界面活性剤 CAE による培養 L 細胞の微細構造変化

東 泉・大 住 伴 子・小 住 佳 子
黒 木 賀代子

九州歯科大学歯科薬理学講座 (主任: 黒木賀代子教授)

平成 7 年 4 月 20 日受理

Change in the Ultrastructure of Mouse L Cells against a Cationic Surfactant CAE

Sen Higashi, Tomoko Ohsumi,
Keiko Ozumi and Kayoko Kuroki

Department of Dental Pharmacology (Chief: Prof. Kayoko Kuroki)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

α -cocoyl L-arginine ethylester DL-pyrrolidone carbonate (CAE), a cationic surfactant, is a condensation product of amino acid with fatty acids and neutralized with DL-pyrrolidone carboxylic acid. This CAE is known to show low irritation of skin and to have detergency and broad bactericidal action. In our previous study, 50% inhibition of cell growth with CAE was about one-eighteenth of that with benzalkonium chloride, which was one of disinfecting cationic surfactants. In this paper, we observed the structure to investigate the cytotoxicity in more detail.

Mouse L cells were cultured at 37°C for 20hr in minimal essential medium (MEM) supplemented with 3% fetal bovine serum. The structure of cultured cell was observed at 1, 3, 5, 10 and 40 minutes after exchanging MEM with the one contained CAE, concentration of which was 75 μ g/ml. Characteristic changes in L cell ultrastructure were revealed by scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM).

The cells were found by SEM to change only 1 minute after CAE treatment. Microvilli were decreased and several wrinkled lines were shown on the surface of spindle-shaped cells. Irregular outline in the nuclei, some concaves on the surface, and bubbled form at the tips of spindle-shaped cell protrusion were shown in 3 minutes. There was slightly less dense cytoplasmic ground substance. These changes became more marked with time, 10-minute-treatment resulted in folding of plasma membrane. Treatment with CAE for 40 minutes seemed to result in cell lysis.

Effects of a cationic surfactant on the ultrastructure of cultured cell appear to be useful for estimating its degree of skin irritation.

Key words : L cell / Surfactant / Ultrastructure / α -cocoyl L-arginine ethylester DL-pyrrolidone carbonate (CAE)

緒 言

界面活性剤は、乳化、浸透、洗浄、分散などの特性をもっている。その中で、微生物に対して静菌ないし殺菌作用をもつものは、消毒薬として汎用されている。しかし、界面活性剤の皮膚に対する影響には、皮膚の脂質や水溶性成分の流出に加えて、吸着浸透によって生じる蛋白変性などもあると考えられている。従って、界面活性剤の、より低毒性の消毒薬が望まれるところである。

Na-cocoyl L-arginine ethylester DL-pyrrolidone carbonate (以下、CAE) は、アミノ酸と天然のヤシ油脂肪酸を縮合し、さらに DL-ピロリドンカルボン酸で中和して塩としたカチオン界面活性剤である。従来のカチオン界面活性剤に比べ生体に対する刺激性がきわめて弱く、かつ広範囲の殺菌や静菌力を示すと言われている¹⁾。我々はこれまでに、培養細胞に対する 50% 発育阻止濃度でみた場合、CAE の細胞毒性が同じカチオン界面活性剤の塩化ベンザルコニウムの約 18 分の 1 程度しかないことを確認している²⁾。ここでは CAE の細胞毒性をさらに詳しく調べるため、培養細胞に及ぼす影響について、走査型電子顕微鏡 (以下、SEM) および透過型電子顕微鏡 (以下、TEM) で、その微細構造を観察した。

材料および方法

培養細胞には、マウス正常皮下結合組織由来の L-929 株細胞 (NCTC Clone 929, 大日本製薬) を用いた。培養液は、Eagle 最少培地 (Nissui MEM-1, 日水製薬) に L-グルタミン (和光純薬) ならびに fetal bovine serum (FBS, DIFCO) を 3% 添加したものを使用した。

実験ではまず、 1×10^4 cell/cm² の濃度に調整した細胞を、37°C, 5% CO₂ の条件下で、プラスチックシャーレ (直径 35 mm, Falcon) で約 20 時間培養した後、CAE (味の素) を含む培養液と交換した。CAE の濃度はそれを 24 時間作用させた場合の 50% 発育阻止濃度にあたる 75 µg/ml とした。なお、control では CAE の溶媒に使用した dimethyl sulfoxide (DMSO, MERCK) を含む培養液と交換した。

CAE 含有培養液と交換後、1, 3, 5, 10 および 40 分と、時間の経過を追って細胞の微細構造観察のために、電子顕微鏡用の試料作製を行った。走査像は、通法により細胞を固定・脱水後、凍結乾燥装置 (Eiko, ID-2 型) で処理し、蒸着後 SEM (日本電子, JSM-T300)

で観察した。透過像は、固定・脱水後エポキシ樹脂で包埋を行い、薄切、染色して TEM (日本電子, JEM-1200 EX II) で観察した。

結 果

I. SEM による観察

control では、紡錘形、球形、多角形など様々な形態の細胞において、多数の微絨毛がよく発達しているのが観察された (Fig. 1)。細胞質辺縁部には微絨毛より細くて長い糸状偽足も見られ、シャーレの底面に貼りつくように伸びていた。

CAE を作用させた場合、走査像では、わずか作用時間 1 分で control との違いが観察できた。すなわち、細胞表面に多く見られた微絨毛が減少傾向にあり、紡錘形をした細胞表面には長軸方向に走る数条の皺状構造が現れた (Fig. 2 a)。その他の形態をした細胞では、この皺状構造は不明確であった。作用時間 3 分で表面の皺状構造がさらに深く明瞭になった。それとは別に紡錘形の細胞だけでなく大半の細胞表面に、1~2 箇所小さな凹状構造が見られるようになった。また、この段階で、紡錘形細胞突起の先端部分には、胞状構造物の形成されるものが観察された (Fig. 2 b)。作用時間 5 分では、微絨毛が非常に減少し (Fig. 2 c)、10 分後にはほとんど消失した。この作用時間 10 分では、それまで見られ

Fig. 1 Scanning electron micrographs of mouse L cells exposed to DMSO only. Rounded, angular and spindle-shaped cells are found. Bars represent 10 µm.

Fig. 2 Scanning electron micrographs of L cells exposed to CAE. a : One minute after CAE treatment. Wrinkled lines (W) appear on the surface. b : 3 minutes' treatment. Bubbled form (*) at the tip of cell protrusion and concaves on the surface (arrowheads) are shown. c : 5 minutes' treatment. Microvilli decreased extremely. d : 10 minutes' treatment. The fold-like membrane are found very often. e : 40 minutes' treatment. The damages can be seen as extremely indented surface (large arrow), and numerous small hollows (small arrows) and protrusions. (P) on the surface. Bars represent 5 μ m.

た表面の皺状構造の溝が一層深くなり、細胞膜がひだ状を呈するようになった (Fig. 2 d). 作用時間 40 分以上になると、細胞表面は非常に荒れた状態を示し、1～2 条の深い溝および陥凹や多くの細孔が観察された。なかには、多数の胞状構造物の形成が見られる細胞も出現した (Fig. 2 e).

II. TEM による観察

control では細胞表面に微絨毛が多数観察され、細胞質全体の電子密度は比較的高かった。核はいくらか凹凸のある楕円形のもので大半で、暗く粒状の染色質をもっていた (Fig. 3).

走査像の表面構造では、1 分経過で既に CAE の影響が観察されたが、同じ作用時間 1 分の透過像には、細胞質および細胞小器官などに control との違いがほとんど見られなかった。しかし、3 分経過すると凹凸の激しい核輪郭の不整が見られた。また、一部の細胞小器官に電子密度のやや低くなるものが観察された (Fig. 4 a). 作用時間 5 分では、核輪郭は作用時間 3 分のものとはほとんど変化ないが、細胞小器官が膨化することによ

Fig. 3 Transmission electron micrograph of L cells exposed to DMSO only. Numerous microvilli are found. The nucleus is dark with granular chromatin. Bar represents 2 μ m.

り、細胞質における小器官の占める容積の割合が高くなっているようであった。細胞小器官内の電子密度は全体的に低下する傾向を示し、特にミトコンドリアでの低下が著しかった。細胞膜も一部で大きく波打つ状態が観

Fig. 4 Transmission electron micrographs of L cells exposed to CAE. a: 3 minutes' treatment. This nucleus is deeply indented. Slightly less dense organelles are found. b: 5 minutes' treatment. Mitochondria are moderately dilated. Bars represent $2\mu\text{m}$.

Fig. 6 Transmission electron micrographs of L cells exposed to CAE for 40 minutes. a: In the damaged cell, numerous vacuoles and pale homogeneous nucleus are present. b: This cell has breakage in both plasma membranes and nucleus membranes. Bars represent $2\mu\text{m}$.

Fig. 5 Transmission electron micrographs of L cells exposed to CAE for 10 minutes. a: Cells are considerably irregular in outline. Vacuoles can be seen within the cytoplasm. b: Some peripheral parts of the cell seem to separate off from the remainder of the cell. c: At a higher magnification most of the vacuolated organelles appear to be mitochondria. Bars represent $1\mu\text{m}$.

察された (Fig. 4 b). 作用時間 10 分を経過すると、5 分までに見られた変化が一層顕著になった。核輪郭については、不整が一段と進むものと、逆に丸味を帯びて円形になるものがみられた。作用時間 5 分でも一部に見られた細胞膜の陥凹部は、それまでに比べてより深く、その周辺部には細胞膜および細胞質の破損による細胞の断片が観察された (Fig. 5 a, b). 細胞質内に見られる空胞様の小器官の大半はミトコンドリアであった (Fig. 5 c). 作用時間が 40 分以上になると、細胞小器官は全て膨化し、多数の空胞が細胞質内に存在した。ほとんど全ての細胞の細胞質や核の電子密度は極端に低下した (Fig. 6 a). 多くの細胞の細胞膜はいたるところで破れ、そこから細胞内物質の一部が漏出した。核はそれまでと異なり、クロマチンの分布が均質になった。また、CAE の影響を強く受けた細胞では、核膜も破壊されるなどの変化が見られ、全体に cell lysis を起こしていた (Fig. 6 b).

考 察

今回、微細構造の観察により、濃度 75 $\mu\text{g/ml}$ では 1 分間作用させた時点で CAE の影響が細胞表面に既に現れ、40 分後には明らかな細胞死の状態に至ることが判明した。培養細胞の微絨毛の数や分布については、細胞の種類によって異なるが、同一細胞でも機能状態によって変化することが知られている³⁻⁷⁾。特に、細胞周期による変化が著明であり、G1, G2 期で数が増加し、G1 末期から S 期に減少する³⁾。さらに、細胞周期によって薬物などによる障害の受けやすさが異なる場合があること⁷⁾は容易に想像される。従って、control との比較は全体像の形から判断して、ほぼ同じ細胞周期にある細胞間で行うようにした。今回、作用初期から観察された微絨毛の減少という変化は、幾種類かの薬物に対する培養細胞の変化として、共通して見られる初期の変化であり、CAE に特異的なものではない。向井ら (1986)⁸⁾は、点眼薬が Chang の培養ヒト結膜上皮細胞へ及ぼす影響を SEM で観察している。その結果、細胞毒性の主な原因は、製剤に防腐剤として含まれている界面活性剤の塩化ベンザルコニウムによることを確認している。塩化ベンザルコニウムでは、50% の細胞障害をきたす 30 秒間の接触時間で、既に微絨毛の減少を軽度で認めている。接触 1 分間では、紡錘形細胞の相対的割合の減少、微絨毛および糸状偽足の減少、細胞が全般に細くなる傾向を観察している。さらに、2 分間の接触では微絨毛の消失や、細胞膜での多数の小孔形成を認めている。当然

のことながら、濃度や薬物の違いによる発現時間の差はあるが、これらの微絨毛の変化の過程は、今回の我々の結果でも認められている。この表面構造を複雑にしている微絨毛は、細胞膜伸展時の表面積の補給部位の役割を果たしていると考えられている^{6,9)}。今回の結果で、微絨毛減少と皺状構造は同時期から観察されたことから、微絨毛減少によって生じた余剰の細胞表面が皺状構造へ移行したものと考えられる。

今回観察された胞状構造物の形成については、L 細胞に他の薬物を作用させた場合にも確認されている。フェノールの場合では、位相差顕微鏡観察において、薬物作用直後に光を透過しない胞状物を細胞周辺部に認めている¹⁰⁾。胞状物の形成頻度は濃度により異なるが、その出現数が最も多かった 1% フェノールにおける経時的観察では、時間の経過とともに胞状物の大きさがやや大きくなり、光を透過するようになることを観察している。細胞の微絨毛の減少も見られない低い濃度や、蛋白凝固作用を示す 1% より高い濃度では、胞状物は観察されていない。これらの胞状物構造は、走査像でも突起状の胞状物として観察されており^{10,11)}、CAE の作用で観察されたものはこれに類似している。しかし、フェノールでは作用直後に細胞のあちこちに形成されるのに対し、今回用いた濃度の CAE の場合、紡錘形細胞の先端部にのみ観察され、発現時間も 3 分後と遅かった。

作用時間 40 分には、細胞の受けた障害は大きく、cell lysis を起こしている。細胞膜の破壊された透過像などから判断して、走査像において観察された陥凹や細孔の部分から、一部の細胞質が細胞外に漏出していると推定される。しかし、それが徐々に生じているものか一瞬の細胞膜の破壊によって生じているものかは確認できなかった。この点については培養液中に漏出した酵素の測定などによりある程度判明すると考えられる。

核輪郭の不整は分化途中の細胞や、ウイルス感染により増殖が刺激された細胞においても認められ、代謝活性の亢進に伴う核と細胞質間の物質交換の盛んな状態を反映しているものとされている¹²⁾。CAE の作用時間 3 分で見られはじめた核輪郭の不整は、CAE の刺激作用に対する反応であり、作用時間 10 分で円形の核が観察されるのは、この時点でおそらくほとんど不可逆的な障害を受けつつあるのではないかと考えられる。

カチオン界面活性剤の基本的性質は、生体内にある負に帯電した物質 (細胞内顆粒、蛋白質、核酸など) に強く吸着することによると考えられている^{13,14)}。カチオン界面活性剤の 1 つである塩化ベンザルコニウムの殺菌作

用は、陽イオンが微生物中に侵入し、生理的变化をもたらすためであるとされている¹⁵⁾。まだ、不明な点も多いが、界面活性剤の生体膜への吸着が原因となって、膜にも様々な作用を及ぼすようである。一方、全ての界面活性剤は高濃度において、細胞膜を崩壊させるという現象が古くから知られ、この作用が細胞に対する毒性発現の一因となっている¹⁶⁾。界面活性剤と細胞膜の崩壊との間の作用機序には多くの説が考えられている¹⁶⁾が、いずれにしても今回観察した細胞、特に膜における微細構造の変化を観察することが、界面活性剤の消毒薬としての有効性を判定するためのかなり有効な方法であると推察できる。

しかし、消毒薬としての安全性を高めるためには、実際の使用濃度と細胞膜の崩壊を引き起こす濃度との差が大きいことが望まれる¹⁶⁾。75 $\mu\text{g/ml}$ という単一濃度下で、細胞の形態変化を経時的に観察したところ、膜に明らかな変化が見られるまでに5～10分間を要した。CAEの消毒薬としての有効性を細胞レベルで判定するためには、今後いろいろな濃度のものを用い、作用時間をもっと細く区切ることにより、微細構造の経時的な変化ばかりでなく、影響を受ける細胞の比率や、影響を受けやすい細胞周期などについても観察する必要がある。細胞毒性試験の結果は、障害過程の一部を明らかにしているに過ぎない。しかし、これら1つ1つの過程の組合せから総合的に障害を予知することが動物代替法として重要であると考えられる。

結 語

L-929細胞に及ぼすCAE(濃度75 $\mu\text{g/ml}$)の影響をSEMおよびTEMを用いて形態的に観察した。

1. 1分間の作用で微絨毛は減少し、紡錘形細胞の表面に数条の皺状構造が現れた。

2. 3分間の作用では、細胞突起先端部に胞状構造の形成、細胞内では核輪郭の不整および細胞小器官の電子密度低下が観察された。

3. 時間経過とともに変化は顕著になり、10分間作用では表面構造はひだ状を呈し、一部細胞膜が切断されたと思われる像も観察された。

4. 40分間作用以降、表面には多数の細孔や陥凹などが観察され、細胞内物質の漏出もみられ、全体的に

cell lysisを起こしていた。

培養細胞を用いた今回の方法は、界面活性剤の毒性の評価をするために有効であると考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究に多大の有益な助言を賜った九州大学薬学部生理学教室の姫野 勝教授ならびに同教室の石川豊子博士に心から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 杉本喜憲, 豊島 滋: B型肝炎ウイルス消毒剤の現状. 日本医事新報 2852: 30-34, 1978.
- 2) 東 泉, 大住伴子, 黒木賀代子: 二種界面活性剤の抗微生物作用と細胞毒性. 歯基礎誌 34 (supp.): 244, 1992.
- 3) 永田哲士, 村田長芳: 走査電顕による培養細胞表面微細構造の研究. 組織培養 7: 413-426, 1978.
- 4) 大西礼子: 細胞周期と細胞表面形態. 組織培養 7: 442-453, 1978.
- 5) Porter, K., Prescott, D. and Frye, J.: Changes in surface morphology of chinese hamster ovary cells during the cell cycle. J. Cell Biol. 57: 815-836, 1973.
- 6) Knutton, S., Sumner, M. C. B. and Pasternak, C. A.: Role of microvilli in surface changes of synchronized P815Y mastocytoma cells. J. Cell Biol. 66: 568-576, 1975.
- 7) 高橋信夫, 藤川孝三郎, 宮越 稔, 寺岡弘平, 谷内喜美子: 塩化ベンザルコニウムの細胞周期に与える影響—flow cytometerによる解析—. 日眼会誌 96: 823-827, 1992.
- 8) 向井佳子, 高橋信夫: 副腎皮質ホルモン点眼剤の培養結膜細胞に対する影響. 日本眼科紀要 37: 339-342, 1986.
- 9) Ericson, C. A. and Trinkaus, J. P.: Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. Exp. Cell Res. 99: 375-384, 1976.
- 10) 牛村幸子: フェノールの作用に関する知見補遺. 歯学 72 (1): 21-25, 1984.
- 11) 近藤勝洪: 培養L細胞に対するフェノールの作用走査型電子顕微鏡による観察. 歯学 71 (3): 483-496, 1983.
- 12) 筒井祥博, 星野宗光: 核の構造と病理(電顕). 現代病理学大系2A. 中山書店, 東京, 1990, 13-45.
- 13) 辻井 薫: 界面活性剤の種類と物性. 中毒研究 3: 211-216, 1990.
- 14) Urano, K. and Saito, M.: Adsorption of surfactants on microbiologies. Chemosphere 13: 285-292, 1984.
- 15) 日本公定書協会: 第十二改正日本薬局方解説書. 廣川書店, 東京, 1991, C-366-C-369.
- 16) 菊地一憲, 梅田真郷, 井上圭三: 界面活性剤の細胞への作用. 中毒研究 3: 217-221, 1990.