

不同類型清潔劑之雞胚胎細胞體外毒性試驗 與家兔眼角膜體內試驗之比較研究

趙磐華

摘 要

以5 mg 等五種劑量之 Sodium Dodecylbenzene Sulfonate (SDS) 進行角膜試驗時，可引起家兔眼角膜混濁、糜爛、脫落並伴隨著眼瞼腫脹，結合膜潮紅、出血等不同程度之變化，而以同一劑量之 SDS, Sodium Deoxycholate, Triton X-100, 及 Cetyltrimethylammonium Bromide 等四種清潔劑眼刺激性試驗比較，其致不可恢復性傷害之濃度量大小依序為：Cetyltrimethylammonium Bromide (Cationic type) > Sodium Deoxycholate (anionic, nature bile salt) > SDS (anionic type) > Triton X-100 (non-ionic type)。

另一項以雞胚細胞培養法所進行之體外試驗顯示：四種清潔劑之致細胞毒性之濃度與體內之角膜試驗者一致，而測試所使用之劑量較後者為低，實為檢測清潔劑眼刺激性試驗前初步篩選之理想方法。

鍵語：清潔劑，Draize test, Cornea Test, Chicken Embryo cell, Detergents。

前 言

清潔劑屬於界面活性劑、本身具有洗滌 (Detergency)，乳化 (Emulsifying)，分散 (Dispersing) 等作用¹。因為被廣泛地使用於化粧品如面霜，及家庭用洗滌成品中；故而，增加人們接觸的頻數。近年來，使用清潔劑後造成對身體黏膜、皮膚或其附屬器（如毛髮、毛囊）等部位的傷害事件，時有所聞。有關是類成品使用的清潔劑成分種類以及安全性評估，已倍受注目與重視。

本試驗即是以一種陰性離子型清潔劑 Sodium Dodecylbenzene Sulfonate (SDS) 之不同濃度量，進行家兔眼刺激性試驗，以觀察其外觀與角膜之組織病理變化，並以導致該角膜不可恢復性毒害反應之最低量，比較另外三種不同類型清潔劑：Cetyltrimethylammonium Bromide (cationic type)，Sodium Deoxycholate (anio-

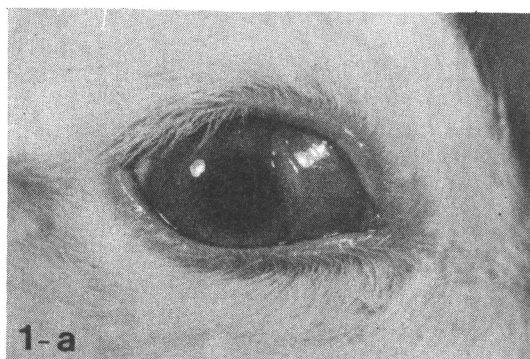
nic type)、Triton X-100 (non-ionic type) 同劑量下對眼刺激性之強度。並同時進行雞胚胎初代細胞培養之體外試驗、測估其細胞毒性之最低濃度量及細胞變化。

材料與方法

一、眼刺激性試驗^{2,3}：

白色健康家兔（體重 2.5 ~ 3.5 kg），分為五組，每組四隻，檢品 (SDS) 5mg, 12.5 mg, 25 mg 及 200 mg 等五種劑量溶於 100 μ l Dist. Water 中，以自動注射器，徐徐地全部滴入各隻動物之左側眼瞼內，其右側眼瞼則滴入蒸餾水以做為對照。點眼後，暫置兔固定架上三十分鐘後再放入飼籠中，避免因不適而引起搔抓，隨即記錄其外觀，72 小時後，動物剖檢，取兩側眼球，經 10 % Formalin 液固定，行組織病理學檢驗。

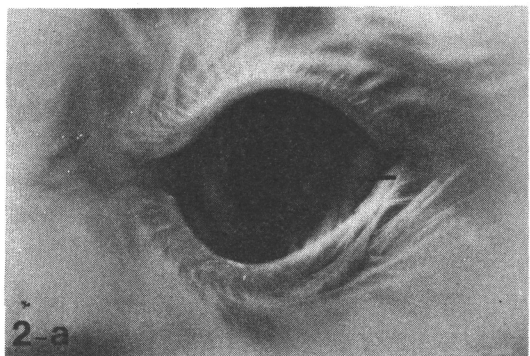
二、雞胚胎初代細胞培養法：



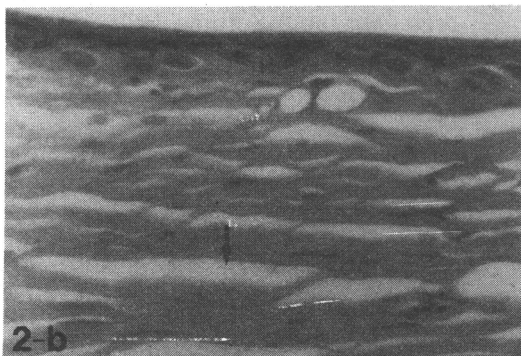
圖一(A) 正常家兔眼睛外觀



圖一(B) 正常角膜組織像，其外表皮層(1)屬於複層扁平上皮，下面為固有層，不含血管組織。X 100 (HE 染色)



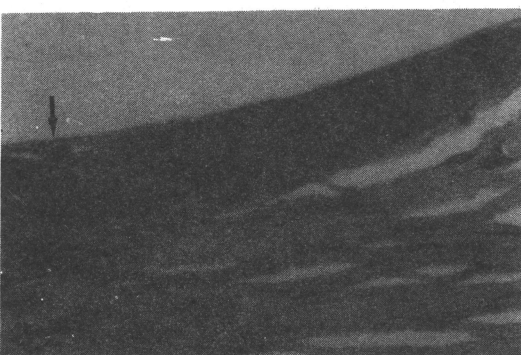
圖二(A) 5mg/μl D.W之SDS，結合膜充血(←)



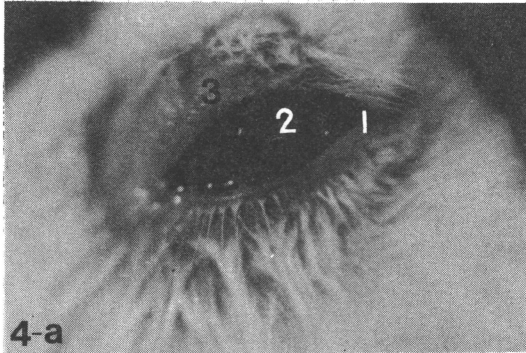
圖二(B) 同前圖之組織病理顯微像：固有層之結締組織鬆散(↓)，上皮細胞尚完整。X 100 (HE 染色)



圖三(A) 12.5mg/100μl D.W之SDS，角膜呈現混濁。



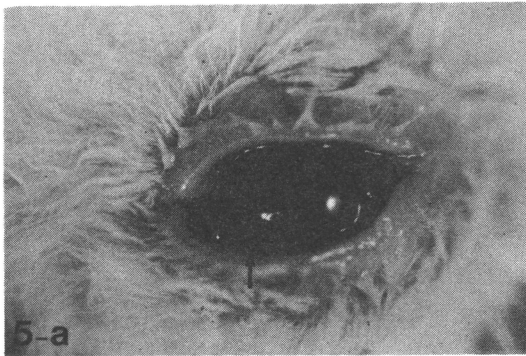
圖三(B) 同前圖之組織病理顯微像：角膜上皮細胞變性(↓)。X 100 (HE 染色)



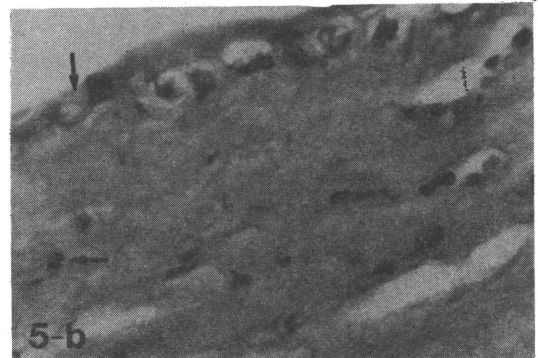
圖四(A) 25mg/100 μ l D.W之SDS，明顯地結合膜充血(1)眼瞼水腫(3)及角膜混濁(2)



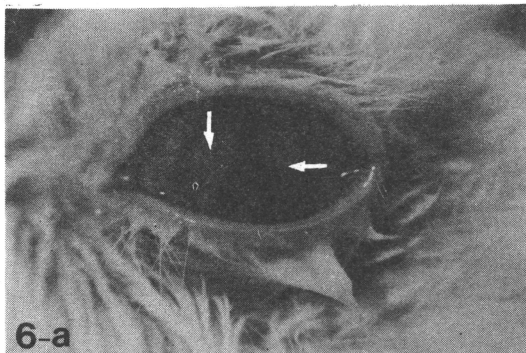
圖四(B) 同前圖之組織病理顯微像：角膜上皮細胞壞死(↓)，脫落(→)。100 X，H E 染色)



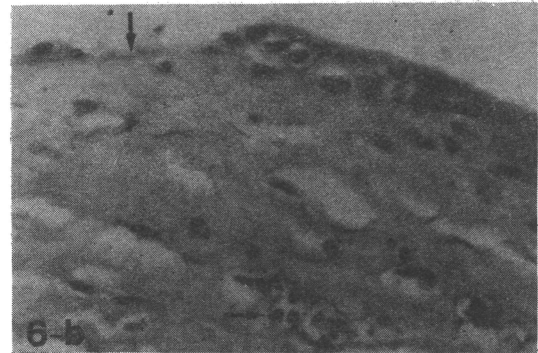
圖五(A) 50mg/100 μ l D.W之SDS，結合膜出血。



圖五(B) 同前圖之組織病理顯微像：角膜上皮層變薄(↓)，固有層散佈著中性球(←)。X 100 (H E 染色)



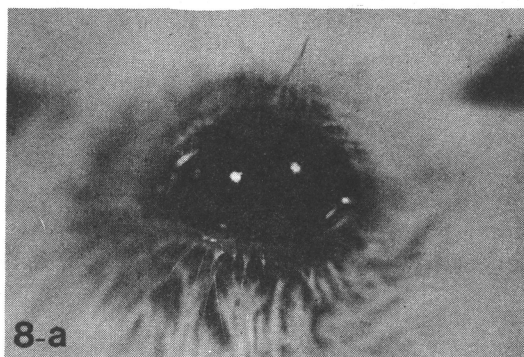
圖六(A) 200mg/100 μ l D.W之SDS，角膜糜爛、破潰、瞬膜停滯。



圖六(B) 同前圖之組織病理顯微像：角膜上皮層完全脫落(↓)，微血管及紅血球侵入固有層。



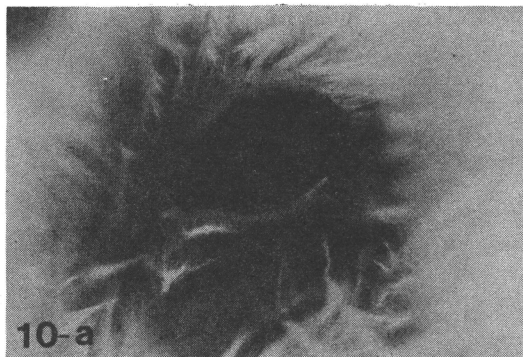
圖七 12.5 mg/100 μ l D.W之SDS，眼角膜外觀變化。



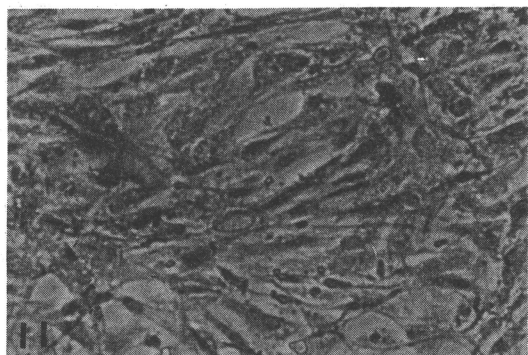
圖八 12.5 mg/100 μ l D.W之Triton X-100，結合膜明顯的充血。



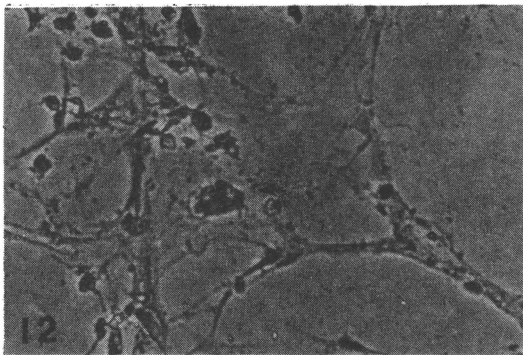
圖九 12.5 mg/100 μ l D.W之Cetyltrimethylammonium Bromide，結合膜、眼瞼明顯地水腫、角膜脫落、壞死、失明。



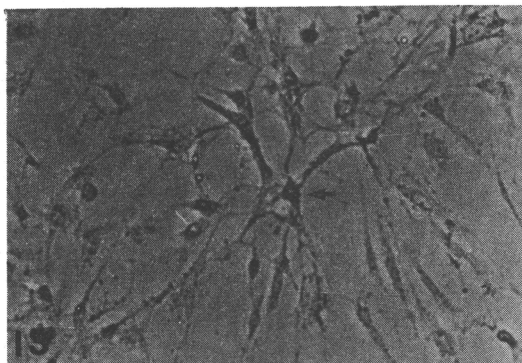
圖十 12.5 mg/100 μ l D.W之Sodium Deoxycholate，角膜潰爛、失明。



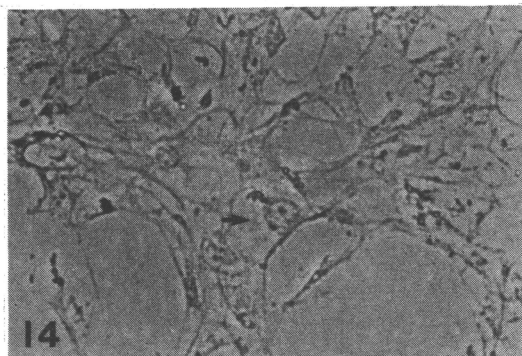
圖十一 正常雞胚胎細胞培養顯微像X 400。



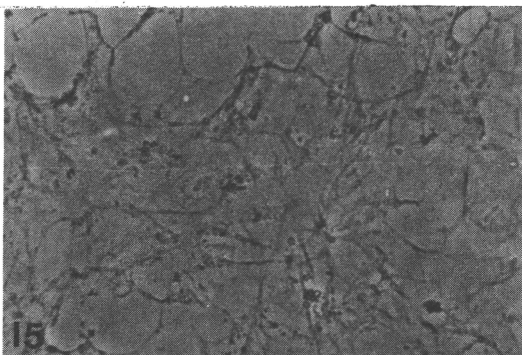
圖十二 100 μ l 之2% Triton X-100(W/V) 加入培養皿中，經24小時後之細胞像，明顯細胞脫落與圓形化(←)。



圖十三 0.1% SDS 同量加入培養皿中，經 24 小時後之細胞像、細胞核之皺縮 (←) 為主要變化。



圖十四 0.05% Sodium Deoxycholate 同量加入培養皿中，經 24 小時後之細胞像，主要造成細胞迅速死亡及細胞核之腫脹 (→)。



圖十五 0.01% 之 Cetyltrimethylammonium Bromide 同量加入培養皿經 24 小時後之細胞像、細胞核明顯地腫大 (←) 及細胞質之皺縮。

7—11 日齡之雞胚細胞初代培養 (MEM with Earle's Salt + 5% FCS)，俟形成單層細胞後，以不同濃度量之清潔劑溶液 $100\mu\text{l}$ ，加入培養皿後 1 小時，倒去原培養液，更換新鮮培養液，再置入 37°C ，5% 二氧化碳定溫箱中培養 24 小時，傾去培養液，加入 Hank's PBS，置鏡下檢查細胞。

結 果

一、眼刺激性試驗：

(一) 不同劑量 SDS 對家兔刺激性外觀及其角膜之組織病理變化如表一及圖 A~六(B)。

(二) 以 $12.5\text{mg}/100\mu\text{l}$ Dist. Water 之同一劑量之四種不同類型清潔劑 SDS, Triton x-100, Cetyltrimethylammonium Bromide 及 Sodium Deoxycholate, 眼刺激性試驗之外觀，如圖七~十。

二、雞胚胎初代細胞培養體外試驗，以不同濃度清潔劑測試所得之最低致細胞毒性濃度量及細胞像變化如表二及圖十一~十五。

討 論

一、清潔劑之動物法安全性評估方法有皮膚貼附法 (Skin Patch Test)、眼刺激性試驗 (Eye Irritant Test)⁴，本次試驗係引用後者，乃基於組織學 (Histology) 的觀點上：皮膚與角膜之上皮組織雖均屬於複層扁平上皮 (Stratified Squamous Epithelium)，結構，但角膜缺乏最外緣之角化層 (Keratin layer)，以茲保護，且其皮下固有層 (Propia Substantia)，不含血管，故極易受清潔劑等化學物質作用而發生變化，並且這些變化之強弱程度，亦完全單純地決定於該化學物質對上皮細胞之直接作用，而較不受到體內其他生理因素之影響，此外，除了眼刺激性之外觀判定外，另以角膜之組織病理檢驗、觀察細胞組織之病變反應，更提高角膜試驗法之敏銳與精確。

二、以組織病理學及眼角膜外觀變化顯示：以 SDS $12.5\text{mg}/100\mu\text{l}$ Dist. Water 之劑量點眼，即可造成無法恢復之破壞反應，各種清潔劑安全劑量之探討與限定，至為重要，俾以維護使用者之安全。

三、在以同一濃度量 (12.5mg) 之四種清潔劑所

進行眼刺激性試驗結果顯示：陽性離子型之 Cetyltrimethylammonium Bromide 所引起角膜及眼瞼，結合膜之刺激性最爲嚴重，陰性離子型之 Sodium Deoxycholate 及 SDS 次之，非離子型之 Triton X-100 最輕，此結果與 L.W. Hazleton et al⁵ 及 J.H. Draize et al⁶ 等結果相同。

四、以細胞培養檢測清潔劑之毒害性已多有報告，其使用之細胞種類包括了：家兔角膜細胞⁷，口腔內膜細胞⁸，肥大細胞⁹ (Mast Cell)，老鼠纖維芽細胞 (Mouse Fibroblast Cell)¹⁰，及 HEP 2 cell¹¹ 等，本次試驗係採用易取得之雞胚胎初代細胞，結果發現：Cetyltrimethylammonium Bromide 10^{-3} mg, Sodium Deoxycholate 10^{-2} mg, SDS 10^{-2} mg, 及 Triton X-100 2×10^{-1} mg, 時即可致細胞毒性，鏡檢時可見不同之細胞變化，並與口腔黏膜細胞變化相同⁷，由於操作簡易，判定需時短，經濟而敏感性高，實爲一理想之初步篩選試驗方法。

三、本試驗 SDS 所使用之劑量係自 0.001mg 至 250mg 間之兩倍及 5 倍等比值含量所進行之角膜試驗，可發現其使用劑量之高低與導致角膜組織在外觀上與細胞組織病理像之傷害程度，均有著劑量—反應之相關性 (Dose-Response Relationship) 本試驗所列舉之各項劑量係挑選在外觀上及病理顯微變化上較爲典型與差別性者爲代表餘者略去不列之。

誌 謝

本研究承蒙陳技士作琳小姐協助，以及臺北市家畜衛生檢驗所人員之組織病理學方面支援，得以順利完成，謹此特表謝忱。

參考文獻

1. 刈米孝夫．1980．界面活性劑の性質上應用

。1st. 幸書房。

2. 北川晴雄．1982．毒性學．第1版，p.265-267 南江堂。
3. Code of Federal Regulation. 16: 1500, 3. Eye irritancy and cornea test.
4. Draize, J.H. et al. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substance applied topically to the skin and mucosa membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82, 377-390.
5. Hazleton, L.W. 1952. Relation of surface active properties to irritation of the rabbit eye. *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc.*, 17, 5-9.
6. Draize, J.H. et al. 1952. Toxicity to eye mucosa of certain cosmetic preparations containing surface activating agents. *Proc. Scie. Sect. Toilet. Goods Assoc.*, 17, 1-4.
7. Muir, C.K. et al. 1983. A novel approach to the search for in vitro alteration to in vivo eye irritancy testing. *Toxicology letters*, 18, 1-5.
8. Bettley, F.R. 1968. The toxicity of soaps and detergents. *Br. J. Derm.* 80, 635-642.
9. Prottey, C. and T.F.M. Ferguson. 1976. *Food Cosmet. Toxicol.*, 14, 425-430.
10. Kemp, R.B. and R.W. J. Meredith et al. 1983. A rapid cell culture technique for assessing the toxicity of detergent-based products in vitro as a possible screen for eye irritancy in vivo. *Cytobios.* 36, 153-159.
11. Scaife, M.C. 1982. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 4, 179-193.

A COMPARISON BETWEEN THE CYTOTOXICITY TEST WITH CHICKEN EMBRYO CELLS IN VITRO AND THE CORNEAL TEST WITH RABBIT EYES IN VIVO OF DIFFERENT DETERGENTS

EDWARD CHAO

ABSTRACT

An anionic surfactant, sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS), was administered directly to the corneal surface of albino rabbits, causing various irritations and histopathological changes to eyes and corneal membranes of the rabbits. The toxicity of four different detergents determined by this corneal test followed the order of cetyltrimethylammonium bromide (cationic) > sodium deoxycholate (anionic) > SDS (anionic) > triton x-100 (nonionic).

These substances were also tested for cell toxicity in vitro using a primary culture of chicken embryo cells and the minimum cytotoxicity concentrations were found to be of the same level as in the corneal test, yet the doses required were much smaller. This method offers a very good means for screening the potentially irritating detergents without using live animals and can be used to select product formulations for studies in vivo.