

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 (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「チロシナーゼによる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により検出する方法を構築することを目的とする。

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。本条件で水溶性の低い 4 置換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た。

フェノール類の「代謝活性化」の検出法として、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いてオルトキノン代謝物のチオール付加体を分析する「代謝物解析法」を確立し、その有用性を示した (R3 年度)。代謝活性化を「チロシナーゼ依存性の細胞毒性の発現」により検出する方法として、メラノーマ B16BL6 細胞のチロシナーゼを siRNA ノックダウンし検討した (R4 年度)。また抗酸化転写因子 Nrf2 をノックダウンし細胞感受性を増強することに成功した (R5 年度)。しかしながら、代謝物解析においてオルトキノン体を検出した白斑誘導性フェノール類の全てに細胞毒性は検出されなかった。したがって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。

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、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。4-置換フェノールを2時間暴露すると、オルトキノン代謝物のグルタチオンおよびシステイン付加体の濃度依存的な産生が培地および細胞で確認された。一方、4-置換フェノール構造を持たない物質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。エクオール(EQ)、レスベラトロール (RES) およびそのジメチル誘導体であるプテロスチルベン(PTS)について検討し、いずれもオルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の濃度依存的な産生を確認した。ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用い、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する方法は、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。ヒドロキノン(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、ヒドロキシベンズキノン(HHQ)の生成が認められた。

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
生化学部客員研究員

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、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。

前期研究において、25 種類の 4-置換フェノールについて 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、4 位の置換基の構造により反応性及び生成物の構造に明らかな違いが見られた。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、生成物が単純化された。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いた代謝物解析において、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体が、白斑誘導性モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) および 4-tert ブチルフェノール (4-TBP)、ラズベリーケトン (RK)、および 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) など 4-置換フェノール/カテコール類で顕著に産生されるのに対し、2-置換の 2-S-システアミニルフェノール (2SCAP) では認められないことを示した。エクオール (EQ) はチロシナーゼの

良好な基質となり、オルトキノン体を生成し、SH 化合物と反応して、一付加体、二付加体を形成した。EQ オリゴマーは GSH を GSSG に酸化し、またプロオキダント活性をもつことが示された。293T 細胞においても EQ はオルトキノン体を経て、グルタチオン・システイン二付加体を形成した。また、白斑形成能を持つ RK の活性代謝物である DBL-カテコールの代謝を調べ、Diels-Alder 型反応による二量体、三量体の生成を証明した。

本研究ではさらに発展させ、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。

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、これまでの反応液組成では困難だった水溶性の低い被験物質に適用できる方法を検討する。

白斑誘導性 4-置換フェノール類 (メラニン前駆体チロシン類似のフェノール類) はチロシナーゼによりオルトキノン体へと代謝され、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 (図 1)。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により検出する方法の構築を目的とする。

「代謝活性化」の代謝物解析による検出については、R3 年度までにヒトチロシナーゼ高発現を用いた代謝物解析系を構築し、有用性を検討する。メラノーマ B16BL6 細胞の「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」を代謝活性化の指標とできるか検討を行い (R4 年度)、さらに抗酸化転写因子 Nrf2 のノックダウンによりオルトキノン代謝物への細胞感受性の増強を試みる (R5 年度)。

さらに、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

ぜ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 (Ito et al., *Pigment Cell Melanoma Res.*, 28, 295-306, 2015; Ito et al., *J. Dermatol. Res.* 80, 18-24, 2015)。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 電気化学検出法を用いて測定する手法について条件を確立した。

本研究では、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) についても適用できるかどうか調べた。

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エクオール (EQ; Tanaka et al., 2021), レスベラトロール (RES) およびそのジメチル体であるプテロスチルベン (PTS) についても解析を行った。

最後に、色素沈着症の治療に汎用されているヒドロキノン (HQ) について、同様な代謝解析を行った。HQ はチロシナーゼ依存性の代謝が十分に解明されていないフェノール体である。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[秋山]

30 μ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5) に 47 μ L の超純水又は超純水と DMSO 混液を加え、4.5 μ L の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、6.8 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、LC-MS で分析した。

2. 安全性評価法 (細胞系: 代謝物解析) 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 時間後に各種フェノール類 (図 2) の処理を開始し、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。

3. 安全性評価法 (細胞系: 毒性評価) の構築 [最上]

[最上]

B16BL6 細胞のチロシナーゼあるいは Nrf2 を特異的 siRNA 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 (図 2) 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。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. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[秋山]

文献調査により DPRA ペプチドと被験物質の結合は有機溶媒を含有する水溶液中でも進行することがわかった。DMSO を 20% や 50% 含有する水溶液中でチロシナーゼの活性を検討したところ、ロドデノールなどで反応が進行することが判明した。そこで水溶性の低い物質であるアピゲニンについて検討した。すると、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) と異なるピークが検出され、これらは

そのマススペクトルにも m/z 510 のマスピークが観察されたことからプロトンが 2 個付加した 2 価陽イオンと考えられた。

2. 安全性評価法（細胞系：代謝物解析）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、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) を検討に追加した。これまでの研究成果と統合し、白斑誘導の知られる 7 種のフェノール/カテコール誘導體 (RD, ラズベリーケトン (RK)、4S-システアミニルフェノール (4SCAP)、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 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ることが判明した。一方、RUC や 2-S-システアミニルフェノール (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の低下をもたらすことが判明した (R3 年度)。

3. 安全性評価法（細胞系：代謝物解析）の汎用性 [伊藤] [最上]

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エクオール(EQ)、レスベラトロール (RES) およびそのジメチル誘導體であるプテロスチルベン(PTS)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。

4. 安全性評価法（細胞系：毒性評価）の構築 [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と想定されることから、メラノーマ細胞 B16BL6 のチロシナーゼを siRNA でノックダウンし、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」が評価指標となり得るか検討した。白斑誘導性フェノール類 7 化合物のうち、チロシナーゼ依存の細胞毒性が観察されたのは 5 化合物に限定された (R4 年度)。

そこで抗酸化転写因子 Nrf2 のノックダウンにより、オルトキノン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-システアミニルフェノール (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)の細胞毒性が増強された。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顕著に増強された。一方、2SCAP のみならず、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 (R5 年度)。

5. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築 (II) [伊藤]

(1) 白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ依存的代謝活性化の評価

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に高発現させた細胞に、RK, MBTH, TBC, TBP, CRE を 2時間暴露すると、オルトキノン代謝物のグルタチオンおよびシステイン付加体の濃度依存的な産生が培地および細胞で確認された。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 (Nishimaki-Mogami et al., 2022)。

(2) サプリメント EQ, RES および PTS のチロシナーゼ依存的代謝活性化の評価

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、サプリメントとして広範に使用されている EQ (Tanaka et al., 2021) 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濃度依存的な産生を確認した。

RES およびそのジメチル誘導体である PTS についてもチロシナーゼによる代謝活性化の比較検討を行った。その結果、RES および PTS はチロシナーゼ酸化によりオルトキノン体を形成し、種々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、PTS と RES は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2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 (Tanaka et al., 投稿準備中)。

(3) 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、システニル-HQ を生成した (Ito et al., 投稿準備中)。

D. 考察

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[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。

調査で情報が得られなかったチロシナーゼの活性に与える影響について、DMSO を用いて検討したところ、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、アピゲニンを用いた反応を検討し、20%DMSO 含有反応液において酸化で生じたオルトキノンと Cys ペプチドが結合した物質が検出され、本条件で水溶性の低い4置換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た。

2. 安全性評価法 (細胞系:代謝物解析) の構築 [伊藤] [最上]

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」は白斑発症に決定的な過程と考えられている。この「代謝活性化」を評価する方法として、ヒトチロシナーゼを高発現する細胞を調製して「代謝物解析」を行い、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体は、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 EQ、RES ならびに PTS からオルトキノン体のチオール付加体の産生を確認した。

3. 安全性評価法 (細胞系:毒性評価) の構築 [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。B16BL6細胞のチロシナーゼノックダウンによる「チロシナーゼ依存的な細胞毒性の発現」の検出は、白斑誘発性化合物中の一部に限定された。そこで細胞のオルトキノン体に対する感受性を増大するために、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、細胞毒性の増強がオルトキノン体の産生に関連することが示唆された。しかしながら、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、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる代謝物解析が優れることが判明した。

4. 安全性評価法の構築 [最上][伊藤][秋山]

RD や類似構造を有する 4-置換フェノール類に共通して認められ、白斑発症に決定的過程である「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化」を評価する方法として、本研究では、代謝物解析、ならびに細胞毒性による評価方法を検討した。代謝物解析法である「ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いてオルトキノン体のチオール付加体を分析する手法」では、白斑誘導性 7 化合物全てに代謝活性化が検出され、白斑報告の無い 2 化合物では検出されなかった(令和元-3 年厚生労働行政推進調査事業費補助金「医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究」による成果を含む)。オルトキノン体産生は細胞内グルタチオン低下を伴っていた。ヒトチロシナーゼ

可溶性領域(短縮型)を用いる *in vitro* での代謝物解析法においても、白斑誘導性化合物のオルトキノン体への代謝が確認されている(平成 29 年度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」分担研究報告書「安全性評価法(代謝物分析系の構築)」。一方、B16BL6 細胞での「チロシナーゼ依存的な細胞毒性の発現」は白斑誘発性化合物中の一部に限定された。以上の細胞毒性および代謝物解析による評価結果を図にまとめた(図 3)。この成果は論文発表を行っている(Nishimaki-Mogami et al., *J Dermatol Sci*, 108: 77-86, 2022)。白斑誘発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明らかになった。

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。

さらに、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について検討を行った。その結果、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。

次に、RESおよび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。

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。

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「チロシナーゼによる代謝活性化」は白斑発症の鍵と想定される。「代謝活性化」をヒトチロシナーゼ高発現細胞の代謝物解析により評価する方法を確立した。一方、B16BL6細胞でのチロシナーゼ依存的細胞毒性の発現を検出し、抗酸化転写因子Nrf2ノックダウンにより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が、検出感度と特異性において代謝物解析が優れることが判明した。

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を確立した。本評価法をサプリメントとして汎用されているEQ、RESおよびそのジメチル体であるPTSに適用し、メラノサイト特異的な細胞毒性を示す可能性が示唆された。さらに、HQのチロシナーゼ依存的な代謝を明らかにした。

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) 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.

3) 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.

4) Bjerke DL, Wu S, Wakamatsu K, Ito S, Wang, J, Laughlin T, Hakozaki T. A framework to mitigate the risk of chemical leukoderma: consumer products. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 131, 105157, 2022.

5) Nishimaki-Mogami T, Ito S, Cui H, Akiyama T, Tamehiro N, Adachi R, Wakama

tsu K, Ikarashi Y, Kondo K. A cell-based evaluation of human tyrosinase-mediated metabolic activation of leukoderma-inducing phenolic compounds. *Journal of Dermatological Science*. 108, 77-86, 2022.

6) Abe Y, Okamura K, Ito S, Hozumi Y, Suzuki T. Topical vitamin D3 analog significantly promotes repigmentation in rhododendrol-induced leukoderma mouse. *Journal of Dermatological Science*, 106, 127-129, 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 (2021.10.23, 仙台)
- 2) 伊藤祥輔, 最上知子, 田中ひとみ, 若松一雅. ハイドロキノンのチロシナーゼによる代謝: 外因性 Ochronosis (組織褐変症) の機序解明に向け

て. 第4回日本白斑学会学術大会 (2022.9.24, 山形)

- 3) 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, 若松一雅, 五十嵐良明, 近藤一成. 皮膚に白斑を誘発する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. 日本薬学会第143年会 (2023.3.27, 札幌)
- 4) 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

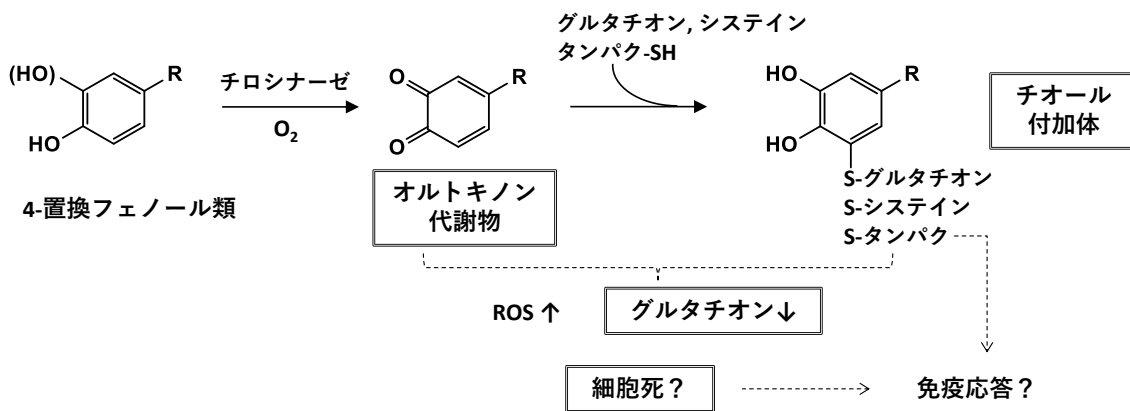


図1. 白斑誘発性フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化

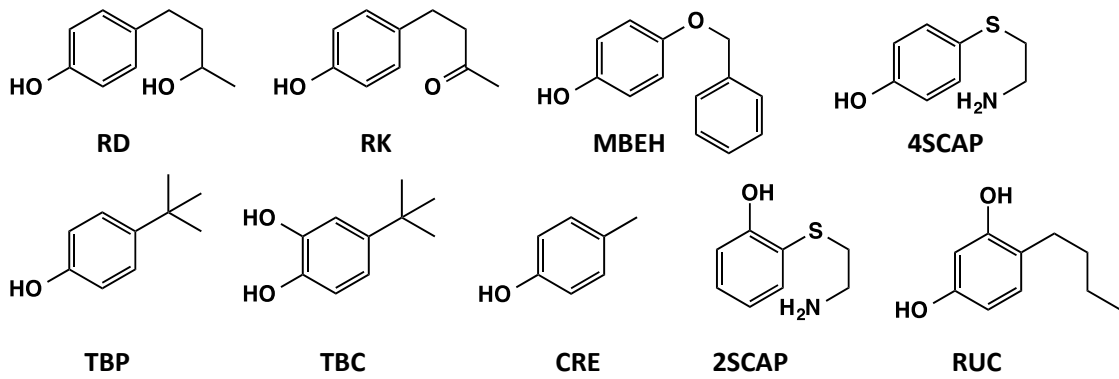


図2. 検討したフェノール化合物

RD, rhododendrol; RK, raspberry ketone; MBEH, monobenzyl ether of hydroquinone; 4SCAP, 4-S-cysteaminyphenol; TBP, 4-*tert*-butylphenol; TBC, 4-*tert*-butylcatechol; CRE, *p*-cresol; 2SCAP, 2-S-cysteaminyphenol; RUC, rucinol

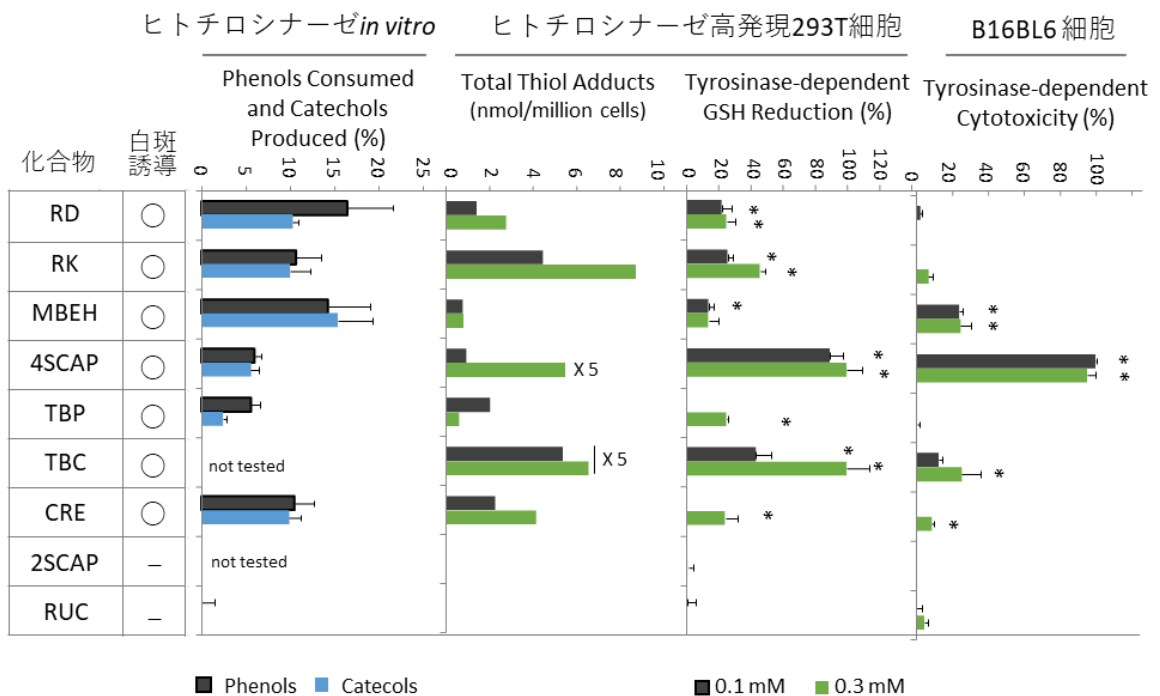


図3. 各種フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化の検出には、細胞および *in vitro* での代謝物解析が有効である

左よりヒトチロシナーゼ可溶性領域を用いた *in vitro* 解析 (0.1 mM 化合物を30分反応)、ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞 (0.1, 0.3 mM 化合物を2時間処理) でのオルトキノ-チオール付加体、細胞内グルタチオン低下、B16BL6細胞でのチロシナーゼ依存的細胞生存率低下 (0.1, 0.3 mM 化合物を24時間処理)

