

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00585

研究課題名(和文) 除菌成分塩化ベンザルコニウムの低濃度吸入曝露がアレルギーに及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of benzalkonium chloride on allergic inflammation following a low-dose inhalation exposure in allergic murine model

研究代表者

定金 香里 (Sadakane, Kaori)

大分県立看護科学大学・看護学部・助教

研究者番号：20322381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、汎用されている除菌・消臭スプレーのアレルギーへの影響を調べるため、有効成分、塩化ベンザルコニウムをミスト状にしてアレルギーモデルマウスに反復吸入曝露し、その病態が悪化するか検討した。濃度は、市販品と同程度またはそれ以下に設定した。その結果、市販品以下の濃度でもマウスのアレルギー性気管支喘息やアトピー性皮膚炎の症状や病態が悪化した。一方、幼児期曝露が、成人性アレルギー疾患に影響しているか調べるために、若齢期のマウスにミスト状塩化ベンザルコニウムを予め曝露し、成獣期にアレルギーを発症させた実験では、喘息、アトピー性皮膚炎はいずれも悪化しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

衛生意識の向上により、除菌・消臭スプレーの使用が増えている中、健康への影響も危惧されている。本研究では、有効成分塩化ベンザルコニウムの吸入曝露により、アレルギー病態が悪化することを、モデル動物を用いて明らかにした。この結果は、除菌・消臭スプレーの使用場所や回数を再考する一助になり得る。一方、若齢期の曝露は、成長後に発症させたアレルギー病態に影響を及ぼさない事が示された。しかし、安全性を担保するには、若齢期にアレルギー発症と塩化ベンザルコニウムを同時期に曝露した時の影響など、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of a commercial sterilization/deodorant spray on allergic diseases, we, repeatedly, exposed an allergic murine model to low-dose atomizing benzalkonium chloride, an active ingredient of the spray. We noted that exposure to low-dose atomizing benzalkonium chloride equal to or less than the commercial spray exacerbated mite-induced allergic airway inflammation and atopic dermatitis. We also clarified if the inhalation of benzalkonium chloride in infancy aggravates the condition of adult allergic diseases. Our results show that the prior exposure of juvenile mice to benzalkonium chloride did not aggravate these allergic diseases induced in adulthood.

研究分野：環境毒性学

キーワード：塩化ベンザルコニウム アレルギー性気管支喘息 アトピー性皮膚炎 除菌・消臭スプレー 吸入曝露

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、衛生意識の高まりにより、除菌・消臭スプレーが汎用されているが、それとともに、そうしたスプレー剤の曝露による健康への影響も懸念されている。除菌・消臭スプレーの有効成分である塩化ベンザルコニウムは、比較的高濃度（<5%）で喘息発症のリスクを高めたり、経皮曝露によって接触性皮膚炎を生じたりすることが報告されている。しかし、市販品と同程度の濃度でのアレルギーへの影響を調べた研究はほとんどない。

また、成人型アレルギーの罹患率が近年、上昇しているのは、小児期から化学物質にさらされることが原因ではないかと疑われている。除菌・消臭スプレーの使用頻度が高くなってきたことは近年であることから、小児期曝露の影響についてはまだ見解がない。

これらのことから、アレルギー疾患モデル動物を用いたミスト状塩化ベンザルコニウムの低濃度吸入曝露の影響を評価する必要性があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、スプレー式除菌・消臭剤の使用増加が、アレルギー増加に関与しているのではないかと考え、その成分である塩化ベンザルコニウムを、ミスト状、低濃度の状態でアレルギー性気管支喘息およびアトピー性皮膚炎モデルマウスに曝露し、病態が悪化するか検証する。また、若齢期曝露が成人期のアレルギー疾患の病態に及ぼす影響についてもモデルマウスを用いて検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミスト状塩化ベンザルコニウム曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響

除菌・消臭スプレーで使用されている0.1 w/v%の濃度、またはその1/10、1/100の濃度の塩化ベンザルコニウム（BZC）をミスト状にして、マウスに反復曝露し、気管支喘息様病態を示すアレルギー性気道炎症の病態にどのような影響があらわれるか検討した。

BALB/c系マウス（オス、8週齢）に2週間毎に4回、ダニ抗原2 $\mu$ gを気管内投与し、アレルギー性気道炎症を誘発した。同期間、0.001、0.01、0.1%のBZCをネブライザーでミスト状にし、マウスに週2回（各回、10分間）、計14回、吸入曝露した。最終BZC曝露の翌日にマウスを屠殺し、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数、炎症性サイトカイン・ケモカイン（IL-5、IL-13、eotaxinなど）量の測定、肺組織の病理観察、血清中の抗体産生量（抗原特異的IgG1抗体、総IgE抗体）の測定により、悪化の程度を比較、評価した。

#### (2) ミスト状塩化ベンザルコニウム曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

0.001、0.01、0.1 w/v%の塩化ベンザルコニウム（BZC）のミストを、ダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎モデルマウスに曝露し、症状や病態が増悪するか検討した。

NC/Nga系マウス（オス、8週齢）の耳介にダニ抗原5 $\mu$ gを2、3日毎に1回、計8回、皮下投与し、アトピー性皮膚炎を誘発した。同期間、0.001、0.01、0.1%のBZCをネブライザーでミスト状にし、マウスに週に2~4回（各回、10分間）、計9回、全身吸入曝露した。抗原を投与した翌日に皮膚の症状を観察、スコア化した。また、最終抗原投与の翌日にマウスを屠殺し、耳介組織のホモジネート上清中の炎症性サイトカイン・ケモカイン類（IL-5、IL-13、eotaxinなど）の測定、皮膚組織の病理観察、血清中の抗体産生量（抗原特異的IgG1抗体、総IgE抗体）の測定により、悪化の程度を比較、評価した。

#### (3) 若齢期の塩化ベンザルコニウム曝露が成人期アレルギー症状に及ぼす影響

4週齢のマウスにミスト状にしたBZCを4週間、曝露し、その後、8週齢期にアレルギーを誘発し、症状や病態にどのような影響があらわれるか検討した。

4週齢のBALB/cマウス（アレルギー性気道炎症モデル）に週2回（各回、10分間）、計8回、0.01 w/v%の塩化ベンザルコニウムをミスト状にして吸入曝露し、8週齢からアレルギー性気道炎症を誘発した。解析は（1）と同様に行った。

また4週齢のNC/Nga系マウス（アトピー性皮膚炎モデル）に週3回（各回、10分間）、計12回、0.001 w/v%の塩化ベンザルコニウムをミスト状にして全身吸入曝露した。解析は（2）と同様に行った。

なお、BZCの曝露濃度は、成獣での実験で、最も病態を強く悪化させた濃度に設定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ミスト状塩化ベンザルコニウム曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響

##### ①気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数への影響

総細胞数では、BZCを曝露した群はいずれもDf+生食群より高値を示し、Df+BZC 0.001%群とDf+BZC 0.1%群では有意差（有意確率5%未満をもって有意差ありとする）を認めた（図1）。好酸球数においては、Df+BZC 0.01%群が高値を示したが、他の2群はDf+生食群と同程度であった。BZCを曝露した群の好中球数は、Df+BZC 0.1%群でDf+生食群より高い値を示した。マクロファージ数については、BZCを曝露した群はいずれもDf+生食群に対し有意な増加を認めた。BZCを曝露した群のリンパ球数は、Df+BZC 0.001%のみDf群に対して増加する傾向を示した。

##### ②血清中の抗体量への影響

BZCを曝露した群の血清中の抗原特異的IgG1抗体価はいずれもDf+生食群より高値を示し、Df+BZC 0.001%群とDf+BZC 0.1%群では有意差を認めた。総IgE量も、BZCを曝露した群はいずれもDf+生食群より増加する傾向を示し、Df+BZC 0.1%群では有意差を認めた。

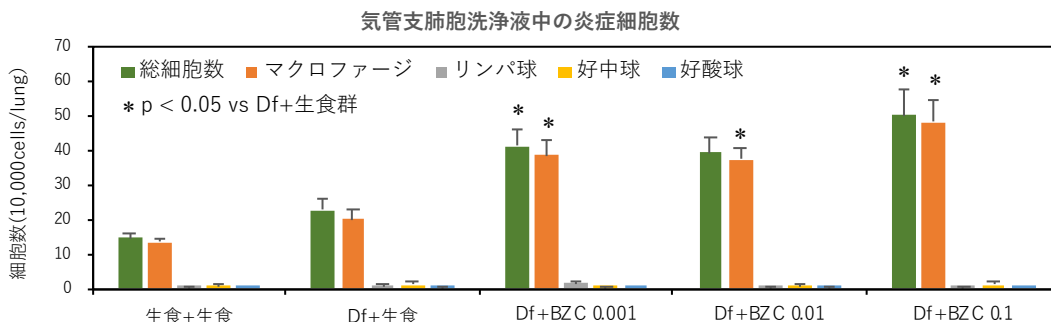


図1. 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数

### ③気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量への影響

IL-5は、BZCを曝露した群で、いずれもDf+生食群より増加する傾向を示した。Df+BZC 0.01%群が最も高値であり、次いで、Df+BZC 0.001%群とDf+BZC 0.1%群が同程度の値であった。しかし、Df+生食群との有意差は認められなかった。IL-13は、Df+BZC 0.1%でDf群に対し、有意な増加がみられたが、いずれの群も産生量が極めて少なかった。IL-17は、BZC曝露の影響がみられなかった。MIP-1 $\alpha$ の産生量は各群とも極めて低値だった。IL-6、cotaxin、RANTES、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ もほとんどの検体で検出限界以下だった。

### ④気管支肺胞洗浄液中の粘液成分量への影響

気管支肺胞洗浄液中の粘液成分MUC5AC量は、Df+BZC 0.01%群とDf+BZC 0.1%群において、有意な増加を認めた。

### ⑤肺の病変的变化

図2に肺組織の光学顕微鏡像を示す。PAS染色像では、Df+BZC 0.01%群が最も強い粘液細胞化および気道粘膜下へのリンパ球の浸潤を認めた。次いでDf+BZC 0.1%群、Df+BZC 0.001%群は、Df+生食群と同程度だった。メイ・ギムザ・グリュンワルド(MGG)染色では、Df+BZC 0.01%群とDf+BZC 0.1%群で多数の好酸球浸潤が観察された。一方、Df+BZC 0.001%群では、好酸球浸潤の程度はDf+生食群と同程度だった。

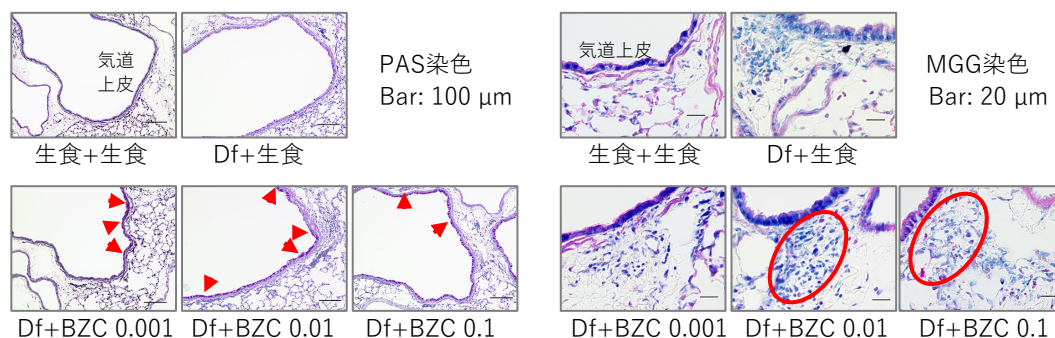


図2. マウス肺組織像

### ⑥まとめ

気管支肺胞洗浄液中の総炎症細胞数、血清中の抗原特異的IgG1では、最も低濃度のBZC 0.001%と最も高濃度の0.1%吸入曝露で高い値となり、病態の悪化を示した。また、0.1%の曝露では総IgEも高値を示した。気管支肺胞洗浄液中の粘性物質MUC5ACは、BZC 0.01%と0.1%の吸入曝露で、Dfに対し有意に増加した。一方、I型アレルギーの指標となる好酸球の増加がみられたのは0.01%曝露のみであった。また肺組織の病変も最も強かった。一方、サイトカイン、ケモカイン産生については、BZC曝露の影響が弱かった。以上の結果をまとめると、市販されている除菌・消臭スプレーの濃度以下の塩化ベンザルコニウムの吸入曝露でもアレルギー性呼吸器疾患を悪化させる可能性が示唆された。

### (2) ミスト状塩化ベンザルコニウム曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

#### ①皮膚症状への影響

皮膚症状をスコア化し、継続的な変化を図3に示した。最も高いスコアを示したのはDf+BZC 0.001%群で、Df+生食群との間に有意な差が認められた。Df+BZC 0.1%群、Df+BZC 0.01%群は、Df+生食群と有意な差はなかった。実験最終日の耳介像を図4に示す。

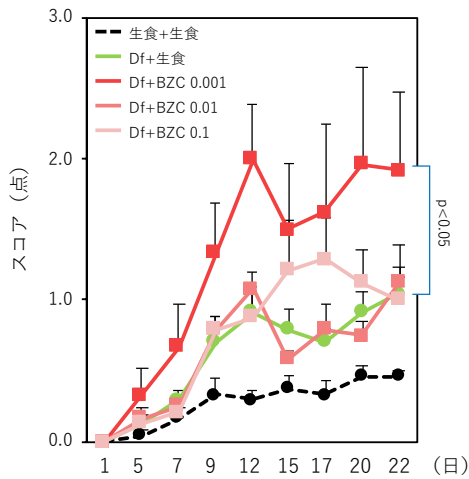


図3. 皮膚症状スコアの経時変化

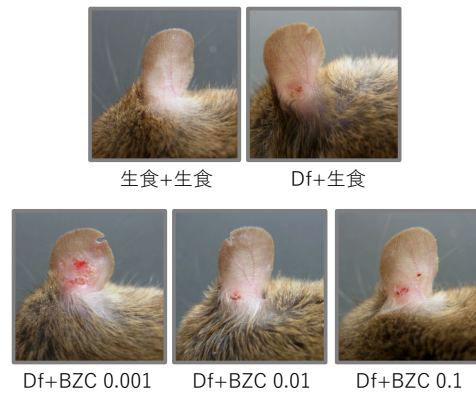


図4. 実験最終日(22日目)の  
マウス右耳介像

②血清中抗原特異的IgG1抗体価への影響

Df+BZC 0.1%群で有意に増加していた。Df+BZC 0.001%群は、最も高値を示したが統計的に有意な増加ではなかった。

③耳介組織の病変的变化

皮下組織中の好酸球数は、Df+BZC 0.001%群が最も高値を示し、Df+BZC 0.01%群、Df+BZC 0.1%群はDf+生食群と同程度だったが、いずれも統計学的に有意な差ではなかった(図5)。マスト細胞の総数は、群間に差はみられなかった。また脱顆粒の程度別にみても、重度の脱顆粒像を示すマスト細胞数は、Df+生食群とミスト状BZCを曝露した群との間に差はなかった。

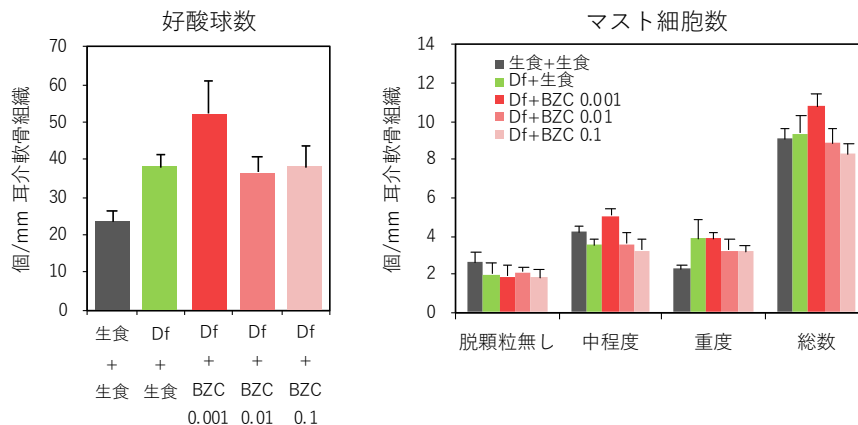


図5. 耳介組織中の炎症細胞数

④皮膚組織中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量への影響

Df+BZC 0.1%群は、IL-13で高値を示した。Df+BZC 0.01%群はMCP-3で、BZC 0.001%群は、IL-18、TSLP、eotaxinで高値を示した。いずれも有意な増加ではなかった。KC、MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、TARC、IL-1 $\beta$ については、群間に差はなく、IL-4、IL-5、IL-12は検出限界以下だった。

⑤まとめ

増悪を表す皮膚症状のスコアが最も低濃度の0.001%の曝露で有意に高値を示した。また、この濃度では皮下組織中の好酸球数、Df特異的IgG1抗体価が増加する傾向であった。一方、皮下組織中のマスト細胞浸潤や活性化、サイトカイン・ケモカイン産生については、ミスト状BZCの曝露による影響は弱かった。以上の結果から、除菌・消臭スプレー成分の曝露量が少なくてもアトピー性皮膚炎が悪化する可能性が考えられた。

(3) 若齢期の塩化ベンザルコニウム曝露が成人期アレルギー症状に及ぼす影響

(3)-1 アレルギー性気管支喘息に及ぼす影響

①気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数への影響

BZC+Df群の総細胞数は、生食+Dfに対し有意に低値を示した(図6)。また、各炎症細胞(好酸球、好中球、マクロファージ、リンパ球)もBZC+Df群の方が生食+Dfより低い値を示し、マクロファージでは有意差を認めた。

②血清中の抗原特異的IgG1抗体価への影響

BZC+Df群の血清中抗原特異的IgG1抗体価はDf+生食群より高値を示したが統計的に有意ではなかった。総IgE量は群間の差がなかった。これは、通常環境(非SPF)下で長期間、飼育したため、対照群の総IgE値も上昇したためと考えられる。

### ③気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量への影響

気管支肺胞洗浄液中のIL-13、IL-6、MCP-1、MCP-3、MIP-1 $\alpha$ 、KC、IL-17、eotaxin、RANTES、IL-5について測定した。いずれにおいてもBZC曝露によってこれらサイトカイン、ケモカインの産生は増加していなかった。いくつかのサイトカインでは、統計的に有意ではなかったが、BZCを曝露した方が生食+Df群よりも低い値を示す傾向が見られた。

### ④肺の病理的变化

PAS染色、MGG染色を施した。BZC+Df群の病理組織は、いずれの染色像においても、生食+Df群と同程度の炎症を示していた。

### (3)-2 アトピー性皮膚炎に及ぼす影響

#### ①皮膚症状への影響

BZC+Df群の皮膚症状スコアは、生食+Df群とほぼ同程度のスコアで推移し、有意差は認められなかった(図7)。

#### ②血清中抗体産生への影響

BZC+Df群の総IgE値、抗原特異的IgG1抗体価ともに、生食+Df群よりも低い値を示したが、統計的な有意差はなかった。

#### ③耳介組織の病理的变化

皮下組織中の好酸球、およびマスト細胞数をカウントした結果、BZC+Df群の好酸球数、マスト細胞数は、生食+Df群よりも低い値を示したが、有意ではなかった。マスト細胞の脱顆粒の程度別にみても、重度の脱顆粒を示すマスト細胞は、BZC+Df群の方が生食+Df群より低値を示した。

#### ④皮膚組織中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量への影響

皮膚組織のホモジネート上清中のIL-13、IL-6、MCP-1、MCP-3、MIP-1 $\alpha$ 、KC、IL-17、eotaxin、RANTES、IL-5について測定したが、いずれもBZC曝露による産生の増強はみられなかった。統計的に有意ではなかったが、BZCを曝露した方が生食+Df群よりも低い値を示す傾向が見られた。

### (3)-3 まとめ

若齢期にミスト状BZCを、繰り返し全身吸入曝露し、成長後にアレルギー性気管支喘息、アトピー性皮膚炎症状を発症させたが、病態の悪化は認められなかった。いずれのアレルギー疾患においても、いくつかの指標で、若齢期にBZCを予め曝露した群の方が、アレルギー状態が緩和している、あるいはその傾向がみられた。

### (4) 結論

ミスト状の塩化ベンザルコニウムを市販の除菌・消臭スプレーと同程度(0.1 w/v%)またはそれ以下(0.01 w/v%、0.001 w/v%)の濃度にして、アレルギー疾患モデルマウスに、繰り返し吸入曝露した。その結果、低濃度のミスト状塩化ベンザルコニウムの吸入曝露とアレルゲンの曝露が同時期であると、アレルギー性気管支喘息やアトピー性皮膚炎の症状や病態が悪化することがわかった。また、小児期の化学物質曝露が成人期のアレルギー疾患の罹患率に関与していることがいくつかの疫学調査で指摘されていることを受けて、若齢期にミスト状塩化ベンザルコニウムを曝露し、成長後にアレルギーを誘発して症状が悪化するか検討した。その結果、症状の増悪はみられず、アレルギー指標のいくつかは症状の緩和傾向を示していた。このことから、低濃度の塩化ベンザルコニウムに関しては、小児期の吸入曝露による成人性アレルギー疾患の罹患率の上昇や悪化に関与している可能性は低いと考えられる。

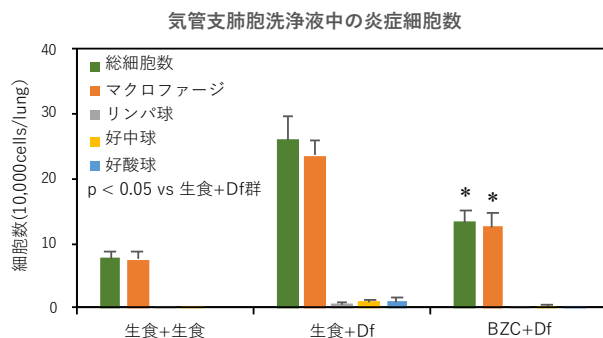


図6. 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞

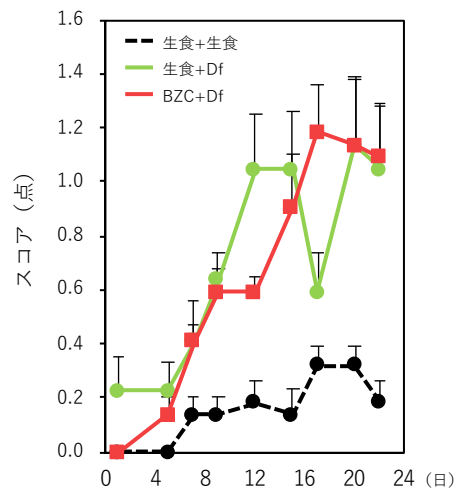


図7. 皮膚症状スコアの経時変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 定金香里、市瀬孝道
2. 発表標題 ミスト状塩化ベンザルコニウムの吸入曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響
3. 学会等名 第49回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 定金香里、市瀬孝道
2. 発表標題 ミスト状塩化ベンザルコニウム曝露がアトピー性皮膚炎様病態に及ぼす影響
3. 学会等名 第51回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考