 時間後の細胞生存率は濃度依存的に低下し、Nrf2 ノックダウンによりさらに顕著に低下した。一方、4SCAP の位置異性体 2SCAP を 24 時間、48 時間処理した場合には生存率は全く低下せず、Nrf2 ノックダウンの影響も認められなかった。

MBEH を暴露すると、24 時間後の細胞生存率の低下は Nrf2 ノックダウンにより増強された。Nrf2 ノックダウンによる低下は 48 時間後にはさらに拡大した。CRE の場合には、Nrf2 ノックダウンによる生存率低下は 24 時間で顕著に認められた。

RD ならびに RK 処理の場合には、24 時間後の細胞生存率に Nrf2 ノックダウンは有意な影響を与えなかった。処理を 48 時間に延長すると、Nrf2 ノックダウンにより顕著に低下した。

一方、TBP については、24 時間、48 時間処理において Nrf2 ノックダウンの影響は認められなかった。

[令和 4 年度分担報告書の訂正

p.14 C.2 14～16 行目を以下に変更：

(100 μ M) の共存は、RK (0.3～1.0 mM)、MB (0.01～0.3 mM) の 24 時間処理による細胞生存率低下に影響を]

[p.14 C.2 18～20 行目を以下に変更：

ES936 (500 μ M) は RD (0.1～0.6 mM)、RK (0.1～0.6 mM) による細胞生存率低下を増強しなかった。]

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オルトキノン体への代謝活性化」は、白斑発症に決定的な段階と考えられている。昨年度はメラノーマ B16BL6 細胞を用い、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」が代謝活性化の評価指標となり得るか検討を行ったが、毒性の検出は白斑誘導性フェノール類の一部に限定された。そこで今年度は、B16BL6 細胞の Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝物に対する細胞感受性の増強を図った。転写因子 Nrf2 は細胞の抗酸化作用に関わる一連の遺伝子転写を制御し、酸化ストレスの防御に機能する。実際、Nrf2 がメラノサイトでの MBEH の毒性を防ぐ役割が報告されている。

B16BL6 細胞の Nrf2 を siRNA 処理によりノックダウンすることにより、白斑誘導性フェノール類 5 化合物の細胞毒性が顕著に増強されることが判明した。一方、チロシナーゼの基質とならずオルトキノン体に代謝されない 2SCAP では影響が無く、毒性増強がオルトキノン体産生に関連することが示唆された。4SCAP、MB、CRE の増強は速やかであり、RD、RK の毒性も処理時間の延長により劇的に増強され、チロシナーゼ依存の細胞毒性評価が困難であった化合物の評価に有用と期待される。しかしながら TBP については Nrf2 ノックダウンによる毒性増強は認められなかった。TBP は代表的な白斑誘導性フェノールであり、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた代謝物解析ではオルトキノン代謝が検出されている。したがって、チロシナーゼによ

る代謝活性化の評価には代謝物解析が優れており、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる手法は、細胞毒性による評価より感度と特異性に優れることが判明した。

E. 結論

白斑誘導性フェノール類の「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝」を効率良く検出するために、B16BL6 細胞の抗酸化転写因子 Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝物による細胞毒性を増強することに成功した。

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

1) 最上(西巻) 知子, 伊藤祥輔, 崔紅艶, 秋山卓美, 為廣紀正, 安達玲子, 柴田識人, 若松一雅, 五十嵐良明, 近藤一成. 白斑誘発性フェノール類のヒトチロシナーゼによる代謝活性化の評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20, 横浜)

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、4-置換フェノール類に広範囲に応用でき、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、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-システアミニルフェノール(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-システアミニ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。

さらに、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、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およびエクオールについても解析を行い、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確認した。

レスベラトロール(RES)のジメチル誘導体であるプテロスチルベン(PTS)が、RES 同様にサプリメントとして注目を集めている。令和5年度は、PTS のチロシナーゼによる代謝活性化について、RES との比較検討を行った。

最後に、チロシナーゼ依存性の代謝が明確でないヒドロキノン(HQ)について、同様に解析を行った。

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(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. PTS のチロシナーゼによる代謝

以前、我々は RES がチロシナーゼの基質となり、メラノサイトに対して高い細胞毒性を持つオルトキノン代謝物を生成することを報告した。今回、我々は PTS が RES と同様の代謝を受ける可能性について比較検討を行った。その結果、PTS はチロシナーゼ酸化によりオルトキノン体を形成し、*N*-アセチルシステインなどのチオール類と反応して付加体を形成した。また、ヒトチロシナーゼ発現細胞において、細胞内には PTS が RES よりも 8 倍多く取り込まれ、システインおよびグルタチオン付加体が 3 倍多く産生されることを確認した。加えて、B16BL6 細胞において、チロシナーゼ依存性の細胞毒性を示した。この結果は親油性基である PTS の二つのメチル基により膜透過性が向上して細胞内タンパクと結合しやすくなり、メラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性を示唆している。

2. HQ のチロシナーゼによる代謝

HQ に触媒量の L-ドーパの存在下、マッシュルームチロシナーゼを作用すると、ヒドロキシベンゾキノン (HHQ) の生成が認められた。すなわち、HQ はチロシナーゼの基質となり、カテコール体を生成した。一方、ヒトチロシナーゼを用いた場合、HHQ は生成しないことから、HQ はヒトチロシナーゼの直接の基質にはならないが、天然基質であるドーパの存在下、そのキノン体であるドーパキノンとの酸化還元反応により *p*-ベンゾキノンへと酸化されることを明らかにした。この系にシステインが存在すると、*p*-ベンゾキノン はシステインと結合し、システイニル-HQ を生成した(投稿準備中)。

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。本法は細胞生存率を用いる細胞毒性評価法に比べ、感度および特異性において優れている。

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。

昨年度は、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 EQ ならびに RES 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。

令和 5 年度は、PTS の *in vitro* でのチロシナーゼによる代謝活性化について、ヒトチロシナーゼ強制発現 293 細胞を用いて、チオール付加体への代謝活性化を確認した。

さらに、HQ について、これまで明確でなかったチロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。

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、同様な4-置換フェノール構造を有し、RESのジメチル体であるPTSについてチロシナーゼによる代謝活性化を調べた。その結果、RES同様にPTSについてもメラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性が示唆された。

HQは色素沈着症の治療に汎用されている化合物であるが、まれに色素過形成(外因性ochronosis)を起こすことが知られている。しかし、その機序は明らかではない。今回、チロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。Ochronosis機序解明につながることを期待したい。

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

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

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
なし					

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 本間 正充

次の職員の令和5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 ・ 客員研究員

(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 本間 正充

次の職員の令和5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。

2024年 3月 25日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

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5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製作研究事業
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) 医療科学部・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。