

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