総 説

化粧品に用いる界面活性剤の
安全試験代替法

林 俊克・板垣 宏

(株)資生堂研究開発本部第一リサーチセンター
(〒223 横浜市港北区新羽町 1050) The Alternatives to Animal Testing for Safety Assessment
of Cosmetic Surfactants

Toshikatsu HAYASHI and Hiroshi ITAGAKI

Research & Development Headquarters

Shiseido Research Center 1

(1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama-shi, 〒223)

Abstract : Recently, the development of alternatives to animal testing has become one of the most important issues in the field of safety assessment of cosmetic ingredients, especially surfactants. In this review, both general concept and current status of alternatives are described. Also, the hemoglobin denaturation (HDR) test, one of the *in vitro* methods we developed, is explained in detail as an example. HDR test has been systemically studied from various aspects and has developed as an alternative to Draize eye irritation test. The advantages of HDR test are high reproducibility as well as an easy handling without aseptic operation. Factorial analysis on the data obtained from the *in vivo* test and several *in vitro* tests suggested a battery system, the useful combination of *in vitro* methods based on different mechanisms, for the purpose of predicting eye irritancy. Furthermore, quantitative structure-activity relationship for surfactants was investigated to discuss eye irritancy predicted by HDR test. In the near future, the necessity of development of *in vitro* methods will be increased as seen in eye irritation test.

Key words : surfactants, safety assessment, animal testing, alternatives

1 はじめに

近年、「動物実験代替法 (Alternatives to animal testing)」という言葉が社会に広く知られるところとなってきた。もちろん、その理由の一つには動物愛護運動も挙げられる。しかし、企業においては、動物愛護の精神は既に当然のこととし、さらに研究開発のコストの低減を目的に化学物質の薬理効果や毒性のスクリーニング法の開発をかなり早期から実施してきたということが事実であろう。例えば弊社では、1986年には「タンパク結合性により感作性を評価する方法」について日本化粧品科学会で報告している¹⁾、その後は同学会の他、日本動物実験代替法学会、日本毒科学会、さらには国際的な毒科学会や代替法学会でも成果の一部を継続し

連絡者：林 俊克

て報告している²⁾。

動物実験代替法という言葉は、油化学の分野ではなじみが浅いと考えられるので、始めに動物実験代替法の考え方について紹介する。次に化粧品の安全性試験代替法の現状について弊社の例を中心に紹介し、さらに我々が開発したヘモグロビン変性試験を例として、動物実験代替法による界面活性剤の安全性評価について記述する。

2 動物実験代替法の考え方

「動物実験代替法」という単語自身には「動物を全く用いない試験法」というニュアンスが含まれるが、現在世界的に受け入れられている「動物実験代替法」の概念としては次に示す“3R”が一般的である²⁾。すなわち、Replacement (完全に動物を用いない方法)、Reduction (動物実験に使用する動物数の削減)、Refinement

(実験で動物が受ける苦痛の軽減)である。動物福祉の観点から、最終的には Replacement を目指すことが望ましいことではあるが、*in vivo* の動物実験のすべての局面を完全に *in vitro* 試験法で再現することは決して容易なことではない。したがって、段階的に少しでも動物福祉を進めようという視点から提唱されているのが、Reduction であり、不必要な動物実験を止め、より少ない動物数で評価できるような試験法を確立しようという努力が進められている。また、現在の科学水準では動物を用いる試験が必要不可欠な場合においても、動物実験代替法の一環の Refinement として実験動物が感じる苦痛をより和らげる検討が行われている。

ここで、代替されるべき目標となっている動物試験について考えてみることは、*in vitro* 試験法を理解するうえで重要である。安全性試験における動物実験の主目的が、化学物質のヒトに対する安全性の外挿や予測であるため、日常試験のレベルでは、ヒトへの適用に対応するような実験を設定し、得られた結果を安全係数等をもとに評価するのが一般的と思われる。つまり、動物に生ずる反応は、様々なプロセスを経た最終的な結果故に、日常試験のレベルでは特殊な場合を除き、化学物質の生体内動態や毒性発現の機構的な考察はあまり大きな比重をもって考えられない傾向にあると考えられる。

一方、*in vitro* 試験法では、通常、複雑な *in vivo* 試験の一部を限定された条件下で示しているに過ぎないため、信頼に足る動物実験代替法たるためには *in vivo* 試験のどのようなメカニズムを再現しているのかを明確にする必要がある。さらに、実際の評価系としては、生体で生じる主反応を再構築すべく複数の異なるメカニズムを持った試験法を組み合わせ、バッテリーシステム (Battery system) という形が必要となってくる。

安全性試験の代替法の場合、*in vitro* 試験法がガイドライン等に採用されるためには、施設間バリデーション (Validation) が必要である。これは、評価すべき試験法が、多くの試験施設において施設間の再現性が高いこと、かつその結果がヒトに対する作用を外挿するのに十分なほど予知性が高いことを証明する作業である。現在、この施設間バリデーションは、最も先行している眼刺激性試験代替法に関して、厚生科学研究班 (厚生省、国立衛生試験所が主管)^{3),4)}、日本動物実験代替法学会 (JSAAE)⁵⁾、欧州代替法評価センター (ECVAM)⁶⁾ 及び欧州化粧品工業会 (COLIPA) 等で行われている。今後、これらのバリデーションの結果が発表され、場合によっては、国際的なハーモナイゼーションも必要となるとと思われる。さらに、安全性試験代替法がガイドライン等に採用されるためには、ある程度の制約と決断が要求されることから、まだ多くの時間を要するものと思われる。

3 化粧品の安全性試験代替法の現状

化粧品に用いる界面活性剤の安全性については、これまで多くの場合、主として実験動物を用いた方法で検討されてきた。新原料を配合した化粧品の申請時に添付すべき安全性資料の範囲を Table 1 に示すが、原料レベルと製品レベルでの違いこそあれ、実験動物を用いた安全性評価方法が求められている⁷⁾。よって、これらの試験法の多くが代替すべき試験法となりうる。一方、代替法はただ 1 研究機関で完成されればそれだけで完成するという性質のものではないため、それぞれの試験法は段階に応じて様々な開発ステージにある。以下に化粧品の安全性試験代替法に関する現在の状況について、各試験法ごとに弊社の開発状況を中心に詳述する。

3.1 眼刺激性試験

眼刺激性試験については実用段階に到達していると考えられる。弊社でも眼刺激性試験代替法の開発には積極的に取り組み、「角膜脂質リポソームによる試験法」^{8)~11)}、「クリスタルバイオレット (CV) 法による細胞毒性試験」¹²⁾、「トリパンブルー染色による鶏卵しょう (漿) 尿膜 (CAM) 試験」^{13),14)} 及び「ヘモグロビン変性試験」^{15)~18)} について報告している。

角膜脂質リポソームによる試験法は脂質を用いて疑似細胞膜を作り、化学物質による膜破壊を蛍光物質の漏出により評価する方法である^{8)~11)}。CV 法はクリスタルバイオレットが生着細胞のタンパク質に結合する性質を利用した細胞毒性試験法であり、他の細胞毒性試験より操作が簡単で、同程度の相関性で眼刺激性を予測することが可能であるため、日常試験として優れた特徴がある¹²⁾。トリパンブルー染色を用いた CAM 試験は、被験物質による鶏卵漿尿膜の傷害をトリパンブルーを用いて定量的に評価し、眼刺激性の予測試験として応用したものである^{13),14)}。この CAM 試験は被験物質の性状に影響されず、再現性良く眼刺激性を予測できるため、非水溶性物質に対しても適用が可能であり、また原料原体、製品形態への応用も可能な汎用性の高い方法と考えられている^{13),14),19)~23)}。ヘモグロビン変性試験は被験物質のタンパク変性を、ヘモグロビンの吸光度の変化を測定することにより評価する方法であり、機構的に異なる因子による眼刺激性はとらえられない^{17),18),24)}。しかし、通常、強い眼刺激性を有する化学物質はタンパク変性を伴うことが多いため、ヘモグロビン変性試験は、強い眼刺激性物質に対するスクリーニング試験として、またバッテリーシステムの一部として評価系の構築に役立つと考えられる¹⁸⁾。さらに、培養等の無菌操作に伴う特別の設備や技術が必要でないため、誰でも簡単に実施できるという長所を有し、油化学の関係分野では導入しやすい試験法と考えられる。なお、本内容につい

Table 1 Safety Data Required for Application of Cosmetics Containing New Raw Materials.

Test item	Ingredients	Products
1. Acute toxicity	Required	Case by case ^{a)}
2. Primary skin irritation	Required	Not required
3. Cumulative skin irritation	Required	Not required
4. Sensitization	Required	Not required
5. Phototoxicity	Required ^{b)}	Not required
6. Photosensitization	Required ^{c)}	Not required
7. Eye irritation	Required	Required ^{d)}
8. Mutagenicity	Required	Not required
9. Human patch test	Required	Required ^{e)}

Notes :

a) Execute test when LD₅₀ of target new material is 2 g/kg or less. However, the test is not required when the product is assumed to be safe in consideration of the amounts formulated.

b),c) Not required for material with no UV absorption.

d) Not required when irritation responses of cornea and iris are not observed and also chance of exposure to eye is low.

e) Not required for products that are rinsed off.

When it is necessary to take great care about toxicity of new materials including bactericides, preservatives, antioxidants, chelating agents, UV absorbents and coal-tar dyes, it may be necessary to add data about subacute toxicity testing, chronic toxicity testing, reproductive toxicity testing, absorption, distribution, metabolism and excretion testing, etc.

ては次章で詳述する。これらの試験法の多くはすでに社内的なスクリーニング試験として原料の安全性評価に活用されているに留まらず、化粧品原料の眼刺激性試験に関する薬事申請を *in vitro* 試験で置き換えることを目標とする厚生科学研究班のバリデーションでも代替試験法の候補として取り上げられている^{3),4),25)~27)}。

これらの方法以外に、三次元培養系キットを含む様々な培養細胞系に対して、一般的に用いられている「MTT法」^{28)~32)}、「ニュートラルレッド法」^{28),32),33)}、「LDH法」^{31),34)}等の細胞毒性試験を適用した方法、大豆等から得られたタンパク質の変性を白濁により評価する眼刺激性評価用キット「EYTEX」^{35)~37)}、摘出眼球あるいは角膜を用いてその角膜の白濁あるいは血管反応を評価する摘出眼球試験^{38),39)}、化学物質による赤血球の膜破壊を評価する赤血球溶血試験等^{40),41)}が報告されている。

このように眼刺激性試験については、様々な機制的角度から多くの Replacement が研究され、前述のようにそのいくつかの方法についてはバリデーションが進んでおり、近い時期に公的機関を含めた社会的な評価がくだされんと思われる。

3・2 皮膚刺激性試験

皮膚刺激性を *in vitro* で評価する方法については、まだその緒についたばかりである。弊社では、界面活性

剤について正常ヒト皮膚角化細胞や株化された皮膚線維芽細胞等を用いる細胞毒性試験結果と皮膚刺激性試験結果の対応性を検討し、強い細胞毒性を示す物質は、皮膚刺激性物質であるということを報告している⁴²⁾。一方、細胞毒性試験では捕らえられない中等度刺激性物質に対しては、角化細胞からの炎症性サイトカインのインターロイキン8 (IL-8) の放出を指標にすることが有効であることも報告している^{43),44)}。IL-8 は好中球走化性因子として知られているサイトカインで、皮膚の炎症を誘導する一つの因子と考えられることから、血管系を持たない細胞毒性試験を補完する指標の一つとなりうることが示唆された。

一方、皮膚は眼の場合と異なり、外界と接する角層を持っていることから、化学物質の皮膚への適用をシミュレートする場合、物質の経皮吸収性を考慮する必要がある。弊社では、界面活性剤の経皮吸収性をシリコン膜の透過性によりモデル化し、細胞毒性試験結果を補正することで細胞毒性試験結果と皮膚刺激性試験の結果の対応性が向上することも報告している⁴⁵⁾。

その他の一般的な皮膚刺激性試験の代替法としては、角化細胞、皮膚線維芽細胞あるいは三次元再構成皮膚モデルによる、IL-1^{46)~48)}、IL-6⁴⁹⁾、TNF- α ⁵⁰⁾等のサイトカイン、PGE₂^{51),52)}、LTB₄等のアラキドン酸カスケードの代謝物を測定する方法が報告されている。

皮膚刺激性は、免疫機構の関与しない局所の炎症反応であり、予測される傷害が重篤でない場合はヒトでの試験で代替することも可能なことから、現在の趨勢、特に欧州では他の試験法の開発が優先されているように思われる。

3・3 光毒性試験

光毒性は、化学物質が紫外線的作用を受けて変化することにより、適用局所の皮膚で傷害性が現れる現象を意味し、紫外線照射により初めて現れる皮膚刺激反応である。弊社では、「赤血球の溶血試験」^{53),54)}、「酵母の生育阻害試験」^{53),55)}及び「ヒト皮膚線維芽細胞や角化細胞等の培養細胞を用いる光毒性試験」⁵⁶⁾の *in vitro* 試験法を開発している。溶血試験は眼刺激性試験で用いられている赤血球の溶血試験に適量の紫外線照射を組み込んだ方法であり、赤血球の細胞膜破壊を評価している。また、酵母の生育阻害試験は、紫外線照射を受けた化学物質の傷害性を寒天培地には(播)種した酵母の生育の阻止円の径を測定することにより評価している。この方法は酵母の細胞膜破壊あるいは核への損傷の機構に基づいている。現在、弊社ではこれらの方法を組み合わせたバッテリーシステムを原料の安全性評価にスクリーニング試験として活用している。これらの方法以外に BALB/C 3 T 3 線維芽細胞や三次元再構成ヒト皮膚モデル等を利用して紫外線を伴った細胞毒性試験により光毒性を評価する方法も報告されている^{57),58)}。この2方法は欧州化粧品工業会 (COLIPA) でバリデーションが行われており、その結果については1996年内に公表されると考えられる。

いずれにしても、*in vitro* 光毒性試験は眼刺激性と並び開発の最終段階にあり、化粧品原料を評価する試験方法として認められつつあると考えられる。

3・4 接触感作性試験

感作反応は、免疫応答に基づく全身系の反応である。したがって、複雑な発現機序に基づく感作反応を理論的に *in vitro* 試験法で置き換えることは、現状では非常に困難であり、現在は Reduction と Refinement の観点からの検討がなされている。このような試験法の代表が、マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) である。LLNA はモルモットを用いたマキシミゼーション法 (GPMT)⁵⁹⁾ に比べ、1) 使用する動物数が少なく、2) アジュバントを使用せず、3) また必要な試験期間も短いなどの点から、動物に対する負担を軽減しているが、検出感度はやや低いという欠点もある。弊社においても、リンパ節細胞初代培養上清中の IL-2 産生を ELISA を用いて定量する方法により、放射性同位体を用いる LLNA 原法を改良した方法を確立している⁶⁰⁾。また、純粋に *in vitro* 試験法として、弊社では被験物質のタンパク結合性より感作性を評価する方法¹⁾

についても検討を行ったが、一部の構造類似化合物に対する有効性は確認したものの試験法としては確立されていない。世界的にも、いくつかの研究機関で免疫に関係するランゲルハンス細胞等を用いて、実験的な試みがなされているのみで体系的に試験法として評価された Replacement の系はいまだ確立されていない^{61)~63)}。

このように、感作性試験の代替法については今後も研究が必要な分野であり、その社会的ニーズを考えると、近い将来に大きな発展が期待される領域である。

3・5 その他の試験法

以上述べてきた試験法以外にも急性経口毒性、あるいは催奇形性などの生殖毒性、発がん性、体内動態等が化粧品品の安全性試験でも要求される場合がある。しかしながら、これらの全身系が関与する毒性については、ほとんど代替法の検討は進んでいない。一部に急性経口毒性を細胞毒性で評価する方法等^{64)~66)}があるが、その妥当性には疑問が残る。また、催奇形性を全はい(胚)培養等の手段で検討することも提案されているが^{67)~69)}、技術的な側面とともに倫理的な面からもコンセンサスが必要と考えられる。

全身系の毒性に対して *in vitro* 試験法がどのように展開できるのかについては今後の課題と思われる。

4 ヘモグロビン変性試験を用いる界面活性剤の安全性評価

4・1 ヘモグロビン変性法

ヘモグロビン変性試験は、強い刺激性を有する化学物質が強いタンパク変性を生ずるという現象に着目した非常に簡便な眼刺激性評価法で、筆者らが近年開発したものである。この方法は、培養施設等の特殊な設備や環境を必要とせず、可視領域(ソーレー帯)に明確な吸収ピークを持つヘムタンパクであるヘモグロビンを用いて変性タンパク質と非変性タンパク質を分離することなく吸光度変化によりタンパク変性を測定する方法(HDR法)である¹⁵⁾。

簡単に実験方法を紹介すると、96穴マイクロプレート上で2%界面活性剤水溶液から2倍希釈法によって調製した11濃度水準の被験液とアジドメトヘモグロビン緩衝液とを5minインキュベート後、マイクロプレートリーダーにて418nmの吸光度を測定し、各濃度水準におけるヘモグロビン変性率(HDR%)を算出するものである。試薬として購入できる牛ヘモグロビンは、pH 6.86の標準リン酸緩衝液(アジ化ナトリウムを0.1%含有)中に溶解すると、418nmに吸収のピークを示すアジドメトヘモグロビンとして存在するが、タンパク変性能を持つ界面活性剤の共存下ではそのピークの高さが減少することから、ヘモグロビン変性率(HDR%)が算出できる。

HDR法の吸光度変化とタンパク変性の関係については、円二色性スペクトル(CD)の観測によるメトヘモグロビンの二次構造の変化、HPLCによる変性成分の分析及びメトヘモグロビンに対する界面活性剤の吸着量を測定し、相関分析により解析した²⁴⁾。硫酸ドデシルナトリウム(SDS)とラウロイルメチルタウリンナトリウム(LMT)の2種類のアニオン界面活性剤を例として検討した結果、HDR法は、界面活性剤によって引き起こされるメトヘモグロビンの α -ヘリックスのランダム構造化に起因するヘム周辺の変化を間接的に測定する試験法であることが確認された(Table 2)。

次に、HDR法の眼刺激性試験代替法としての可能性について、化粧品原料等に使用されている12種類の界面活性剤を用いて検討した¹⁵⁾。その結果、特定濃度においてHDR%はDraize法におけるトータルスコアと良好な相関関係($r=0.792$)を示し、HDR法が眼刺激性試験代替法として使用可能なことが確認された(Fig. 1)。

また、各界面活性剤の各濃度水準におけるHDR%のデータの因子分析から、ヘモグロビンの変性機構には濃度の高低により異なる2つの因子の存在することが明らかとなった(Table 3)。一般に界面活性剤は臨界ミセル濃度(cmc)を境にその界面活性や物理化学的特性の変化することが知られているが、この結果は、界面活性剤のヘモグロビンに対する変性能、すなわち界面活性剤とヘモグロビンとの相互作用の大きさについても、濃度に依存した物理化学的な性質の違いが影響しているものと考えられる。

さらに、より合理的な安全性評価モデルの構築を目指し、重回帰分析によりそれらの2つの異なるヘモグロビン変性メカニズムを数学的に組み合わせ、推定精度の向上を試みた¹⁵⁾。その結果、Draize法におけるトータルスコア(Dt)とHDR%との間に次式に示す関係式が得られた。

Fig. 1 Correlation between Draize Score (Dt) and Estimated Score from HDR Test at 2% SAA.

$$\begin{aligned} Dt = & 14.922 + 0.686 \times \text{HDR\% (at 2\%)} \\ & + 0.496 \times \text{HDR\% (at 0.063\%)} \end{aligned}$$

なお、この線形結合式によって、相関係数は、単独濃度時の $r=0.792$ から $r=0.861$ まで向上した(Fig. 2)。

以上の結果、HDR法は特定濃度においてもDraize法の代替法となりうること、またヘモグロビンの変性機構を考慮した重回帰式を用いることでさらに推定精度が向上することが明らかとなったものと考ええる。

4・2 眼刺激性発現機序の因子分析による解析とバッテリーシステムの構築

Draize法は、被験物質により角膜、虹彩及び結膜に生ずる傷害に特定の重み付けをして評価されている⁷⁰⁾。一方、眼刺激性試験代替法については、3・1項に記述したように、既に多くの試験法が報告されており、弊社においても数種の試験法についてはその有用性について検討してきた。ここで、Draize法の結果がどのようなメ

Table 2 Correlation Coefficient Matrix of Obtained Data.

	HDR%	α -Helix	Random	β -Turn	β -Sheet	Molar ellipticity at 222 nm	Sorption	HDR% by HPLC
HDR%	1.000							
α -Helix	-0.804	1.000						
Random	0.711	-0.879	1.000					
β -Turn	-0.402	0.537	-0.529	1.000				
β -Sheet	0.364	-0.483	0.081	-0.590	1.000			
Molar ellipticity at 222 nm	-0.884	0.949	-0.871	0.494	-0.387	1.000		
Sorption	0.789	-0.637	0.652	-0.464	0.227	-0.659	1.000	
HDR% by HPLC	0.901	-0.792	0.772	-0.511	0.308	-0.820	0.903	1.000

Table 3 Results of Factorial Analysis.

Concentration tested (%)	Factor loading	
	1 st Factor	2 nd Factor
2.000	-0.536	0.722
1.000	-0.590	0.763
0.500	-0.830	0.407
0.250	-0.901	0.243
0.125	-0.961	0.150
0.063	-0.976	0.070
0.032	-0.984	0.036
0.016	-0.986	-0.018
0.008	-0.952	-0.057
0.004	-0.890	-0.083
Contribution ratio (%)	70.2	15.7
Meaning of the factor	Hemoglobin denaturation caused under low concentration conditions	Hemoglobin denaturation caused under high concentration conditions

Fig. 2 Correlation between Draize Score (Dt) and Estimated Score from HDR Test (Multi-regression Analysis)

カニズムで生じているのか、また Draize 法と提案されている *in vitro* 試験法とがどのような関係にあるのかを数学的に明らかにすることは、眼刺激性試験代替法の構築の上で非常に重要なことである。

そこで、前述の 12 種類の界面活性剤について、Draize 法と 7 種の *in vitro* 試験法で得られた試験結果を因子分析により解析した¹⁷⁾。その結果、Draize 法により評価される眼刺激性は、1) 細胞膜破壊に関する因子、2) HDR 法で測定されるタンパク変性に関連する因子、3) EYTEX 法で測定されるタンパク変性に関連する因子及び 4) 細胞毒性試験に関連する因子、の順で 4 つの因子が大きく関与することが示唆された。さらに、

代替すべき Draize 法は、HDR 法に代表されるタンパク変性因子と、リポソーム法あるいは赤血球溶血 (RBC) 法に代表される細胞膜破壊因子によって説明できることが推察された (Table 4)。このことは、HDR 法とリポソーム法あるいは RBC 法とを組み合わせたバッテリーシステムを構築することで Draize 法を眼刺激性の発現機序に基づき再現できることを示唆している。

そこで、眼刺激性の発現機序に基づくバッテリーシステムの構築を目指し、重回帰分析により HDR 法とリポソーム法あるいは RBC 法を数学的に組み合わせ、推定精度の向上を試みた¹⁸⁾。その結果、HDR% と赤血球を 50% 溶血させる界面活性剤濃度 (RBC₅₀) とを組み合わせることにより、Draize 法におけるトータルスコア (Dt) と最も高い相関係数 ($r=0.941$) の得られることが明らかとなった (Fig. 3)。

$$\begin{aligned} Dt = & 30.877 - 0.025 \times RBC_{50} + 0.671 \times HDR\% \text{ (at 2\%)} \\ & - 1.774 \times HDR\% \text{ (at 0.125\%)} + 1.960 \\ & \times HDR\% \text{ (at 0.063\%)} \end{aligned}$$

同様に、HDR 法とリポソーム法の組み合わせについても線形結合式によりトータルスコアに良く相関する結果が得られた。

以上の結果、Draize 法により評価される界面活性剤の眼刺激性因子を明らかにし、眼刺激性試験代替法としてその主要な発現機序を組み合わせたバッテリーシステムを構築できたものと考えられる。

4.3 構造活性相関による安全性の推定

構造活性相関とは、特定の化学的特徴 (官能基や原子団) と薬理効果や毒性の発現度合いとの関係を数学的・

Table 4 Nature of the Factors Emerging from Factorial Analysis and Each Test's Loading on the Factors.

Test system	1 st factor	2 nd factor	3 rd factor	4 th factor
Draize corneal	△	◎	△	—
Draize total	△	◎	△	—
HDR 2.000%	—	◎	—	—
HDR 1.000%	—	◎	—	—
HDR 0.125%	○	◎	—	—
HDR 0.063%	△	◎	—	—
SC 100	○	—	—	—
EYTEX	—	—	◎	—
SIRC	△	△	—	◎
HeLa	○	—	—	◎
CAM	△	○	○	—
LIPO	◎	—	—	—
RBC human	◎	—	—	—
RBC rabbit	◎	—	—	—
RBC guinea pig	◎	—	—	—
RBC rat	◎	—	△	—
Contribution ratio (%)	39.1	28.8	12.2	8.6
Nature of the factor	Cellular plasma membrane destruction	Hemoglobin type protein denaturation	EYTEX type protein denaturation	Cytotoxicity

◎, factor loading score is more than 0.7;

○, factor loading score is from 0.5 to 0.7;

△, factor loading score is from 0.3 to 0.5.

Fig. 3 Correlation between Draize Score (Dt) and Estimated Score from HDR Test and RBC Test (Battery System, Multi-regression Analysis)

統計的あるいはエキスパートシステムにより解析し、未知の化学物質の特性を予測しようとするものである。昨今のコンピューターの性能向上に伴い急速に発展してきた分野であり、動物実験を必要としない究極の代替法の一つとして考えられる。

筆者らは、21種類のアニオン界面活性剤の構造活性相関について、HDR法により推定されるDraize法のトータルスコアを目的変数とし、界面活性剤の化学構造の特徴を末端親水基、対イオン及び分子内の末端以外の親水性原子団の3要因に分類し、数量化理論Ⅰ類を用いて解析した¹⁶⁾。その結果、界面活性剤の化学構造上の特徴とHDR法によって推定されるトータルスコアの間には高い相関性(相関係数 $r=0.92$)の存在することが明らかとなった。具体的には、末端親水基については、カルボキシル基($-\text{COO}^-$ 基)とスルホン基($-\text{SO}_3^-$ 基)を同一分子内に持つ非相同な界面活性剤が最も刺激性が弱く、その他の親水性原子団の存在は眼刺激性の低減にはさほど貢献しないことが示唆された。対イオンに

Fig. 4 Effect of Each Structure Toward Estimated Draize Score (Dt).

については、いずれも大きな影響力を持たないが、Na よりもトリエタノールアンモニウム (TEA) の方が若干刺激性を弱めると考えられた。末端以外の分子内親水性原子団については、アミド結合 ($-\text{CONH}-$) とエチレンオキシド鎖 ($-\text{EO}-$ 鎖) を同時に分子内に持つ界面活性剤が最も刺激が低く、次いで *N*-メチルアミド結合 [$-\text{CON}(\text{CH}_3)-$] を持つものであることが示唆された。逆に、刺激性を強める傾向にある界面活性剤は、末端親水基にリン酸基 ($-\text{PO}_4$) を持つもの、もしくは分子内親水性原子団としてエステル結合 ($-\text{COO}-$) と $-\text{EO}-$ 鎖を同時に持つ界面活性剤及び $-\text{COO}-$ や $-\text{CONH}-$ を持つものであると考えられた (Fig. 4)。

本項では、数量化理論Ⅰ類を用いて HDR 法による眼刺激性推定値と界面活性剤の化学構造の関係を明らかにし、さらに得られたデータをもとに低刺激性を示すと考えられる界面活性剤の分子設計の方向性も示した。このようなアプローチはまだ緒に着いたばかりである。毒性に関する構造活性相関の報告としては、菅井らの Draize 法による眼刺激性の解析^{71), 72)}、Barratt らの化学物質の皮膚刺激性・眼刺激性等についての構造活性相関^{73), 74)}等があげられ、今後のさらなる発展が期待される。

5 おわりに

以上、動物実験代替法の考え方、化粧品品の安全性試験代替法の現状及びヘモグロビン変性試験を用いる界面活性剤の安全性評価について述べてきた。動物実験代替法の研究に関しては、科学的妥当性を有するだけでなく、倫理的、社会的な評価にも堪えられなければならない点に困難さがある。一方、将来の安全性試験のあるべき姿として「動物試験の代替」が本当に望ましいのかどうかを検討する必要があると考える。すなわち、ヒトへの刺激あるいは毒性を予測するために動物実験を行い、その

試験結果を外挿する代替法を開発している現状では、代替法の結果とヒトでの試験結果との隔たりは科学的にも必至と考えられる。しかし、安全性試験本来の目的は、あくまでもヒトへの影響の予測にあるということを考えれば、動物実験代替法の開発からヒト試験の代替法開発に考え方を変更することも考慮すべき時期と考える。例えば、4・3 項で紹介したように物理化学的な側面からは化学物質の構造活性相関が明らかになりつつある。また影響を受けるヒトや動物の側面ではトキシコカインेटックスにより化学物質の体内動態が明確になりつつあり、さらにはヒトの代謝機能を持つ培養細胞も既に誕生しているという状況がある。近い将来、これらの情報を体系的に組み込んだ究極の代替法としてのコンピューターを用いる毒性予測が格段に進歩すると考えられる。

このような状況のもと、動物実験代替法の開発は、安全性に携わる研究者として 21 世紀には現状を変革するという意識で取り組むべき課題の一つと考える。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり有益なご助言を頂いた (株) 資生堂第一リサーチセンター参事畑尾正人博士に感謝する。

(受付: 1996 年 6 月 27 日, 受理: 1996 年 7 月 25 日)

文 献

- 1) 板垣 宏, 加藤 忍, 内山真理子, 小林敏明, 藤山喜雄, 第 11 回日本化粧品科学会学術大会要旨集 (東京) p. 38 (1986).
- 2) M. Hatao, H. Itagaki, T. Kobayashi, T. Ozawa, *Environ. Dermatol.*, 3 (suppl 1), 103 (1996).
- 3) Y. Ohno, T. Kaneko, T. Kobayashi, T. Inoue, Y. Kuroiwa *et al.*, *In Vitro Toxicol.*, 7, 89 (1994).
- 4) Y. Ohno, T. Kaneko, T. Kobayashi, T. Inoue, Y. Kuroiwa *et al.*, *AATEX*, 3, 123 (1995).
- 5) T. Ohno, H. Itagaki, N. Tanaka, H. Ono, *Toxic. in Vitro*, 9, 571 (1995).
- 6) M. Balls, P.A. Botham, L.H. Bruner, H. Spielmann, *Toxic. in Vitro*, 9, 871 (1995).
- 7) 光井武夫編, “新化粧品学”, 南山堂, 東京 (1993) p. 219
- 8) 板垣 宏, 鹿子木宏之, 日皮協ジャーナル, 27, 133 (1991).
- 9) S. Kato, H. Itagaki, I. Chiyoda, S. Hagino, T. Kobayashi *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 2, 125 (1988).
- 10) 板垣 宏, 千代田泉, 萩野滋延, 加藤 忍, 小林敏明, 藤山喜雄, 日本化粧品科学会誌, 12, 145 (1988).
- 11) 鹿子木宏之, 山口道広, 日本化粧品科学会誌, 12, 151 (1988).
- 12) H. Itagaki, S. Hagino, S. Kato, T. Kobayashi, M. Umeda, *Toxic. in Vitro*, 5, 139 (1991).
- 13) S. Hagino, H. Itagaki, S. Kato, T. Kobayashi, M. Tanaka, *Toxic. in Vitro*, 5, 301 (1991).
- 14) S. Hagino, H. Itagaki, S. Kato, T. Kobayashi, *Toxic. in Vitro*, 7, 35 (1993).

- 70) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏, “毒性試験講座 7 機能
毒性学: 皮膚毒性”, 地人書館, 東京 (1989) p. 268.
- 71) S. Sugai, K. Murata, T. Kitagata, I. Tomita, *J.*
Toxicol. Sci., 15, 245 (1990).
- 72) S. Sugai, K. Murata, T. Kitagata, I. Tomita, *J.*
Toxicol. Sci., 16, 111 (1991).
- 73) M.D. Barratt, *ATLA*, 23, 111 (1995).
- 74) M.D. Barratt, *Toxic. in Vitro*, 10, 85 (1996).
- 注) 本文献中 AATEX は *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* の略, ATLA は *Alternatives To Laboratory Animals* の略。
-

- 15) T. Hayashi, H. Itagaki, T. Fukuda, U. Tamura, S. Kato, *AATEX*, 2, 25 (1993).
- 16) T. Hayashi, H. Itagaki, T. Fukuda, U. Tamura, S. Kato, *AATEX*, 2, 49 (1993).
- 17) T. Hayashi, H. Itagaki, T. Fukuda, U. Tamura, S. Kato, *Toxic. in Vitro*, 8, 215 (1994).
- 18) T. Hayashi, H. Itagaki, T. Fukuda, U. Tamura, S. Kato, *AATEX*, 2, 215 (1994).
- 19) N.P. Luepke, *Fd Chem. Toxicol.*, 23, 287 (1985).
- 20) J. Leighton, R. Tchao, J. Verdone, J. Nassauer, "ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY" 3, Mary Ann Liebert Inc., New York (1985) p. 355.
- 21) R.S. Lawrence, D.M. Ackroyd, D.L. Williams, *Toxic. in Vitro*, 4, 321 (1990).
- 22) D.M. Bagley, P.Y. Rizvi, B.M. Kong, S.J. De Salva, *J. Toxicol. -Cut. & Ocular Toxicol.*, 10, 95 (1991).
- 23) D.M. Bagley, P.Y. Rizvi, B.M. Kong, S.J. De Salva, *J. Toxicol. -Cut. & Ocular Toxicol.*, 10, 105 (1991).
- 24) T. Hayashi, H. Itagaki, T. Fukuda, U. Tamura, Y. Sato, Y. Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 540 (1995).
- 25) S. Hagino, H. Itagaki, S. Kinoshita, N. Tani, T. Nakamura, N. Ono, K. Konishi, H. Kojima, Y. Ohno, A. Takanaka, *AATEX*, 3, 137 (1995).
- 26) H. Itagaki, M. Shibata, N. Tani, S. Kinoshita, H. Kakishima *et al.*, *AATEX*, 3, 182 (1995).
- 27) H. Itagaki, T. Hayashi, H. Kakishima, T. Ogawa, M. Kotani *et al.*, *AATEX*, 3, 154 (1995).
- 28) D. Triglia, S. Sherard Braa, C. Yonan *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 5, 573 (1991).
- 29) R. Pirovano, P. Zaninelli, J. Noben *et al.*, *ATLA*, 21, 81 (1993).
- 30) R. Gay, M. Swiderek, D. Nelson *et al.*, *J. Toxicol. -Cut. & Ocular Toxicol.*, 11, 47 (1992).
- 31) M. Cornelis, D. Dupont, J. Wepierre, *ATLA*, 19, 324 (1991).
- 32) E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil, *Toxic. in Vitro*, 2, 1 (1988).
- 33) R. Roguet, K.G. Dossou, A. Rougier, *ATLA*, 20, 451 (1992).
- 34) T. Sasaki, K. Kawai, K. Saijo-Kurita *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 6, 451 (1992).
- 35) V.C. Gordon, H.C. Bergman, "ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY" 3, Mary Ann Liebert, New York (1985) p. 293.
- 36) V.C. Gordon, H.C. Bergman, "ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY" 6, Mary Ann Liebert, New York (1988) p. 309.
- 37) V.C. Gordon, C.P. Kelly, H.C. Bergman, *Toxic. in Vitro*, 4, 314 (1990).
- 38) M.K. Prinsen, H.B.W.M. Koeter, *Fd Chem. Toxicol.*, 31, 69 (1993).
- 39) A.B.G. Burton, M. York, R.S. Lawrence, *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 471 (1981).
- 40) J.W.P. Wolfgang, U. Pfannenbecker, U. Hoppe, *Mol. Toxicol.*, 1, 525 (1987).
- 41) 岡本裕子, 神崎紀子, 田中宣征, 日本化粧品技術者会誌, 23, 272 (1990).
- 42) H. Itagaki, M. Sugiyama, M. Shibata, K. Inoue, S. Kato, T. Kobayashi, *2nd Scientific Conference of the Asian Societies of Cosmetic Scientists Conference Proceedings (Seoul)*, p. 139 (1995).
- 43) 柴田道男, 津田孝也, 板垣 宏, 森川良広, 日本動物実験代替法学会第9回大会要旨集 (京都) p. 76 (1995).
- 44) M. Shibata, T. Tsuda, H. Itagaki *et al.*, *The Toxicologist*, 15, 325 (1995).
- 45) 高本隆一, 高松 翼, 板垣 宏, 小林敏明, 日本薬学会第115年会要旨集4 (仙台) p. 50 (1995).
- 46) S. Silvka, F. Zeigler, *J. Toxicol. -Cut. & Ocular Toxicol.*, 12, 49 (1993).
- 47) E. Corsini, M. Marinovich, L. Marabini *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 8, 361 (1994).
- 48) C. Cohen, G. Dossou, A. Rougier *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 5, 407 (1991).
- 49) A. Gueniche, M. Poncet, *Toxic. in Vitro*, 7, 15 (1993).
- 50) R.W. Lewis, J.C. McCall, P.A. Botham *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 7, 393 (1993).
- 51) K. Muller-Decker, G. Furstemberger, F. Marks, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127, 99 (1994).
- 52) F.M. Dickson, J.N. Lawrence, D.J. Benford, *Toxic. in Vitro*, 7, 385 (1993).
- 53) M. Sugiyama, H. Itagaki, S. Kato, "ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY" 10, Mary Ann Liebert, New York (1994) p. 213.
- 54) M. Sugiyama, H. Itagaki, S. Kato, *AATEX*, 2, 183 (1994).
- 55) M. Sugiyama, H. Itagaki, S. Kato, *AATEX*, 2, 193 (1994).
- 56) 杉山真理子, 板垣 宏, 森川良広, 日本動物実験代替法学会第9回大会要旨集 (京都) p. 80 (1995).
- 57) H. Spielmann, M. Balls, M. Brand, B. Doring, H. G. Holzhutter *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 8, 793 (1994).
- 58) M. Liebsch, B. Doring, T. A. Donnelly, P. Longmann, L. A. Rheins, H. Spielmann, *Toxic. in Vitro*, 9, 557 (1995).
- 59) B. Magnusson, A.M. Kligman, *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268 (1962).
- 60) M. Hatao, T. Hariya, Y. Katsumura *et al.*, *Toxicology*, 98, 15 (1995).
- 61) A.H. Enk, V.L. Angeloni, M.C. Udey *et al.*, *J. Immunol.*, 150, 3698 (1993).
- 62) A.H. Enk, S.I. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 1398 (1992).
- 63) S. Aiba, S. Katz, *J. Immunol.*, 145, 2791 (1990).
- 64) W. Halle, H. Spielmann, *ATLA*, 20, 40 (1992).
- 65) J.R. Fry, M.J. Garle, A.H. Hammond *et al.*, *Toxic. in Vitro*, 4, 175 (1990).
- 66) B. Ekwall, I. Bondesson, J.V. Castell *et al.*, *ATLA*, 17, 83 (1989).
- 67) P.D.C. Brown-Woodman, F. Huq, L. Hayes, C. Herlihy, K. Picker, W.S. Webster, *Teratology*, 52, 233 (1995).
- 68) T.W. Sadler, L. Shum, C.W. Warner, M.K. Smith, *Toxic. in Vitro*, 2, 175 (1988).
- 69) 福永佐和子, 佐々 齊, 脇坂美国, 第1回胎仔培養を用いた発生毒性試験の開発に関するシンポジウム要旨集 (東京) p. 1 (1990).

- 70) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏, “毒性試験講座 7 機能
毒性学: 皮膚毒性”, 地人書館, 東京 (1989) p. 268.
- 71) S. Sugai, K. Murata, T. Kitagata, I. Tomita, *J.*
Toxicol. Sci., 15, 245 (1990).
- 72) S. Sugai, K. Murata, T. Kitagata, I. Tomita, *J.*
Toxicol. Sci., 16, 111 (1991).
- 73) M.D. Barratt, *ATLA*, 23, 111 (1995).
- 74) M.D. Barratt, *Toxic. in Vitro*, 10, 85 (1996).
- 注) 本文献中 AATEX は *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* の略, ATLA は *Alternatives To Laboratory Animals* の略。
-

〔総説〕 化粧品に用いる界面活性剤の安全性試験代替法

林 俊 克・板 垣 宏

(株)資生堂研究開発本部第一リサーチセンター (〒223 横浜市港北区新羽町 1050)

近年、動物実験代替法の開発は化粧品原料の安全性評価、特に界面活性剤の評価では重要な項目の一つとなってきた。本稿では、動物実験代替法の考え方及び安全性試験代替法の現状について、またヘモグロビン変性(HDR)試験を代替法の例として記述する。HDR試験は眼刺激性代替法として体系的に検討・開発した試験法である。本法の長所は、高い再現性と無菌操作を必要としない点である。種々の眼刺激性評価法の因子分析により、刺激性の発現機序に基づく *in vitro* 試験法の組み合わせ(バッテリーシステム)が眼刺激性の予測には有効であることが示唆された。さらに、界面活性剤の構造活性相関を HDR 試験により予測される眼刺激性の観点から検討し、界面活性剤の構造と眼刺激性との間に高い相関関係の存在することが示唆された。近い将来、眼刺激性試験がそうであったように *in vitro* 試験の開発の必要性は増加するものと考えられる。

(連絡者: 林 俊克) Vol. 45, No. 10, 1179 (1996).

〔総説〕 界面活性剤の水環境への影響

菊 地 幹 夫

東京都環境科学研究所 (〒136 東京都江東区新砂 1-7-5)

界面活性剤は家庭用合成洗剤の主要成分である。河川水中から何種類かの界面活性剤がしばしば検出されるため、これらの界面活性剤の水環境への影響が米国、ヨーロッパや日本で議論されてきた。この論文ではアニオン界面活性剤について、環境汚染のモニタリング、環境中での運命、急性毒性・慢性毒性・致死濃度以下での毒性と環境リスク評価についてレビューを行った。日本では家庭排水が十分には処理されていないために、報告された急性毒性と慢性毒性の値は河川水中の LAS の濃度レベルの悪いほうのケースとオーバーラップし、十分に安全であるとは言えなかった。そのほかの界面活性剤の環境安全性については、河川での汚染濃度もまた慢性毒性データも不十分であることから、最近の研究を紹介するにとどめた。界面活性剤のライフサイクルアセスメントの事例も紹介した。

(連絡者: 菊地幹夫) Vol. 45, No. 10, 1189 (1996).