

アミノ酸誘導体型界面活性剤ラウロイル- β -アラニンの皮膚に及ぼす影響^{†1}吉村政哲, 城倉洋二, 花沢英行, 野崎利雄, 奥田峰広, 芋川玄爾
花王株式会社 生物科学研究所^{†2)}**Biological Characterization of a Unique Amino acid
Derivative-surfactant, Lauroyl Beta-alanine in
Relation to its Cutaneous Effect.**^{†1}Masaaki Yoshimura, Yoji Jokura, Hideyuki Hanazawa,
Toshio Nozaki, Minehiro Okuda and Genji Imokawa
Biological Science Laboratories, Kao Corporation^{†2)}

Lauroyl beta-alanine (LBA) is a unique amino acid derivative-surfactant which has recently been found to have very low potential of inducing a specific inflammation-related receptor on epidermal cells, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) when incubated with human keratinocytes. This led us to assume that this surfactant possesses very low cutaneous inflammatory properties as opposed to ordinary commercially available anionic surfactants. Thus, we have assessed the biologic effects of LBA on several cellular derangements in the stratum corneum, cytotoxicity against human keratinocytes and an influence on arachidonic metabolism in skin tissue in comparison with those by other ordinary anionic surfactants such as potassium myristate (SOAP), sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium cocoyl isethionate (SCI), acylmethyl taurine (AMT) and monoalkyl phosphate (MAP).

Permeability experiments using hairless pig skin indicated that LBA is 10 and 3 times as lower permeable as SOAP and MAP, respectively. In *in vitro* study on human keratinocytes, of all anionic surfactants used, LBA showed the lowest inhibitory effect on cell growth which was accompanied by a lower level of the release of arachidonic metabolite such as prostaglandin E₂ (PGE₂) from human keratinocytes. This mild cellular effect was also corroborated by the previous observations that LBA elicits on substantial expression of ICAM-1 which has recently been identified on surface of epidermal cells in inflammatory dermatosis typified by T cell infiltration, in contrast to a marked expression by some of other anionic surfactants.

In order to clarify *in vivo* cutaneous effect, cumulative cup shaking test was carried out on the inner surface of human forearm skin by applying surfactant aqueous solutions twice a day for four days. Whereas almost all anionic surfactants induced severe scaling and erythematous reactions during repeated treatments, LBA was the only surfactant which did not elicit any roughness and inflammatory reaction. This non-inflammatory property was also corroborated by an additional study on damaged skin that roughened forearm skin after acetone/ether treatment can be slightly restored even by successive applications of LBA, but not other anionic surfactants used. These findings indicate that LBA has biologically low active properties to

both stratum coreum and epidermal cells which may lead to the development of a unique surfactant applicable to damaged skins.

1. 緒 言

家庭で用いられる様々な界面活性剤の消費量は年々増え続けており、皮膚と接触する機会が多い。家庭用製品に含まれる活性剤は、少ないがある程度は皮膚刺激や肌荒れを起こすポテンシャルがあることは知られている。

活性剤が皮膚に及ぼす悪い影響を除くための改良は、長い間行われてきており、モノアルキルフォスフェイト (MAP), N-アシルメチルタウリン (AMT), ソディウムココイルイセチオネート (SCI) 等、様々ないわゆる低刺激活性剤が用いられている^{1)~10)}が、そのターゲットは主に正常な皮膚に限定されてきた。それ故に、商業ベースで用いられているマイルドな活性剤は、正常でない皮膚状態、つまり乾皮症やアトピー性皮膚炎といった人の要求には答えていなかった。従って皮膚に対して刺激性の極めて低い活性剤を開発することは重要なことと言えよう。

皮膚に対する活性剤の刺激作用は、主としてその化学構造と表面の化学特性に依存していることは良く知られている。また、最近の報告によると、活性剤によって起こる刺激反応の大部分は、経皮吸収、細胞毒性、ある種の接着分子の発現、アラキドン酸代謝物の放出によって引き起こされる、表皮細胞の変性によるものであり、皮膚の炎症を意味している。

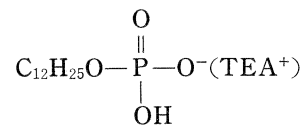
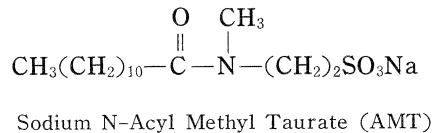
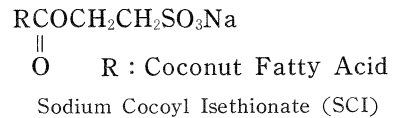
我々は、ユニークなアミノ酸由来の界面活性剤を開発した。それは最近見つけられた表皮細胞上の炎症に特異的な接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)^{11)~15)} を非常に低いレベルしか発現させなかった。更に皮膚残留性、

アラキドン酸代謝物の放出、細胞毒性、といった性質についても評価した。

2. 実 験

2.1 活性剤

活性剤 (Fig.-1) の入手先は以下の通りである (標識化合物を除く)。ソディウムドデシルサルフェイト (SDS, 和光純薬工業), SCI (Rhune-Poulenc, フランス), AMT (日光ケミカル), ミリスチン酸 (SOAP), MAP, LBA (自製)。尚, ミリスチン酸は水酸化カリウムまたはトリエタノールアミン (TEA, 和光純薬) で, MAP 及び LBA は, TEA で中和して用いた。



Triethanolamine
Monoalkyl Phosphate (MAP)



Triethanolamine
N-Lauroyl beta-Alaninete (LBA)

Fig.-1 Structural formula of surfactants.

^{†1)} 第17回 IFSCC 横浜大会 ('92年10月) で口頭発表

^{†2)} 321-34 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606; 2606 Akabane Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi Pref. 321-34 Japan

2.2 活性剤残留量の測定

本実験では、一般の豚に比べて体毛が柔らかく、少ない為、経皮吸収性がヒト皮膚に近いことが知られているユカタンミニブタ (Charles River より入手) の背部皮膚を用いた¹⁶⁾。放射性の LBA 及び MAP は、それぞれ、 β -[1-¹⁴C]-アラニン (Du Pont-New England Nuclear), 1-¹⁴C-アルキルアルコール (ICN Biomedicals, Inc.) を原料として我々が合成した。³⁵S-SDS 及び ³H-ミリスチン酸はアマシャム社から購入した。SCI 及び AMT は非標識化合物で行った。この実験では、ミリスチン酸を TEA で中和して用いた。ユカタンミニブタの皮膚をデルマトームで 2 mm の厚さに薄切後、70%のエタノール綿で拭いて表在脂質を取り除いた。直径 25mm のガラスのカップに皮膚を付け、100mM の種々の活性剤溶液 1.5ml をカップに入れ、30°C で 30 分間インキュベートした。その後、1.5ml の蒸留水 (30°C) で 3 回濯いだ。長さ 1.5cm、幅 1 cm のセロハンテープ (ニチバン) で 10 回のテープストリップを行い、それぞれのテープに含まれる活性剤量を測定した。放射性化合物である SOAP, SDS, MAP 及び LBA は液体シンチレーションカウンターで、AMT と SCI はエプトン法で求めた。

2.3 細胞毒性

活性剤による細胞毒性をクリスタルバイオレット染色法¹⁷⁾で調べた。ヒトケラノチノサイト (倉敷紡績) を 96 穴プレート (Becton Dickinson & Co.) で 24 時間無血清培地 (K-GM, 倉敷紡績) で培養後、活性剤 (SDS, SOAP, SCI, AMT, MAP 及び LBA, 10⁻⁶~10⁻²M) を含む培地に換えて、6 時間、37°C, 5%CO₂ 下でインキュベートした。インキュベート終了後、死細胞を PBS で洗浄除去し、プレートに生着している細胞を 2%パラホルムアルデヒドで固定し、続いて細胞を 20%エタノールに溶かした 0.2% クリスタルバイオレット中で 4°C で 1 時間インキュベートすることにより染色し、エタノール/メタノール/水 (4:5:1) で溶解後、570nm の吸光度を測定した。

2.4 活性剤によるヒト前腕屈曲側部での洗浄試験

被験者は年齢 20 から 30 歳の健康な男女 20 人で 10 人づつ 2 つのグループに分け実験を行った。1 つのグループは、前処理せず、活性剤を前腕部に付けたカップに入れ振盪させ、健康な皮膚に対する評価を行った。一方、別のグループは、アセトン/エーテル (1:1, A/E) で脱脂処理後、活性剤処理し、人工的に荒れた皮膚に対する評価とした^{18), 19)}。

健康な皮膚に対する評価では、30 分間の活性剤溶液処理を 1 日 2 回、4 日間行った。尚、使用活性剤は、ミリスチン酸カリウム塩 (SOAP), MAP 及び LBA である。また荒らした皮膚に対する評価では、初日 (Day 0) に A/E で 10 分間処理した後、翌日から 30 分間の活性剤溶液処理を 1 日 2 回 3 日間行った。尚、使用活性剤は、MAP, LBA, AMT 及び SCI である。

直径 25mm の底の開いたカップを 3 個ずつ前腕屈曲側部に付け、場所を決めて活性剤溶液を各 5ml をカップに入れ、腕を一定速度で振盪させた。落屑及び紅斑は次の基準に従って判定した。-: 認めない, ±: 僅かに認める, あるいは明瞭だが一部に限定される, +: 処理部位の全面に認める, あるいは一部に明瞭に認める。+: 処理部位の全面に明瞭に認める, あるいは極めて重篤な変化を認める。

コンダクタンスは、ぬるま湯で前腕屈曲側部を濯ぎ、キムワイプで拭いた後、Skicon-200hygro-meter (I. B. S.) を用いて、プローブを 30g の圧力で皮膚に押し当てて測定した。測定の原理は田上らの方法²⁰⁾に拠る。測定は 5 回行い、平均値を求めた。尚、皮疹判定とコンダクタンスの測定は、20°C, 40% の環境下、20 分間順化させた後行った。

3. 結 果

3.1 活性剤残留量の測定

一般に荒れた皮膚では経皮吸収が高まることが知られているが、それを確認するため、A/E 処理によって作ったモデル荒れ肌を用いて、SDS の残

留量を測定した。その結果、無処理の皮膚に比べて、約1.5倍の活性剤の浸透残留量が認められた。この結果は、荒れた肌では活性剤の浸透残留量が、より多くなる可能性を示唆する。

次に様々な活性剤を用いて、ユカタンミニプタ皮膚に対する活性剤の浸透残留量を調べた。テープストリップによる定量の結果、いずれの活性剤においても角層の表面に近いほど活性剤が多く残留していることがわかった。特に SOAP や SDS においてより多く残留しており、低刺激活性剤といわれる。MAP, SCI, AMT, LBA の間でも活性剤の残留量に差が認められた。そこで、各活性剤について、10枚のテープをまとめた残留量をグラフ化した (Fig.-2)。その結果、AMTとLBAの間で有意差が認められ、LBA は低刺激活性剤の中でも最も浸透残留量の低い活性剤であることが明らかとなった。

3.2 細胞毒性

次に、界面活性剤が直接表皮細胞に接触した時の影響を検討するため、細胞毒性を評価した。その結果、Fig.-3 で示した様に特に MAP や LBA では細胞への影響が少ないことが明らかとなった。

3.3 活性剤によるヒト前腕屈側部での洗浄試験

次に我々は、ヒトの前腕屈側部を用いた *in vivo* 系で界面活性剤の皮膚作用の評価を行った。

1日2回30分ずつ4日間合計8回処理し、皮膚判定及びコンダクタンスの測定を1日おきに行ない、10人の落屑スコアをまとめた。

今回用いた方法は、従来の低刺激活性剤の評価方法と比較して、活性剤処理時間が長く、厳しい評価方法と言えるが、SOAP では重度の落屑が認められたが、ラウロイル- β -アラニン低刺激活性剤である MAP より更に乾燥粗糙性変化が少ないことがわかった。紅斑についても、同様の結果が得られ、コンダクタンスの変化でも、ラウロイル- β -アラニンは水とほぼ同レベルであり、ほとんど低下が認められなかった (Fig.-4)。以上のように、健常肌では、ラウロイル- β -アラニンは、落屑、紅斑、コンダクタンスのいずれの指標によ

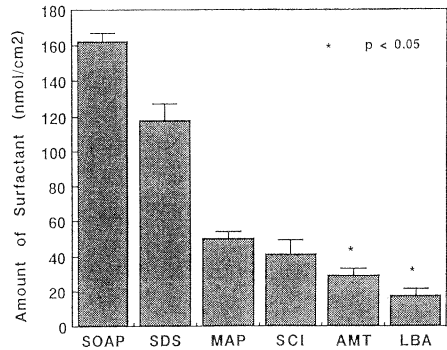


Fig.-2 Total amounts of surfactants in the stratum corneum. Sum of 10 tripped tapes which removed from the stratum corneum-treated with various surfactant solution. N=5. Mean \pm SD.

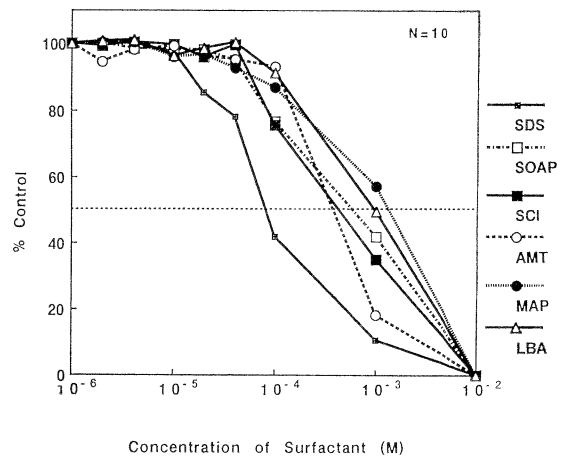


Fig.-3 Dose-response relationships of cytotoxicity for six surfactants, SDS, SOAP, SCI, AMT, MAP and LBA by the crystal violet staining method. N=10.

っても刺激が極めて低い活性剤であることがわかった。

次に、健常肌ではなく、アセトン/エーテル処理により脂質を除いたモデル荒れ肌で、活性剤処理による影響を調べた。

ヒト前腕屈側部を10分間、アセトン/エーテル

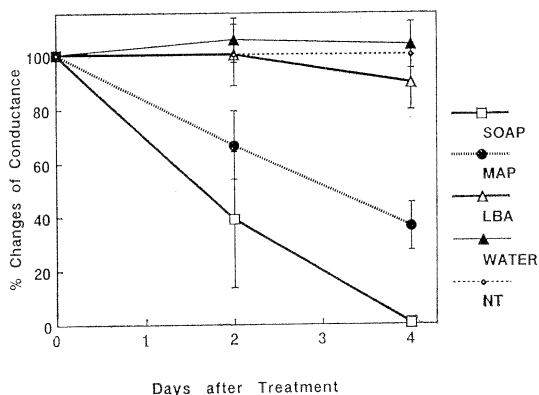


Fig. 4 Time course curve of conductance value induced by various surfactants on normal healthy forearm skin. N=10. Mean±SE. NT : nontreated.

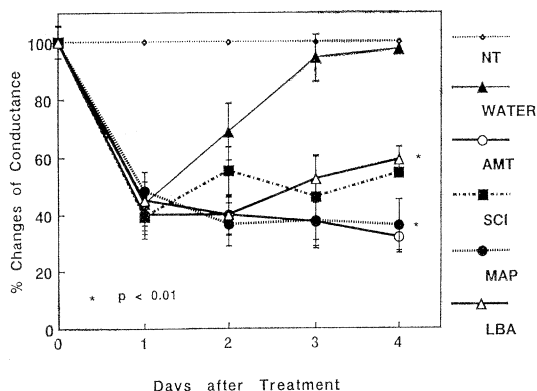


Fig. 5 Time course curve of conductance value after acetone/ether treatment and subsequent daily cumulative treatments of surfactants. N=10. Mean ±SE. NT : nontreated

処理後、翌日から3日間、毎日2回30分間合計6回の活性剤処理を行った。

A/E 処理により誘導した落屑は、さらにAMT, MAP 処理を行うことにより悪化する傾向が認められるのに対し、LBA では回復する傾向が認められた。

紅斑は10分間の A/E 処理のみでは全く認められなかったが、その後の活性剤処理により AMT, SCI, MAP では出現したのに対し、LBA は水処理と同様全く変化が認められなかった。

Fig. 5 に初期値及び無処理の値を100%とした時のコンダクタンスの変化率を示した。いづれも、アセトン/エーテル処理でコンダクタンスが低下し、その後の活性剤処理で、AMT や MAP ではほとんど回復が認められないのに対し、LBA やSCIではいづれの被験者でも回復が認められ、最終日では、LBA は、AMT や MAP との間に有意差が認められた。

4. 考 察

これまでの界面活性剤の皮膚への影響に関する研究は、活性剤による、NMF、セラミド等の角層内成分の溶出等の、角層を中心とした研究が多く行なわれてきた^{1)~10)}。我々は、皮膚のバリアー

機能が低下している、荒れた肌への応用を考え、表皮細胞への活性剤の直接的な作用を調べることを目的として、角層での残留性及び表皮ケラチノサイトに対する起炎性について検討した。

ケラチノサイトの起炎性の指標として、まず培養ヒトケラチノサイトに対する細胞毒性評価を行った結果、MAP や LBA では細胞への影響が少ないことが明らかとなった。

皮膚外界からの刺激に対して、表皮ケラチノサイトが、炎症性サイトカインを分泌する。このサイトカインが炎症局所の血管内皮細胞を活性化し、内皮細胞での接着分子、例えば intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 等の発現を促す。リンパ球はこれらの接着分子と接着後、血管外へ浸潤する。リンパ球がマクロファージや抗原に出会うことにより活性化し、再び炎症性サイトカインを産生する。これらのサイトカインの刺激により、ケラチノサイト自身も ICAM-1 を発現し、リンパ球が表皮へ接着したリンパ球はさらにサイトカインを分泌し、ICAM-1 がさらに増強される。その後種々の炎症関連細胞の産生するサイトカインにより細胞が動員され炎症はピークへと向かう。最近の研究で、このケラチノサイトの ICAM-1 がアトピー性皮膚炎等の炎症の初期状態

において重要な役割をしていることがわかってきている^{11)~13)}。そこで我々は、これを炎症の初期状態の指標として用いた。更にその後のアラキドン酸代謝物の放出として、活性剤連続塗布後バイオペシーした皮膚中のプロスタグランジン E_2 (PG E_2) の定量を行った。その結果、LBA ではそれらが低いレベルにあることが認められた。

以上のことから LBA の特徴をまとめると次のようになる。

in vitro の評価において、皮膚浸透性、細胞毒性が低いことから、乾燥粗糙性変化や、表皮細胞への影響が少いことが考えられ、さらに PGE₂ 放出量、ICAM-1 の発現量が少ないことから、炎症の発生が抑制されることが考えられる。

実際、*in vivo* 系で評価した結果、健康肌での刺激がほとんどなく、モデル荒れ肌でも、他の活性剤とは異なり回復傾向が認められたことで、*in vitro* の結果が裏付けられた。

5. 総 括

ラウロイル- β -アラニン は、極めて低刺激の活性剤であり、荒れ肌やアトピー性皮膚炎等バリアーが低下する疾患を持つ人でも安心して使用できる可能性が示唆された。

REFERENCES

- 1) G. Imokawa, K. Sumura and M. Katsumi, J. Am. Oil. Chem. Soc., **52**, 479 (1975)
- 2) G. Imokawa, K. Sumura and M. Katsumi, J. Am. Oil. Chem. Soc., **52**, 484 (1975)
- 3) G. Imokawa and T. Takeuchi, Cosmet. Toiletries, **91**, 32 (1976)
- 4) G. Imokawa, H. Tsutsumi and H. Kurosaki, J. Am. Oil. Chem. Soc., **55**, 839 (1978)
- 5) G. Imokawa and Y. Mishima, Contact. Dermatitis., **5**, 357 (1979)
- 6) G. Imokawa, J. Am. Oil. Chem., **56**, 604 (1979)
- 7) G. Imokawa, J. Soc. Cosmet. Chem., **31**, 45 (1980)
- 8) M. Kawai and G. Imokawa, J. Soc. Cosmet. Chem., **35**, 147 (1984)
- 9) H. Takahashi, Fregrance J., **68**, 49 (1984)
- 10) T. Anzai, Fregrance J., **68**, 42 (1984)
- 11) M.L. Dustin, Annu. Rev. Immunol., **9**, 27 (1991)
- 12) C.M. Willis, C.J.M. Stephens and J.D. Wilkinson, J. Invest. Dermatol., **96**, 505 (1991)
- 13) V.A. De Leo, L.C. Harber, B.M. Kong and S.J. De Salva, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **184**, 477 (1987)
- 14) K.H. Singer, D.T. Tuck, H.A. Sampson and R.P. Hall, J. Invest. Dermatol., **92**, 746 (1989)
- 15) T.J. Stoof, R.S. Mitra, V. Sarma, V.M. Dixit and B.J. Nickoloff, J. Invest. Dermatol., **98**, 92 (1992)
- 16) T. Kurihara-Bergstrom, M. Woodworth, S. Feisullin and P. Beall, Lab. Anim. Sci., **36**, 396 (1986)
- 17) K. Saotome, H. Morita and M. Umeda, Toxicol. Vitro, **3**, 317 (1989)
- 18) G. Imokawa and M. Hattori, J. Invest. Dermatol., **84**, 282 (1985)
- 19) G. Imokawa, S. Akasaki, M. Hattori and N. Yoshizuka, J. Invest. Dermatol., **87**, 758 (1986)
- 20) H. Tagami, M. Ohi, K. Iwatsuki, Y. Kanamura, M. Yamada and B. Ichijo, J. Invest. Dermatol., **75**, 500 (1980)

(1993年5月26日受理)