化粧品原料に対する粘菌 *Physarum Polycephalum* の走化性について

赤坂日出道 柳 光男 桂 博二

Chemotaxis of Slime Mold *Physarum Polycephalum* in Various Cosmetic Ingredients

Hidemichi Akasaka, Mitsuo Yanagi and Hakuji Katsura

Chemotaxis of the slime mold *Physarum polycephalum* for various cosmetic ingredients was investigated in relation to their effects on the skin using double-chamber method.

The effect of these agents on the slime mold appeared in the far lower concentration range than at general safety evaluation tests for animals such as guinea pigs and rabbits.

The slime mold exhibited negative chemotaxis for all the cosmetic ingredients tested.

The relationship was recognized between the threshold concentration of cosmetic ingredients for chemotaxis of slime mold and their toxicity (LD_{50} etc) in general test animals.

1. 緒 言

化粧品の安全性を論ずる場合、皮膚や粘膜に対する刺激は非常に重要なファクターとなっている。これはいわゆる動物や人の皮膚、または粘膜に化学物質を接触させ、反応が出るか出ないか、その反応が強いか弱いかで判断するものであり、皮膚表面の角層又は細胞膜へのアタックと考えられている。従来より安全性試験としてマウス、モルモット、ウサギなどの動物を用いた試験の他に、テトラヒメナ、細菌などの微生物や培養細胞を用いた試験が行なわれているが、これらは化学物質による増殖阻害を観察するものがほとんどで、刺激に対応する細胞膜での応答を指標としたものではない。

ところで、真性粘菌 *Physarum polycephalum* は、Fig.-1 のようなライフサイクルをとるが¹⁾、その変形体は細菌などと異り、外側に細胞壁はなく、細胞膜が最外にあるので、化学物質との相互作用を測定する材料として用いられている。その測定手段としては、変形体は種々の物質に対して正または負の走化性（物質に近寄りたり、逃避したりすること）を示すが、この運動は原形

質流動によるので、その駆動力を測定することにより定量的に表現することが行なわれている²⁾。上田らの研究によれば、走化性を示す濃度で膜電位、 δ 電位も変化するので、その反応は細胞膜からの応答であると考えられている。

このような粘菌の走化性を利用して、化粧品原料の生体に対する挙動を調べようとすることは現在まで全く行なわれていないので検討を試みた。本報では、種々の原料等に対する粘菌の走化性の閾値を測定し、構造との関係につき考察した結果につき報告する。

2. 材料及び実験方法

2.1. 材 料

粘菌 *Physarum polycephalum* は、北海道大学薬学部栗原先生よりいただいたものを Camp の方法³⁾ で培養して用いた。得られた変形体を1晩0.7% 寒天にはわせ、糸状の部分を用いた（写真-1）。試料は市販のもの（化粧品原料または試薬）を用いた。溶媒として使用した水は、ガラス容器で2回蒸留したものである。

2.2. 方 法

粘菌変形体の走化性の測定

神谷の複室法で原形質流動の駆動力を測定することにより調べた。Fig.-2⁴⁾ のようなセルの両室にあらかじ

資生堂研究所：横浜市港北区新羽町 1050
Shiseido Laboratories 1050, Nippa-cho, Kohoku-ku,
Yokohama, Japan

Fig.-1 Life Cycle of Physarum Polycephalum.

写真-1 寒天をはう変形体

め1%寒天ゲルを Fig.-2-b のようにセットする。寒天にはわせた変形体の先端部を小さく切り取って複室の両側に置き、2つの先端部を変形体の糸でつなぐ。シリコングリースをぬり、ガラスをかぶせ、両室間での空

気もれがないようにする。30～60分暗所に放置後、糸部を顕微鏡で観察すると、原形質流動がみられる。この原形質流動を止めるのに必要な圧力を片方の部屋にかけ、その時の圧力差を測定することから、原形質流動の駆動力を調べた。圧力差は、圧力変換装置（日計電測 PG/OIK, SBM-120BTE）で電圧に換え、記録計（理化電機 B-28/SS）に接続して、自動的に記録した。始めに蒸留水を両室に入れ、20～30分駆動力を記録した後、片方の部屋を試験溶液で置き換え、20～30分測定し、得られた曲線の面積平均から蒸留水中と試験溶液中との圧力平均の差 ΔP を求めた (Fig.-3)。この ΔP が走化性の定量的表現である。通常、誘引物質は ΔP を正で、忌避物質は負の値で表わすが、試験した全ての化粧品原料に対し、粘菌は負の走化性を示した（逃げる方向にずれた）。また、閾値を幅で示している場合は、この範囲内に閾値が存在することを示す。

3. 結果及び考察

3.1. グライコール類に対する影響

Fig.-4 に 1,3-Propanediol に対する粘菌の走化性の駆動力 (ΔP) の濃度依存性を示した。また、Fig.-5 に

Fig.-2 Schematic diagram illustrating the experimental setup for measuring motive force of protoplasmic streaming of slime molds: (a) the double chambers used. S: slime mold. Slime mold is placed between two compartments through a narrow ditch. Solution is exchanged as indicated by arrows. (b) Sideview of the double chambers. AG: agar gels. (c) Apparatus supplying the pressure difference between two compartments. M: U-tube manometer containing H_2O . Pressure difference is controlled by pressing rubber ball with screw, SG.

Fig.-3 Dynamoplasmogram; the time-courses of the pressure needed to stop the protoplasmic streaming of the slime mold. Motive force of taxis of the plasmodium is the difference in the area average pressure, $\bar{\Delta P}$ as depicted in the figure.

グリコール ($HO-(CH_2)_n-OH$) に対する $\bar{\Delta P}$ の濃度依存性を示した。 $\bar{\Delta P}$ は濃度の増加とともに増大しており、 $n=2\sim5$ の範囲内ではほとんど同じ閾値を示し $n=6\sim10$ の範囲で直線的に影響が増大した。また、 $n=3$ のとき

1,3-Propanediol $\leq$ 1,2-Propanediol (Propyleneglycol), $n=4$ のとき 1,4-Butanediol $<$ 1,3-Butanediol であり、末端に $-OH$ がある方が影響が小さい傾向にあった。 $n=2\sim5$ で同じ閾値を示すのは、濃度が高い為に浸透圧等の効果が表われたものと思われる。尚、上田らによると⁵⁾、 n -アルコール ($H-(CH_2)_n-OH$) は $n=3\sim10$ の範囲で直線的に影響が増大しており、同じ炭素数で比較すると、アルコールの方がグリコールよりも影響が大であった (Fig.-6)。

Fig.-7 に各種グリコール類に対する粘菌の走化性の閾値と急性経口毒性 (LD_{50}) を示した。ポリエチレングリコールは他のグリコールに比べて非常に影響が少いことがわかる。また、 LD_{50} と比べると、ヘキセングリコールは毒性が強く、ポリエチレングリコールは分子量の増加に伴い毒性が減少しており、粘菌の結果と良く一致していた。

3.2. 活性剤に対する影響

3.2.1. ノニオン活性剤に対する影響

Fig.-8 にノニオン活性剤に対する粘菌の走化性の閾値を示した。エステル系活性剤 (POE-sorbitane monoesters, POE-hydrogenated castor oils) は、エーテル系活性剤 (POE-lauryl ethers,[†] POE-nonylphenyl ethers) と比べて全体的に影響が小さかった。ただし、

Fig.-4 Change in motive force by the addition of 1,3-propanediol. The solution in both compartments of the double chamber is changed from H₂O to 0.07M 1,3-PG (a), 0.1M 1,3-PG (b) 0.2M 1,3-PG (c) at the arrows as indicated in the figure.

Fig.-5 Concentration dependence of the chemotactic motive force, ΔP , for glycols.

Fig.-6 Dependence of the alkyl chain length for glycols and n-alcohols.

Slime Mold log Cth (g/100ml)		Acute Oral Toxicity (LD ₅₀) g/kg
Hexylene glycol	←→	4.76(rat), 4.7(mouse)
Stylene glycol	←→	—
Propylene glycol	←→	30(rat), 21(mouse)
Dipropylene glycol	←→	14.8(rat)
1,3-Butylene glycol	←→	22.8(mouse)
Glycerine	←→	19-23(mouse)
Ethylene glycol	←→	6.1(rat), 8.3(mouse)
PEG — 100 — 400 — 1500 — 4000	←→ ←→ ←→ ←→	— 33(rat), 36(mouse) 51(rat) >50(rat, mouse)
PCA-Na	←→	—
Sorbitol	←→	17.8(mouse)

Fig.-7 Comparison of the threshold concentrations in slime mold with acute oral toxicity for various glycols.

Fig.-8 Threshold concentrations for various nonionic surfactants in slime mold.

POE (20) sorbitane mono laurate (tween-20) は例外で、エステル系の中で最も影響が大であった。また、エーテル系活性剤の EO 付加モル数の影響をみると、10 モル付近が最も大であり、EO 付加モル数が大きくなる程減少する方向にあった。一方、藤井らは、動物テストや培養細胞を用いた実験において、EO 付加数10モル付近において最も強い刺激性を認めており⁶⁾、粘菌の結果と非常に良く一致していた。また、EO 付加数20モルのエーテル系活性剤 ($\text{RnO(EO)}_{20}\text{H}$) についてアルキル基の影響を調べると、lauryl ether が最も大であり、同じ炭素数 (C_{18}) では、不飽和 (oleyl ether) の方が飽和 (stearyl ether) よりも影響が大であった (Fig.-9)。

3.2.2. アニオン活性剤に対する影響

Fig.-10 に RnCOONa に対する粘菌の走化性の閾値と、皮膚一次刺激性、眼瞼刺激性⁷⁾を示した。 C_{10} 、 C_{12} が影響が大であり、動物テストの結果と良く一致していた。また、Fig.-11 に各種アニオン活性剤に対する粘菌の走化性の閾値を示した。 C_{12} の活性剤については、 $\text{C}_{12}\text{-SOAP} > \text{C}_{12}\text{-AS} = \text{C}_{12}\text{-LAS} > \text{C}_{12}\text{-ABS} = \text{C}_{12}\text{-SAS}$ であり、 $\text{C}_{12}\text{-SOAP}$ (Na-Laurate) が最も影響が大であった。 C_{12} の活性剤と対応する工業製品とを比較した場合、SOAP BASE は $\text{C}_{12}\text{-SOAP}$ と比べて影響が $\frac{1}{10}$ に減少した。また、他の活性剤についても、基本構造やアルキル基の違いによって影響が大きく異なっていた。魚

Fig.-9 Threshold concentrations for nonionic surfactants with various alkyl chain lengths in slime mold.

類に対する毒性においても、LAS は ABS よりも毒性が強く、また、LAS とか AS とかいう基本構造やアルキル基、エチレンオキシド鎖の違いにより毒性が大きく異なっていた⁸⁾。全体的にみて、今回テストしたアニオン活性剤については、 $\text{C}_{12}\text{-SOAP}$ 、AS、LAS、AES、N-アシルザルコシン塩等が影響が大きく、ABS、SAS。

Fig.-10 Comparison of the threshold concentrations in slime mold with primary skin irritation and eye irritation for RnCOONa.

Fig.-11 Threshold concentrations for various anionic surfactants in slime mold.

AOS, SOAP BASE 等が小さかった。

3.2.3. カチオン活性剤に対する影響

Fig.-12 にアルキルトリメチルアンモニウムクロライドに対する粘菌の走化性の閾値を示した。アルキル基の影響を調べると、C₁₆, C₁₈ が最も影響が大きいく、これは一般的な抗菌力の傾向と良く一致していた。

3.3. 色素に対する影響

Fig.-12 Threshold concentrations for alkyltrimethylammonium chlorides with various carbon numbers in slime mold.

Fig.-13 にタール系色素10種に対する粘菌の走化性の閾値を示した。キサンテン色素 (Erythrosine, Eosine YS, Phloxine-B, Rose Bengal) が特に影響が大きいく、構造との相関が示唆された。

アゾ色素等の色素は、非常に影響が少く、発ガン性、遺伝毒性等で問題になっている色素 (Acid Violet, Amaranth) は必ずしも低濃度で影響を及ぼさず、本法では探知出来なかった。

Fig.-13 Threshold concentrations for artificial food dyes in slime mold.

Fig.-15 Relationship between Cth for parabens in slime mold and partition coefficient (octanol/water).

Fig.-14 Comparison of the threshold concentrations in slime mold with acute oral toxicity for various antimicrobials.

Fig.-16 Relationship between Cth for antimicrobials in slime mold and LD₅₀ orally in rats.

3.4. 抗菌剤に対する影響

Fig.-14 に各種抗菌剤に対する粘菌の走化性の閾値

と、急性経口毒性 (LD₅₀) を示した。粘菌の走化性に対するパラベンの影響は、アルキル基の増加に伴い増大し

た。これは、一般的には抗菌力や分配係数 (octanol/water) にみられる現象であり⁹⁾、これらとの相関がみとめられた (Fig.-15)。全体的にみて、エタノール、メチルパラベンに影響が少く、逆に、DHA-Na, TMTD, Irgasan CF₃, TCC, G-11 は大であり、毒性の結果と良く一致していた (Fig.-16)。

4. 総 括

化粧品原料の皮膚への影響を調べるために、粘菌の走化性により検討した。動物テストを用いた安全性テストに於て、刺激受容の初期過程は、細胞膜との相互作用の問題であると同時に、細胞膜で受容された情報がどのような機構で神経系や運動系へ変換、伝達されるかが問題である。粘菌の走化性は、細胞膜からの応答の結果により生ずると考えられ、高等動物の刺激受容反応のメカニズムに対応すると言われており、味覚や嗅覚の研究に用いられている。

我々は、この作用を応用して、化粧品原料の影響を検討したが、粘菌の走化性に対して、動物テストで反応の表われる濃度よりもはるかに低濃度で影響が生じた。また、試験した原料全ては負の走化性を示した (一般には粘菌が好まない物質と考えられる)。走化性の閾値と安全性データ (特に LD₅₀) との間にはかなりの相関性のあることが認められた。走化性と LD₅₀ との関の関係については、重金属や殺虫剤での研究があり、非常に高い相関性が認められているので¹⁰⁾、毒性評価の為には有効な一手段になりうると思われる。

本研究を進めるに当たり、いろいろ御指導いただきました北海道大学薬学部物理化学教室、小島陽之助先生、栗原堅三先生、上田哲夫先生に感謝致します。

文 献

- 1) H. P. Rusch, "Some Biochemical Events in the Life Cycle of Physarum polycephalum" (Advances in Cell Biology vol 1) p. 297 (1970) North-Holland Pub, Amsterdam.
- 2) N. Kamiya, "The Structure of Protoplasm" p. 199 (1942) Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- 3) W. G. Camp, Bull. Torrey. Bot. Clul. **63**, 205 (1936)
- 4) T. Ueda, K. Terayama, K. Kurihara and Y. Kobatake, J. Gen. Physiol. **65**, 223 (1973)
- 5) T. Ueda and K. Kobatake, Cytobiologie **16**, 16 (1977)
- 6) 藤井, 宇塚, 植原, 小林, 中嶋, 西日皮膚 **41** (1) 97 (1979)
- 7) 未発表, 資生堂研究所報告
- 8) 若林明子, 菊地幹夫, 遺伝 **30** (7) 10 (1976)
- 9) C. Hansch, J. L. Coubeils and A. Leo, CHIMIE THERAPEUTIQUE, (6) 427 (1972)
- 10) K. Terayama, H. Honma and T. Kawanabashi, J. Toxicol. Sci, **3**, 293 (1978)

(昭和54年10月11日受理)