

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

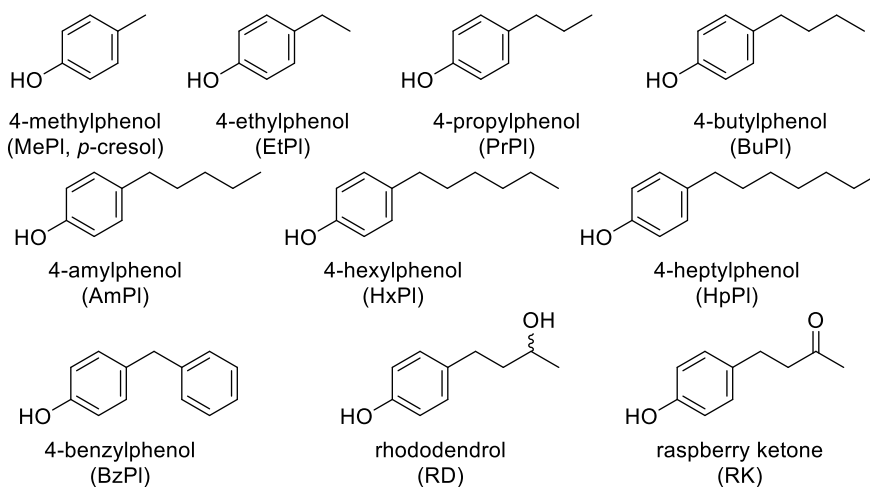
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし

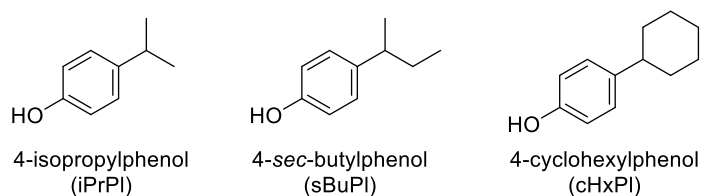
G. 研究発表

1. 論文発表

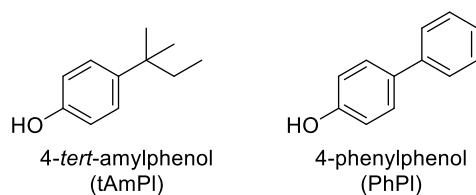
Phenols substituted with methyl group or a primary alkyl group at position 4



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

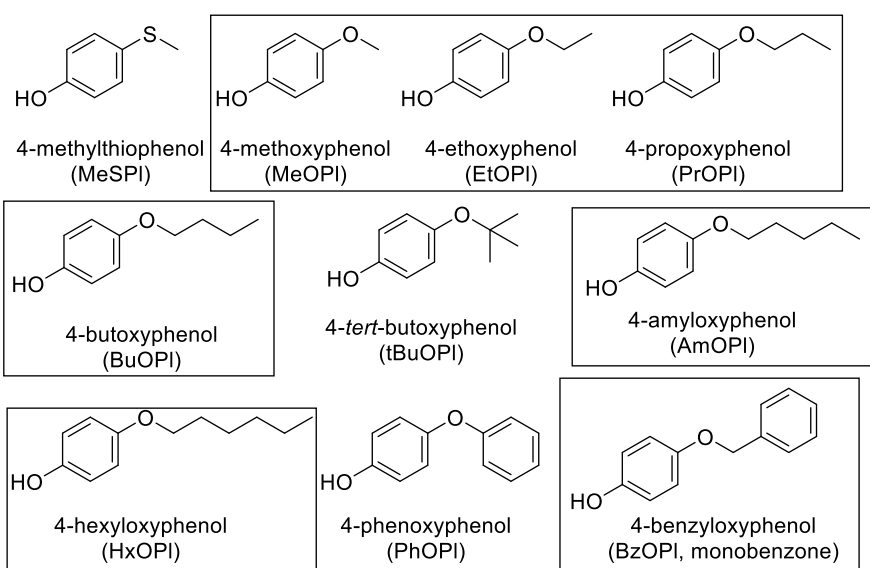


Fig. 1. Structures of 4-substituted phenols.

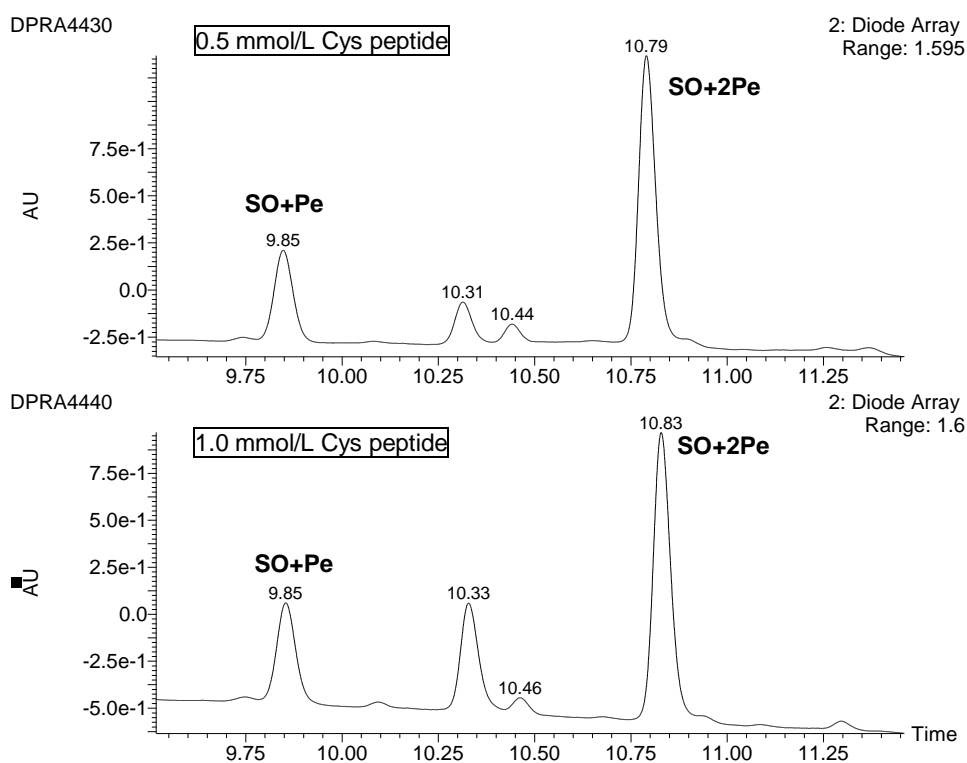


Fig. 2. Reaction with MeOPI as a substrate.

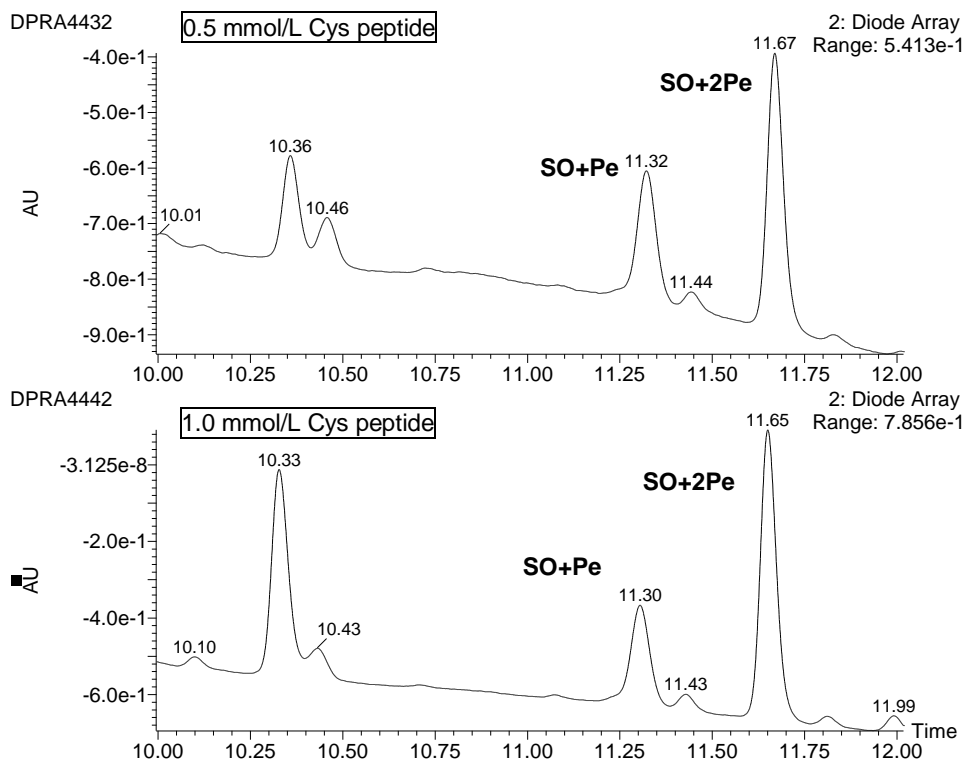


Fig. 3. Reaction with EtOPI as a substrate.

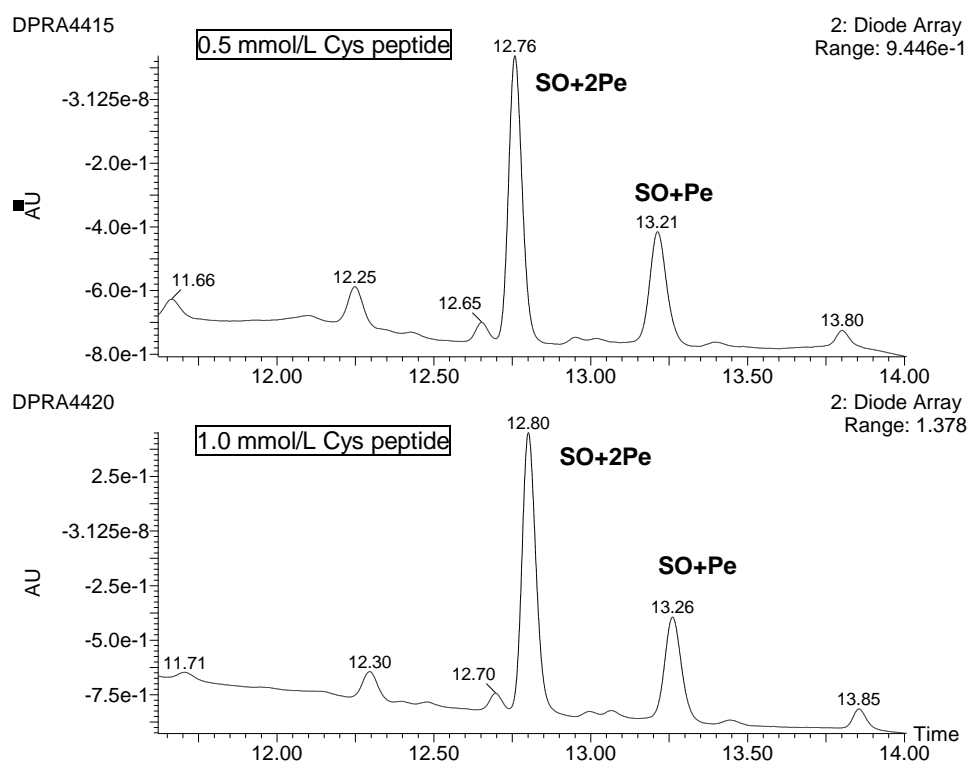


Fig. 4. Reaction with PrOPI as a substrate.

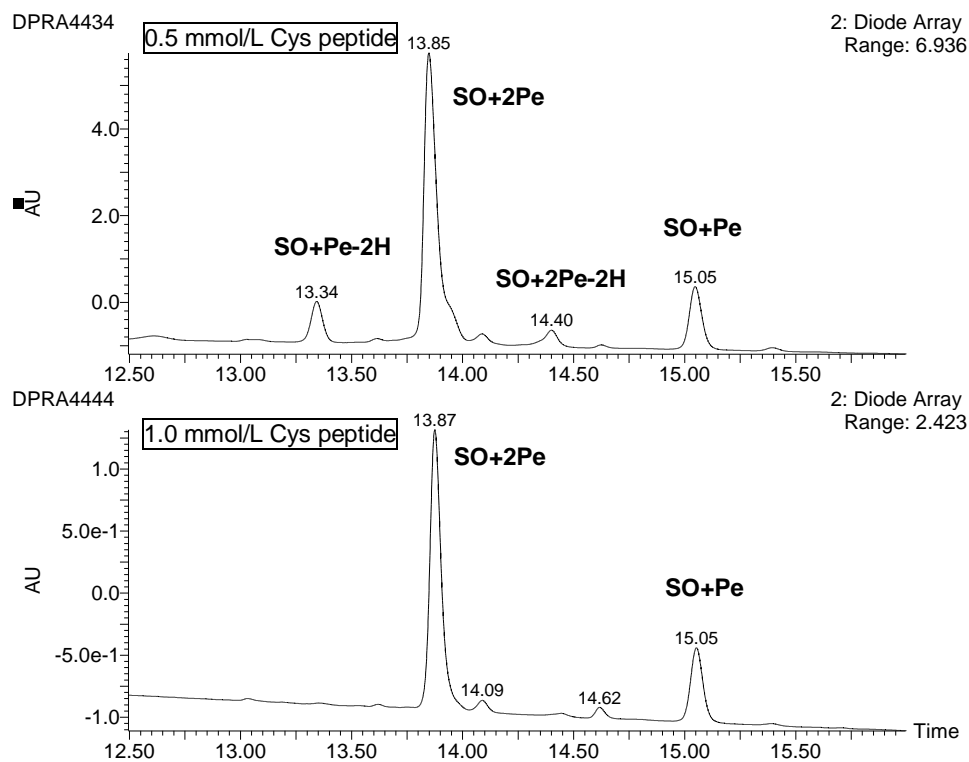


Fig. 5. Reaction with BuOPI as a substrate.

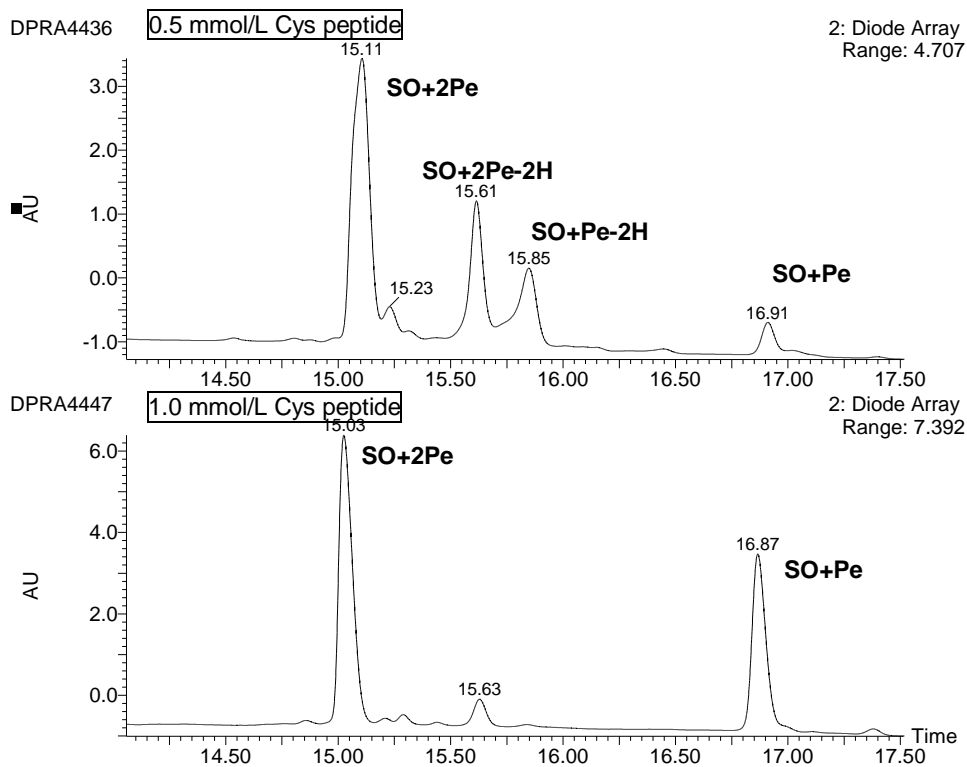


Fig. 6. Reaction with AmOPI as a substrate.

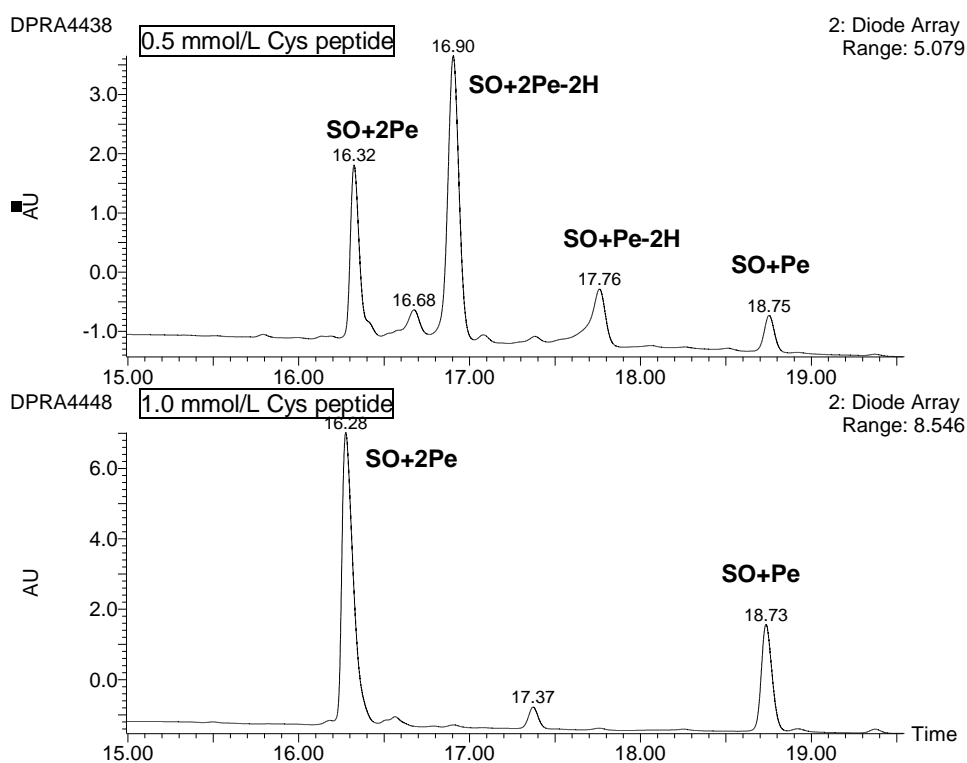


Fig. 7. Reaction with HxOPI as a substrate.

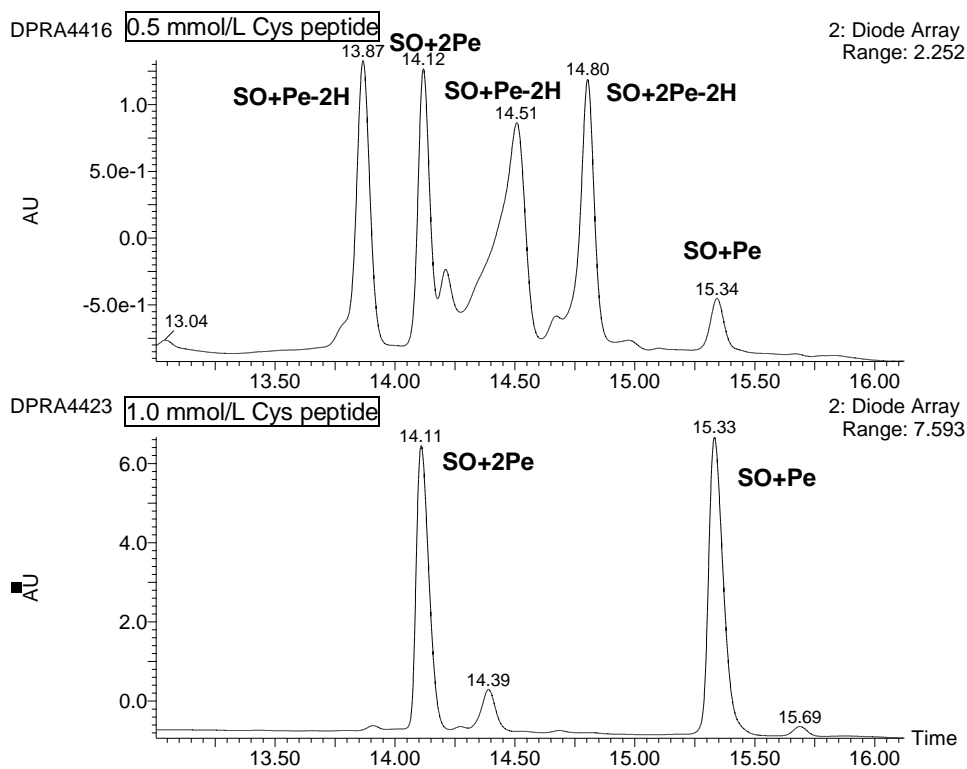


Fig. 8. Reaction with BzOPI as a substrate.

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