

## 原 著

# 培養細胞試験を中心とした界面活性剤の 皮膚障害性試験

## I. 非イオン型界面活性剤

小 西 宏 明<sup>1)2)</sup> 井 上 佳 子<sup>1)</sup> 安 藤 寛 治<sup>1)</sup>  
小 林 正 久<sup>1)</sup> 徳 田 安 章<sup>3)</sup> 高 瀬 吉 雄<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> (株) ピアス研究所    <sup>2)</sup> 信州大学医学部皮膚科学教室  
<sup>3)</sup> 東京医大皮膚科学教室

## CYTO-TOXIC TEST OF SURFACTANTS ON CULTURED HUMAN EPITHELIAL CELLS: AN IN VITRO TEST METHOD FOR EVALUATING IRRITANCY OF SURFACTANTS I. NONIONIC SURFACTANTS

Hiroaki KONISHI<sup>1)2)</sup>, Yoshiko INOUE<sup>1)</sup>, Kanji ANDO<sup>1)</sup>,  
Masahisa KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Yasuaki TOKUDA<sup>3)</sup> and  
Yoshio TAKASE<sup>2)</sup>

- 1) Pias Cosmetic Laboratories
- 2) Department of Dermatology, Faculty of Medicine,  
Shinshu University
- 3) Department of Dermatology, Tokyo Medical Collage

Key words: 細胞障害性効果 (cyto-toxicity)  
非イオン型界面活性剤 (nonionic surfactants)  
ヒト細胞 (human cells)  
JTC-17

### I. 緒 言

化粧品, 洗浄料, 医薬品製剤等に広く用いられている界面活性剤のヒト皮膚への影響, とくに障害性の試験方法として, ヒト或いは実験動物に対する連続塗擦試験, パッチテスト, 浸漬試験などが一般に行なわれる<sup>1)2)</sup>。そしてこれら試験法が, それなりの必然性と有意性をもっていることは云う迄もない。一方実施に非常な労力と時間を必要とし, 一時に多数の試験をおこなうことに困難さがある。我々はこれらの試験法に代わる in vitro 試験として細胞培養法に着目し, ヒト健常皮膚由来培養細胞株に対する非イオン型界面活性剤の影響, とくに細胞障害性効果を試験した。家兎

皮膚連続塗擦試験も併せておこなった。非イオン型界面活性剤のヒト皮膚培養細胞株への障害性効果と, 家兎皮膚障害性効果が相関性のあることを見出した。このヒト皮膚培養細胞株を用いての試験が, 非イオン型界面活性剤の皮膚障害性効果を評価する in vitro のスクリーニングテストとして充分有用であるとの結論を得た。ここにその概要を報告する。

### II. 実験材料および方法

#### A. 実験材料

試験した41種の非イオン型界面活性剤を表1に示す。いずれも市販品そのままを用い, 特別な精製しなかった。

培養細胞試験を中心とした界面活性剤の皮膚障害性試験

表 1

試験した非イオン型界面活性剤

| 化 学 名                              | 商 品 名          | メーカー名 |
|------------------------------------|----------------|-------|
| 1) POE 高級脂肪酸エステル                   |                |       |
| POE ( 2 ) stearate                 | Nikkol MYS-2   | N     |
| POE ( 2 ) oleate                   | Nikkol MYO-2   | N     |
| POE ( 4 ) stearate                 | Nikkol MYS-4   | N     |
| POE ( 8 ) stearate                 | Myrj-45        | K     |
| POE (10) stearate                  | Nikkol MYS-10  | N     |
| POE (10) oleate                    | Nikkol MYO-10  | N     |
| POE (10) laurate                   | Nikkol MYL-10  | N     |
| POE (25) stearate                  | Nikkol MYS-25  | N     |
| POE (40) stearate                  | Myrj-52        | K     |
| POE (45) stearate                  | Nikkol MYS-45  | N     |
| POE (50) stearate                  | Myrj-53        | K     |
| POE (55) stearate                  | Nikkol MYS-55  | N     |
| 2) POE ソルビタン高級脂肪酸エステル              |                |       |
| POE ( 4 ) sorbitan mono stearate   | Tween 61       | K     |
| POE ( 4 ) sorbitan mono laurate    | Tween 21       | K     |
| POE ( 5 ) sorbitan mono oleate     | Tween 81       | K     |
| POE (20) sorbitan mono stearate    | Tween 60       | K     |
| POE (20) sorbitan mono tristearate | Tween 65       | K     |
| POE (20) sorbitan mono oleate      | Tween 80       | K     |
| POE (20) sorbitan trioleate        | Tween 85       | K     |
| POE (20) sorbitan mono palmitate   | Tween 40       | K     |
| POE (20) sorbitan mono laurate     | Tween 20       | K     |
| 3) POE ヒマシ油および水添ヒマシ油               |                |       |
| POE (20) castor oil                | Nikkol CO-20   | N     |
| POE (40) castor oil                | Nikkol CO-40   | N     |
| POE (60) castor oil                | Nikkol CO-60   | N     |
| POE (10) hydrogenated castor oil   | Nikkol HCO-10  | N     |
| POE (20) hydrogenated castor oil   | Nikkol HCO-20  | N     |
| POE (40) hydrogenated castor oil   | Nikkol HCO-40  | N     |
| POE (80) hydrogenated castor oil   | Nikkol HCO-80  | N     |
| POE (100) hydrogenated castor oil  | Nikkol HCO-100 | N     |
| 4) POE 高級アルコールエーテル                 |                |       |
| POE ( 2 ) cetyl ether              | Nikkol BC-2    | N     |
| POE ( 9 ) lauryl ether             | Nikkol BL-9    | N     |
| POE (10) oleyl ether               | Nikkol BO-10   | N     |
| POE (10) cetyl ether               | Nikkol BC-10   | N     |
| POE (20) oleyl ether               | Nikkol BO-20   | N     |
| POE (20) cetyl ether               | Nikkol BC-20   | N     |
| POE (21) lauryl ether              | Nikkol BL-21   | N     |
| POE (40) cetyl ether               | Nikkol BC-40   | N     |
| POE (50) oleyl ether               | Nikkol BO-50   | N     |
| 5) POE ノニルフェニルエーテル                 |                |       |
| POE ( 5 ) nonylphenylether         | Nikkol NP-5    | N     |
| POE (10) nonylphenylether          | Nikkol NP-10   | N     |
| POE (20) nonylphenylether          | Nikkol NP-20   | N     |

(略号) POE : polyoxyethylene    N : 日光ケミカルズ(株)    K : 花王アトラス(株)

## B. 方 法

### 1. ヒト健康皮膚由来培養細胞株に対する影響

細胞株は XX-male (JTC-17)<sup>3)</sup>を用いた。本細胞株は上皮性細胞の形態を示し、世代時間は約26時間である。

対数増殖期にある XX-male をトリブシン (Difco 1:300) 0.1% を加えた Eagle MEM 溶液にて単細胞浮遊液とし、1000rpm, 5分で遠沈。上澄液を捨て、残った細胞をトリブシンを含まない Eagle MEM 溶液 (仔牛血清20%添加) 中に再分散させ、Fuchs-Rosenthal 血球計算盤にて細胞数を計数する。次いで直径6cm シヤーレに30万細胞ずつ正確に分注し、Eagle MEM (仔牛血清20%添加) を加えて、空気95%と炭酸ガス5%の混合気流をセットした37°Cの炭酸ガス細胞培養器中で2日間準備培養する。

準備培養完了後、培養液を種々重量比濃度の界面活性剤を加えた Eagle MEM (仔牛血清20%添加) と交換し、さらに3日間培養を継続する。3日後この試験培養液を捨て、着生細胞をメタノールで5分間固定、ギムザ染色をおこない、シヤーレの底に着生していた生存細胞の数量および形態を対照と比較して、障害性影響の有無と程度を判定した。なお、界面活性剤を加えない培養液を用いて同様の操作をおこなったものを対照とした。

界面活性剤は水溶液として、120°C, 10分間高圧蒸気滅菌した。試験培養液はこの界面活性剤水溶液、2倍濃度に調製した培養液、および滅菌水を適宜混合して調製した。試験培養液の pH はすべて7.0~7.4の範囲であり、対照培養液のそれと殆んど差はない。

### 2. 家兔皮膚に対する連続塗擦の影響

14種の界面活性剤を検査した。USP snow white 白色ワセリンと界面活性剤とを重量比で6:4に混合したものを検査試料とした。体重2および4kgの雄2匹家兔の背中をハサミで刈毛し、試料を1日1回、連続8回塗擦し、塗擦部皮膚の巨視的および顕微鏡的検査をおこなった。顕微鏡検査は10%中性ホルマリン固定、アルコール脱水、キシロール透徹、パラフィン包埋、5~10 $\mu$  切片とし HE 染色にて観察した。なお対照として、無処理対照のほかに白色ワセリンのみ塗擦の対照を設けた。

## Ⅲ. 結 果

### A. 培養細胞に対する影響

次の基準に従って採点した。

スコア0: 着生細胞の量、形態ともに対照との差異が認められない

- 1: 着生細胞量は対照と殆んど差異はないが、検鏡により細胞の萎縮傾向および細胞間隔の広がりだけが僅かに認められる
- 2: 着生細胞量は対照と比較して、肉眼で見てもわかる程度に減少している
- 3: 着生細胞量は対照と比較して、大巾に減少している
- 4: 着生細胞量はごく僅かである
- 5: 着生細胞はまったく、又は殆んど認められない

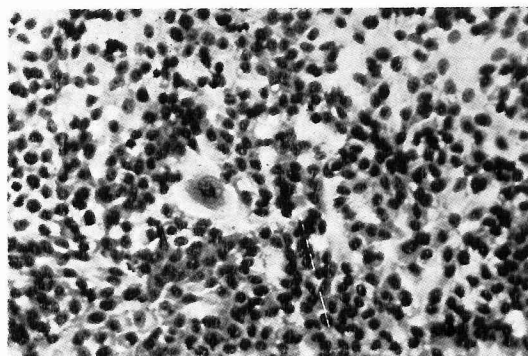
以上、着生細胞量を主体とし、相対的に比較して採点した。スコア2以上では、着生細胞量の減少と平行して、球形に萎縮し濃染される細胞の割合が増加していく。0から5の各スコアに相当する細胞の顕微鏡写真 (メタノール固定、ギムザ染色) を図1に示す。

この実験を通じて対照シヤーレは100枚を充分超えたが、スコア1に該当するものはなかった。従ってスコア1を含め、それ以上を界面活性剤による細胞の萎縮、さらに増殖抑制影響ありと評価した。

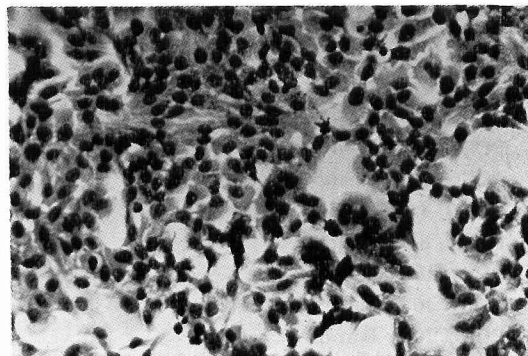
ポリオキシエチレン (以下 POE と略) 高級脂肪酸エステル型、POE ソルビタン高級脂肪酸エステル型、POE ヒマシ油および水添ヒマシ油型界面活性剤についての結果を表2に、POE 高級アルコールエーテル型、POE ノニルフェニルエーテル型界面活性剤についての結果を表3に示す。

表2に示す POE 高級脂肪酸エステル型界面活性剤の培養細胞への影響は、親水基であるエチレンオキシド (以下 EO と略) の平均付加モル数 (POE (2) のごとく、カッコ内に示す) の増大するほど明らかに減少する。スコア2程度の影響を細胞に与えるに必要な界面活性剤の濃度を POE ステアレートと比較すると、EO 8モルのもので約250PPMであるが、EO 40モルでは2倍の約500PPM、EO 50モルでは3倍の約750PPMとなっている。EO 付加モル数が増大するほど細胞への影響が減少するこの傾向は、POE 高級脂肪酸エステル型のみならず、今回試験したすべてのタイプの非イオン型界面活性剤に明瞭に認められた。

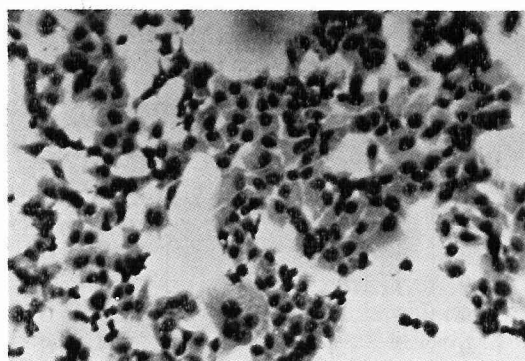
ただ培養液に不溶乃至は難溶である EO 付加モル数の小さい界面活性剤、即ち表2の POE (2) オレエートおよびステアレート、POE (4) ステアレート、表3の POE (2) セチルエーテル、POE (5) ノニル



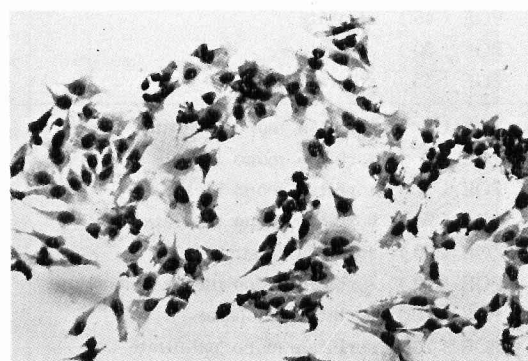
スコア 0



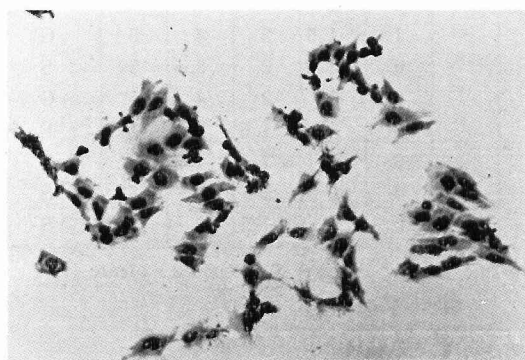
スコア 1



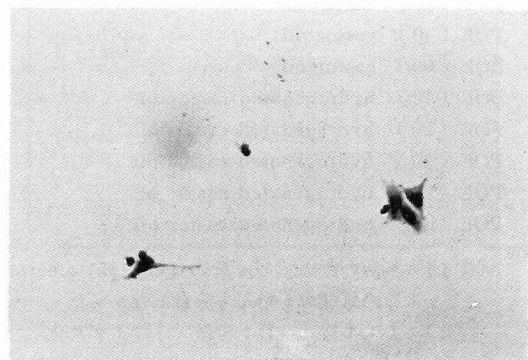
スコア 2



スコア 3



スコア 4



スコア 5

図 1

培養細胞に対する影響の判定基準  
×100, XX-male, ギムザ染色

エニルエーテルなどは、逆に付加モル数のやゝ大きく溶解性のより高い同型のものより細胞への影響は小さく出る。特に溶解も分散もしない POE (2) オレエー  
トおよびステアレートは表2の注のごとく、そのままでは実験が不能であった。よってこの2品、および

POE (2) セチルエーテル (表3) について各作用濃度の  $\frac{1}{20}$  量の POE (55) ステアレートを添加して溶解性をより高めた状態で試験したところ、多少の障害性影響の増強がみられた。尚 POE (55) ステアレートの添加濃度は、すべて本品単独では全く影響の出ない

表 2

エステル型界面活性剤の培養細胞に対する細胞障害性効果

| 界 面 活 性 剤                         | 作 用 濃 度 (PPM) |     |     |     |      |      |      | (注2)<br>水に対する<br>溶解性 |
|-----------------------------------|---------------|-----|-----|-----|------|------|------|----------------------|
|                                   | 100           | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1500 | 2000 |                      |
| POE (2) stearate(注1)              | 0             | 0   | 3   |     |      |      |      | I                    |
| POE (2) oleate(注1)                | 0             | 0   | 1   |     |      |      |      | I                    |
| POF (4) stearate                  | 0             | 1   | 4   |     |      |      |      | I                    |
| POE (8) stearate                  | 0             | 2   | 5   |     |      |      |      | D or G               |
| POE (10) stearate                 | 1             | 2   | 5   |     |      |      |      | G                    |
| POE (10) oleate                   | 0             | 1.5 | 5   |     |      |      |      | G                    |
| POE (10) laurate                  | 1             | 3   | 5   |     |      |      |      | S                    |
| POE (25) stearate                 | 0             | 0   | 3   | 5   |      |      |      | S                    |
| POE (40) stearate                 | 0             | 1   | 2   | 4.5 | 5    |      |      | S                    |
| POE (45) stearate                 | 0             | 0   | 2   | 3   | 5    |      |      | S                    |
| POE (50) stearate                 | 0             | 0   | 1   | 2   | 3    |      |      | S                    |
| POE (55) stearate                 | 0             | 0   | 0   | 1   | 2    |      |      | S                    |
| POE (4) sorbitan mono stearate    | 0             | 0   | 2   |     |      |      |      | G                    |
| POE (4) sorbitan mono laurate     | 0             | 0   | 4   |     |      |      |      | G                    |
| POE (5) sorbitan mono oleate      | 0             | 0   | 3   |     |      |      |      | D                    |
| POE (20) sorbitan mono stearate   | 0             | 0   | 1.5 | 4   |      |      |      | S                    |
| POE (20) sorbitan tristearate     | 0             | 0   | 1.5 | 2.5 | 3    |      |      | G                    |
| POE (20) sorbitan mono oleate     | 0             | 0   | 1   |     |      |      |      | S                    |
| POE (20) sorbitan trioleate       | 0             | 0   | 0   | 2   | 3    |      |      | D                    |
| POE (20) sorbitan mono palmitate  | 0             | 0   | 2   | 4   |      |      |      | S                    |
| POE (20) sorbitan mono laurate    | 0             | 0   | 2   |     |      |      |      | S                    |
| POE (20) castor oil               |               |     | 1   | 2   | 5    |      |      | G                    |
| POE (40) castor oil               |               |     | 1   | 1.5 | 2    | 4    | 5    | G                    |
| POE (60) castor oil               |               |     | 0   | 1.5 | 2    | 3.5  | 5    | S                    |
| POE (10) hydrogenated castor oil  |               |     | 0   | 1   | 2    | 4    | 5    | G                    |
| POE (20) hydrogenated castor oil  |               |     | 0   | 1   | 1.5  | 3    | 4    | S                    |
| POE (40) hydrogenated castor oil  |               |     | 0   | 0   | 1    | 1.5  | 2    | S                    |
| POE (80) hydrogenated castor oil  |               |     | 0   | 0   | 1    | 2    | 3    | S                    |
| POE (100) hydrogenated castor oil |               |     | 0   | 1   | 1.5  | 2    | 2.5  | S                    |

(注1) 不溶のため、 $1/20$  量の POE (55) stearate を加えて分散させたデータ。POE (2) oleate はこの処理でも殆んど分散しなかった

(注2) I : 不溶 D : 分散 G : ゲル化 S : 可溶

濃度範囲内である。

表2に示す POE 高級脂肪酸エステル型、POE ヒマン油および水添ヒマン油型界面活性剤の培養細胞への影響と、表3に示す POE 高級アルコールエーテル型、POE ノニルフェニルエーテル型界面活性剤の影響とを比較すると、後者群の与える影響は前者群のそれらよりも格段に強い。後者群がスコア5を与える濃度は数十 PPM のオーダーであるが、前者群のそれは数百 PPM である。化学構造の類似した、例えば POE

(10) オレエートとオレイルエーテルがスコア5を与える最低必要濃度を比較すると、前者が約 500PPM なのに対し後者は約 10PPM であり、約50倍の差がある。スコア5は着生細胞なし、または殆んど認めないもので、単に細胞増殖抑制に止まらず、全細胞を死滅させるほどの影響を示したものである。親水基である EO 分子と、親油基である高級脂肪酸、高級アルコールなどの分子との結合様式が、エステル型である前者より、エーテル型である後者が強い作用をもってい

表 3 エーテル型界面活性剤の培養細胞に対する細胞障害性効果

| 界 面 活 性 剤                           | 作 用 濃 度 (PPM) |    |    |    |    | 水に対する溶解性 |
|-------------------------------------|---------------|----|----|----|----|----------|
|                                     | 5             | 10 | 20 | 30 | 50 |          |
| POE (2) cetyl ether                 | 1             | 2  |    | 3  | 4  | I        |
| POE (2) cetyl ether <sup>(注1)</sup> | 1.5           | 3  |    | 4  | 5  | I        |
| POE (9) lauryl ether                |               | 3  |    | 5  |    | G        |
| POE (10) oleyl ether                |               | 5  |    |    |    | G        |
| POE (10) cetyl ether                |               | 4  |    | 5  |    | G        |
| POE (20) oleyl ether                |               | 3  |    | 5  |    | S        |
| POE (20) cetyl ether                |               | 2  |    | 3  | 4  | S        |
| POE (21) lauryl ether               |               | 0  |    | 3  | 4  | S        |
| POE (40) cetyl ether                | 0             | 1  |    | 2  | 3  | S        |
| POD (50) oleyl ether                |               | 0  |    | 2  | 3  | S        |
| POE (5) nonylphenyl ether           | 1             | 2  | 3  |    |    | I        |
| POE (10) nonylphenyl ether          | 5             |    |    |    |    | S        |
| POE (20) nonylphenyl ether          | 1             | 3  | 4  |    |    | S        |

(注1) 難溶のため 1/20 量の POE (55) stearate を加えて分散させたデータ

た。

今回試験した界面活性剤のうち、POE ヒマン油および水添ヒマン油型、特に POE 水添ヒマン油型は培養細胞への影響が小さかった。このヒマン油および水添ヒマン油はトリグリセライドであるが、EO が付加されるとエステル型となる。

表2に示す通り POE (10) 脂肪酸エステルの細胞への影響をみると、強さの順位は作用濃度 250PPM および 100PPM で比較すると、1) ラウレート、2) ステアレート、3) オレエートである。また POE ソルビタンモノ脂肪酸エステルでは、EO 4 モル、500PPM で、1) ラウレート、2) ステアレート、EO 20 モル、500PPM で、1) ラウレート、2) ステアレート、3) オレエートの順、同様に POE (20) ソルビタントリ脂肪酸エステルでは 500PPM で、1) ステアレート、2) オレエートとなっている。非イオン型界面活性剤の親油基を構成する脂肪酸の培養ヒト皮膚細胞に対する影響は、ラウレートがもっとも強く、ステアレートが中位、オレエートがもっとも弱いと云える。

## B. 家兎皮膚に対する連続塗擦の影響

非イオン型界面活性剤試料を塗擦経過中に生じた皮膚の肉眼的な炎症性変化と、8回の塗擦完了2日後に HE 染色をおこなった組織学的所見を表4に示す。

皮膚の炎症の強さは、以下の基準に従って記載した。

ー：変化が認められない

±：変化がごく軽度認められる

＋：変化が軽度認められる

≡：変化が中等度認められる

≡≡：変化が強度認められる

実験に用いた家兎は2匹であり、1品目1ヶ所塗擦で塗擦部位は閉鎖せず、また動物は固定せず自由な行動を許した。そのため、塗擦された検体と皮膚との接触時間は区々不定の可能性を残す。また軽度の炎症が塗擦部位に生じると、動物はこれを咬み、あるいは掻破して出血性変化を2次的に現わし易い。化学物質の味、匂いによる忌避現象すらそれに加わり得る。こうした理由から、肉眼的および顕微鏡的变化の強弱が、被検物質の皮膚への影響、もしくはいわゆる毒性と必ずしも平行しない。

にもかかわらず今回の我々の小実験の結果を一応まとめてみると、2種の対照を除く14試験品目のうち、1) (ー)～(±) 程度の肉眼的変化のものは POE 水添ヒマン油3品目、POE ステアレート3品目中 EO 2 モル、50モルの2品目、POE ソルビタンオレエート3品目中 EO 20 モルモノオレエート1品目、POE セチルエーテル3品目中 EO 40 モルの1品目、POE ノニルフェニルエーテル2品目中 EO 10 モルの1品目の合計8品目、2) (＋) 以上の変化（発赤、鱗屑、痂皮）のものは POE ステアレート3品目中 EO 10 モルの1品目、POE ソルビタンオレエート3品目中 EO 5 モルのモノオレエート、EO 20 モルのトリオレ

表 4 非イオン型界面活性剤の家兔皮膚連続塗擦の影響

| 所 見                          | 巨 視 的 変 化                     | 組 織 所 見                           |            |                 |                 | 表皮肥厚                  |                    |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------------|--------------------|
|                              |                               | 特徴的な組織変化                          | 真皮上層部の血管拡張 | 皮下出血            | 真皮上層部の細胞浸潤      |                       | 真皮上層部のカリオリキナー      |
| 界面活性剤                        |                               |                                   |            |                 |                 |                       |                    |
| 無処理対照                        | (-)                           | (-)                               | (-)        | (-)             | (±)<br>好塩性小リンパ球 | (-)                   | (-)                |
| ワセリン塗擦対照                     | (-)                           | (-)                               | (±)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)<br>毛のう口付近のみ    |
| POE (2) stearate             | 発 赤 (±)                       | (-)                               | (+)        | (+)             | (±)             | (±)                   | (+)                |
| POE (10) stearate            | 6日目より発赤 (++)                  | 有棘細胞内浮腫 (+)                       | (+)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)                |
| POE (55) stearate            | (-)                           | (-)                               | (±)        | (±)             | (+)             | (-)                   | (+)                |
| POE (5) sorbitanmono-oleate  | 発 赤 (+)                       | 有棘細胞間浮腫 (+)<br>基底細胞の配列の乱れ         | (+)        | (+)<br>特に毛のう周辺部 | (+)             | (+)                   | (+)                |
| POE (20) sorbitanmono-oleate | (-)                           | (-)                               | (±)        | (-)             | (±)             | (±)                   | (+)                |
| POE (20) sorbitantriolate    | 6日目より発赤 (++)                  | (-)                               | (+)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)<br>角形形成        |
| POE (2) cetylether           | 2日目より発赤<br>6日目より痂皮 (++)~(++)  | 表皮細胞の壊死<br>毛のうは開口部付近で萎縮<br>表皮下小水疱 | (+)        | (+)             | (+)             |                       | (+)                |
| POE (10) cetylether          | 3日目より発赤<br>6日目より大型鱗屑 (+)~(++) | 毛のう壁細胞の空胞変性                       |            | (+)             | (+)             | (+)<br>特に毛のう周辺部と表皮直下部 | (+)                |
| POE (40) cetylether          | (-)                           | (-)                               | (±)        | (-)             | (±)             | (±)                   | (+)                |
| POE (5) nonylphenyl-ether    | 4日目より発赤, 同時に痂皮 (++)           | 表皮細胞の壊死<br>真皮上層部に小水疱<br>毛の脱落      | (+)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)                |
| POE (10) nonylphenyl-ether   | 6日目頃より皮膚の浮腫 (±)               | 毛のう口付近と毛根部に萎縮傾向                   | (+)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)<br>毛のう口周辺は (+) |
| POE (10) 水添ヒマシ油              | 発 赤 (±)                       | (-)                               | (+)        | (+)             | (+)             | (+)                   | (+)                |
| POE (40) 水添ヒマシ油              | (-)                           | (-)                               | (±)        | (-)             | (-)             | (-)                   | (+)                |
| POE (100) 水添ヒマシ油             | (-)                           | (-)                               | (±)        | (±)             | (±)             | (-)                   | (+)                |

エートの2品目, POE セチルエーテル3品目中EO 2モル, 10モルの2品目, POE ノニルフエニルエーテル2品目中EO 5モルの1品目の合計6品目であった。

組織顕微鏡所見では, 対照の白色ワセリン塗擦のみでも軽度の血管拡張と真皮上層部の出血, 細胞浸潤, 表皮肥厚が認められた。肉眼的炎症性変化に相当して, 真皮上層部の血管拡張, 出血, 細胞浸潤, 表皮肥厚などの変化が対照よりも強い。そして鱗屑形成, 痂皮形成と炎症が増大すると, 組織変化もそれに対応している。また炎症の主な部位は全般的に真皮上層部であるが, 毛のう口および毛のう周辺の炎症も強い。代表的なものについてHE染色による組織顕微鏡写真を図2から図11に示す。

#### Ⅳ. 考 按

非イオン型界面活性剤の動物皮膚塗擦試験としては, 高須ら<sup>5)</sup>, Treon ら<sup>6)</sup>, Mezei ら<sup>7)</sup>の報告がある。高須らは市販 commercial grade の POE ソルビタンモノオレエートのEO 5モルと20モル, POE オレエートのEO 6モルと16モル, POE オレイルエーテルのEO 6モルと16モル, POE ノニルフエニルエーテルのEO 7.5モルと18モルなどを家兎皮膚に塗擦し, 親水基と親油基の結合様式がエーテル型である POE オレイルエーテルおよび POE ノニルフエニルエーテルに強い皮膚障害性影響があるという。特にエーテル型でも付加するEOモル数の小さいものに障害性影響が顕著であり, 痂皮形成の早いことが特徴的であること, 水溶液, ワセリンと混合, 稀釈せずに原液のまま塗擦する剤型および濃度を変えても差のないこと, 同じ化学構造のものであればメーカーが違っていても障害性影響に差のないことを報告している。一方 Treon らの報告は, 家兎にパッチテストしたものである。すべてのパッチテスト部位に炎症が生ずるまで反復試験していない点に問題はあるが, POE 高級アルコールエーテル群ではEO付加モル数の小さいものが一次刺激指数 (Primary Irritation Index) も大きく, とくに POE (2) セチルエーテルのそれが大きい。またヒトのパッチテストでも, この POE (2) セチルエーテルの一次刺激指数がもっとも大きく, しかも付加EOモル数が10モルになるとこの指数も大きく減少すると述べている。Mezei らによる家兎塗擦試験でも, 皮膚障害性影響の強さの順位は, 1) POE (2 および10) 高級アルコールエーテル, 2) POE (20) ソル

ビタン高級脂肪酸エステル, ソルビタン高級脂肪酸エステルであり, エーテル型の障害性影響が大きい。ただEO付加モル数の影響については, ふれていない。我々が今回おこなった塗擦試験でも, 非イオン型界面活性剤が家兎皮膚に障害性の影響を与える傾向を認め, かつ親水基および親油基の結合様式並びにEO付加モル数との関係についても, 上記諸報告とよく合致している。

今回我々が行なった非イオン型界面活性剤のヒト健康皮膚由来培養細胞株への影響をみる試験結果も, 細胞培養液にある程度以上溶解乃至分散するものについては, 上記動物試験結果とよく一致している。すなわち, 1) 動物試験で皮膚障害性影響の強い非イオン型界面活性剤は, 培養細胞に対する増殖抑制乃至致死効果も強いこと, 2) この細胞障害性効果は, 非イオン型界面活性剤の親水基と親油基の結合様式がエーテル型のものはエステル型のものに比較して強いこと, 3) 同一の基本化学構造を有する界面活性剤での比較では, 付加するEOモル数が増大するほど, 同一重量比濃度で比較した細胞障害性効果が減少していくこと。以上の3点をさらに明瞭に示すことが出来た。

エーテル型非イオン界面活性剤が皮膚および培養細胞株に強い障害性影響を与えるメカニズムについては, 必ずしも明らかではない。Mezei ら<sup>7)</sup>によると, 家兎に非イオン型界面活性剤を塗擦するとまず皮膚のリン脂質合成が高まり, 遅れてDNA合成も高まるが, リン脂質/DNAの比は無処理の場合より常に高値を示す。この生合成を高める作用の強さの順位は, 1) POE (10) オレイルエーテル, 2) POE (20) ソルビタントリオレエートおよびソルビタントリオレエートであり, 皮膚障害性影響の順序と一致したとしている。しかしエーテル型とエステル型の質的な作用の違いは見出していない。エーテル型がエステル型に比較して乳化力, 可溶化力にすぐれていることも, 細胞障害性影響に差異の出る一因かも知れない。さらに POE ソルビタン高級脂肪酸エステルをラットに経口投与すると, ソルビタンとエステル結合している脂肪酸はリパーゼにより比較的簡単にはずれる。一方 POE とソルビタン間のエーテル結合ははずれず, POE ソルビタンとして糞便中に排泄されたとの Treon ら<sup>6)</sup>の報告がある。このようにエーテル型結合がエステル型結合に比較して生分解を受けにくいとも思われ, このことも細胞障害性影響の強いことの理由の一つとなるであろう。



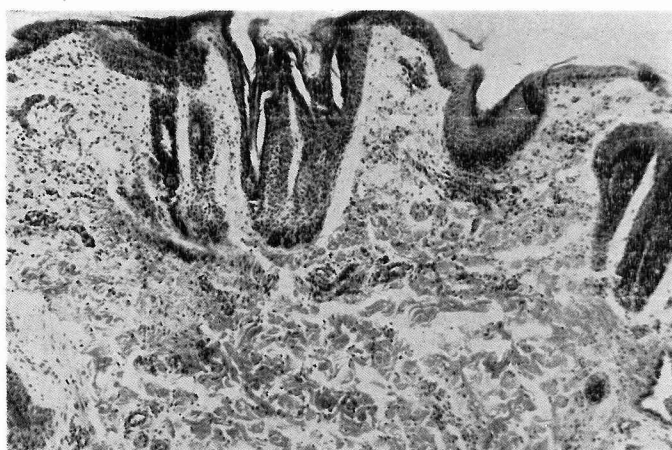


図 2 白色ワセリン塗擦家兎の組織像  
×100  
軽度の表皮肥厚を示す  
H E 染色

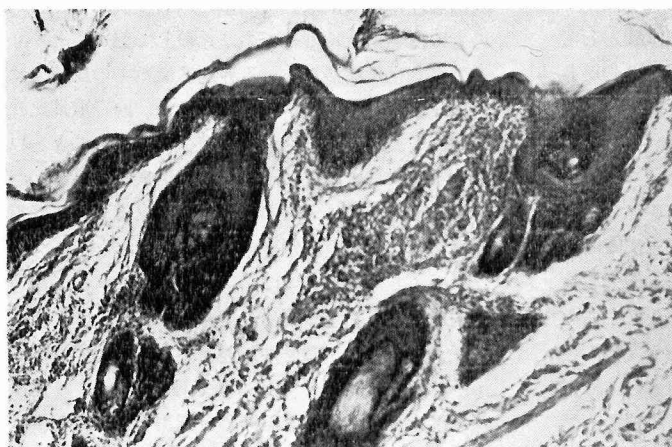


図 3 POE (10) MONOSTEARATE 塗擦家兎の組織像  
×100  
強度の血管拡張, 中等度の表皮肥厚と不全角化を示す  
H E 染色

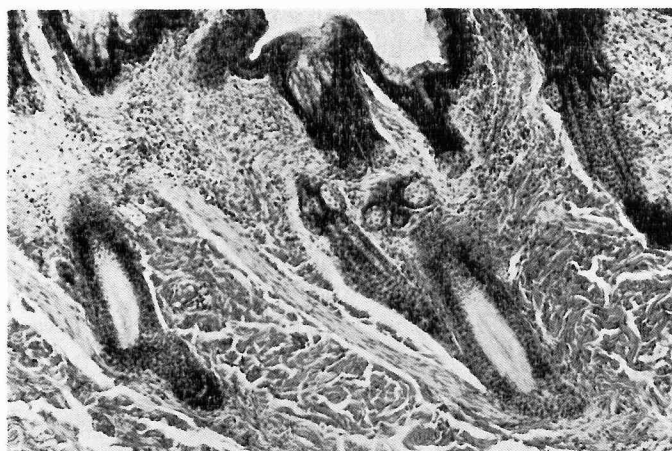


図 4 POE (20) SORBITAN MONOOLEATE 塗擦家兎の組織像  
×100  
軽度の表皮肥厚を示す  
H E 染色

図 5 POE (20) SORBITAN  
TRIOLEATE 塗擦家兎の組織像  
× 100  
強度の表皮肥厚と皮下出血を示す  
H E 染色

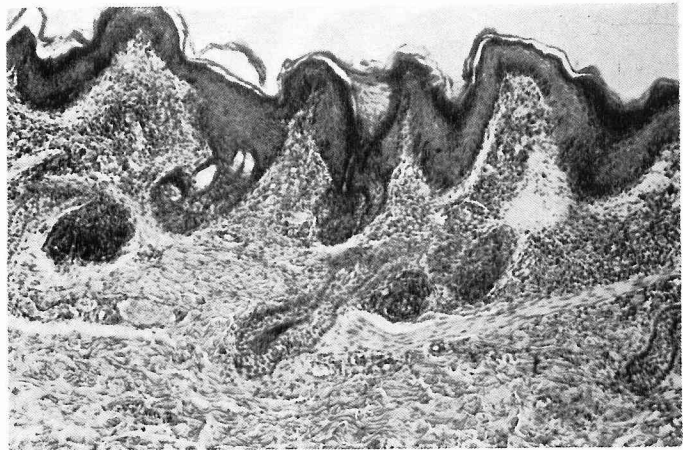


図 6 POE (2) CETYL ETHER  
塗擦家兎の組織像  
× 100  
強度の表皮肥厚, 血管拡張および皮下出血を示す  
H E 染色

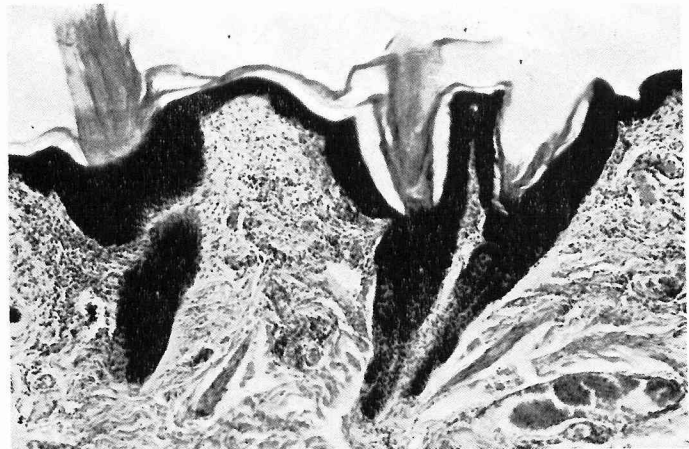


図 7 POE (10) CETYL ETHER  
塗擦家兎の組織像  
× 100  
強度の表皮肥厚と中等度の皮下  
出血を示す  
H E 染色



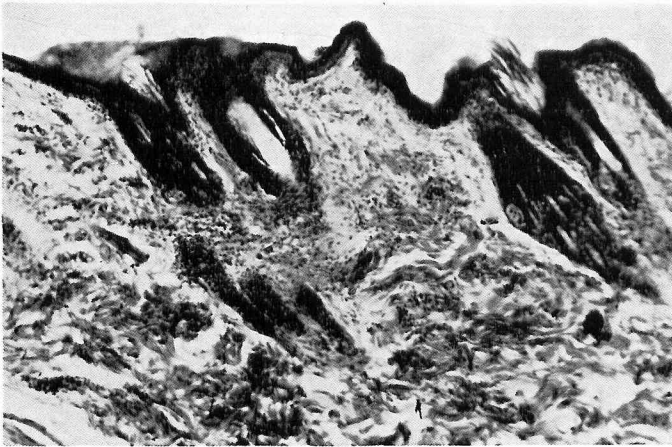


図 8 POE (40) CETYL ETHER  
塗擦家兎の組織像  
×100  
軽度の表皮肥厚を示す  
H E 染色



図 9 POE (5) NONYLPHENYL  
ETHER 塗擦家兎の組織像  
×100  
強度の表皮肥厚と血管拡張、皮  
下出血および真皮上層部の小水  
疱を示す  
H E 染色

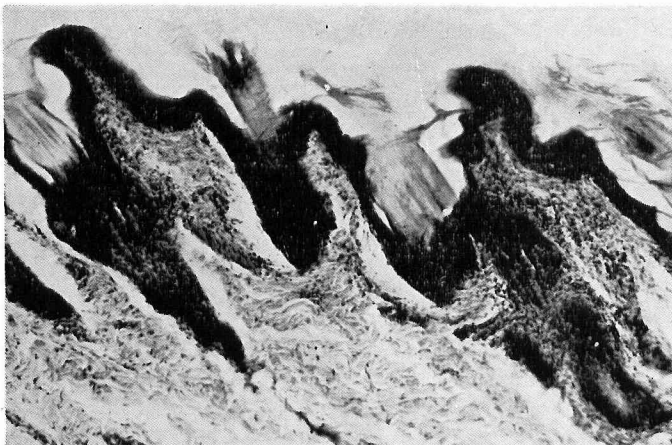
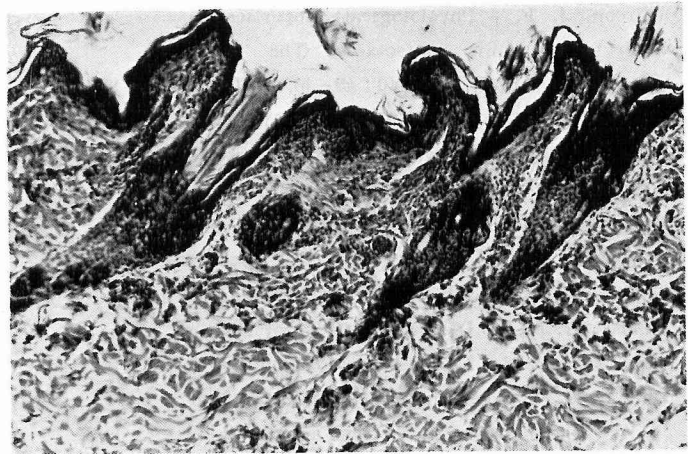


図10 POE (10) NONYLPHENYL  
ETHER 塗擦家兎の組織像  
×100  
中等度の表皮肥厚と皮下出血を  
示す  
H E 染色

図11 POE (40) HYDROGEN-  
ATED CASTOR OIL 塗擦家  
兎の組織像  
×100  
軽度の表皮肥厚を示す  
H E 染色



試験した界面活性剤のうち POE 水添ヒマシ油型のものがもっとも障害性影響が小さかった。本品は EO 鎖の一端で脂肪酸のカルボキシル基と、他端でグリセリンの水酸基と結合しており、エステル型の構造をとっている。

近藤ら<sup>10)</sup>は市販の界面活性剤を用いてウシ赤血球膜の可溶化能を研究し、pH 7.2 での可溶化能の強さの順位は、1) POE (9) ラウリルエーテル、2) POE (10) ノニルフェニルエーテル、3) POE (21) ラウリルエーテル、POE (20) ソルビタンモノラウレート、であったとしている。この結果は我々の得た細胞障害性影響の順序とは違っており、培養細胞と赤血球膜という材料の相違に起因するのであろう。

## V. 結 論

1) 41種の市販非イオン型界面活性剤のヒト健常皮膚由来培養細胞株に対する影響、とくに細胞障害性効果を試験した。

2) 同じく14種類の市販非イオン型界面活性剤について家兎皮膚連続塗擦試験をおこない、皮膚に対する影響、とくに皮膚障害性効果を試験し、1)の結果と比較した。

3) 培養細胞と家兎皮膚に対する障害性効果の強さの順序はよく一致した。よってヒト健常皮膚由来培養細胞株を用いた培養細胞試験が、非イオン型界面活性剤の皮膚障害性効果を評価する in vitro のスクリーニングテストとしてすぐれている。

4) 非イオン型界面活性剤の培養細胞および家兎皮膚に対する障害性効果は、親水基と親油基の結合様式

がエーテル型のものがエステル型のものより著るしく大きく、また付加する EO モル数が大きくなる程減少する。試験した界面活性剤のうち、POE 水添ヒマシ油型のものが障害性効果がもっとも小さかった。

5) 細胞培養液に難溶の界面活性剤は障害性効果が小さく出るので、培養細胞試験は培養液に可溶の水溶性物質の試験に適している。

本論文の要旨の一部は、第70回日本皮膚科学会学術大会（昭和46年4月4日、東京）にて発表した。

## 引用文献

- 1) Idson, B.: Primary irritation testing, Toxicol. Applied Pharm., Supplement 3: 84-89, 1969
- 2) 石原 勝: 洗剤, 特に界面活性剤と皮膚障害, 皮臨床, 10: 193-200, 1968
- 3) Furuyama, J., Mori, Y. and Kikkawa, H.: A male bearing XX sex chromosome constitution in human skin, Proc. XII Intern. Congr. Genet., 1: 216, 1968
- 4) Sato, A.: Changes in chromatin pattern during long term of tissue culture of human male skin cells exhibiting XX chromosome, 26th Meeting Japan Tissue Culture Assoc., 1968
- 5) 高須 久, 湯木繁子: 非イオン界面活性剤の皮膚に及ぼす影響, 日皮会誌, 71: 381-400, 1961

- 6) Treon, J. F. : Physiological properties of selected nonionic surfactants, *The Toilet Goods Assoc. Sci. Sect.*, 40 : 40-46, 1963
- 7) Treon, J. F., Gongwer, L. E., Nelson, M. F. and Kirschman, J. C. : Physiologic and metabolic patterns of nonionic surfactants, *Proc. Intern. Congr. Surface Active Substances IV. Brussels*, 3 : 381-395, 1966
- 8) Mezei, M., Sager, R. W., Stewart, W. D. and Deruyter, A. L. : Dermatitic effect of nonionic surfactants I, Gross, microscopic, and metabolic changes in rabbit skin treated with nonionic surface-active agents, *J. Pharm. Sci.*, 55 : 584-590, 1966
- 9) Mezei, M. and Sager, R. W. : Dermatitic effect of nonionic surfactants II, Changes in phospholipid and in deoxyribonucleic acid content of rabbit epidermis in vivo, *J. Pharm. Sci.*, 56 : 1604-1608, 1966
- 10) 近藤三雄, 吉村正見, 奥山典生 : 各種界面活性剤によるウシ赤血球膜の可溶化. *生化学*, 44 : 849-865, 1972

(52. 5. 20 受稿)