

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18980

研究課題名（和文）法医学的診断基準の確立に向けた炭素鎖長の異なる塩化ベンザルコニウムの毒性機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the toxic mechanism of benzalkonium chloride differing in carbon chain length for establishment of diagnostic criteria in forensic medicine

研究代表者

関島 秀久（Sekijima, Hidehisa）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60792447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、C14の炭素鎖を有する塩化ベンザルコニウム（BAC）がC12の炭素鎖を有するBACと比較して低濃度で毒性を発現すると仮説を立て、BACの体内動態と臓器傷害性を炭素鎖間で比較検証した。その結果、BACの体内動態や臓器傷害性は炭素鎖間で同等であり、本研究の手法では仮説通りの結果を得ることができなかった。一方、研究遂行の過程において、プログラムされた細胞死の一種であるアポトーシスを伴う急性肺傷害をBAC経口摂取後の新たな中毒機序として見出した。これらの成果は、BAC中毒死の法医学的診断基準の確立のための基礎的情報になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩化ベンザルコニウム（BAC）の経口摂取を原因とした中毒死の法医学的診断法は確立されていない。中毒死の診断法の確立のためには、BACの毒性機序の詳細を明らかにする必要がある。本研究で得られた成果は、BAC経口摂取後の毒性機序の理解を一層深めるものであり、法医実務に応用可能な診断基準の確立のみならず、急性中毒時の新たな治療法の確立のための基礎的知見として有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we hypothesized that benzalkonium chloride (BAC) with a carbon chains C14 would be toxic at lower concentrations than BAC with a carbon chains C12. We compared the pharmacokinetics and organ toxicity of BAC between carbon chains using mice. The pharmacokinetics and organ toxicity of BAC were similar between carbon chains, and it could not obtain results that conform to the hypothesis in the method of this study. On the other hand, we discovered acute lung injury with apoptosis as a novel toxic mechanism after oral BAC ingestion in the courses of the study. These findings will be useful as a basic information for establishment of forensic diagnostic criteria for BAC poisoning.

研究分野：法中毒学

キーワード：塩化ベンザルコニウム 炭素鎖長 致死量 体内動態 臓器傷害 急性肺傷害 細胞死

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 塩化ベンザルコニウム (BAC) は、炭素鎖 C8-C18 を有するカチオン性界面活性剤である。特に、C12 および C14-BAC の混合物 (C12:C14=4:1) が消毒剤として繁用されている。その一方で、法医実務において、BAC の経口摂取を原因とした中毒例がたびたび報告される。法医実務での BAC 中毒死の診断には、体内 BAC の存在が必須条件となる。しかし、剖検時における体内の BAC 濃度が致死性かどうか明確な基準はない。さらに、どの炭素鎖の BAC を中毒指標とするか明確な基準はなく、法医学的診断に難渋することが予想される。この問題を解決するためには、BAC の毒性機序を詳細に解析する必要がある。

(2) これまでに、同濃度に調製された C12 および C14-BAC をそれぞれ、ウサギ角膜上皮に単独暴露した研究では、C14-BAC のみで細胞形態変化が報告されており、C14-BAC は C12-BAC と比較して毒性が強いと推測される。本研究では、BAC の毒性発現に至るまでの流れについて、C14-BAC が C12-BAC と比較して低濃度で生命維持に影響を及ぼす臓器傷害を引き起こすのではないかと仮説立て、それを明らかにすることは、将来の BAC 中毒死の法医学的診断に役立つのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、炭素鎖長の異なる C12 および C14-BAC を単独または混合して、種々用量でマウスに摂取させ、BAC の体内動態と臓器傷害性を炭素鎖長間で比較検討し、BAC の毒性発現機序と炭素鎖長との関係性を明らかにすることを目的とした。超高齢社会の本邦では、認知症患者数の増加に伴い、誤飲による薬毒物中毒事例が増加すると想定され、BAC 含有消毒剤の事例も増加すると予想される。本研究では、BAC の毒性発現について、新たな基礎的知見が得られることから、BAC 中毒時の法医学的診断基準の確立に向けた応用研究につながると考える。また、BAC 中毒例は救急医療においても報告されていることから、毒性機序の理解は患者の予後や救命率を大幅に向上させるため、本研究で得られる知見は将来の治療成績の向上に寄与すると考える。

### 3. 研究の方法

本研究での実験動物には、C57BL/6 マウス (雄性、8 週齢) を用いた。本研究の動物実験は、三重大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### (1) BAC 経口摂取後の体内動態解析

BAC をマウスに経口投与するために、市販製剤を模倣した C12・C14-BAC 混合溶液 (C12:C14=4:1)、さらに C12 および C14-BAC 単独溶液を調製した。調製した BAC 混合溶液および単独溶液のマウスへの経口投与量は、これまでのげっ歯類を用いた既報論文を参考に、100 (0%致死量)、250 (50%致死量) および 1250 (100%致死量) mg/kg に設定した。経口投与後、血液、主要臓器 (脳・心臓・肺・脾臓・肝臓・腎臓) および消化管 (胃・小腸・大腸) を経時的に採取した。採取後、血液、臓器および消化管から BAC を除タンパク法により前処理した。前処理したサンプルの BAC 濃度を LC-MS/MS を用いて分析し、BAC の体内動態を投与量および炭素鎖間で比較評価した。

#### (2) BAC 経口摂取後の臓器傷害性解析

(1) と同様の手法により BAC をマウスへ経口投与し、上述した臓器および消化管を経時的に採取し、ホルマリン固定処理後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した。HE 染色した標本を顕微鏡で観察し、組織傷害性を投与量および炭素鎖間で比較評価した。加えて、アポトーシス細胞を検出するために、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色し、顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) BAC 経口摂取後の体内動態解析

BAC の体内動態が投与量、さらには炭素鎖長の影響を受けるかどうかを明らかにするために、BAC 投与後の血中、臓器中および消化管中の濃度およびその推移を評価した。その結果、実験終了時までの血中および臓器中濃度レベルは、100 mg/kg では一定であったのに対し、250 および 1250 mg/kg では経時的に増大した。一方、消化管中の濃度レベルは、いずれの投与量においても投与後から実験終了時まで、それぞれ一定のレベルを維持した。これら濃度レベルやその推移は、炭素鎖間で違いは認められなかった。以上より、経口投与により消化管から吸収された BAC の体内動態は、致死量域および致死量未滿で濃度推移が異なるものの、炭素鎖間での違いは認められなかった。

## (2) BAC 経口摂取後の臓器傷害性解析

BAC による臓器毒性が投与量、さらには炭素鎖長の影響を受けるかどうかを明らかにするために、BAC 経口投与後の臓器および消化管の組織傷害性を評価した。その結果、致死量域の C12・C14-BAC 混合溶液および単独溶液投与後の肺、肝臓、腎臓および脾臓、さらに消化管では、うっ血や壊死等の所見が観察された。その傷害レベルは炭素鎖間で違いはなかったが、投与量依存的であった。特に、肺では、アポトーシスを伴う急性肺傷害を引き起こしていることがわかった(図1)。急性肺傷害時の肺胞上皮細胞の過剰なアポトーシス誘導は、重症化因子の一つとして考えられていることから(文献 )、これら現象が BAC 経口摂取後の中毒死に寄与していると考えられた。また、アポトーシス誘導のレベルは、C12・C14-BAC 混合溶液および単独溶液投与後のいずれの投与条件下でも同等であり、炭素鎖間で違いがないことがわかった。以上より、致死量域の BAC 経口投与後に多臓器傷害を発現し、さらには死に寄与する可能性のある急性肺傷害も認められたが、それら現象の炭素鎖間での違いは認められなかった。

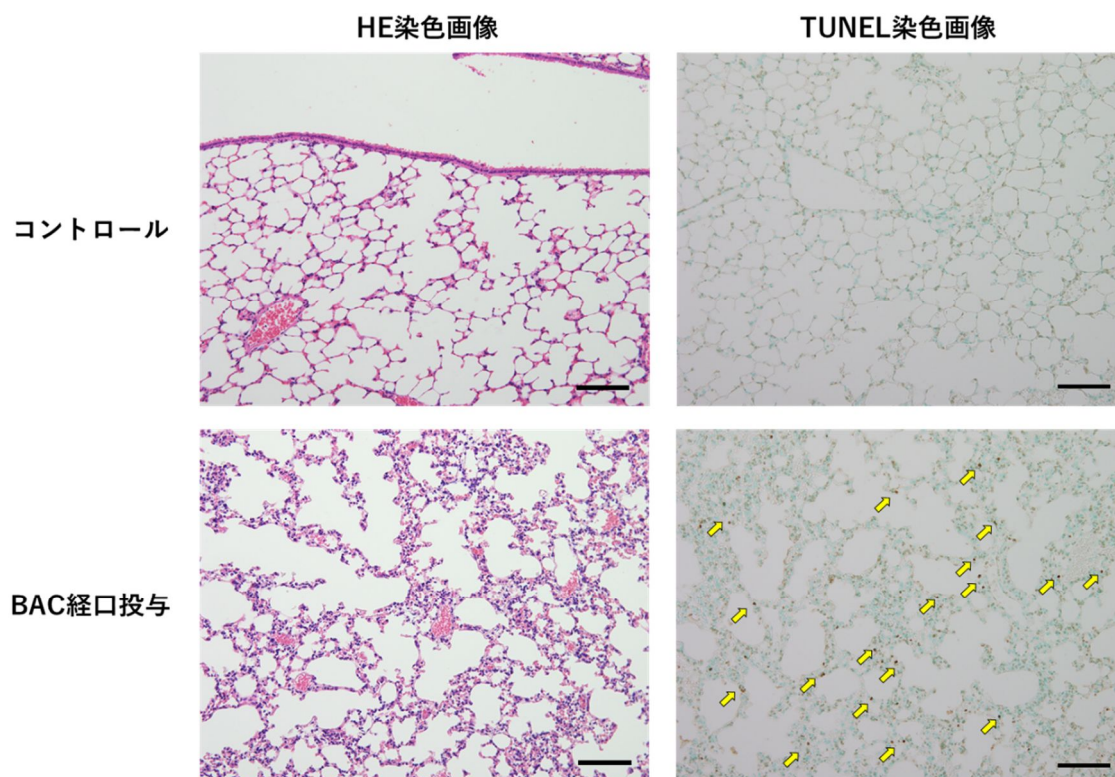


図1. BAC経口投与後の肺傷害発現とアポトーシスの誘導  
矢印：TUNEL陽性細胞（濃茶色）、スケールバー：100  $\mu$ m

## (3) まとめ

本研究は、C14-BAC が C12-BAC と比較して低濃度で生命維持に影響を及ぼす臓器傷害を引き起こすのではないかと、すなわち、BAC の経口摂取による毒性発現機序が炭素鎖間で異なると仮説を立て、遂行した。その結果、BAC の体内動態や臓器傷害は炭素鎖間で同等であり、本研究の手法では仮説通りの成果を得ることはできなかった。しかし、研究遂行の過程において、BAC 経口摂取後の新たな中毒機序としてアポトーシスを伴う急性肺傷害を見出し、その論文が国際学術誌に採択された(文献 )。今後、BAC 経口投与後のアポトーシス誘導や肺傷害発現のメカニズムの詳細を明らかにできれば、法医実務に応用可能な診断基準の確立のみならず、急性中毒時の治療法の確立にもつながると考えられる。

## 文献

: Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, Matsuba T, Kunitake R, Tanaka T, Maeyama T, Hara N. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol.* 2000;157(2):597-603. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64570-1.

: Sekijima H, Oshima T, Ueji Y, Kuno N, Kondo Y, Nomura S, Asakura T, Sakai-Sugino K, Kawano M, Komada H, Kotani H. Toxicologic pathological mechanism of acute lung injury induced by oral administration of benzalkonium chloride in mice. *Toxicol Res.* in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sekijima Hidehisa, Oshima Toru, Ueji Yuno, Kuno Naoko, Kondo Yukino, Nomura Saera, Asakura Tomomi, Sakai-Sugino Kae, Kawano Mitsuo, Komada Hiroshi, Kotani Hirokazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Toxicologic pathological mechanism of acute lung injury induced by oral administration of benzalkonium chloride in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43188-023-00178-0	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関島秀久, 杉野香江, 大島徹, 倉田智美, 丹野美佐子, 原晶子, 向井陽子, 河野光雄, 駒田洋, 小谷泰一
2. 発表標題 食物摂取が塩化ベンザルコニウム中毒死にもたらす影響
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会、第69回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------