

培養皮膚モデルを用いた界面活性剤の 皮膚一次刺激性の評価

内田 恵美子, 筏 義 人*

(奈良教育大学教育学部, *奈良県立医科大学大和ハウス住居医学寄附講座)

原稿受付平成 18 年 10 月 27 日; 原稿受理平成 19 年 3 月 3 日

Evaluation of Primary Skin Irritation of Surfactants with the Cultured Skin Model

Emiko UCHIDA and Yoshito IKADA*

Faculty of Education, Nara University of Education, Nara 630-8528

*Department of Indoor Environmental Medicine, Nara Medical University, Kashihara 634-8521

It is important to assess the safety of clothes that are used in contact with human skin. In this study the level of primary skin irritation against various surfactants applied to clothes was evaluated using a cultured skin model. The irritation of anionic surfactants depended on the number of carbons in the alkyl substituent. When the number of carbons was in the range from 9 to 12, the surfactants showed positive in the irritation at concentrations higher than 0.5 wt%. However, the anionic surfactants with carbon numbers lower than 9 or higher than 12 showed negative even at concentrations as large as 1 wt%. The cell viability of nonionic surfactants containing poly(ethylene oxide) chains was dependent on the number of chains. The surfactants containing few chains or many carbons showed negative in the irritation assay, while those containing a certain number of chains and the carbon numbers around 10 showed highly positive at concentrations higher than 0.1 wt%. The irritation of quaternary ammonium salts, which are cationic surfactants, showed positive even at low concentrations, regardless of the number of carbons in the alkyl group.

(Received October 27, 2006; Accepted in revised form March 3, 2007)

Keywords: primary skin irritation 皮膚一次刺激性, surfactants 界面活性剤, cultured skin model 培養皮膚モデル, assessment safety 安全性評価, cell viability 細胞生存率.

1. 緒 言

衣料にとって、人体の生理機能や運動機能を補助し、着心地の良い素材であることと同時に大変重要な要素は人体への安全性である。とりわけ、皮膚と直接接する頻度の高い衣料にとって接触皮膚障害への安全確認は欠かせない。現在、反応染料や仕上げ加工剤、残留洗剤などによる接触皮膚炎が多く報告されており^{1)~4)}、一部には職業病として認定されているものもある。それにもかかわらず、これまで衣料の接触皮膚障害に関する基礎研究はほとんど行われていない。その理由の一つは、安全性の確認方法が煩雑で難しいことである。これまで、民間レベルで皮膚に接する商品の皮膚安全性を自主的に事前評価するために「日本

産業皮膚衛生協会（日皮協）」が設立され、河合氏が考案した河合法⁵⁾と呼ばれるヒトテストやパッチテストなどで評価し、皮膚障害事故防止に努めてきた。これらはヒトを被験者とするため、一定数以上の被験者の確保が難しく、被験者間のデータのばらつきが大きいなどの問題点を抱えている。したがって、より簡単に短時間で、試験結果のばらつきの少ない判定法が求められ、漸く、2005年に細胞培養技術の進歩によって正常ヒト細胞を用いた皮膚に近似した構造をもつ三次元培養皮膚モデルによる試験法が開発され、JIS化された⁶⁾。そこで、われわれはこの方法の元となった繊維製品新機能評価協議会の皮膚化学試験法⁷⁾（暫定法）に準拠して、現在、一般家庭で衣料に使われてい

る代表的な化学物質であり、洗剤や柔軟剤の主成分である界面活性剤の皮膚一次刺激性の評価をめざし、三次元培養皮膚モデルを用いて、まず、界面活性剤そのものの皮膚刺激性を検討した。その結果を報告する。

2. 実験方法

ここでは、安全基準の基礎データとして、界面活性剤を吸着させた繊維の刺激性ではなく、まず、分子量や化学構造の異なる各種界面活性剤そのものの皮膚一次刺激性の検討を行った。

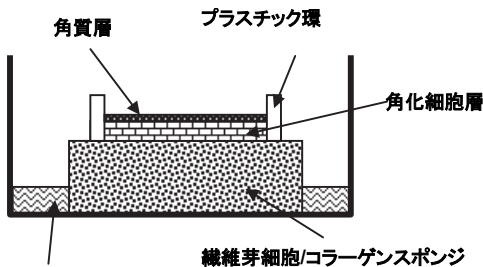
(1) 試料および試薬

培養皮膚モデルにはグンゼ株式会社から提供されたヒト由来の皮膚角化細胞と皮膚繊維芽細胞から構成されている三次元培養皮膚モデルを用いた⁸⁾。その構造を図1に示す。プラスチック環は皮膚モデルの把持および被験物質添加時の受け皿として使用した。被験物質はいずれも市販薬剤をそのまま用いた。陰イオン界面活性剤として、化学構造の異なる脂肪酸塩 (Soap)、高級アルコール硫酸エステル塩 (AS) および直鎖ア

ルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) を用いた。これらを表1に示す。非イオン界面活性剤として、ポリエチレングリコール誘導体である高級アルコールエチレンオキシド付加物 (AE) とアルキルフェノールエチレンオキシド付加物 (APE) を用いた。APE は非イオン界面活性剤の中では生分解性も高く、最も洗浄剤として重要視されている。陽イオン界面活性剤としては、化学構造の異なる4種類のアルキルトリメチルアンモニウム塩を用いた。これらは通常イソプロパノールやメチルアルコールに混合して使われ、柔軟加工剤やヘアリンスが主用途である。殺菌性や消毒剤としての用途もある。これらを表2, 3に示す。

(2) 皮膚一次刺激性試験

採用した皮膚一次刺激性試験方法は暫定法に若干の改良を加えた方法で行った。すなわち、その原理は、被験物質を皮膚モデルに一定時間作用させた後の細胞生存率を MTT 法⁹⁾により測定し、皮膚一次刺激性を予測するものである。MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) は真核細胞のミトコンドリア内の脱水素酵素の基質となり、その作用を受けて青紫色のホルマザン色素を生成する。細胞によるホルマザン色素の生成は生きた細胞の数に比例する^{10)~12)}。ホルマザン色素は吸光度によって定量する。各濃度の被験物質水溶液を 50 μ l ずつ皮膚モデルに添加し、CO₂インキュベーターにて 37°C、5% CO₂の条件下で 24 時間培養後、皮膚モデル表面に残存する添加物をリン酸緩衝液を用いて洗浄する。その後、これらの皮膚モデルを MTT 溶液に浸漬し、37°C、5% CO₂条件下で再び 3 時間培養し、生細胞を染色する。色素の抽出は皮膚モデルの中心部分を 6



培養液(またはゼラチンゲル)

図1. 三次元培養皮膚モデルの構造

表1. 陰イオン界面活性剤

界面活性剤の種類	分子式	略称	分子量	製造会社名・級
脂肪酸塩 (RCOONa)	C ₉ H ₁₉ COONa	Soap-10	194.3	東京化成工業 1級
	C ₁₁ H ₂₃ COONa	Soap-12	222.3	和光純薬工業 1級
	C ₁₃ H ₂₇ COONa	Soap-14	250.3	和光純薬工業 1級
	C ₁₅ H ₃₁ COONa	Soap-16	278.7	東京化成工業 1級
硫酸エステル塩 高級アルコール硫酸エステル塩 (ROSO ₃ Na)	C ₁₂ H ₂₅ OSO ₃ Na	AS-12	288.0	和光純薬工業 1級
	C ₁₆ H ₃₃ OSO ₃ Na	AS-16	344.5	東京化成工業
スルホン酸塩 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (RC ₆ H ₄ SO ₃ Na)	C ₉ H ₁₉ C ₆ H ₄ SO ₃ Na	LAS-9	306.4	ナカライテスク 特級
	C ₁₂ H ₂₅ C ₆ H ₄ SO ₃ Na	LAS-12	348.5	和光純薬工業 1級
	C ₁₄ H ₂₉ C ₆ H ₄ SO ₃ Na	LAS-14	376.5	ナカライテスク 特級

表2. 非イオン界面活性剤

界面活性剤の種類	分子式	略称	分子量	製造会社名・級
高級アルコールエチレンオキシド付加物 (RO(CH ₂ CH ₂ O) _n H)	C ₁₂ H ₂₆ O(CH ₂ CH ₂ O) ₉ H	AE-12 ₉	585	ナカライテスク 特級
	C ₁₆ H ₃₃ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂₀ H	AE-16 ₂₀	1,154	ナカライテスク 1級
アルキルフェノールエチレンオキシド付加物 (RC ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) _n H)	C ₈ H ₁₇ C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) ₁₀ H	APE-8 ₁₀	646	ナカライテスク 特級
	C ₉ H ₁₉ C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ H	APE-9 ₂	308	東京化成工業
	C ₉ H ₁₉ C ₆ H ₄ O(CH ₂ CH ₂ O) ₁₀ H	APE-9 ₁₀	659	東京化成工業

表3. 陽イオン界面活性剤

界面活性剤の種類	分子式	略称	分子量	製造会社名・級
アルキルトリメチルアンモニウム塩 RN(CH ₃) ₃ Br, Cl	C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃ Br	LTAB	308.4	ナカライテスク 1級
	C ₁₀ H ₂₁ N(CH ₃) ₃ Cl	DTAC	235.8	東京化成工業 1級
	C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃ Cl	LTAC	263.9	東京化成工業 1級
	C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃ Cl	HTAC	320.0	東京化成工業 1級

mm のポンチで打ち抜き、抽出溶媒液（イソプロピルアルコールに 1/100 容量の 4 N 塩酸を添加したもの）と抽出補助剤（10 wt% 濃度ラウリル硫酸ナトリウム水溶液）でホルマザン色素を抽出する。抽出は室温暗所にて 24 時間以内に行う。抽出液の 570 nm における吸光度をダブルビーム分光光度計（日立ハイテクノロジー U-2800 形）にて測定する。測定は 1 条件について $n=3$ で行った。細胞生存率は次式から算出した。

$$\text{細胞生存率}(\%) = (A_1 - b_1) / (A_2 - b_1) \times 100 \quad (1)$$

ここで、 A_1 は被験物質を添加した組織片から抽出した液の吸光度、 A_2 は被験物質を添加していない空組織片から抽出した液の吸光度、 b_1 は抽出溶媒の吸光度である。

皮膚への一次刺激性は暫定法に則り、24 時間培養試験の細胞生存率が 50.0% 未満を陽性、50.0% 以上、80.0% 未満を弱陽性、80.0% 以上を陰性に分類した。

3. 結果

(1) 陰イオン界面活性剤の細胞生存率

図 2 はアルキル基の炭素数の異なる Soap (Soap-10, Soap-12, Soap-14, Soap-16) の添加濃度と細胞生存率の関係を示したものである。Soap-10 と Soap-12 は常温で水に溶解するが、Soap-14 と Soap-16 は白濁する。そのため、加熱溶解の後、37°C で攪拌分散して、すぐに細胞へ添加した。Soap-10 と Soap-12 では添加

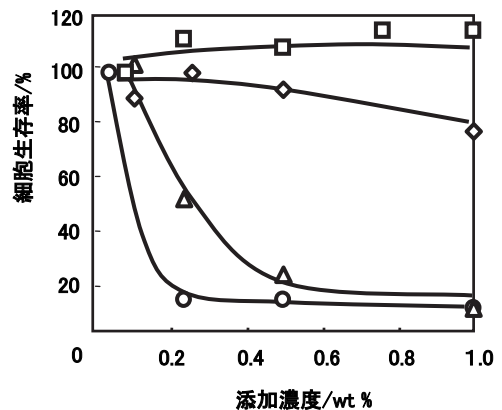


図2. 炭素数の異なる Soap の細胞生存率

○: Soap-10, △: Soap-12, ◇: Soap-14, □: Soap-16.

濃度が 0.5 wt% 以上で細胞生存率は 20% 以下であるが、Soap-14 と Soap-16 では添加濃度が 1 wt% でも細胞生存率は 80% 以上で、分子量が大きいほど皮膚一次刺激性が小さい。図 3 はアルキル基の炭素数の異なる AS (AS-12, AS-16) の添加濃度と細胞生存率の関係を示している。アルキル基の炭素数が 16 のものは細胞生存率が高く、皮膚一次刺激性が弱い。洗剤として最もよく使われている AS-12 では添加濃度が 0.15 wt% で細胞生存率は 10% 以下となった。図 4 はアルキル基の炭素数の異なる LAS (LAS-9, LAS-12, LAS-14) の添加濃度が細胞生存率に与える影響を示している。LAS-9 と LAS-12 の皮膚刺激性はほとんど

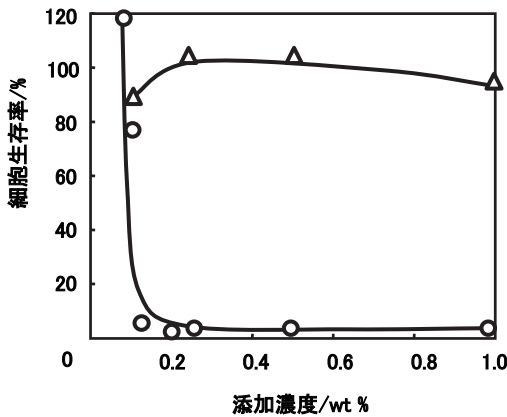


図3. 炭素数の異なる AS の細胞生存率
○ : AS-12, △ : AS-16.

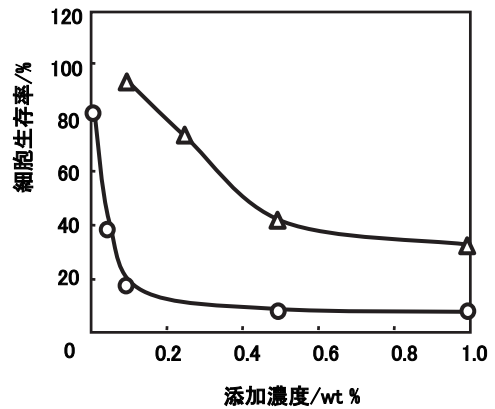


図5. AE の細胞生存率
○ : AE-12₉, △ : AE-16₂₀.

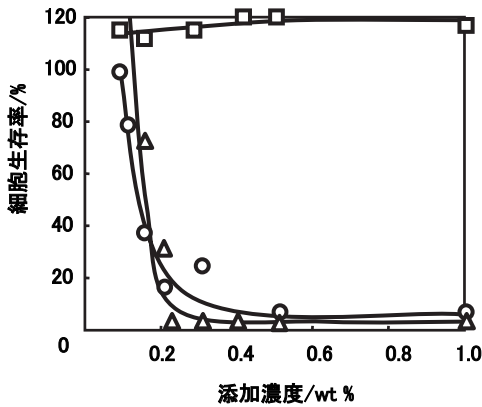


図4. 炭素数の異なる LAS の細胞生存率
○ : LAS-9, △ : LAS-12, □ : LAS-14.

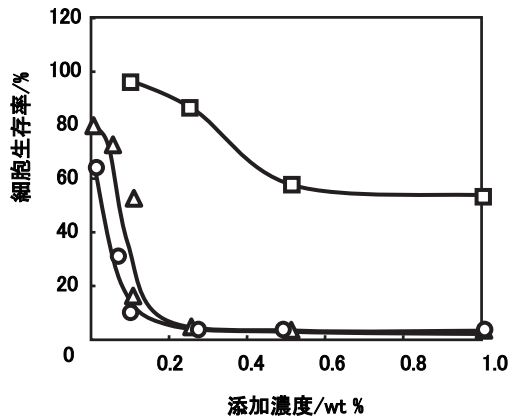


図6. APE の細胞生存率
○ : APE-8₁₀, △ : APE-9₂, □ : APE-9₁₀.

同じであるが、LAS-14 の場合、1 wt%以下の濃度では細胞生存率は100%以上であり、皮膚一次刺激性は陰性である。

(2) 非イオン界面活性剤の細胞生存率

図5はAE (AE-12₉, AE-16₂₀) の細胞生存率を示したもので、AE-12₉では添加濃度が0.1 wt%での生存率は20%以下となっている。AE-16₂₀では添加濃度が1 wt%でも細胞生存率は40%であり、分子量の大きいほど細胞生存率は高い。これらは皮膚に接触した時点では水に溶解した状態であった。図6はAPE (APE-8₁₀, APE-9₂, APE-9₁₀) の細胞生存率を示している。アルキル基の炭素数が同じ9であっても、エチレンオキシドの付加数によって細胞生存率は大きく異なる。エチレンオキシドの付加数の少ないAPE-9₂の

ほうが細胞生存率は大きく、添加濃度が1 wt%でも50%以上の生存率を示しており、皮膚一次刺激性は弱陽性である。また、エチレンオキシドの付加数が同じAPE-8₁₀とAPE-9₁₀での細胞生存率はほぼ等しく、添加濃度が0.1 wt%で細胞生存率は20%以下となり、0.2 wt%以上では細胞生存率は10%以下となった。すなわち、この場合もエチレンオキシドの付加数の影響が大きい。エチレンオキシドの付加数が少ないと水への溶解性が小さくなり、液は白濁している。

(3) 陽イオン界面活性剤の細胞生存率

図7は陽イオン界面活性剤であるアルキルトリメチルアンモニウム塩の細胞生存率を示している。炭素数の異なるアルキルトリメチルアンモニウムクロライド (DTAC, LTAC, HTAC) では炭素数が12の場合が

最も生存率が小さいが、アルキル基の炭素数が10から16になっても細胞生存率に大きな差はない。ラウリルトリメチルアンモニウム塩 (LTACとLTAB) ではClイオンとBrイオンでの細胞生存率の違いは見られなかった。

4. 考 察

三種類の陰イオン界面活性剤の結果 (図2~4) を重ね合わせてみると、いずれの活性剤でも細胞生存率は親水性部分の化学構造にかかわらず、炭化水素鎖の炭素数によって大きく異なることがわかる。すなわち、炭素の数が9から12までは添加濃度が0.2 wt%で細胞生存率は50%以下であり、皮膚刺激性は陽性を示した。炭素数が14から16では1 wt%の添加濃度でも細胞生存率は80%以上であり、皮膚刺激性は陰性を示している。炭化水素鎖に続く親水基の化学構造の違いも若干見受けられ、ASやLASはSoapと比べて、皮膚刺激性が強く、添加濃度が0.2 wt%ですでに細胞生存率は20%以下となっている。この傾向は芋川らの足底ケラチン (たんぱく質モデル) への種々の陰イオン界面活性剤の吸着と肌荒れ強度との関係を調べた研究¹³⁾の結果ともよく一致している。さらに、彼らは皮膚荒れがアルキル鎖長の影響を受けるのと同様に吸着もまたアルキル鎖長の影響を受けると述べている。この吸着力はAS>LASの順に大きく、ひとつの可能性として、界面活性剤が徐々に角質層の変性を起こし、角質の水分保持機能の著しい減少を導くものであろうとも述べている。また、界面活性剤の刺激性を累積刺激性テスト、パッチテスト、浸漬刺激性テストから検

討した宮澤ら¹⁴⁾も、界面活性剤が角質へ収着残留し、角質を変性させることが浸漬刺激性の重要な原因のひとつと考え、皮膚刺激性の評価には累積刺激性テストやパッチテストだけでは不十分であると述べている。Soapでは炭素数が12から18のものが、LASでは炭素数10から14のものが洗浄に優れているといわれており¹⁵⁾、衣類の洗浄剤として使われているが、炭素数10~12は比較的皮膚一次刺激性も強い。

非イオン界面活性剤の結果 (図5, 6) をまとめてみると、陰イオン界面活性剤と同様に、細胞生存率はアルキル基の炭素数に依存しているが、エチレンオキシドの付加数によっても細胞生存率が大きく異なっている。すなわち、付加数が9, 10のときの細胞生存率は付加数が2の場合より小さい。芋川らの研究¹³⁾でも、エチレンオキシド付加モル数が増えるほど吸着量は少なくなる傾向が示されている。これは付加数が2のときの水への溶解性が影響していると考えられる。

陽イオン界面活性剤では、陰イオンや非イオン界面活性剤で皮膚一次刺激性が陰性であったアルキル基の炭素数が16であっても、低い細胞生存率を示し、皮膚一次刺激性は陽性となった。この細胞生存率の低さは、4級アンモニウム塩の殺菌性や消毒効果などの作用¹⁶⁾との関連性から、今後検討していくことが望まれる。

5. ま と め

① 陰イオン界面活性剤の皮膚一次刺激性はアルキル基の炭素数に大きく依存しており、炭素数が9から12の範囲では添加濃度が0.5 wt%以上で陽性を示すが、炭素数が少ない場合や14以上では添加濃度が1 wt%であっても細胞生存率は80%以上であり、陰性を示す。これらの皮膚一次刺激性は界面活性剤の水への溶解性が大きく関係しており、溶解性が高いほど皮膚への浸透が高く陰性を示すといえる。

② エチレンオキシド付加物からなる非イオン界面活性剤では細胞生存率はエチレンオキシドの付加数にも大きく依存しており、付加数の少ない場合や、アルキル基の炭素数の大きい場合は皮膚刺激性が弱くなる。適度な付加数を持ち、アルキル基の炭素数が10前後のとき、添加濃度が0.1 wt%以上で細胞生存率は20%以下となり、皮膚一次刺激性は陽性を示す。

③ 陽イオン界面活性剤である4級アンモニウム塩では、アルキル基の炭素数にかかわらず、低濃度の被験物質でも細胞生存率が小さく、皮膚一次刺激性は陽

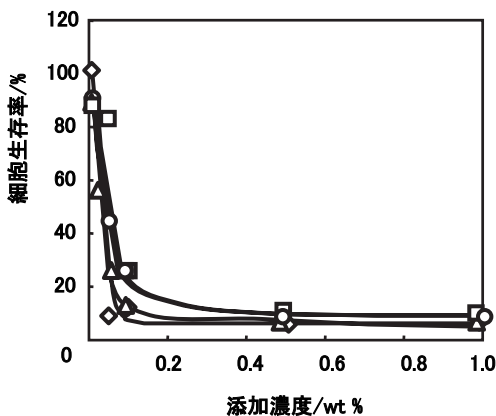


図7. 陽イオン界面活性剤の細胞生存率

○: DTAC, △: LTAC, □: HTAC, ◇: LTAB.

性を示す。

これらの結果は他の試験法による界面活性剤と皮膚刺激性の結果と良い一致を示し、三次元培養皮膚を用いたこの試験法は皮膚刺激性を評価する有効な手法の一つと考え、今後、さらに、条件を精査し、布に吸着した薬剤での研究を深めてゆく予定である。

本研究を進めるにあたり培養皮膚をご提供いただきましたグンゼ株式会社開発研究部ならびに安全性試験法をご指導いただいた森川訓行氏に厚く御礼を申し上げます。

なお、本研究は平成15年度から17年度科学研究費補助金基盤研究(C)課題番号15500512によって行われた研究の一部である。

引用文献

- Hatch, K. L., Motschi, H., and Maibach, H. I.: Disperse Dyes in Fabrics of Patients Patch-Test-Positive to Disperse Dyes, *Am. J. Contact Dermat.*, **14**, 205-215 (2003)
- Giusti, F., Mantovani, L., Martella, A., and Seidenari, S.: Hand Dermatitis as an Unsuspected Presentation of Textile Dye Contact Sensitivity, *Contact Dermatitis*, **47**, 91-95 (2002)
- Metzler-Brenckle, L., and Rietschel, R. L.: Patch Testing for Permanent-Press Allergic Contact Dermatitis, *Contact Dermatitis*, **46**, 33-37 (2002)
- Kiriyama, T., Sugiura, H., and Uehara, M.: Residual Washing Detergent in Cotton Clothes: A Factor of Winter Deterioration of Dry Skin in Atopic Dermatitis, *J. Dermatol.*, **30**, 708-712 (2003)
- Kawai, K.: Evaluation of Skin Patch Tests Using Sump Method, *J. Dermatol.*, **2**, 19-26 (1975)
- 日本規格協会：『JIS L1918 繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法—培養ヒト皮膚モデル法—』(2005)
- 繊維製品新機能評価協議会：『皮膚化学刺激性試験方法の中間報告』(2001)
- 諸田勝保：三次元培養皮膚モデル，組織培養工学，**24**，156-159 (1998)
- Morota, K., Morikawa, N., Morota, S., Kojima, H., and Konisi, H.: Development and Evaluation of the Culture Skin Model, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, **17**, 87-93 (1998)
- Mosmann, T.: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983)
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofzger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M. R.: Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Res.*, **48**, 4827-4833 (1988)
- 鈴木文男：『テトラゾリウム塩を用いた毒性試験法 [MTT法]』，動物実験代替法マニュアル，東京，共立出版，51-61 (1994)
- 芋川玄爾，植村啓子，葛見 衛：足底ケラチン粉末に対する界面活性剤の吸着と肌荒れとの相関性，油化学，**23**，17-23 (1974)
- 宮澤 清，田村宇平，勝村芳雄，内川恵一，坂本哲夫，富田健一：頭皮・頭髮洗剤としてのアニオン界面活性剤の研究，油化学，**38**，297-305 (1989)
- 鈴木 洋：『界面と界面活性物質』，産業図書，東京，95-112 (1990)
- 井上嘉幸：『抗菌防臭』，繊維社，大阪，57-99 (1989)