

## 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

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

### 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

トキノンと 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