

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03043

研究課題名(和文)陽イオン界面活性剤使用による健康被害の実態解明に関する基礎研究

研究課題名(英文)A basic study for health effects of cationic surfactants

研究代表者

平野 靖史郎 (Seishiro, Hirano)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・フェロー

研究者番号：20150162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウムなどの陽イオン界面活性剤をミストとして吸入した場合、肺の炎症と呼吸不全に至ることが知られている。本研究では、まず物理化学的手法を用いて、陽イオン界面活性剤が肺サーファクタントの表面張力を変化させることを明らかにした。また、陽イオン界面活性剤がアポトーシスを誘導すること、細胞障害性が陽イオン界面活性剤のアルキル鎖長に依存すること、インフラマゾームを活性化すること、ストレス顆粒を誘導することなどを明らかにした。エアロゾルとして吸入した場合は、貪食レセプター介して細胞内に取込まれる可能性も示し、陽イオン界面活性剤による肺の炎症機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌作用があるため消毒用の日用品として広く使われている塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウムなどの陽イオン界面活性剤は、ミストとして吸入した場合、肺の炎症と呼吸不全を起こすことが知られている。本研究では、これらの陽イオン界面活性剤が肺胞を被覆しているサーファクタントに及ぼす影響を、物理化学的手法を用いることによりはじめて定量的に示した。また、陽イオン界面活性剤の細胞毒性をはじめ、炎症作用にアポトーシスやインフラマゾームが関与していることを明らかにした。これらの生体作用機序に関する研究成果は、陽イオン界面活性剤の安全使用に関する重要な指針を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Benzalkonium chloride (BAC) and cetylpyridinium chloride (CPC) are potential pulmonary toxicants, when inhaled as aerosols. The surface pressure/trough area (π -A) isotherm feature and atomic force microscopy (AFM) images of lipid monolayers indicated that BAC and CPC change physiological functions of the alveolar lining. Exposure to BAC and CPC caused caspase 3-dependent apoptotic cell death in A549 cells and the cytotoxicity increased with the length of the alkyl chain of BAC. Our study indicates that aerosolized BAC and CPC can be internalized into alveolar cells via Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO) which recognizes the surface of unopsonized environmental particles. We have also shown that BAC and CPC activate the inflammasome in macrophages and induce stress granules in G3BP1-expressing cell. Together, the current study shows mechanistic pathways, whereby cationic detergents cause severe inflammation in the lung when inhaled as aerosols.

研究分野：毒性学

キーワード：陽イオン 粒子状物質 表面活性 肺 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日常生活で汎用されているがゆえに、健康に大きな被害が及び可能性があるにもかかわらず、不用意に使用されている化学物質がある。韓国で加湿器を使用することにより 95 名が死亡した事件は、我が国においても驚きをもって報道された。この事件は、加湿器の水槽内に添加された殺菌剤であるポリヘキサメチレングアニジンを、エアロゾルとして吸入したことにより起こったものと考えられている。一方、我が国においても、病院内で用いた点滴液の中に殺菌作用をもつ界面活性剤が混入していたため、点滴を受けた患者が死亡するという事件が起こった。この 2 つの事件に共通することは、皮膚などを消毒するために一般的に使われている殺菌性の薬剤や界面活性剤が、吸入や静脈内というルートで体内に取り込まれたことにより、死亡者がでる事態に至ったという点である。しかし、この 2 つの事件に関して病因論的解明はなされていない。通常、消毒に用いられる薬剤は、陽イオン系の界面活性剤である。医用機器や手指の消毒に用いられている塩化ベンザルコニウム、上記のポリヘキサメチレングアニジン、あるいは薬用液体歯磨きとして用いられている塩化セチルピリジニウム等の医薬部外品も、陽イオン界面活性剤である。また、ベンザルコニウムは市販の目薬の中にも防腐剤として添加されており、その安全性に関しては様々な議論がなされているところである。これまでに、電荷の違いに着目した化学物質の毒性研究や安全性評価が行われた例はほとんど見当たらないことから、陽イオン界面活性剤による健康影響を毒性学的立場から早急に解明すべきであると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 陽イオン界面活性剤が肺表面活性に及ぼす影響：手指の消毒などに用いられている塩化ベンザルコニウムやポリヘキサメチレングアニジンのほか、薬用液体歯磨きとして用いられている抗菌性薬剤も、すべて陽イオン界面活性剤である。その理由は、細菌の表面がマイナスにチャージしており、陽イオンとの反応性が高いためであると考えられている。陽イオン界面活性剤をミストとして吸入した場合、リン脂質を主成分とする肺胞表面被覆物質であるサーファクタントの表面活性作用を攪乱し、その後呼吸不全に至るものと考えられる。そこで、まずサーファクタントを模擬した脂質単層膜を用いて、陽イオン界面活性剤が肺サーファクタントの表面張力に及ぼす物理化学的影響を Wilhelmy 法で解析し、またサーファクタント表面の形状変化を原子間力顕微鏡を用いて観察することとした。

(2) 粒子状物質と細胞表面との反応性：エアロゾルとして吸入された陽イオン界面活性剤は、粒子状物質として肺胞表面に沈着し、マクロファージや肺上皮細胞に影響を与えるものと考えられる。そこで、マクロファージの細胞表面に多く発現し粒子の貪食に関して重要な役割を担っていると考えられている Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO) を発現させた細胞を用いて、粒子の表面電荷と細胞膜との反応性について詳細な研究を進め、粒子状物質の細胞内への取込み機構を明らかにする。

(3) 陽イオン界面活性剤の細胞毒性と肺の炎症作用：陽イオン界面活性剤はアミノ基とアルキル鎖から構成されている。分子構造の違いによる細胞障害性を調べるために、長さの異なるアルキル鎖からなるベンザルコニウム化合物を用いて細胞障害性試験を行う。また、細胞障害性にアポトーシスが関与するかどうか、炎症の過程にインフラマゾームが活性化されるかどうか、さらにストレス顆粒が誘導されるかどうかについても調べる。

3. 研究の方法

陽イオン界面活性剤としては、抗菌性の日用品として汎用されている塩化セチルピリジニウムと塩化ベンザルコニウムを、また陰性対照物質としてアルキル鎖のない塩化ピリジニウムを用いて研究を進めた。

(1) 陽イオン界面活性剤が肺表面活性に及ぼす影響：肺表面活性物質の主成分であるジパルミトイルホスファチジルコリン、ならびに人工肺表面活性物質であるサーファクテンの両親媒性分子を用いて、単層リン脂質からなる Langmuir-Blodgett 膜 (LB 膜) を作製した。陽イオン界面活性剤を LB 膜作成時にジパルミトイルホスファチジルコリンとともに導入した場合、表面張力と単層膜面積の関係を示す π -A 曲線にどのような変化が現れるか測定した。また、雲母劈開面に単層膜捕集し、原子間力顕微鏡を用いて陽イオン界面活性剤を添加したことによる LB 膜表面の変化を画像解析した。これらの測定結果をもとにして、陽イオン界面活性剤が肺表面活性に及ぼす影響について物理化学的に解析した。

(2) 粒子状物質と細胞表面との反応性：マウス由来の mMARCO を、GFP タグとともに安定的に発現させた CHO-K1 細胞、ならびにテトラサイクリン作動性として発現させた CHO-K1 細胞を用いた。界面活性剤から生成するミセルを模擬した粒子状物質として、マウスあるいはヒト血清から ExoQuick exosome extraction kit を用いて調製したエクソソームを用いた。CD9 and CD63 をマーカーとしてエクソソームを確認するとともに、PKH26 red- or PKH67 green-fluorescent dye を用いてエクソソームを蛍光標識した。エクソソームの細胞内への取込みは、IN Cell Analyzer 6000、ならびに confocal super-resolution microscopy (SpinSR10) を用いて測定し、また定量化した。

(3) 陽イオン界面活性剤の細胞毒性と肺の炎症作用：A549, BEAS-2B, J774.1, THP-1 などのライン化された細胞は、10% FBS を含む培地中で通常の条件下で培養を行った。骨髄由来マクロファージ (Bone Marrow-Derived Macrophages, BMDMs) は次のようにして調製した。管理された飼

育施設環境下において生まれた雄の C57BL/J マウスを用いた。10 週齢に達したマウスを頸椎脱臼の処置を行い、規定の方法により頸骨と大腿骨を摘出した。生理食塩水で骨髄をファルコンチューブに流出させ、 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ の密度で 20 ng/mL mrM-CSF と 10% FBS を含む RPMI1640 培地に懸濁後、4 日間表面処理を行っていないペトリ皿培養し、培地交換の後さらに同条件で 3 日間培養した。接着細胞をトリプシン-EDTA で回収し骨髄由来マクロファージとした。また、ストレス顆粒の誘導は、マーカータンパク質である G3BP1 を GFP で蛍光標識した分子を安定的に発現させた CHO-K1 細胞を用い、蛍光顕微鏡を用いて視覚的に確認した。細胞障害性試験は、WST-8、あるいは alamarBlue を用いて行った。カスパーゼ活性の測定には化学発光法を用い、インフラマゾーム誘導やオートファジー関連分子の変化は、主としてウエスタンブロット法を用いて測定した。

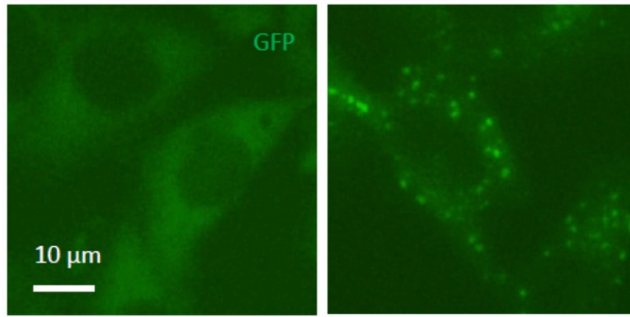
4. 研究成果

(1) 陽イオン界面活性剤が肺表面活性に及ぼす影響：塩化セチルピリジニウムなどの陽イオン界面活性剤である被検物質を単分子膜作製のトロフ下層に添加したところ、濃度依存的にジパルミトイルホスファチジルコリンの -A 曲線の liquid expanded (LE) 相の傾きを低下させたことより、陽イオン界面活性剤がサーファクタントの膜崩壊圧を低下させている可能性が示された。また、塩化ベンザルコニウムも同様に -A 曲線の LE 相の傾きを低下させることを確認した。ジパルミトイルホスファチジルコリンの代わりに人工サーファクタントであるサーファクテンを用いて作製した単分子膜においても、同様の結果が得られた。一方、疎水基を持たず界面活性作用のない塩化ピリジニウムは、ジパルミトイルホスファチジルコリンや人工サーファクタントの展開単分子膜の -A 曲線を変化させなかったことより、陽イオン界面活性剤の疎水基部分が肺サーファクタントと強い相互作用をするものと考えられる。これらのことより、陽イオン性界面活性剤は吸入暴露により肺胞表面層に沈着すると、肺胞表面の伸縮性を低下させる可能性が示された。小児呼吸器窮迫症候群は、サーファクタントが十分ないために肺が虚脱する疾患であるが、陽イオン界面活性剤をエアロゾルとして吸入した場合も、肺サーファクタント活性の低下が原因となって呼吸機能障害に至る可能性があるものと考えられる。

(2) 粒子状物質と細胞表面との反応性：貪食細胞表面に発現しているレセプターである MARCO は、粒子状物質の認識に重要な役割を果たしている。GFP で標識した MARCO、あるいはテトラサイクリン作動性因子下流に組み込まれた MARCO を細胞に強発現させ、MARCO を介した粒子の取り込みを、20nm のポリスチレンナノビーズ、マウスあるいはヒト血清から調製したエクソソームをモデル粒子として調べた。これらの粒子は、ともに MARCO を介して細胞に取り込まれること、さらにアクチン重合やダイナミンの関与が必要であることが分かった。これらのことは、肺に沈着した陽イオン界面活性剤がミセル構造を形成していた場合は、MARCO を介して細胞内に取込まれる可能性を示している。

(3) 陽イオン界面活性剤の細胞毒性と肺の炎症作用：ヒト肺上皮細胞である A549 細胞を使用した *in vitro* 毒性実験において、塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウムの濃度依存的細胞障害性を調べた。また、細胞障害性が認められない濃度においてもカスパーゼ 3/7 の活性上昇が認められたことから、陽イオン界面活性剤が細胞にアポトーシスを起こすことが分かった。塩化ベンザルコニウム分子におけるアルキル鎖長が細胞障害性に及ぼす影響を調べるために、アルキル鎖の炭素数を C-12, C-14, C-16 と変えた場合の細胞生存率を調べたところ、C-12 と C-14 は同程度の細胞毒性を示したが、C-16 では C-12, や C-14 に比べて有意に高い細胞障害性を示すことが分かった。また、酸化ストレスを軽減することが知られている N-アセチルシステインは、塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウムの細胞毒性を低減させたが、その効果は限定的であった。A549 と BEAS-2B 細胞を用いて、陽イオン界面活性剤に曝露した細胞の形態学的変化と細胞周期に及ぼす影響を調べた。走査電顕を用いた観察により、A549 細胞表面の稠密な微絨毛構造が、陽イオン界面活性剤により著しく損傷を受けることを見いだした。また、細胞周期を制御している Cdc6 が低下することをウエスタンブロットティングの結果より明らかにした。

一方、陽イオン界面活性剤によるインフラマゾーム誘導過程についても詳細に調べた。陽イオン界面活性剤をエアロゾルとして吸入すると肺に炎症が引き起こされが、韓国においては死亡事例まで報告されている。そこで、陽イオン界面活性剤を曝露したマクロファージにおいてインフラマゾームが誘導されるかどうか、ホルボールエステルで刺激してマクロファージ様に分化させたヒト単球系細胞である THP-1 を用いて調べた。塩化ベンザルコニウムや塩化セチルピリジニウムを曝露した細胞では、カスパーゼ 1 の活性化とともに活性化インターロイキン 1 (IL-1) の産生が認められたのに対し、陰イオン界面活性剤である SDS を曝露した細胞ではインフラマゾームの誘導が認められなかった。培養細胞である THP-1 細胞で観察された陽イオン界面活性剤によりインフラマゾーム形成が、実際マウスより調製した BMDMs においても見られることを確認した。これらのことより、陽イオン界面活性剤の吸入に伴う肺の炎症のメカニズムとして、インフラマゾームの誘導を介する可能性を示すことができた。しかし、陽イオン界面活性剤によるインフラマゾームの活性化は、細胞障害性が認められる濃度ではじめてみられることから、陽イオン界面活性剤に特異的な反応ではないものと考えられる。このことは、LC3-II/LC3-I 比や p62/SQSTM 量などのオートファジーのマーカーが、細胞毒性が現れる濃度ではじめて上昇することに類似している。また、GFP で蛍光標識した G3BP1 を安定的に発現させた CHO-K1 細胞を



Untreated

40 μ M CPC 1h

用いてストレス顆粒の形成過程を詳細に調べたところ、陽イオン界面活性剤である塩化セチルピリジニウムや塩化ベンザルコニウムは、明らかにストレス顆粒を誘導することが分かった（左図参照）。これらのことより、塩化セチルピリジニウムや塩化ベンザルコニウムなどの陽イオン界面活性剤には、細胞質の相分離を促進する作用があるものと結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sanae Kanno, Seishiro Hirano, Tsubasa Sakamoto, Akiko Furuyama, Hiroshi Takase, Hideaki Kato, Mamiko Fukuta, Yasuhiro Aoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Scavenger receptor MARCO contributes to cellular internalization of exosomes by dynamin-dependent endocytosis and micropinocytosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78464-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanno Sanae, Hirano Seishiro, Kato Hideaki, Fukuta Mamiko, Mukai Toshiji, Aoki Yasuhiro	4. 巻 317
2. 論文標題 Benzalkonium chloride and cetylpyridinium chloride induce apoptosis in human lung epithelial cells and alter surface activity of pulmonary surfactant monolayers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 108962 ~ 108962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbi.2020.108962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Seishiro, Kanno Sanae	4. 巻 65
2. 論文標題 Relevance of autophagy markers to cytotoxicity of zinc compounds in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 104816 ~ 104816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tiv.2020.104816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oberbek Przemyslaw, Bolek Tomasz, Chlanda Adrian, Hirano Seishiro, Kusnieruk Sylwia, Rogowska-Tylman Julia, Nechyporenko Ganna, Zinchenko Viktor, Swieszkowski Wojciech, Puzyn Tomasz	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization and influence of hydroxyapatite nanopowders on living cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 3079 ~ 3094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3762/bjnano.9.286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi Tha Thu, Fujitani Y., Shinji Tsukahara, and Seishiro Hirano
2. 発表標題 Effects of developmental exposure to secondary organic aerosols on immune cells and apoptosis in rat brain.
3. 学会等名 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sanae Kanno, Seishiro Hirano, Jun Otaki, Hideaki Kato, Mamiko Fukuta, Yoshimi Nakamura, Tetsuya Horita, Yasuhiro Aok
2. 発表標題 Cytotoxicity of cationic disinfectants through apoptosis in human alveolar epithelial cells.
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologist (TIAFT) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 さな枝、平野靖史郎、大瀧 純、加藤 秀章、福田 真未子、堀田 哲也、中村 昌美、青木 康博
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮細胞を用いた陽イオン性殺菌剤曝露による細胞毒性とアポトーシス誘導
3. 学会等名 第38年会 日本法中毒学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野さな枝、平野靖史郎、大瀧純、加藤秀章、福田真未子、中村昌美、青木康博
2. 発表標題 陽イオン性殺菌剤曝露によるヒト肺胞上皮細胞への細胞膜毒性
3. 学会等名 第40年会日本法中毒学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Seishiro Hirano	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Cham.	5. 総ページ数 20
3. 書名 Autophagy as a Biomarker of Cytotoxicity. In: Patel V.B., Preedy V.R., Rajendram R. (eds) Biomarkers in Toxicology. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications.	

〔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
研究 分担 者	菅野 さな枝 (Kanno Sanae) (50391090)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------