

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

Ⅱ. 陰イオン型界面活性剤

小西宏明¹⁾²⁾ 井上佳子¹⁾ 渥美隆正¹⁾
安藤寛治¹⁾ 小林正久¹⁾ 高瀬吉雄²⁾

¹⁾ ジャパンオリリー (株) 研究所

²⁾ 信州大学医学部皮膚科学教室

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

Hiroaki KONISHI¹⁾²⁾, Yoshiko INOUE¹⁾, Takamasa ATSUMI¹⁾, Kanji ANDO¹⁾, Masahisa KOBAYASHI¹⁾ and Yoshio TAKASE²⁾

¹⁾ Research Laboratories of Japan O'leary Co., Ltd.

²⁾ Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Shinshu University

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

I. 緒 言

我々は市販41種の非イオン型界面活性剤について、ヒト健常皮膚由来培養細胞株への影響、とくに細胞障害性効果を研究してきた。そして家兎に連続塗擦したときに生ずる皮膚障害性効果と、培養細胞への障害性効果が概ね一致することを指摘した。そしてこの培養細胞での試験が、非イオン型界面活性剤の皮膚障害性効果の in vitro スクリーニングテストとして有用であることも第Ⅰ報として報告した¹⁾²⁾。

本報では、この培養細胞試験が陰イオン型界面活性剤についても同様に皮膚障害性効果の in vitro スクリーニングテスト法となり得るかを確かめる目的で、8種類の陰イオン型界面活性剤を選んだ。培養細胞への障害性効果、モルモット浸漬試験および皮内注射試

験をおこない、比較検討した結果を報告する。

Ⅱ. 実験材料および方法

A. 実験材料

試験した8種の陰イオン型界面活性剤と以下の本文中に使用する略号などを表1に示す。いずれも市販品そのままを用い、特別な精製はしなかった。

B. 方 法

1. ヒト健常皮膚由来培養細胞株に対する影響

培養細胞株は第Ⅰ報と同じく、ヒト健常皮膚由来のXX-male株 (JTC-17)³⁾⁴⁾を用いた。

培養細胞株の準備培養操作は、第Ⅰ報の非イオン型界面活性剤試験と同じである。2日間の準備培養を完了した細胞と界面活性剤との incubation は、i) 第Ⅰ

表 1 試験した陰イオン型界面活性剤

	化 学 名	略号 ^(※1)	商 品 名	純 度	メーカ一
1	Na-Dodecylbenzenesulfonate	A B S	エマール 05 パウダー	95%	花王石鹼 ㈱
2	Na-Lauryl sulfate	S L S	ニッコール SLS	98%以上	日光ケミカルズ㈱
3	Triethanolamine Lauryl sulfate	T L S	ニッコール TEALS	50%水溶液	同 上
4	Na-Laurylethersulfate (3EO)	SLES	ニッコール NES-203	20%水溶液	同 上
5	Na-N-Lauroyl sarcosinate	SLSar.	ニッコールザルコソネートLN	98%以上	同 上
6	Mono Na-N-Lauroyl-L-glutamate	S L G	アミノフト LS-11	93%以上	味の素 ㈱
7	Na-Laurate	S L	純ラウリン酸 ^(※2) の中和		
8	Triethanolamine Laurate	T L	純ラウリン酸 ^(※2) の中和		

(※1) 本文中および表 4, 7, 図10に, この略号を用いる

(※2) 日本油脂 ㈱ NAA-122, 純度99%

報と同様に20%仔牛血清を添加した Eagle MEM 中でおこなう方法, ii) リン酸緩衝食液より MgCl₂, CaCl₂を除いた PBS (-) 溶液 (組成 NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Na₂HPO₄ 0.115%, KH₂PO₄ 0.02%, pH 7.2) 中でおこなう方法, との2法を用いた。

i 法: 準備培養を完了した細胞株の培養液を, 種々の重量比濃度の界面活性剤を含む Eagle MEM (仔牛血清20%添加) に交換し, 炭酸ガス細胞培養器中でさらに3日間培養を継続する。3日後シャーレに着生している細胞をメタノールで5分間固定, ギムザ染色をおこない, 着生細胞の数量および形態を対照と比較して細胞障害性効果の有無と程度を判定した。なお, 界面活性剤を含まない溶液で同様に操作したものを対照とした。

ii 法: 準備培養完了後に培養液を捨て, PBS (-) 溶液 (pH 7.2) にて着生細胞を2度洗う。種々重量比濃度の界面活性剤を含む PBS (-) 溶液 (pH 7.1~7.4) 3ml を加え, 37°C で60分 incubation する。こののち仔牛血清20%添加 Eagle MEM 7.5ml を追加し, 炭酸ガス細胞培養器中でさらに3日間培養を継続する。3日後メタノール固定, ギムザ染色をおこない, i 法と同様に判定した。ii 法をおこなった理由は, i 法での陰イオン型界面活性剤と血清中に含まれるアルブミン等蛋白質との結合による影響及び特に高級脂肪酸石ケン等が培養液中に含まれる Ca, Mg 等と2価金属塩を形成して不溶化する影響を小さくするためである。ii 法での3日間継続培養時の界面活性剤濃度は, 培養液 7.5ml の追加により, PBS (-) 中で60分 incubation した時の濃度の3.5倍に稀釈されている。

2. モルモットの浸漬試験

a. pH 非調節試験

Opdyke らの方法⁵⁾に準じた。動物は体重 250g 前後のハートレー系白色モルモット, 雌雄混合を1群2~3匹, 対照2群 (イオン交換水浸漬および完全無処理) を含む12群の計30匹を準備した。界面活性剤はイオン交換水溶液とし, 濃度は0.25%および1%の2種類, 40°C で1日1回4時間の浸漬を3日間くり返した。浸漬後のモルモットはぬるま湯ですすぎ, 軽くタオルで拭いておく。3日間の浸漬完了後, さらに3日後まで皮膚変化を巨視的に観察した。また浸漬完了3日後に皮膚を採取, 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 μ 切片とし HE 染色, 皮膚の顕微鏡的検査をおこなった。本試験溶液の pH は, 界面活性剤の種類により多少異なっており, SL が 8.1 でもっとも高く, SLG が 5.2 でもっとも低かった。

b. pH 調節試験

界面活性剤の皮膚障害性効果と pH および溶液組成の関係を探るため, pH を 7.2 に調節した溶液での浸漬試験をおこなった。溶液は水溶液と PBS (-) 溶液の2種, 試験した界面活性剤は SLS, SLES, SL の3種, 濃度は0.25%, pH 調節は 1N-NaOH または HCl でおこない, 対照の水については NaHCO₃ にて調節した。動物は前項と同じくハートレー系で1群2~3匹, 対照2群を含む8群の計20匹を準備。浸漬条件は 40°C, 1日3時間を3日間くり返し, 同様に観察した。

3. モルモットの皮内注射試験

体重 250g 前後のハートレー系白色モルモット, 雌雄混合を1群3頭3スポット, 対照1群を含む8群の計29匹を準備した。試験した界面活性剤は ABS, SLS,

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

SLES, SLSar., SL, TL, SLG の7種。モルモットの背部を電気バリカンで刈毛し、界面活性剤の0.1% PBS (-) 溶液の0.05mlを皮内注射する。注射1日後、3日後、5日後にそれぞれエーテル麻酔して皮膚を剝離し、真皮側から透見、注射部位の出血斑を採点した。対照は、PBS (-) 溶液0.05ml皮内注射したものとした。

Ⅲ. 結 果

A. ヒト健常皮膚由来培養細胞株に対する影響

第I報と同じく、次の基準に従って採点した。

スコア0：生存細胞の量、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

非イオン界面活性剤の場合と同様、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する。

界面活性剤を仔牛血清20%添加 Eagle MEM 中に溶解し、3日間細胞に作用させたi法による結果を表2に示す。i法により得られた界面活性剤の培養細胞への影響の強さの順位は、1)SLES, SL, 2)SLSarco., 3)SLS, 4)TL, TLS, ABS, 5)SLG, の順であり、SLES, SL がもっとも強く、SLG がもっとも弱い。ABS や SLS は中位ないしはむしろ弱かった。

界面活性剤を PBS (-) 溶液に溶解し、これを洗浄した細胞に60分作用させたii法による結果を表3に示す。このii法により得られた界面活性剤の培養細胞への影響の強さの順位は、1)ABS, 2)SLS, SLES,

表 2 血清添加培養液中での培養細胞試験

界 面 活 性 剤	作 用 濃 度 (PPM)				
	25	50	100	250	500
Na-Dodecylbenzenesulfonate	0	0	1	1	5
Na-Lauryl sulfate	0	0	0	4	5
Triethanolamine-Lauryl sulfate	0	0	0.5	1	5
Na-Laurylethersulfate (3EO)	0	0	3	5	
Na-N-Lauroyl sarcosinate	0	0	1	5	
Na-Laurate	0	1	2	5	
Triethanolamine-Laurate	0	0	0.5	2	5
Mono-Na-N-Lauroyl-L-glutamate	0	0	0	1	4

表 3 P S B (-) 中での培養細胞試験

界 面 活 性 剤	作 用 濃 度 (PPM)					
	10	25	50	100	150	250
Na-Dodecylbenzenesulfonate	4	5				
Na-Lauryl sulfate	0	5				
Triethanolamine-Lauryl sulfate	0	0	5			
Na-Laurylethersulfate (3EO)	0	5				
Na-N-Lauroyl sarcosinate	0	0	0	0	5	
Na-Laurate	0	0	2	5		
Triethanolamine-Laurate	0	0	0	2	5	
Mono-Na-N-Lauroyl-L-glutamate	0	0	0	0	0	0

3) TLS, 4) SL, 5) TL, SLSar., 6) SLG, の順であり, ABS がもっとも強く, SLS, SLES がこれに次ぎ, SLG がもっとも弱い。

i 法および ii 法の結果より, 試験方法の相違により, 培養細胞への影響の強さの順位が明らかに変動する。特に ii 法で高い順位にある ABS, SLS, それに TLS が, i 法では逆に低い順位になる。おそらく陰イオン型界面活性剤と血清蛋白とが i 法では複合体をつくると思われるが, それがこの差を生ずる一つの理由であろう。

B. モルモットの浸漬試験

a. pH 非調節試験

肉眼的な皮膚炎症性変化を次の基準に従って採点した。

スコア 0 : 異常は認められない

- 1 : 局在性鱗屑形成
- 2 : 汎発性鱗屑形成
- 3 : 汎発性鱗屑形成 + 機能障害 (運動失調)
- 4 : 浸漬試験完了後に死亡
- 5 : 浸漬試験の途中で死亡

組織所見における炎症の程度は次の基準に従って記載した。

- : 変化なし
- ± : ごく軽度な変化
- +
- ++ : 軽度の変化
- +++ : 中等度の変化
- ++++ : 強度の変化

肉眼的な皮膚変化と組織所見の結果を表 4 に示す。皮膚変化は浸漬試験完了 2~3 日後まで観察, 採点し, 2~3 匹の平均値を示した。試験途中死亡したものは, 可能な限り死亡直後に皮片を採取した。また表 4 のカッコ内には, 死亡に至るまでの累積浸漬時間を示した。浸漬試験の場合のみ, SL の試料は最純試薬 (丸若化工) を用いた。

表 4 のごとく, 1% 水溶液浸漬試験 3 群では, SL, SLS, SLG とともにモルモットはすべて途中で死亡した。また 0.25% 水溶液試験 8 群では, SL, SLS, ABS, TLS, TL の 5 群のモルモットはすべて途中で死亡した。1% 水溶液浸漬で死亡したモルモット, 特に SLS, SL のものでは, 鮮紅色潮紅と腫脹が全身に顕著であった。また SLSar. の 0.25% 水溶液浸漬モルモットでは, 2 匹とともに汎発かつ強度の鱗屑形成があらわれ, さらに背部の小点状出血斑, 下半身の腫脹と硬化がみ

られた。この下半身の腫脹と硬化は, SLSar. 浸漬モルモットにのみ観察された特異的な現象である。下半身は屈位を保ち他動的にも伸展しがたく, 特に後肢の運動が不全で正常歩行が不能であった。

浸漬試験での皮膚変化は, 四肢内側部と足底部に生じ, この部位の角層の部分的剝離を生じ易い。この所見は全般的に共通した。

今回の試験では死亡するモルモットが多く, 界面活性剤の皮膚障害性効果を調べる目的からすると, 試験条件が苛酷にすぎたきらいはある。浸漬試験のスコア順, およびスコア 5 のものについては死亡するまでの累積浸漬時間の短かいものに高い順位をつけると, 1) SL, SLS, 2) ABS, 3) TL, TLS, 4) SLSar., 5) SLES, SLG, の順となる。そして SL, SLS, ABS の差は小さい。

組織の顕微鏡検査では, 特に試験途中で死亡した SLS, TLS, ABS, SL, TL 浸漬モルモットに, 表皮又は角質層の部分的離解が認められ, この離解部の表皮細胞の変性も著るしい。不全角化も著明であった。また SL, TL では, 特に毛のう周辺の真皮中下層部まで細胞浸潤が認められ, 経毛のう性吸収の存在を示すと考えられる。その他のものについては, 浸漬試験完了 3 日後の炎症の消退しつつある組織所見ではあるが, SLSar. に著明な不全角化と表皮肥厚が認められた。組織顕微鏡写真を図 1 から図 9 に示す。

b. pH 調節試験

皮膚変化の結果を表 5 に示す。採点基準は前項 a と同じである。

水溶液, PBS (-) 溶液ともに pH7.2 の皮膚障害性効果の順位は, 1) SLS, 2) SL, 3) SLES, である。しかし SLS, SLES は水溶液, PBS (-) 溶液ともに障害性効果の程度に差がないのに対し, SL のそれは PBS (-) 溶液より水溶液の方が明らかに強い。塩類を含む PBS (-) 溶液中では, 水溶液に比較して SL の溶解性が低下するためと考えられる。ただ, 表 4 に示す pH 非調節水溶液試験では, SLS と SL の障害性効果がほぼ同等であったのに対し, 今回の pH 調節水溶液試験では, SLの方が SLS より強く出た。pH 非調節 SL 水溶液の障害性効果には, 高い pH による影響も含まれていたと判断される。

ヒトに界面活性剤 1% 水溶液を 3 時間浸漬した Kuchinska⁶⁾ は, 皮膚刺激性はアルキルサルフェートが高級脂肪酸石ケンより強いとし, Peukert⁷⁾ は, 1) アルキルサルフェート, 2) アルキルアリルスルフォネー

モルモットに対してする浸漬試験 (I)

界面活性剤	(※1) pH	巨視的変化平均スコア(※2)		特徴的な組織変化	真皮上層部の血管拡張	真皮上層部の細胞浸潤	真皮上層部のカリオレキナー	見		
		1.0% 浸漬	0.25% 浸漬					不全角化	角質肥厚	表皮肥厚
Control (Water)	6.8	0.1		角質層の膨潤 (+)	(±)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)
A B S	6.7		5.0 (6-7.5 hrs)	角質層の部分的離解 (+) 角質層離解部の有棘細胞内浮腫 (卅) 毛のう口周辺の有棘細胞の空胞変性 (+)	(±)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)
S L S	6.7	5.0 (3-4 hrs)	5.0 (4-5 hrs)	表皮と真皮の部分的離解 (卅) 有棘、基底細胞の膨化変性 (+) 基底細胞の一部空胞変性 (+)	(+)~(卅)	(+)~(卅)	(±)	(卅)	(卅)	(+)
T L S	6.7		5.0 (9.5-11.5 hrs)	表皮と真皮の部分的離解 (卅) 表皮直下水疱と表皮細胞崩壊 (卅)~(卅) 表皮細胞の膨化と細胞内浮腫 (卅) 毛のう壁細胞も一部崩壊 (+)	(+)	(卅)	(卅)	(卅)	(+)	(±)
S L E S	6.2		1.0	有棘細胞内浮腫 (+)	(±)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)
S L Sar.	6.7		3.0	毛のう脂腺の肥大傾向 (±)	(±)	(-)	(-)	(卅)	(卅)	(卅)
S L (※3)	8.1	5.0 (2 hrs)	5.0 (4-7.5 hrs)	角質層の部分的離解 (+)~(卅) 表皮直下の小水疱 (+) 有棘細胞内浮腫 (卅)	(卅)	(+)~(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(卅)
T L	7.4		5.0 (11-11.5 hrs)	表皮と真皮の部分的離解 (+) 特に毛のう周辺の表皮細胞の細胞内浮腫、萎縮、崩壊がみられる (卅)	(卅)	(+)~(卅)	(卅)	(卅)	(卅)	(±)
S L G	5.2	5.0 (4-8 hrs)	1.3	有棘細胞内浮腫 (+)	(-)	(-)	(-)	(±)~(+)	(+)	(±)~(+)

pH 無調節水溶液, 40°C, 1日4時間3日反復, (※1) 0.25% 水溶液の pH, (※2) 1% 浸漬は3匹, 0.25% 浸漬は2匹

() 内は死亡するまでの累積浸漬時間, (※3) 丸若化工の試薬

表 5 モルモットに対する浸漬試験 (I)

界面活性剤	平均スコア	
	水溶液 ^(※1)	PBS (-) 溶液 ^(※2)
Na-Lauryl sulfate	5.0 (5 hrs)	5.0 (6 hrs)
Na-Laurylethersulfate (3EO)	1.0	0.8
Na-Laurate ^(※3)	4.0	2.3
Control	0	0

0.25%, pH 7.2, 40°C, 1日3時間3日反覆

(※1) 各2匹の平均スコア (※2) 各3匹の平均スコア

(※3) 丸若化工の試薬

ト, 3) 高級脂肪酸石ケンの順であると報告している。Brown⁹⁾ はヒト前腕部浸漬試験での皮膚障害性効果は 1) SLS, 2) ABS, 3) 高級脂肪酸石ケンの順, 岡本⁹⁾ は 1) SLS, 2) SLES, 3) 高級脂肪酸石ケンであると報告している。Prottey ら¹⁰⁾ はラットに水溶液を反覆塗布し, 同モル濃度で比較した一次刺激性は, 1) SLS, 2) SL, 3) SLES の順であるとしている。ただこの場合, 発赤と浮腫の出現は SL がもっとも早い。これらの報告に使われた界面活性剤自体のアルキル基, アンル基の構造, 分子量などが違っていたり, pH などの試験条件も同一でない。我々が今回与え得た界面活性剤の障害性効果の順位を, これらの文献と照合することは出来ない。ただし高級脂肪酸石ケンについて, 我々の得た結果がこれら文献に報告されたヒトの障害性効果に比較してやゝ強く出ているが, 我々の試験条件がやゝ苛酷であったためと思われる。

B. モルモットの皮内注射試験

皮内注射による出血斑は, 注射後経時的に皮膚を剝離し, 出血斑の(面積×発赤の濃さ)から得られる数値そのものをスコアとした。面積は長径と短径を計測して mm² のデイメンジョンで求め, 濃さは 0~5 の範囲で相対的に採点した。なお対照の PBS (-) 溶液 0.05ml 注射部は, 本試験を通じて約 30 スポットに達したが, 24時間後のスコアはおよそ 1.0, 72時間および 120 時間後は 0 であった。1 群 2~3 匹での平均結果を図 10 に示す。

出血斑が経時的に縮小していくものは, SL, TL, SLSar., SLES, SLG であり, 出血斑が 72 時間後を頂点として出るものは, ABS, SLS であった。また SL では, PBS (-) 溶液より水溶液の場合に, 出血斑は強く現れた。これは浸漬試験において, SL 水溶液の皮膚障害性効果が, PBS (-) 溶液より強く現れたことと一致する。

出血斑の面積の大きいものは発赤も濃く, 面積のみ

表 6 モルモットに対する皮内注射試験

界面活性剤	溶媒	pH	平均スコア ^(※1)		
			^(※2)	^(※2)	^(※2)
			1 日	3 日	5 日
Na-Dodecylbenzenesulfonate	PBS (-)	7.2	18	34	4.5
Na-Lauryl sulfate	PBS (-)	7.2	10	34.5	11
Na-Laurylethersulfate (3EO)	PBS (-)	7.2	17	10	10
Na-Lauroyl sarcosinate	PBS (-)	7.2	39	34	14.5
Na-Laurate	PBS (-)	7.7	32.5	16	10
	Water	7.9	50	29	
Triethanolamine-Laurate	PBS (-)	7.4	19	6	2
Mono-Na-N-Lauroyl-L-glutamate	PBS (-)	7.2	3	0.5	
Control	PBS (-)	7.3	1	0	0

(※1) 0.1% 溶液, 0.05ml 皮内注射, 3 匹 3 スポットの平均スコア

(※2) 皮内注射後の日数

図 1 イオン交換水浸漬モルモットの組織像 ×200
軽度の角質層膨潤を示す, pH 6.8 40°C 1日4時間浸漬3日反覆 浸漬完了3日後組織採取 HE染色

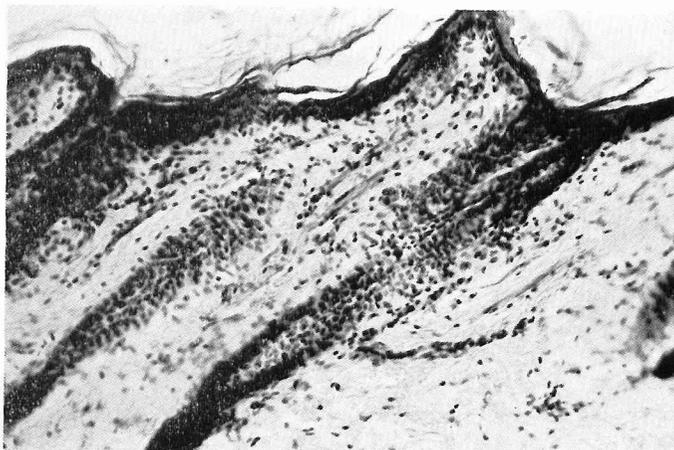


図 2 Na-DODECYLBENZENE SULFONATE 浸漬モルモットの組織像 ×200
強度の表皮肥厚, 有棘細胞内浮腫, 細胞浸潤とカリオレキシー, 中等度の不全角化と角質層離解を示す, 0.25% pH 6.7 40°C 1日4時間計7.5時間浸漬で死亡 直後組織採取 HE染色

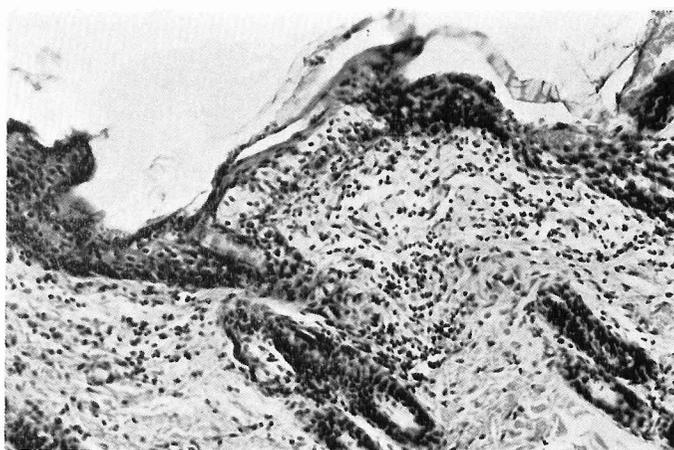
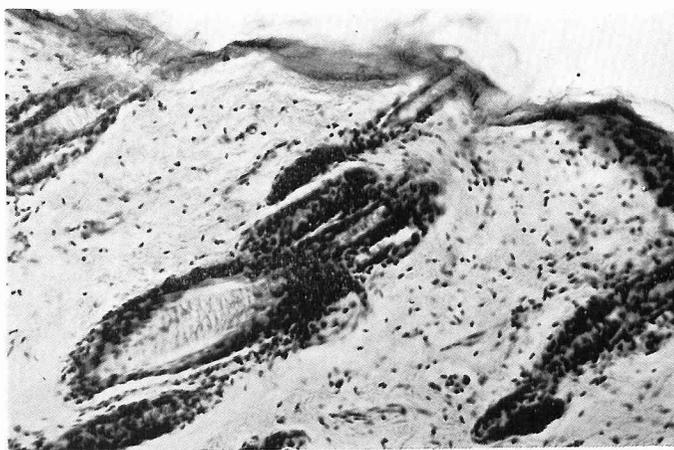


図 3 Na-LAURYL SULFATE 浸漬モルモットの組織像 ×200
強度の不全角化, 中等度の角質層肥厚および表皮と真皮の離解, 表皮細胞の膨化変性を示す, 0.25% pH 6.7 40°C 1日4時間計5時間浸漬で死亡 直後組織採取 HE染色



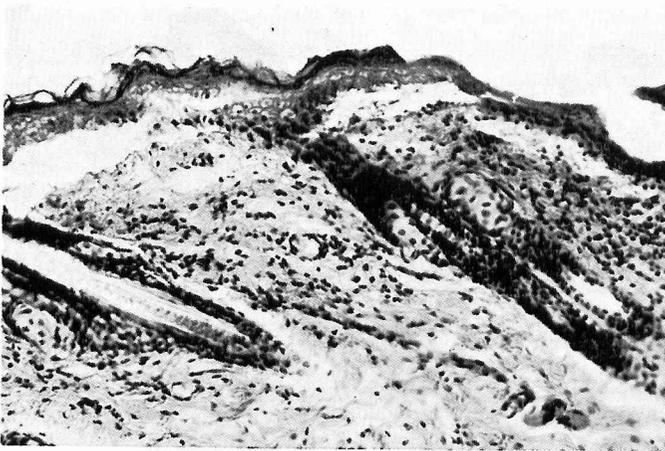


図 4 TRIETHANOLAMINE - LAURYL SULFATE 浸漬モルモットの組織像 ×200
強度の表皮細胞崩壊および細胞内浮腫, 表皮下水泡を示す, 0.25% pH 6.7 40°C 1日4時間計11.5時間浸漬で死亡 直後組織採取 HE染色

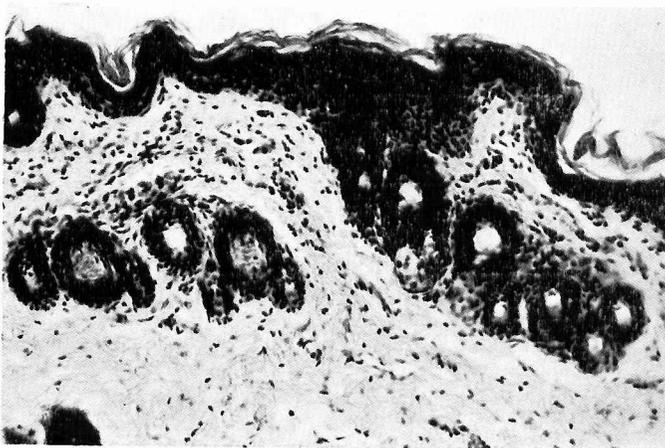


図 5 Na-LAURYLETHER SULFATE (3EO) 浸漬モルモットの組織像 ×200
軽度の有棘細胞内浮腫程度で変化は少ない, 0.25% pH 6.2 40°C 1日4時間浸漬3日反覆浸漬完了3日後組織採取 HE染色

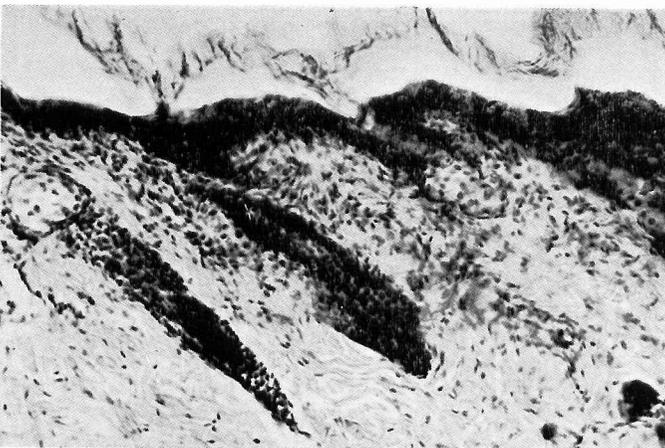


図 6 Na-N-LAUROYL SAR-COSINATE 浸漬モルモットの組織像 ×200
強度の不全角化と角質層肥厚を示す, 0.25% pH 6.47 40°C 1日4時間浸漬3日反覆浸漬完了3日後に組織採取 HE染色

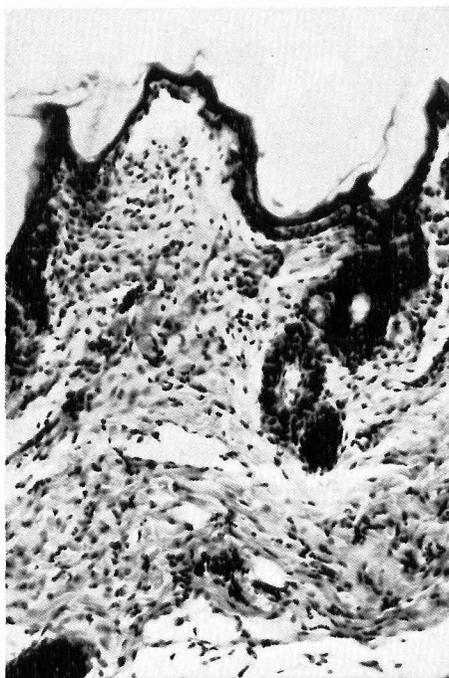


図 7 Na-LAURATE 浸漬モルモットの組織像 ×200

強度の真皮上層部カリオレキシーおよび細胞浸潤，血管拡張を示す，0.25% pH 8.1 40°C 1日4時間計8時間浸漬で死亡 直後組織採取 HE染色



図 8 TRIETHANOLAMINE-LAURATE 浸漬モルモットの組織像 ×200

強度の角質層肥厚と不全角化，表皮と真皮の離解およびカリオレキシーを示す，0.25% pH 7.4 40°C 1日4時間計11時間浸漬で死亡 直後組織採取 HE染色

で表した場合と順序は殆んど変りなかった。

スコアの最大値の順に結果を整理すると、

- 1) SL(Sar.), 2) ABS, SLS, 3) SL, 4) TL, SLES,
- 5) SLG の順となる。尚、ABS, SLS と SL の差は小さい。

IV. 考 按

陰イオン型界面活性剤の皮膚への影響、とくに障害性効果を試験する方法として、浸漬試験およびパッチテストがもっとも一般的におこなわれている⁶⁾。また手荒れを試験する方法としての指間滴加¹¹⁾なども、報告されている。陰イオン型界面活性剤の皮膚障害性効果を試験するに、どれがもっとも的確な方法であるか



図9 NOMO-Na-N-LAUROYL L-GLUTAMATE 浸漬モルモットの組織像 ×200
軽度の不全角化と角質層肥厚を示す, 0.25% pH 5.2 40°C 1日4時間浸漬3日反覆 浸漬完了3日後組織採取 HE染色

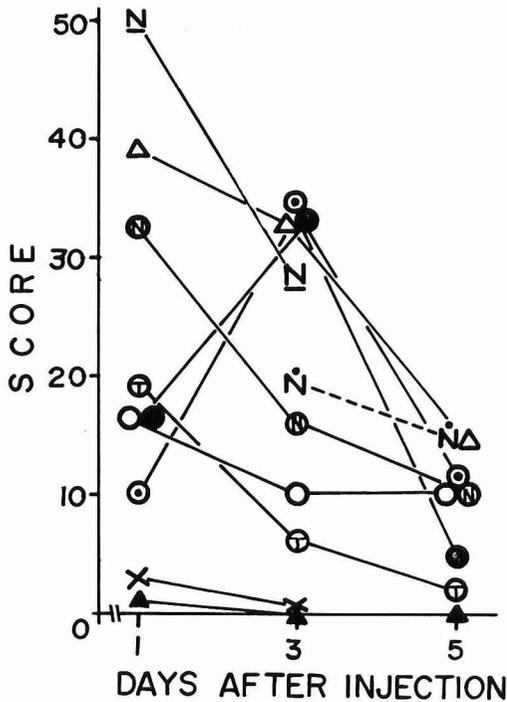


図10 モルモット皮内注射試験
0.1% PBS (-) 溶液
●: ABS, ◎: SLS, ○: SLES, △: SLSar.,
⊙: SL, N: SL 0.1% 水溶液, N̄: SL 0.01% 水溶液, ⊕: TL, ×: SLG, ▲: PBS(-) Control

は種々議論の分れるところで、一概に1つの方法に定めることは難しい。ただ入浴用をも含めて洗浄剤として使用されることの多い陰イオン型界面活性剤では、浸漬試験が選ぶべき試験法と云ってよいであろう。

外用界面活性剤の皮膚障害性効果は、界面活性剤の経皮浸透能と組織障害能の2つの因子に分けられる。浸漬試験では、この2因子の組合せ結果として障害性効果が現れる。しかし皮内注射法では、直接一定量の界面活性剤が皮内に注入されるので、経皮浸透能因子は関与せず組織障害能の大小のみが炎症の大小として現れる。皮内注射法は投与量を自由に変動出来るし、それに対応する皮膚炎症反応の有無と程度を窺うのにすぐれている。

培養細胞試験、浸漬試験、皮内注射試験などで、我々の得た陰イオン型界面活性剤の障害性効果の順位を、表7にまとめる。これら3種の試験による障害性効果の順位をみると、浸漬試験と皮内注射試験でSLS, ABS, SLが強く、TLS, TLが中位、SLES, SLGがもっとも弱い。ただ皮内注射試験では、SLSar.が特異的に強い効果を示した。培養細胞試験のPBS(-)溶液中では、ABS, SLSの効果が高く、TLS, SL, TLが中位、SLGがもっとも弱く、浸漬試験、皮内注射試験の結果とほぼ一致した。ただPBS(-)溶液中でSLESの効果が強くて出ていることが、浸漬試験、皮内注射試験のそれと異なっている。同じ培養細胞試験でも血清添加培養液中での試験では、以上に述べた3方法で障害性効果の強いABS, SLS, TLSなどが弱い効果を示した。この血清添加培養液中での

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 7 各試験法による障害性効果の強さの順位

試験法		順位 ^(※1)					
		1	2	3	4	5	6
培養細胞試験	PBS (-)	ABS	SLS SLES	TLS	SL	TL SLSar.	SLG
	血清添加 Eagle MEM	SLES	SL SLSar.	SLS	TL ABS TLS	SLG	
浸漬試験 ^(※2)		SL SLS ABS	TLS TL	SLSar.	SLES SLG		
皮内注射試験		SLSar.	ABS SLS	SL	TL SLES	SLG	

(※1) 1がもっとも強い (※2) pH無調節水溶液の結果

結果が他の方法と逆に出たのは、血清中のアルブミンとこれら界面活性剤との複合体形成によると考えられる。この複合体形成については詳細な研究がなされている¹²⁾。血清アルブミンに対し SLS が12モル, 52.5モル, 105モル結合した3種の複合体が確認されており、また SLS より ABS の方が、この複合体の結合定数が大きいことも報告されている。いずれにしても、陰イオン型界面活性剤の皮膚障害性効果を目的とした培養細胞試験法では、血清共存下でおこなうことはその効果が弱く現われ、適当でない。第I報で示した非イオン型界面活性剤の場合は、血清アルブミンの影響をうけることは少なかった。

陰イオン型界面活性剤の皮膚浸透性については、Blank ら¹³⁾は pH 8 以下では SL のヒト皮膚浸透性は大きく真皮層まで浸透し得ると、一方 ABS, SLS は通常条件下では真皮層までは浸透しない¹⁴⁾と報告している。この pH 中性付近での SL の皮膚浸透性の大きいことが、浸漬試験における SL の障害性効果の強い理由の一つと考える。SLSar. が皮内注射試験でのみ強い効果を示したのは、皮膚血管障害性効果の強いことが考えられる。また分子中に EO 鎖をもつ SLES が、PBS (-)、血清添加ともに培養細胞試験でのみ強い障害性効果を示したのは、血清アルブミンとの複合体形成が少なく、経皮浸透能もきわめて小さく、皮膚血管障害効果も強くないなどが考えられる。

V. 結 論

1) 市販陰イオン型界面活性剤8種について、ヒト

健常皮膚由来培養細胞株に対する細胞試験、モルモットでの浸漬試験、および皮内注射試験による皮膚障害性効果の有無とその程度を判定した。

3) その結果、以上述べた3方法による障害性効果順位はほぼ一致し、PBS (-) 溶液中での培養細胞試験が、陰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すぐれている。

本論文の要旨の一部は、第73回日本皮膚科学会学術大会(昭和49年4月12日、神戸)にて発表した。

文 献

- 1) 小西宏明, 井上佳子, 安藤寛治: 培養細胞に対する界面活性剤の障害作用の研究. 日皮会誌, 81: 881, 1971 (第70回日本皮膚科学会総会口演抄録)
- 2) 小西宏明, 井上佳子, 安藤寛治, 小林正久, 徳田安章, 高瀬吉雄: 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. 信州医誌, 25 (No.3): 246-258, 1977
- 3) Furuyama, J., Mori, Y. and Kikkawa, H.: A male bearing XX sex chromosome constitution in human, 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) Opdyke, D. L. and Burnett, C. M. : Practical problems in the evaluation of the safety of cosmetics, Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc., 44 : 3-4, 1965
- 6) 石原 勝 : 洗剤, 特に界面活性剤と皮膚障害. 皮臨床, 10 : 193-200, 1968より引用
- 7) Peukert, L. : Hautverträglichkeit von Waschrohstoffen und Waschpulvern, Fette Seifen Anst., 52 : 415-419, 1950
- 8) Brown, V. K. H. : A comparison of predictive irritation tests with surfactants on human and animal skin, J. Soc. Cosmet. Chem., 22 : 411-420, 1971
- 9) Okamoto, K. : The selection of mild surfactants for the skin, Am. Cosmet. Perfumary, 87 : 76, 1972
- 10) Prottey, C. and Ferguson, T. : Factors which determine the skin irritation potential of soaps and detergents, J. Soc. Cosmet. Chem., 26 : 29-46, 1975
- 11) 伊藤知男, 国弘和雄, 林 静男, 刈米孝夫 : 界面活性剤水溶液により生ずる手荒れの評価法. Journal. J. C. C. A., 5 : 18-22, 1966
- 12) 青木幸一郎 : 綜説. 界面活性剤とタンパク質の相互作用. 油化学, 17 : 184-192, 1968
- 13) Blank, H. and Gould, E. : Penetration of anionic surfactants into skin. III. Penetration from buffered sodium laurate solution, J. Invest. Derm., 37 : 485-488, 1961
- 14) Blank, H. and Gould, E. : Penetration of anionic surfactants into skin. I. Study of mechanisms which impede the penetration of synthetic anionic surfactants into skin, J. Invest. Derm., 37 : 311-315, 1961

(52. 5. 20 受稿)