

## 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  $\mu\text{L}$  の 50 mmol/L KPB (pH6.5) に 47  $\mu\text{L}$  の超純水又は超純水と DMSO 混液を加え、4.5  $\mu\text{L}$  の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、6.8  $\mu\text{L}$  又は 13.6  $\mu\text{L}$  の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。1.5  $\mu\text{L}$  の  $1.0 \times 10^4$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$ ; 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  $\mu\text{L}$  中 4.5  $\mu\text{L}$ ) 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

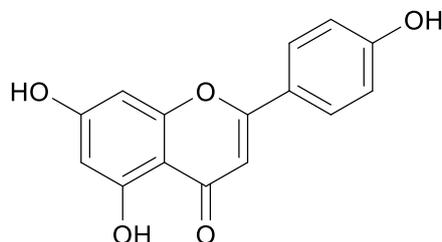


Fig. 1. Apigenin.

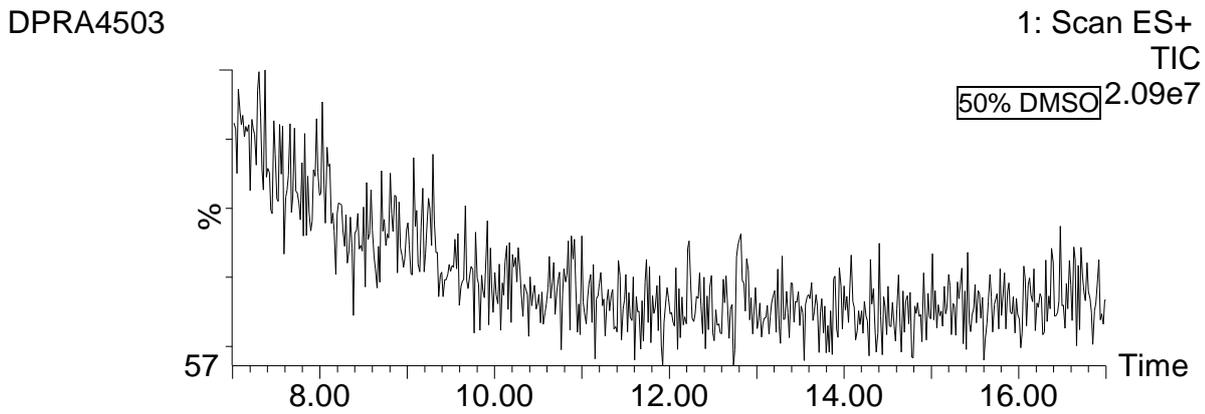
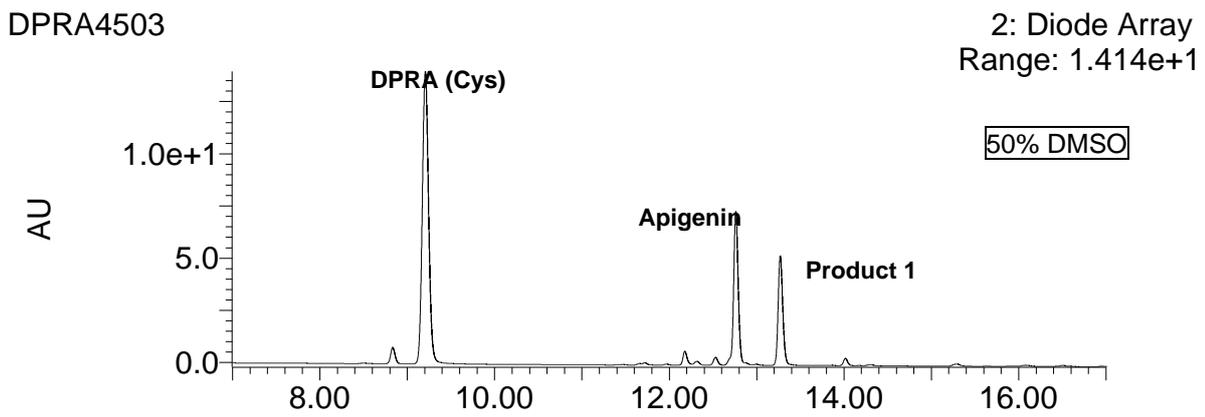
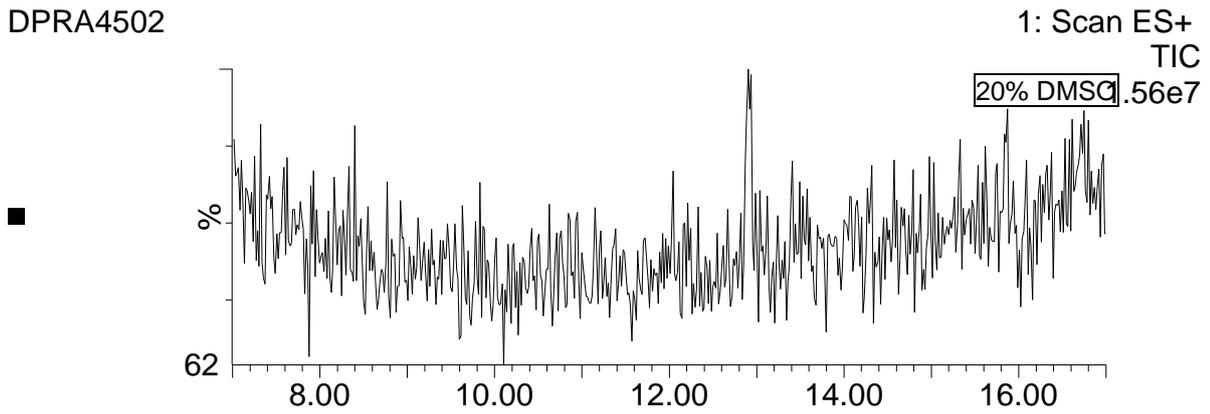
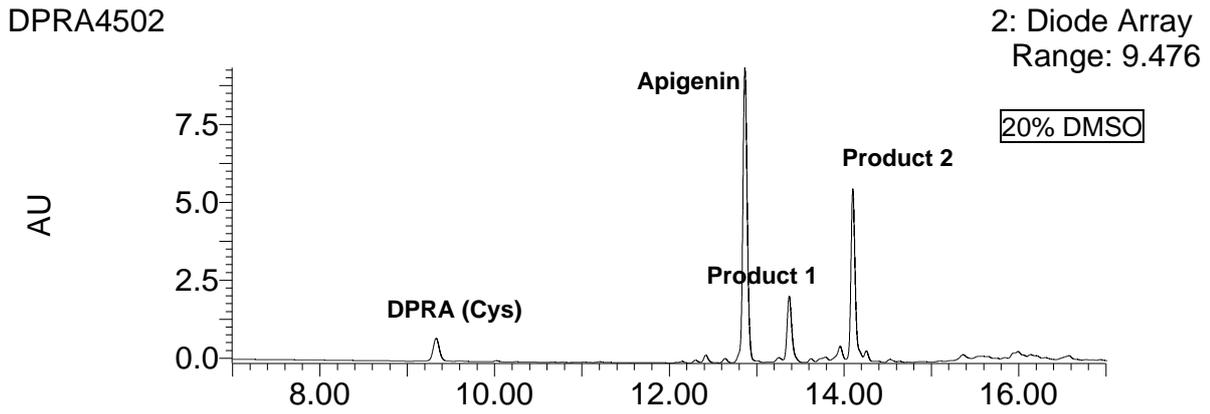
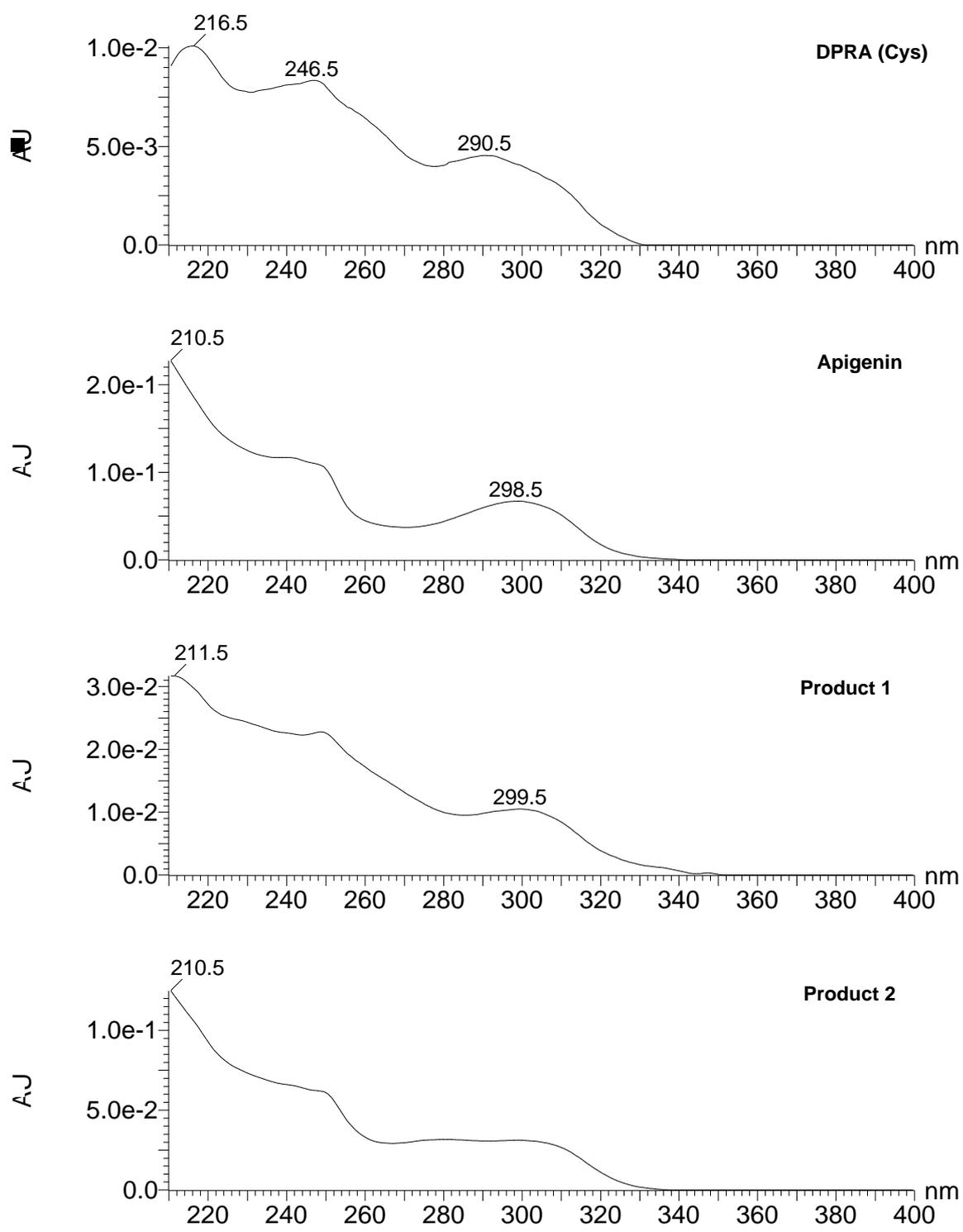
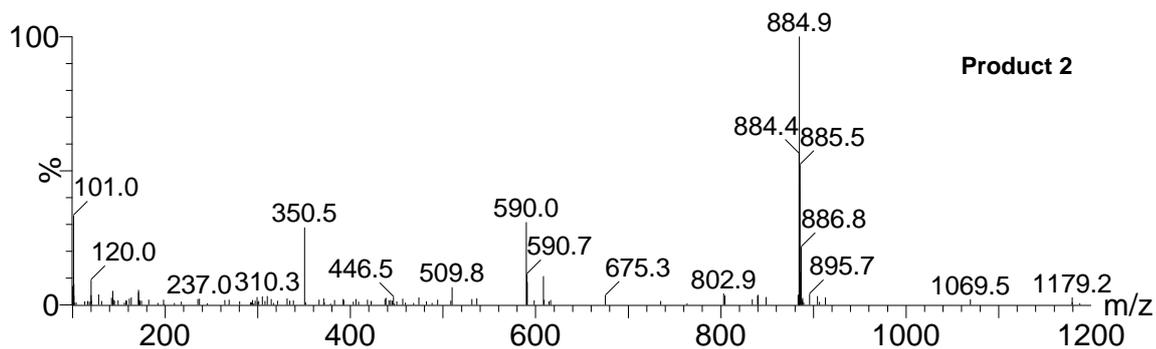
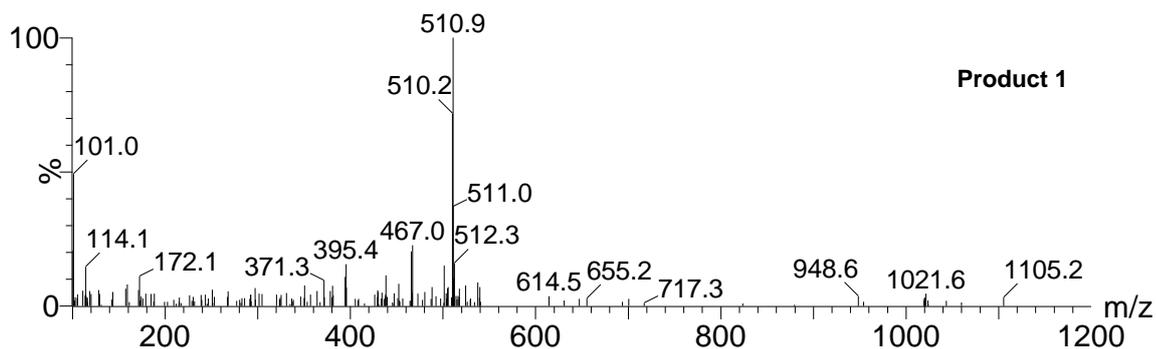
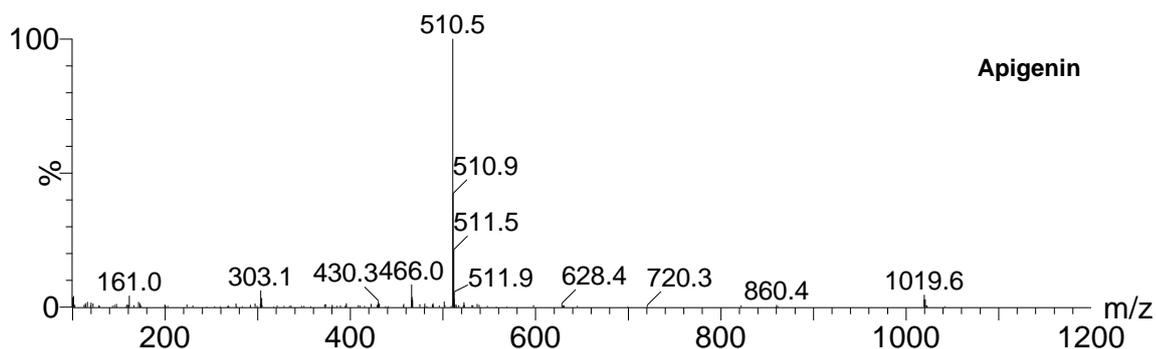
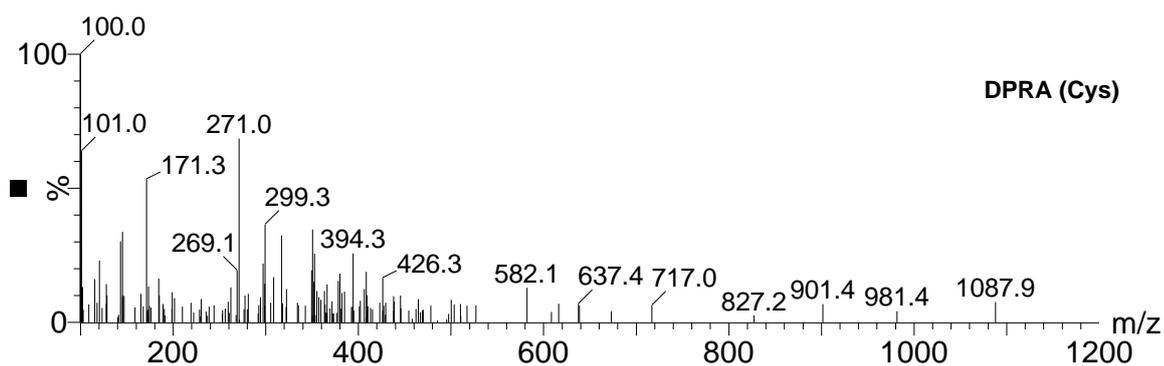


Fig. 2. Apigenin reactions in 20% or 50% DMSO.



**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.