

糖脂質誘導体の毒性学的研究

- (I) POLYOXYPROPYLENE (12) [(2'-0- β -D-GLUCOPYRANOSYL) OXY-] FATTY ACID ESTERの急性毒性, 眼刺激性, 皮膚一次刺激性, 皮膚感作性, 光毒性, 光感作性, 変異原性試験—

池田 祐三, 砂川 隆, 土屋 秀一

近藤 三雄, 岡本 暉公彦

花王株式会社栃木研究所

TOXICOLOGICAL STUDIES ON SOPHROLIPID DERIVATIVES

- (I) ACUTE TOXICITY, EYE IRRITATION, PRIMARY SKIN IRRITATION, SKIN SENSITIZATION, PHOTOTOXICITY, PHOTOSENSITIZATION, MUTAGENICITY OF POLYOXYPROPYLENE (12) [(2'-0- β -D-GLUCOPYRANOSYL- β -D-GLUCOPYRANOSYL) OXY-] FATTY ACID ESTER—

Yuzo IKEDA, Takashi SUNAKAWA, Shuichi TSUCHIYA,
Mitsuo KONDO and Kikuhiko OKAMOTO

Tochigi Research Laboratories, KAO CORPORATION,
2606 Akabane, Ichikaimachi, Haga, Tochigi 321-34, Japan

Accepted February 21, 1986

Abstract.....Acute toxicity, eye irritation, primary skin irritation, skin sensitization, phototoxicity, photosensitization and mutagenicity of sophorolipid derivatives were studied in rats, mice, rabbits, guinea pigs and *Salmonella typhimurium* strains.

The acute oral toxicity of sophorolipid (SL) which *Torulopsis bombicola* produces, and its derivatives (PSL, Ethyl-SL and Oleyl-SL) were shown to be very low. The LD₅₀ values of PSL ranged from 10 g/kg to 16 g/kg on oral administration in rats and mice, and from 5.8 g/kg to 6.6 g/kg on subcutaneous administration in mice. The oral LD₅₀ values of Ethyl-SL and Oleyl-SL were estimated to be greater than 15 g/kg and that of SL was 12.5 g/kg. In eye irritation study, PSL failed to produce any reactions at 50% concentration even

連絡先: ☎321-34 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社栃木第一研究所

池田 祐三

Yuzo IKEDA et al.

when the rabbit eye was not subsequently washed. SL, Ethyl-SL, Oleyl-SL and Tween 20 were “no irritant” or “slight irritant” to the rabbit eye at 20% concentration. PSL showed no irritancy to both the intact and abraded guinea pig skin at 50% concentration. And in other examinations, it was also indicated that PSL had no potentials of skin sensitization, phototoxicity and photosensitization in guinea pigs and had no potentials of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Key words: acute toxicity, eye irritation, primary skin irritation, skin sensitization, phototoxicity, photosensitization, mutagenicity, sophorolipid derivatives, polyoxypropylene (12) [(2'-0- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) oxy-] fatty acid ester.

緒 言

Polyoxypropylene (12) [(2'-0- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) oxy-] fatty acid ester (C₁₆~C₁₈), (以下PSLと略称する) は井上(1983) および木村ら(1985) によって開発された糖脂質誘導体で、乳液、クリーム等の化粧品に配合することにより、優れた使用感を与える作用を有する。本物質は酵母の一種である *Torulopsis bombicola* が産生する Sophorolipid; (2'-0- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) oxy] fatty acid 1', 4" lactone, 6', 6" diacetate (以下SLと略称する) から誘導される油性物質である。

今回、著者らはPSLについて急性毒性、眼刺激性、皮膚一次刺激性、皮膚感作性、光毒性、光感作性、変異原性を検討したのでその成績を報告する。また、SLおよび同じくSLから誘導される(2'-0- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) oxy] fatty acid ethyl ester (以下Ethyl-SLと略称する)、および(2'-0- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) oxy] fatty acid oleyl ester (以下Oleyl-SLと略称する) についても若干の毒性学的検討を加えたので報告する。

被 験 物 質

PSL, SL, Ethyl-SL, Oleyl-SLはいずれも茶褐色の物質でEthyl-SL以外は水に不溶であり、SLおよびEthyl-SLはニカワ状の半固形物質、その他のものは粘稠な液体である。これらの物質の構造式をFig. 1に示した。

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

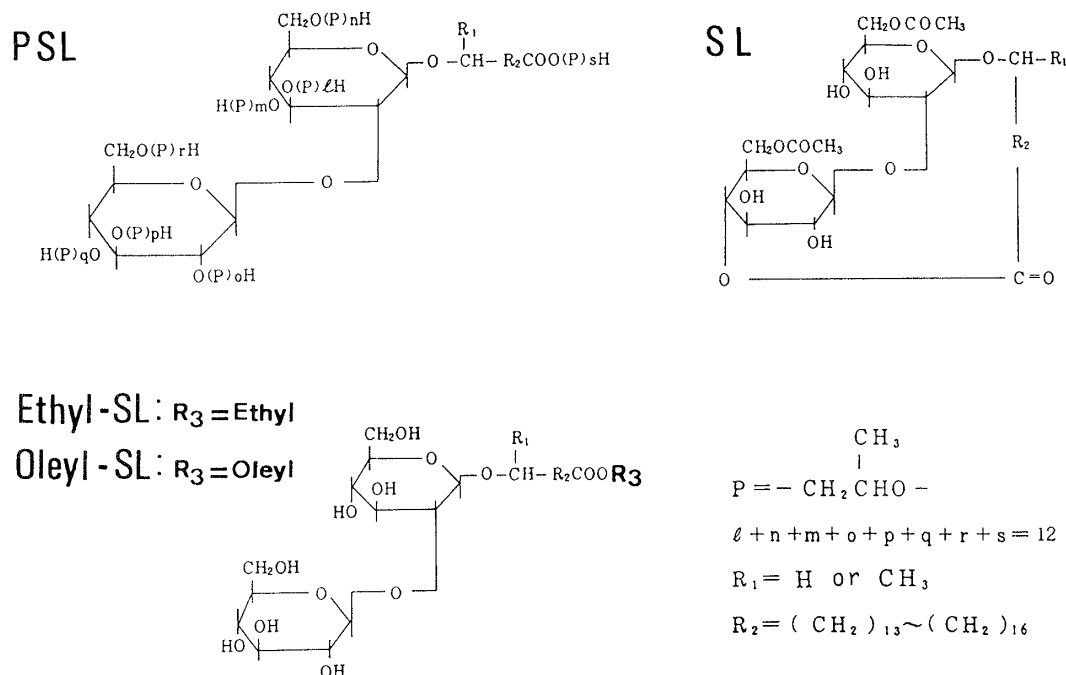


Fig. 1 Chemical structures of PSL, SL, Ethyl-SL and Oleyl-SL.

材料および方法

1. 急性毒性試験

急性毒性試験はPSL, SL, Ethyl-SL, Oleyl-SLについて実施した。

ICR系マウスおよびSprague-Dawley系ラット雌雄を静岡県実験動物農業協同組合より4週齢で購入し、予備飼育した後5～6週齢で試験に供した。被験物質投与時の動物平均体重はマウス雄25～29 g, 同雌21～23 g, ラット雄120～155 g, 同雌100～130 gであった。

マウスは適量の本屑床敷を入れたポリカーボネート製ケージに5匹ずつ収容し、ラットは金網床金属製ケージに2～3匹ずつ収容して室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 10\%$, 換気回数15回/時に設定された動物室中で飼育した。固型飼料(CE-2, 日本クレア株式会社)および水(水道水)は自由に摂取させた。ただし、経口投与の場合は投与前16～18時間の絶食を行った。動物は1群10匹とし各投与群に無作為に配分した。

経口投与の場合は被験物質を蒸留水にて37.5% W/Vの懸濁液となるように調製し、ラット用あるいはマウス用の金属性胃ゾンデを用いて強制投与した。皮下投与の場合は被験物質を滅菌生理食塩液にて50% W/Vの懸濁液となるように調製し、21Gの注射針を用いて動物背部肩甲骨間から背部中央部皮下に投与した。濃度は上記のごとく全て一定とし投与液量を変化させて投与量レベルを設定した。

被験物質投与後は経口投与の場合は7～10日にわたって、皮下投与の場合は45～60日にわたって各動物の症状、一般状態の観察および死亡例の記録を行い、観察期間終了時の死亡率よ

Yuzo IKEDA et al.

りLitchfield and Wilcoxon法 (Litchfield 1974) でLD₅₀ 値を算出した。観察期間中は常に死亡例の発見に務め死亡例は発見次第速やかに剖検し、諸臓器の肉眼的観察を行った。生存例は観察期間終了時にマウスでは頸椎脱臼により、ラットではエーテル深麻酔により致死させ、剖検を行った。

2. 眼刺激性試験

ウサギ雌 (日本白色種, 3.1~3.4 kg) を (有) 市川屋 (東京都) より購入し予備飼育の後、試験に供した。飼育はマウスと同様の環境の飼育室で行った。固型飼料 (CR-1, 日本クレア株式会社) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

被験物質は蒸留水でPSLは50% w/wに、SL, Ethyl-SL, Oleyl-SLは20% w/wに分散、懸濁させて用いた。なお、比較検討するために比較的近縁な物質であるPolyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (以下Tween 20と略称する) の20%水溶液についても試験を行った。

動物は1群3~5羽とし、固定器に固定した状態で各投与液を0.1 ml点眼した。点眼後数秒間は閉眼させ、投与液を眼になじませた。点眼後は1時間固定した後、動物を自由にした。判定は点眼1, 24, 48, 72, 168時間後の計5回にわたりDraize (1959)の基準に従って行った。

3. 皮膚一次刺激性試験

Hartley系モルモット (体重250~300 g) を静岡県実験動物農業協同組合より購入し予備飼育の後、試験に供した。飼育はマウスと同様の環境の飼育室で行った。固型飼料 (CG-3, 日本クレア株式会社) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

被験物質PSLは白色ワセリン中に50% w/wの濃度に混入して用いた。

動物は1群10匹とし、貼付の4~5時間前に背側部被毛を電気バリカンで刈り、さらに電気カミソリで剃毛した後、健全な皮膚の部位と18Gの注射針で血がにじまない程度に井桁状に傷をつけた損傷皮膚の部位にパッチテスト用絆創膏 (スモールサイズ, 鳥居薬品株式会社) を用いて24時間の閉鎖貼付を行った。貼付処置はパッチテスト用絆創膏を貼った上に粘着性スポンジ (レストン, 住友スリーエム社) を圧着し、伸縮性粘着包帯 (Trans pore, 住友スリーエム社) で胴の周囲を巻いて行った。

判定は塗布部位を再度剃毛し、剃毛4~5時間後に下記基準に従って行った。

- : 反応は認められない
- ± : 散在性またはかすかな紅斑
- + : 明瞭な紅斑
- ++ : 浮腫をともなった紅斑
- +++ : 紅斑, 浮腫に痂皮または壊死をともなう

4. 皮膚感作性試験

Hartley系モルモット (体重250~300 g) を静岡県実験動物農業協同組合より購入し、予備飼育の後試験に供した。飼育はマウスと同様の環境の飼育室で行った。固型飼料 (CG-3, 日本クレア株式会社) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

感作方法はMagnusson and Kligman (1969)のMaximization法に準拠し、皮内注射および接

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

触の2段階からなる感作を行った。試験0日目に毛刈り、剃毛した動物の背上部に1%w/wPSL生理食塩液、Freund's complete adjuvant (FCA) (FCA, DIFCO LABORATORIES), およびFCAと2% w/w PSL生理食塩液を等容混合した乳化液の3試料を0.1 mlずつ2カ所に皮内注射した。つづいて試験7日目にPSL原液の0.2 mlをリント布 (2×4 cm) に含浸させ、同じ部位に毛刈り、剃毛の後、48時間閉鎖貼布した。

惹起は試験21日目に塗布で、試験42日目に24時間閉鎖貼付で行った。塗布は綿棒で行い(液量は約0.01 ml)、閉鎖貼付は動物の背側部にパッチテスト用絆創膏(スモールサイズ、鳥居薬品株式会社)を用いて行った。閉鎖貼付の液量は0.05 mlとした。惹起濃度は塗布では10%および50% w/w (エタノール溶液) とし、閉鎖貼付では50% w/w (蒸留水あるいはワセリンに分散) とした。

判定は皮膚一次刺激性試験と同様の基準に従って惹起後24, 48, 72時間目に行った。なお、皮膚の試験部位は判定の4～5時間前に剃毛した。

5. 光毒性試験

Hartley系モルモット(体重300～350 g)を静岡県実験動物農業協同組合より購入し予備飼育の後、試験に供した。飼育はマウスと同様の環境の飼育室で行った。固型飼料(CG-3, 日本クレア株式会社)および水(水道水)は自由に摂取させた。

被験物質PSLはエタノールで10%および50% w/wに調製して用い、Oleyl-SLはエタノールで1%, 5%, 20% w/wに調製して用いた。また、陽性対照として8-Methoxypsoralen (8-MOP)をエタノールで0.001～0.1% w/wに調製して用いた。動物の背部の毛を刈り、剃毛して固定器に腹位に固定した後、調製液の0.025 mlを直径2 cmの円形に照射部、非照射部それぞれ2箇所(計4箇所)に塗布した。塗布30分後に非照射部の箇所をアルミホイルで被った後、光照射を行った。

照射光源は蛍光灯FL20SE(波長275～380 nm, Peak 315 nm, 東芝電気株式会社)および蛍光灯FL20BLB(波長310～400 nm, Peak 350 nm)を用いた。照射はPSLではFL20SE 3本とFL20BLB 3本を交互に配列し、20 cmの高さから10分間行った〔Exposure (B)〕後、ただちにFL20BLB 6本で10 cmの高さから1時間行った〔Exposure (A)〕。また、Oleyl-SLと8-MOPではExposure (A)とExposure (B)とを別々に行い、検討した。

判定は皮膚一次刺激性試験と同様の基準に従って照射後24, 48, 72, 168時間目に行った。なお、試験部位の皮膚は判定の4～5時間前に剃毛した。

6. 光感作性試験

Hartley系モルモット(体重300～350 g)を静岡県実験動物農業協同組合より購入し予備飼育の後、試験に供した。飼育はマウスと同様の環境の飼育室で行った。固型飼料(CG-3, 日本クレア株式会社)および水(水道水)は自由に摂取させた。

動物の頸部の毛を刈り、剃毛して固定器に腹位に固定した後、50% w/w PSLエタノール溶液0.1 mlを2×3 cmの長方形に塗布し、FL20SE 3本とFL20BLB 3本の蛍光灯(交互配列)で20 cmの高さから1時間光照射した。この操作を1日に1回の割合で2週間にわたって計10回行い、感作とした。惹起は感作最終日より2週間後に行った。すなわち、動物の背部毛を毛刈、

Yuzo IKEDA et al.

剃毛し、固定器に固定した後、10%および50% w/w PSLエタノール溶液の0.025 mlを直径2 cmの円形に照射部、非照射部それぞれ2箇所（計4箇所）に塗布し、非照射部の箇所をアルミホイルで被った後、塗布30分後に光照射を行った。惹起の照射光源および照射方法、照射時間は光毒性試験の際のPSLの条件と同様である。

判定は皮膚一次刺激性試験と同様の基準に従って照射後24, 48, 72時間目に行った。なお、試験部位の皮膚は判定の4～5時間前に剃毛した。

7. 変異原性試験

試験方法は矢作（1975）の方法に準じた。

検定菌株は *Salmonella typhimurium* TA 98 (Frameshift型変異株) と TA 100 (塩基交換型変異株) の2菌株を用い、これを培養液 (0.8%ディフコ・ニュートリエントブロス+0.5%塩化ナトリウム) 中で37°Cで1晩振盪培養し、検定菌液とした。

被験物質PSLをDimethyl sulfoxide (DMSO, Merck社製) に溶解して試験試料液とし、これの0.1 mlと100 mMリン酸緩衝液0.5 mlとを混合した後、37°Cで20分間振盪しながら、プレインキュベートした。これに上層軟寒天液 [(0.65%寒天+0.6%塩化ナトリウム)+1/10容量 (0.5 mMヒスチジン+0.5 mMビオチン)] 2 mlを加えた後、Vogel Bonnerの最少寒天培地上に広げた。これを37°Cで2日間培養後、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで計測した。

また、上記試験 (非代謝活性化系) に加えて、PCB (PCB-54, 東京化成工業株式会社) を腹腔内投与したラットの肝より調製したS-9 Mix (S-9分画+NADPH産生系) を検定菌液、試験試料液に添加して同様に培養する試験 (代謝活性化系) も実施した。

陽性対照としては非代謝活性化系では4-Nitro-quinoline-1-oxide (4NQO)を、代謝活性化系では3, 4-Benzo (a) pyrene (BP)を用いた。

試験成績

1. 急性毒性試験

PSL, Oleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLのLD₅₀ 値、動物死亡状況をTable 1に示した。PSLのLD₅₀ 値は経口投与ではラットで15500～16400 mg/kg, マウスで10500～12000 mg/kg, 皮下投与ではラットで6580 mg/kg, マウスで5800 mg/kgであった。その他、Oleyl-SL, Ethyl-SLのマウス雄における経口LD₅₀ 値はいずれも15000 mg/kg以上、SLでは12500 mg/kgであった。

死亡は大略10 g/kg以上の量を経口投与した場合に主として投与0～1日目に生じ、皮下投与ではラットの場合には5 g/kg以上、マウスの場合には4 g/kg以上の量によって死亡例が用量依存的に0～4日目に生じた。特にラットの皮下投与群では6580 mg/kg以上の投与により2～4日目に死亡が生じた。また、ラットでは8日目以降にも数例の死亡が認められたが、これらは皮下に生じた炎症が腹壁穿孔を引き起こしたことによる死亡であった。

PSL経口投与時の症状はラット (投与量約11 g/kg以上)、マウス (投与量約9 g/kg以上) とも当初、自発運動の減少が発現し、続いて鎮静、過呼吸、四肢脱力、軟便、下痢、立毛などがみられ、大量投与 (ラット約19 g/kg以上、マウス約14 g/kg以上) 時には大部分の動物が0～1

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

日目に死亡したが、本物質の特異的な毒性を示唆するような症状は認められなかった。生存例は4～5日目までにこれらの症状から回復した。その他、Oleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLの経口投与においても程度の差はあるものの、本質的にはほぼ同様の症状が観察された。

PSLの皮下投与ではラット(投与量約5 g/kg以上)、マウス(投与量約4 g/kg以上)とも3～4時間目より鎮静が発現し、1日目からは加えて過呼吸、立毛、体側部から下肢大腿部にかけて水腫様腫脹がみられ、同部下肢の運動障害が観察された。大量投与群ではこれらの症状から回復することなく、大概4日目までに死亡したが、ラットにおいては皮下に生じた炎症が腹壁穿孔を引き起こし、8日目以降になって数例が死亡した。生存例ではラット、マウスとも皮下の水腫様腫脹、壊死、痂皮形成等を除き大部分の症状は7～10日目までに消失した。水腫様腫脹部位の皮膚は3日目頃より壊死を生じ、以後硬化および痂皮形成がみられ、その後痂皮の脱落、癒痕形成を経て治癒した。

経口投与試験における剖検ではSL, Ethyl-SL, PSLのいずれにおいても死亡例では胃幽門部から小腸にかけての充血あるいは軽度の出血が認められた。PSLではマウス、ラットの2種で試験を行っているが、いずれにおいても同様の所見であった。生存例では特に異常を認めなかった。

PSL皮下投与におけるマウス死亡例では投与部位皮下および左右どちらか一方の体側部から大腿部の皮下にかけて強度の出血および水腫が認められた。また、同部の皮下にPSLと考えられる物質の残存が認められた。ラットにおいてもほぼ同様の所見であるが、8日目以降の死亡例において痂皮部に腹壁穿孔がみられた。またこれらの例では肝、腎の一部と腹膜との癒着が認められた。一方、生存例の剖検においてもラット、マウスとも癒痕形成部の皮膚と筋組織との癒着、肝、腎、脾、膵、小腸の一部と腹壁との癒着が認められた。

2. 眼刺激性試験

眼刺激性試験の結果をTable 2に示した。PSLの50% w/w懸濁液点眼による刺激性は洗眼しないという条件においても反応を認めなかった。一方、Oleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLの20%水溶液では充血、分泌物を主体とする軽度の結膜炎が点眼後1～3日目まで見られたが、7日後には正常に復した。Draizeの評点は点眼後1時間目に最大値(2～10)を示し、以後漸減した。また比較対照とするために行ったTween 20の20% w/w水溶液では結膜に充血がわずかに認められた。Draizeの評点は最大で2であった。

3. 皮膚一次刺激性試験

皮膚一次刺激性試験の結果をTable 3に示した。PSLのモルモットの健常皮膚および損傷皮膚に対する刺激性は50% w/wの高濃度のものを24時間閉鎖貼付する試験条件においても認められなかった。

4. 皮膚感作性試験

皮膚感作性試験の結果をTable 4に示した。PSLのMaximization法による評価では、塗布による惹起および24時間閉鎖貼付による惹起のいずれにおいても反応はみられず、感作性は認められなかった。

Yuzo IKEDA et al.

Table 1 LD₅₀ values of PSL, Oleyl-SL, Ethyl-SL and SL.

Material	Route	Species	Sex	Dose (mg/kg)	Number of dead animals ^{a)} during observation period (day)				Lethality (%)	LD ₅₀ (95% confidence limits) (mg/kg)			
					0-1	2-4	5-7	8-					
PSL	PO	Rat	M	11340	0	0	0	0	0	16400 (15050-17880)			
				13040	0	1	0	10					
				15000	3	0	0	30					
				17250	5	1	0	60					
				19840	7	2	0	90					
				22810	10	0	0	100					
		F	Rat	F	9860	0	0	0	0	15500 (13840-17360)			
					11340	1	0	0	10				
					13040	3	0	0	30				
					15000	6	0	0	60				
					17250	4	1	0	50				
					19840	9	1	0	100				
	SC	Rat	M	6960	0	0	0	0	12000 (9850-14650)				
				9210	0	3	0	30					
				12170	2	1	0	30					
				16100	7	2	0	90					
				21290	9	1	0	100					
				F	Rat	F	6960	0		0	0	0	10500 (9380-11760)
							8000	2		0	0	20	
							9210	3		1	0	40	
							10590	0		2	0	20	
12170		4	3				0	70					
14000		6	4				0	100					
SC		Rat	M	3760	0	0	0	0	6580 (5530- 7830)				
				4970	0	0	0	0					
				6580	0	4	0	1		50			
				8700	0	6	0	2		80			
	11500			1	9	0	0	100					
	Mouse	M	M	3010	0	0	0	0	5800 (5090-6610)				
				3980	0	1	0	0		10			
				5260	1	0	1	0		20			
				6960	3	5	0	0		80			
				9200	7	3	0	0		100			
Oleyl-SL	PO	Mouse	M	15000	0	0	0	0	>15000				
Ethyl-SL	PO	Mouse	M	15000	1	0	0	10	>15000				
SL	PO	Mouse	M	7230	0	0	0	0	12500 (11060-14130)				
				8680	0	0	0	0					
				10420	1	0	0	10					
				12500	5	0	0	50					
				15000	10	0	0	100					

^{a)} Ten animals/dose level were administered

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

Table 2 Eye irritation scores of PSL, Oleyl-SL, Ethyl-SL and SL.

Test substance	Rinse	Animal number	After instillation	Cornea		Iris Iritis	Redness	Conjunctivae		Discharge	Draize score	
				Density	Area			Chemosis				
PSL (50%)	no	62	1~168 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	
				0	0	0	0	0	0	0		
				0	0	0	0	0	0	0		
				0	0	0	0	0	0	0		
				0	0	0	0	0	0	0		
Oleyl-SL (20%)	no	53	1	0	0	0	1	0	0	0	2	
			24	0	0	0	1	0	0	0	2	
			48	0	0	0	0	0	0	0	0	
			72	0	0	0	0	0	0	0	0	
		57	168	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			1	0	0	0	1	0	1	4		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
		78	72	0	0	0	1	0	0	2		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	1	0	1	4		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	1	0	1	4		
Ethyl-SL (20%)	no	51	1	0	0	0	1	0	1	4		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
			72	0	0	0	1	0	0	2		
		53	168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	1	1	2	8		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	0	0	0	0		
		59	72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	2	1	2	10		
			24	0	0	0	1	0	1	4		
			48	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	0	0	0	0		
SL (20%)	no	52	1	0	0	0	1	0	1	4		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
			72	0	0	0	1	0	0	2		
		56	168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	2	1	1	8		
			24	0	0	0	1	1	0	4		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
		69	72	0	0	0	1	0	0	2		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	1	0	1	4		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
			72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	0	0	0	0		
Tween 20 (20%)	no	66	1	0	0	0	1	0	0	2		
			24	0	0	0	1	0	0	2		
			48	0	0	0	1	0	0	2		
			72	0	0	0	1	0	0	2		
		72	168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	0	0	0	0		
			24	0	0	0	0	0	0	0		
			48	0	0	0	0	0	0	0		
		73	72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	1	0	0	2		
			24	0	0	0	0	0	0	0		
			48	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0		
			168	0	0	0	0	0	0	0		
			1	0	0	0	0	0	0	0		

^{a)} Ocular reactions were judged at 1, 24, 48, 72 and 168 hours after instillation.

Yuzo IKEDA et al.

Table 3 Primary skin irritation of PSL in guinea pigs.

Test substance	Skin condition	Concentration (%)	After application (hrs)		
			1	24	48
PSL	Intact	50	0/10 ^{a)}	0/10	0/10
	Abraded	50	0/10	0/10	0/10

^{a)} No. of positive reactions/No. of treated animals**Table 4** Skin sensitization of PSL in guinea pigs.

Test substance	Challenge	Group	Vehicle	Concentration (%)	After application (hrs)		
					24	48	72
PSL	Open	Sensitized	Ethanol	10	0/15 ^{a)}	0/15	0/15
				50	0/15	0/15	0/15
				10	0/15	0/15	0/15
				50	0/15	0/15	0/15
		Not-Sensitized	Ethanol	10	0/15	0/15	0/15
				50	0/15	0/15	0/15
				10	0/15	0/15	0/15
				50	0/15	0/15	0/15
	Occlusive (24hrs)	Sensitized	Water	50	0/15	0/15	
				Vaseline	50	0/15	0/15
					50	0/15	0/15
		Not-sensitized	Water	50	0/15	0/15	
				Vaseline	50	0/15	0/15
					50	0/15	0/15

^{a)} No. of positive reactions/No. of treated animals

5. 光毒性試験

光毒性試験の結果を Table 5 に示した。PSLについては紫外線の短波長領域と長波長領域の光を同時照射し、検討したが、10%、50%のいずれの濃度においても反応はみられなかった。Oleyl-SLについては波長領域の異なる光源を別々に照射して検討した。その結果、いずれの光源においても5%、20%の濃度で反応を認めたが、光照射を行っていない対照部位においても同程度の皮膚反応が認められた。

一方、陽性対照として用いた8-MOPでは光照射を行った0.005%以上の濃度において強い皮膚反応がみられ、明らかな光毒性が認められた。なお、0.001%の濃度では反応を認めなかった。

6. 光感作性試験

光感作性試験の結果を Table 6 に示した。PSLについては紫外線の短波長領域と長波長領域の光を同時照射して光感作性を検討したが、10%、50%のいずれの濃度においても反応を認めなかった。

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

Table 5 Phototoxic reactions of PSL, Oleyl-SL and 8-Methoxypsoralen(8-MOP).

Test substance	Light sources	Concentration(%)	After application(hrs)					
			24	48	72	168		
PSL	Exposure(B+A)	10	0/15 ^{a)}	0/15	0/15			
		50	0/15	0/15	0/15			
	Non-exposure	10	0/15	0/15	0/15			
		50	0/15	0/15	0/15			
		Oleyl-SL	Exposure(A)	1	0/6	0/6	0/6	0/6
				5	6/6	6/6	5/6	0/6
20	6/6			6/6	6/6	0/6		
Exposure(B)	1		0/6	0/6	0/6	0/6		
	5		6/6	5/6	2/6	0/6		
	20		6/6	6/6	6/6	1/6		
Non-exposure	1	0/6	0/6	0/6	0/6			
	5	6/6	3/6	2/6	0/6			
	20	6/6	6/6	5/6	0/6			
	8-MOP	Exposure(A)	0.001	0/3	0/3	0/3	0/3	
			0.005	2/3	3/3	3/3	2/3	
			0.02	3/3	3/3	3/3	3/3	
0.1			3/3	3/3	3/3	3/3		
Exposure(B)		0.001	0/3	0/3	0/3	0/3		
		0.005	3/3	3/3	3/3	1/3		
		0.02	3/3	3/3	3/3	3/3		
		0.1	3/3	3/3	3/3	3/3		
Non-exposure		0.001	0/3	0/3	0/3	0/3		
		0.005	0/3	0/3	0/3	0/3		
		0.02	0/3	0/3	0/3	0/3		
		0.1	0/3	0/3	0/3	0/3		

Exposure(A) : BLB lamp 6, distance 10 cm, time 60 min.

Exposure(B) : BLB lamp 3+SE lamp 3, distance 20 cm, time 10 min.

^{a)} No. of positive reactions/No. of treated animals

7. 変異原性試験

変異原性試験の結果を Table 7 に示した。PSL の変異原性を *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 を用い S-9 Mix を加えた代謝活性化系および加えない非代謝活性化系で検討したが、いずれの濃度においても溶媒対照と同等の値であり変異原性は認められなかった。陽性対照として用いた 4NQO と BP では明らかな復帰変異コロニー数の増加がみられた。

Yuzo IKEDA et al.

Table 6 Photosensitization of PSL in guinea pigs.

Test substance	Group	Light sources in challenge	Concentration (%)	After application(hrs)			
				24	48	72	
PSL	Sensitized	exposure(B+A)	10	0/15 ^{a)}	0/15	0/15	
			50	0/15	0/15	0/15	
		non-exposure	10	0/15	0/15	0/15	
			50	0/15	0/15	0/15	
		Not-sensitized	exposure(B+A)	10	0/15	0/15	0/15
				50	0/15	0/15	0/15
	non-exposure		10	0/15	0/15	0/15	
			50	0/15	0/15	0/15	

^{a)} No. of positive reactions/No. of treated animals**Table 7** Mutagenicity of PSL

Test substance	S-9 Mix	Concentration (μ g/plate)	TA98	TA100
PSL	—	10	25	147
		100	15	130
		1000	14	141
		2500	19	135
		5000	15	132
		10000	20	111
DMSO	—		17	138
			25	151
4 NQO	—	0.5	253	1684
PSL	+	10	37	143
		100	21	135
		1000	19	144
		2500	22	121
		5000	37	127
		10000	23	111
DMSO	+		30	161
			22	131
BP	+	5	488	960

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

考 察

PSLの急性毒性試験では雌雄ともラットに対するよりもマウスに対する毒性の方がやや強い傾向がうかがえた。また、これらの物質のマウス雄における急性毒性の強さはPSL≒SL>Oleyl-SL≒Ethyl-SLの順であった。PSL, Ethyl-SL, Oleyl-SL, SLの近縁物質としてはSucrose fatty acid ester, Sorbitan fatty acid monoester, Polyoxyethylene (20) sorbitan fatty acid monoesterなどが上げられるが、これらのうち前二者は食品添加物として許可され、使用されている。これらの経口LD₅₀値はSucrose fatty acid esterが20 g/kg以上 (Tokita 1974), Sorbitan fatty acid monoesterが10 g/kg以上 (Krantz 1974), Polyoxyethylene (20) sorbitan fatty acid monoesterが38~40 g/kg (Brandner 1974)であり、これらに比べるとPSL, Ethyl-SL, Oleyl-SL, SLの経口急性毒性はやや強い傾向にあるが、Hodgeら (1943) の分類では実際上無毒あるいは実際上無害の範疇に属するものであった。症状および剖検においては、ラットでは約11 g/kg以上、マウスでは約8 g/kg以上の経口投与により胃腸管への刺激を示唆する軟便、下痢、腸管の充血、出血を、皮下投与では全ての投与量において投与局所の炎症を認めたが、特異的な作用を示唆する所見は特になかった。

PSLの眼に対する刺激性はOleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLのいずれよりも弱い。Oleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLの間では特に差は認められなかった。非イオン界面活性剤であるTween 20と比較すると刺激の強さはPSL<Tween 20<Oleyl-SL, Ethyl-SL, SLの順であった。これらの刺激の強度は通常陰イオン界面活性剤に比べるとはるかに低いものであった。

皮膚一次刺激性試験においてPSLは50%という高濃度においても損傷皮膚に対して何ら刺激性を示さなかったが、このことはこの物質が生体に対してほとんど生理的な作用を有しないことを示唆するものであり、PSLの一連の毒性試験において終始非常に弱い反応しか呈さないことと一致している。また、近縁物質であるSpan 20 (Sorbitan monolaurate), Tween 20の皮膚刺激性、眼刺激性も低く (Treon 1963, Draize 1952), これら関連物質の作用の低さを示している。

光毒性、光感作性は紫外線吸収の有無との関連が深いと言われている。PSLの紫外線極大吸収は210 nmにあるが、地上に到達する紫外線は290 nm以下のものがオゾン層によりカットされているため、到達可能波長領域の紫外線 (275~400 nm) により試験を行った。試験成績は光毒性、光感作性のいずれもないと結論されるものであった。また、Oleyl-SLにおいては皮膚反応がみられたが照射を行っていない対照部位にも同程度の反応が認められており、Oleyl-SLの一次刺激性が現れたものと判断された。

変異原性試験においてはS-9 Mixによる代謝活性化系および非代謝活性化系のいずれにおいても変異原性はなかった。また、PSLの細胞毒性についても10000 μg/plateの高用量においてもコロニー数の減少はほとんど認められないことから、非常に弱いと考えられる。

以上のごとくPSLおよびSL, Oleyl-SL, Ethyl-SLの毒性はいずれも弱く、生体に対する特異的な作用は認められなかった。

Yuzo IKEDA et al.

要 約

1. PSLの経口投与によるLD₅₀値は10~16 g, 皮下投与では5.8~6.6 g, Oleyl-SLおよびEthyl-SLの経口投与によるLD₅₀値は15 g/kg以上, SLの経口LD₅₀値は12.5 g/kgであった。経口投与による症状は鎮静, 過呼吸, 四肢脱力, 軟便, 下痢などであり, 特異的な作用を示唆するものではなかった。大量を経口投与した例では死亡例の剖検において胃腸管への刺激を示唆する充血, 出血が認められ, 皮下投与では投与局所の炎症を示唆する皮下組織の水腫, 出血が認められた。
2. PSLの眼刺激性は非常に低く, 50%の濃度においてもDraizeの評点は0であった。Oleyl-SL, Ethyl-SLおよびSLは20%の濃度で無刺激ないしは軽度の刺激であった。
3. PSLの皮膚一次刺激性は非常に低く, 50%の濃度においても健常皮膚, 損傷皮膚に対して反応を惹起しなかった。
4. PSLはMaximization法において塗布惹起, 24時間閉鎖貼付惹起のいずれにおいても皮膚感受性は認められなかった。
5. PSLに光毒性, 光感受性は認められなかった。またOleyl-SLに光毒性は認められなかった。
6. TA98およびTA100を用いたAmes試験においてPSLに変異原性は認められなかった。

文 献

- Brandner, J. D. (1974): WHO Food Additives Series, No 5, Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents., p. 278-283, WHO Distribution and Sales Service, Geneva.
- Draize J. H. (1959): Appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics. By the staff of the division of Pharmacology Food and Drug Administration, Department of Health Education and Welfare. p. 48-52, Association of Food and Drug Officials of U. S. Business Office, Topeka, Kansas.
- Draize, J. H. and Kelley, E. A. (1952): Toxicity to eye mucosa of certain cosmetic preparations containing surface active agents. Proc. Sci. Toilet Good Assoc., **17**, 1-4.
- Hodge, H. C. and Sterner J. H. (1949): Tabulation of toxicity classes. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., **10**, 93-96.
- 井上恵雄(1983): 糖脂質系バイオサーファクタントの特性とその応用, フレグランスジャーナル, **60**, 21-31.
- 木村義晴, 井上恵雄(1985): 講座・界面活性剤「バイオサーファクタント」, 油化学, **34**, 1041-1048.
- Krantz J. C. Jr. (1974): WHO Food Additives Series, No 5, Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents., p. 278-283, WHO Distribution and Sales Service, Geneva.
- Litchfield, J. T. Jr. and Wilcoxon, F. (1974): A simplified method of evaluating dose effect experiment. J. Pharmacol. Exper. Therap., **96**, 99-112.
- Magnusson, B. and Kligman, A. M. (1969): The identification of contact allergens by animal assay, the guinea pig maximization test method. J. Invest. Derm., **52**, 268-276.
- Tokita K (1974): WHO Food Additives Series, No 5, Toxicological evaluation of some food

Toxicological studies on sophorolipid derivatives

additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents., p. 284-296, WHO Distribution and Sales Service, Geneva.

Treon, J. F. (1963): Physiological properties of selected nonionic surfactants. Proc. Sci. Toilet Good Assoc., **40**, 40-46.

矢作多貴江(1975): 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189.