

## 4級アンモニウム化合物 (QUAT) のマウス免疫系に及ぼす影響

山口 敦美, 藤谷 知子, 大橋 則雄, 中江 大, 小縣 昭夫

**Administration of Antimicrobial Quaternary Ammonium Compounds (QUAT) Caused Immunotoxicity in ICR Mice**

Atsumi YAMAGUCHI, Tomoko FUJITANI, Norio OHASHI, Dai NAKAE and Akio OGATA

# [ 研究年報 第 61 号 (2010) 正誤表 Errata ]

東京健安研七年报 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 61, 357-362, 2010

## 4 級アンモニウム化合物 (QUAT) のマウス免疫系に及ぼす影響

### Administration of Antimicrobial Quaternary Ammonium Compounds (QUAT) Caused Immunotoxicity in ICR Mice

page 357 右段 (right column)

[誤 Error]

今回使用した QUAT の成分は 2.25% *n*-alkyl (C14:60%, C16:30%, C12:5%, C18:5%) dimethyl benzyl ammonium chloride と 2.25% *n*-alkyl (C12:68%, C14:32%) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride

[正 Correct]

今回使用した QUAT の成分は 2.25% *N*-alkyl (C14:60%, C16:30%, C12:5%, C18:5%) dimethyl benzyl ammonium chloride と 2.25% *N*-alkyl (C12:68%, C14:32%) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride

page 362 英文要約 (abstract)

[誤 Error]

*n*-Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (60% C14, 30% C16, 5% C18) and *n*-Alkyl dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride (68% C12, 32% C14).

[正 Correct]

*N*-Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18) and *N*-Alkyl dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride (68% C12, 32% C14).

## 4級アンモニウム化合物 (QUAT) のマウス免疫系に及ぼす影響

山口敦美\*, 藤谷知子\*, 大橋則雄\*\*, 中江大\*\*\*, 小縣昭夫\*\*\*

QUATは2種の4級アンモニウム塩(アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドとアルキルジメチルエチルベンジルアンモニウムクロライド)を含み殺菌剤として使用されている。QUATをマウスに投与した時の免疫毒性を検討した。8週齢雌ICRマウスにQUATを0, 50, 100, 200 mg/kg経口投与し, 2日後に体重と臓器重量, 胸腺, 脾臓と血中のリンパ球分析, 脾臓細胞のサイトカイン産生能の変化を測定した。また, QUAT投与の1日後に卵白アルブミンを投与して, 産生される抗卵白アルブミンIgM抗体を測定した。QUAT投与で用量依存的に血中B細胞の減少, B細胞分化に関与するサイトカインIL6, IL10の減少と, 抗卵白アルブミンIgM抗体産生の減少が観察された。今回の結果は, 単回大量投与ではあるが, 免疫系への抑制作用が用量依存的に見られたことから, 繰り返し使用する時の安全性への考慮の必要性が示唆された。

**キーワード**: 4級アンモニウム塩, QUAT, 殺菌剤, 免疫毒性, マウス

### はじめに

4級アンモニウム化合物 (quaternary ammonium compounds: 以下QUATと略す)は陽イオン界面活性剤であり, 強い陽イオンの極性が, バクテリア, 菌類や酵母等の細胞膜に作用して破壊させて殺菌作用を示す<sup>1,2)</sup>。布製品や室内空間を殺菌・消臭する目的で, 溶液を散布して使用されている。4級アンモニウム化合物の一般的な毒性については, マウスに経口投与した時のLD<sub>50</sub>は150-1,000mg/kgと報告されている<sup>3,4)</sup>。布製品に噴霧して使用するという利用法から, 布製品に触れた皮膚からの吸収や, 皮膚への刺激が考えられたが, 皮膚を介して吸収されることはなく, 2%溶液で皮膚のアレルギーの原因にはならないということが報告されている<sup>5)</sup>。Siddiquiらは妊娠ラットに4級アンモニウム化合物 quaternary Silsequioxaneを1,000 mg/kg投与した時, 仔ラットの催奇性や発毒性はないが, 肝臓重量の増加を観察している<sup>6)</sup>。

これまでに我々は, QUATを含む市販の消臭・殺菌剤の噴霧で乳幼児が経口摂取する可能性を考え, 健康に影響を及ぼすかどうかについての検討をおこなった結果, 消臭・殺菌剤2 mL/kgを新生マウスに経口投与した後, それらのマウスの交配から生まれた仔マウスに, 死亡率の増加と精巣重量の低下を観察してきた<sup>7)</sup>。その市販の消臭・殺菌剤はアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドとアルキルジメチルエチルベンジルアンモニウムクロライドを含んでいた。

QUATの免疫系への作用は不明なので, 免疫毒性を持つかどうかを調べる目的で, 8週齢雌ICRマウスにQUATを経口投与し, 免疫系に及ぼす影響について検討した。

### 実験方法

#### 1. 材料

今回使用したQUATの成分は2.25% n-alkyl (C14:60%, C16:30%, C12:5%, C18:5%) dimethyl benzyl ammonium chloride と 2.25% n-alkyl (C12:68%, C14:32%) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride から構成され, エコア(東京, 日本)から購入した。

リンパ球の細胞表面抗原を検出する抗体は, PE 標識 anti-CD3 (clone:145-2C11), FITC 標識 anti-CD45R/B220 (clone:RA3-6B2), PE 標識 anti-CD8 (clone 53-6.7) 及び FITC 標識 anti-CD4 (clone:GK1.5) は, ベックマン・コールター (CA, USA) から購入した。PE-Cy5.5 標識 anti-CD3 (clone:145-2C11)及びPE-Cy5.5 標識 anti-CD45 (clone:30-F11), anti-CD16/CD32 はバイバイオサイエンス(CA, USA) から購入した。

Ovalbumin (OVA)と bovine serum albumin (BSA) と concanavalin A (ConA) は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。HPR conjugated anti-mouse IgM antibody は Zymed (CA, USA)から購入した。HPR の基質である ABTS Tablets は Roche-Diagnostics (Basel, Swiss) から購入した。

RNAiso Plus は TaKaRa Bio (東京, 日本), RNAp Protect Cell Reagent は Qiagen (東京, 日本), TaqMan Gene Expression Master Mix, TaqMan Gene Expression Assays, Inventoried (IL2: Mm00434256\_m1, IL6: Mm99999064\_m1, IL4: Mm99999154\_m1, IL10: Mm99999062\_m1, IFN $\gamma$ : Mm99999071\_m1)と High capacity RNA-to-cDNA kit は Applied Biosystems Inc. (CA, USA) から購入した。

#### 2. 動物

1) 動物 日本チャールスリバー(株)から, Crlj:CD1(ICR)系

\* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\*\* 元東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\*\*\* 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

統の7週齢雌マウスを購入し、24-26°C、相対湿度50-60%、照明12時間の動物室でチップを敷いたプラスチック製ケージで1匹ずつ、1週間予備飼育した。予備飼育および実験中、マウスは飼料と水を自由に摂取した。

**2) 投与方法** QUAT を蒸留水で溶解し、0, 50, 100, 200 mg/10 mL/kg で1回強制経口投与した。対照は蒸留水のみ投与した。2日目に解剖し肝臓、腎臓、脾臓、胸腺及び副腎の重量を測定した。血液は抗凝固剤としてEDTAを使用して、心臓から採血した。

### 3. 脾臓・胸腺細胞の分離

脾臓及び胸腺を摘出した後、それぞれを4 mLの0.5%BSAを含むPBS中で磨りの付いたスライドガラスの磨りの部分で潰した後、孔径57 µmのナイロンメッシュでろ過した。1,200 rpm, 5 minで遠心した。沈渣を4 mLの0.5% BSAを含むPBSで再浮遊し1,200 rpm, 5 minで洗浄した。沈渣に4 mLの溶血液(0.173 M Tris-HCl (pH 7.65) : 0.83% NH<sub>4</sub>Cl = 1 : 9)を加えて、室温10 minで赤血球を溶血させた。4 mLの0.5% BSAを含むPBSに再浮遊し1,200 rpm, 5 minで2回洗浄して、細胞数を5 x 10<sup>6</sup>/mLに調整した。

### 4. 白血球サブタイプの測定

脾臓及び胸腺由来の5 x 10<sup>6</sup>/mLの細胞浮遊液を96 wellのプレートに0.1 mLずつ分注した。脾臓細胞はPE標識anti-CD3 (T cell) 及びFITC標識anti-CD45R/B220 (B細胞)抗体を加え、胸腺細胞はPE-Cy5.5標識anti-CD3 (T細胞)、PE標識anti-CD8 (CD8陽性細胞) 及びFITC標識anti-CD4 (CD4陽性細胞)を加え室温で30分間インキュベーションした後、250 µLの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄し450 µLの0.5% BSAを含むPBSに再浮遊し、径57 µmのナイロンメッシュでろ過した。血液中のリンパ球は、血液0.1 mLに0.5 µgのanti-CD16/CD3を加えてFc受容体をブロックした後、PE-Cy5.5標識anti-CD3、PE標識anti-CD8及びFITC標識anti-CD4またはPE-Cy5.5標識anti-CD45(白血球共通抗原)、PE標識anti-CD3及びFITC標識anti-CD45R/B220を加え30分インキュベーションした後、4 mLの溶血液(Tris 1 g, NH<sub>4</sub>Cl 2.8 g/500 mL)を加えて氷中で5分インキュベーションした後、同量のPBSで希釈し、1,200 rpm, 5 minで遠心した。さらに4 mLの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄し、450 µLの0.5% BSAを含むPBSに再浮遊した。蛍光染色した細胞はフローサイトメトリー (Cell Lab Quanta SC・ベックマン・コールター社製) で測定した。血液リンパ球はフローサイトメトリーでPE-Cy5.5標識CD45抗体で染色した白血球画分を抽出し、さらに側方散乱の程度で白血球画分からリンパ球画分を決定した。

### 5. 定量PCR

脾臓から細胞を調製し、10% FCS, 1M HEPES (1% v/v), 10 mM sodium pyruvate (1% v/v), 200 mM L-glutamine (1%

v/v), penicillin-streptomycin (1% v/v), 2-ME(0.1% v/v), non-essential amino acids solution (1% v/v)を含むRPMI-1640培地に再浮遊して5% CO<sub>2</sub>, 37°C飽和水蒸気下で培養した。半分の細胞を5 µg/mLのConAで活性化した。5時間後に細胞を集めて、RNA抽出までRNAprotect Cell Reagent溶液中4°Cで保存した。総RNAは5x10<sup>4</sup>個の細胞からRNAiso plusキットで抽出し、High capacity RNA-to-cDNA kitでcDNAを作成した。定量PCRはcDNA特異的プライマーTaqMan Gene Expression Assays (Inventoried)を用いてTaqMan Gene Expression Master Mixで増幅した。反応は、50°C, 2分(1サイクル), 95°C, 10分(1サイクル), 95°C, 15秒と60°C, 1分(45サイクル)で行った。PCR産物はABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc.)でリアルタイムに測定した。発現しているRNA量はハウスキーピング遺伝子β<sub>2</sub> microglobuline (β<sub>2</sub>M)をコントロールとして計算した。

### 6. 免疫

1 mg/mL OVAと9% AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>を1:1で混合しKOHでpH 6.5に調製し、PBSで3回洗浄して、0.5 mg/mLのOVA(+alum)溶液を作成し抗原とした。8-10週齢の雌ICRマウスに、QUATを蒸留水で溶解し、0, 50, 100, 200 mg/10 mL/kgで1回強制経口投与した。翌日1匹あたり100 µg OVA(+alum)/200 µLを腹腔内投与した。対照はPBSを投与した。OVA投与前、投与後8日後に尾静脈から採血し、血清を分離して、測定するまで-80°Cで保存した。

### 7. 抗OVA-IgM抗体量の測定

抗OVA-IgM抗体はELISA法で測定した。96穴のマイクロプレートに100 µg/mL OVAを100 µL加えて4°Cで一晩放置して固相化した。0.05% Tween20/PBS (0.05 T/P)で6回洗浄し、5% BSA/PBS (5 B/P)を加えて室温で1時間ブロッキングした。50倍と150倍に希釈した血清を加えて2時間静置した。0.05 T/Pで6回洗浄後、5 B/Pを加えて室温で1時間ブロッキングした。HRP標識した抗マウスIgM抗体を加えて2時間附置し0.05 T/Pで6回洗浄した後、基質液 (ABTS 錠)を加えて発色させ、OD 405/492 (対照)の波長でマイクロプレートリーダー(サンライズリモート、和光純薬工業社製)で測定した。

## 結果

### 1. 体重と臓器重量変化

表1に対照と200 mg/kg QUATの投与後2日目のICRマウスの体重と臓器重量変化を示した。QUATの投与でICRマウスの体重と肝臓、腎臓、脾臓、胸腺の重量は変化しなかった。

### 2. 胸腺細胞のリンパ球のタイプ

胸腺の全細胞数は、有意差はないがQUATの投与量(0, 50, 100, 200 mg/kg)に依存して減少傾向を示した(それ

ぞれ  $9.59 \pm 0.98$ ,  $9.57 \pm 0.90$ ,  $8.81 \pm 1.39$ ,  $7.70 \pm 1.54 \times 10^7$  細胞). 胸腺の細胞のなかで  $CD3^+CD4^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  と  $CD3^+CD8^+$  の細胞数は変化しなかったが,  $CD3^+CD4^+CD8^+$  細胞は 0, 50, 100, 200 mg/kg QUAT の投与でそれぞれ  $5.03 \pm 0.52$ ,  $4.84 \pm 0.54$ ,  $4.19 \pm 0.49$ ,  $3.66 \pm 0.67 \times 10^7$  に減少傾向を示した (図 1).

### 3. 脾臓のリンパ球のタイプ

図 2 に末梢血中の T 細胞と B 細胞の数を示す. QUAT 投与後の脾臓中 T 細胞と B 細胞の数は対照と比べて変化しなかった (図 2A).

### 4. 末梢血のリンパ球のタイプ

末梢血の白血球数は 200mg/kg QUAT の投与で対照の 80% に減少した. 白血球中の T 細胞数は 200 mg/kg の QUAT 投与でも変化しなかったが, B 細胞は 200 mg/kg の QUAT 投与で対照の 62% に有意に減少した. また, B 細胞の減少は QUAT の用量依存性があった (図 2B). (\* $p < 0.05$  Jonckheere test )

### 5. 抗体産生

QUAT 投与後, OVA/alum で免疫したマウスの 8 日後の血清中の抗原特異的 IgM 抗体を ELISA で測定した (図 3). 0, 50, 100, 200 mg/kg QUAT 投与で抗 OVA-IgM 抗体量は容量依存的に減少した (\* $p < 0.05$  Jonckheere test ). 200 mg/kg QUAT 投与では抗 OVA-IgM 抗体量は対照に比べて 64% で有意に減少した.

### 6. 脾臓細胞のサイトカイン産生

QUAT を投与したマウスの脾臓細胞を ConA で刺激した時のサイトカイン mRNA の変化を示した (図 4). 対照 (0 mg/kg) では ConA 刺激前に比べ, IL2 は 230 倍, IL4 は 28 倍, IL6 は 14 倍, IL10 は 1.8 倍,  $INF\gamma$  は 7.8 倍にそれぞれ増加した. 50-200 mg/kg の QUAT を投与したマウスの脾臓細胞を ConA で刺激すると, IL2, IL4 と  $INF\gamma$  mRNA は対照と同様に増加した. しかし, IL6 mRNA は 50, 100, 200 mg/kg QUAT 投与で対照の 63%, 49%, と 31% にそれぞれ減少した. IL10 mRNA は 50, 100, 200 mg/kg QUAT 投与で対照の 39%, 50%, 31% とそれぞれ有意に減少した (\* $p < 0.05$  Jonckheere test ).

### 考察

QUAT を経口投与した時のリンパ球のサブセットに変化があるかどうかを, 胸腺, 脾臓, 末梢血液で調べた. 末梢血中の B 細胞のみが QUAT の投与量に依存して数が減少し, 200 mg/kg 投与では有意であった. しかし, 脾臓の B 細胞の数は変化しなかった. また, 胸腺, 脾臓, 末梢血中とも T 細胞の数は変化しなかった. QUAT の作用は T 細胞には影響を与えず, 血中の B 細胞に特異的であった. QUAT を経口投与すると一部が腸から吸収されて血中に入り, 血中

の B 細胞に影響を与えている可能性が示唆された.

血中 B 細胞の数が減少していることがわかったので, B 細胞の減少が抗体産生を低下させているかを調べた.

QUAT 投与後, 抗原として OVA を投与して抗 OVA-IgM 抗体量を調べた. 確かに, QUAT 投与は血中 B 細胞数の減少に伴い抗 OVA-IgM 抗体量も減少した.

抗 OVA-IgM 抗体は T 細胞依存性であり, B 細胞が活性化されて増殖し, 抗体産生が促進するためには T 細胞からのシグナルを必要とする. つまり T 細胞はサイトカインを産生して B 細胞を活性化する. IL2, IL4, IL6, IL10,  $INF\gamma$  は T 細胞が産生するサイトカインであり, 免疫反応を促進させる働きをする. Th1 は IL2,  $INF\gamma$  を Th2 は IL4, IL6, IL10 を産生する. ConA は T 細胞を活性化してサイトカイン産生を促進するが, QUAT 投与後, ConA 刺激で, Th2 の産生するサイトカインのうち IL4 は対照と同程度に増加したが, IL6, IL10 は対照に比べ減少傾向を示した. 特に IL10 は用量依存性に有意に減少した. IL6, IL10 は B 細胞の増殖と抗体産生を促進することが知られているので, それらの減少が, B 細胞の減少と抗体産生の減少の原因であることが考えられた. このことは, QUAT は最初に Th2 細胞に作用し, Th2 細胞からの IL6, 10 産生の減少が, 抗体産生を減少させている可能性を示唆している.

200 mg/kg QUAT の 1 回の投与は, 免疫系に有意な抑制作用を示した. この QUAT の量は 2% 溶液であれば 10 mL/kg の投与量である. 消臭, 消毒に用いられている 0.01-1% よりも高濃度ではある. 一度に 200 mg/kg の量を生体内に取り込むことは現実には起こりえないが, QUAT の作用には用量依存性がみられたことから, 少量の繰り返し曝露で免疫抑制作用がおこる可能性がある. 消臭, 殺菌の目的でカーテンや家具に噴霧した薬剤が, 少量でも, 頻繁に, 直接あるいは手を介して口に入る可能性が, 特に乳幼児の場合に考えられ, 今後の詳細な検討が必要である.

### 文献

- 1) Isquith, A. J., Abbott, E. A. and Walters, P. A.: *Appl Microbiol*, **24**: 859-63, 1972.
- 2) Walters, P. A., Abbott, E. A. and Isquith, A. J.: *Appl Microbiol*, **25**: 253-6, 1973.
- 3) Cutler, R. A. and Drobeck, H.P.: *Cationic Sur*, **4**: 527-616, 1969.
- 4) Gloxhuber, C.: *Arch Toxicol*, **32**: 245-70, 1974.
- 5) Jowsey, I. R., Kligman, A. M., White, I. R., et al.: *Dermatitis*, **18**: 32-9, 2007.
- 6) Siddiqui, W. H. and York, R. G.: *Fundam Appl Toxicol*, **21**: 66-70, 1993.
- 7) 藤谷知子, 久保喜一, 安藤 弘, 他: 東京健安研七 年 報, **58**, 311-316, 2007.

表 1. マウスの体重と臓器重量に対する QUAT の影響 mean ± SE (n=5)

	Cont		QUAT	
Body Weight (g)	26.09	± 0.64	26.60	± 0.91
Thymus (mg)	54.7	± 13.1	61.1	± 3.7
Spleen (mg)	117.9	± 5.2	112.8	± 18
Liver (g)	1.36	± 0.13	1.42	± 0.09
Kidney (mg)	333	± 35.1	346	± 14.8

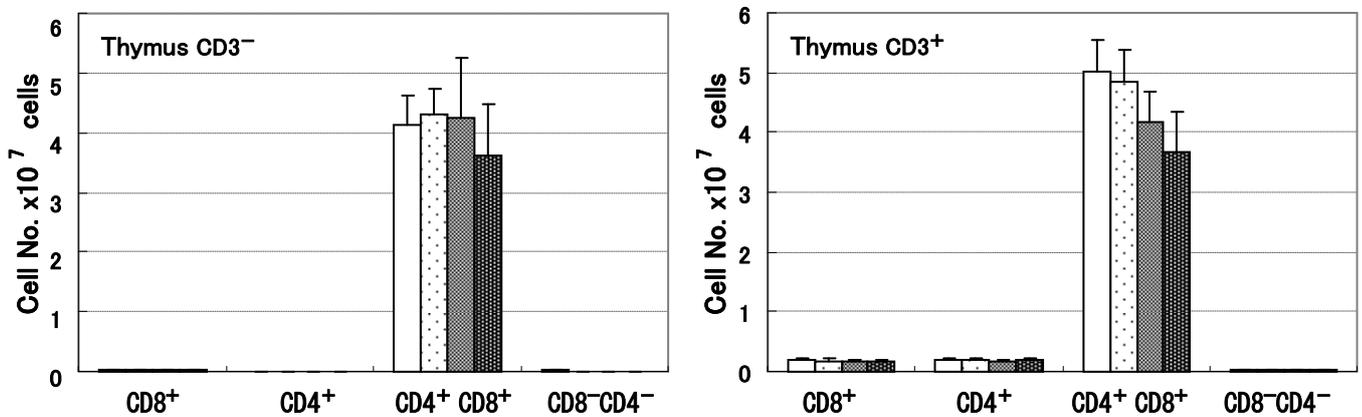


図 1. 胸腺細胞に対する QUAT の影響  
n=9 □ 0 □ 50 ▨ 100 ▩ 200 mg/kg

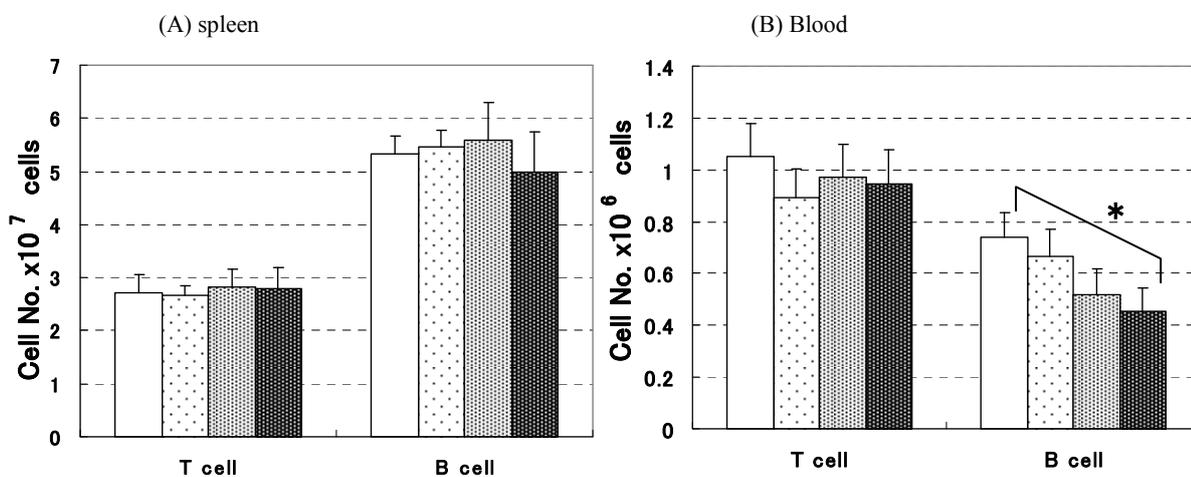


図 2. (A)脾臓細胞と(B)血液細胞に対する QUAT の影響  
n=9 \*p<0.05 Jonckheere Test □ 0 □ 50 ▨ 100 ▩ 200 mg/kg

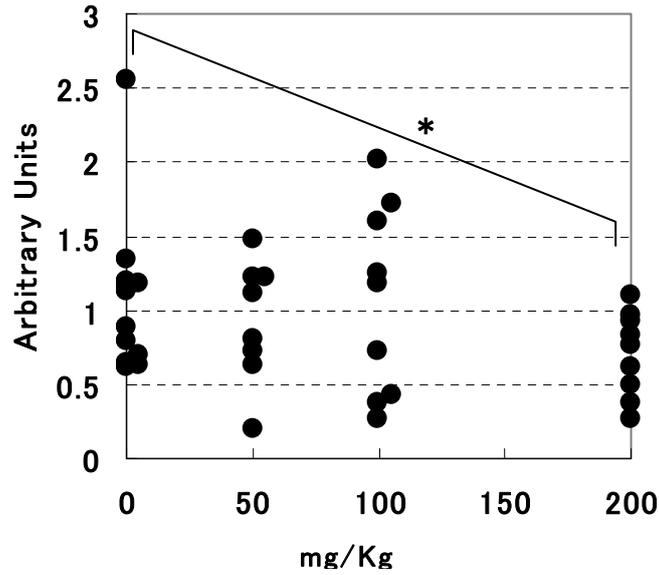


図 3. 抗 OVA-IgM 抗体産生に対する QUAT0, 50, 100, 200mg/kg 投与の影響  
\*p<0.05 Jonckheere Test

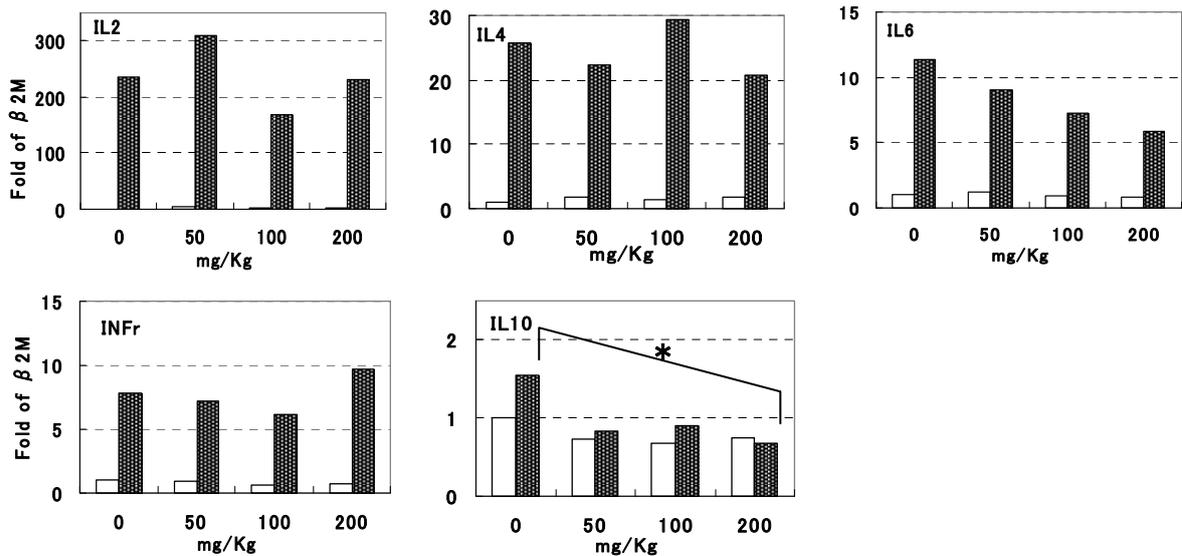


図 4. マウス脾臓細胞のサイトカイン産生能に対する QUAT の影響  
n=2-3 \*p<0.05 Jonckheere Test    □ no    ▨ ConA

**Administration of Antimicrobial Quaternary Ammonium Compounds (QUAT) Caused Immunotoxicity in ICR Mice**

Atsumi YAMAGUCHI\*, Tomoko FUJITANI\*, Norio OHASHI\*\*, Dai NAKAE\* and Akio OGATA\*

In this experiment, we studied quaternary ammonium sanitizer (QUAT), which is widely used as an antimicrobial agent, containing 2 types of quaternary ammonium compounds, namely, *n*-Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (60% C14, 30% C16, 5% C18) and *n*-Alkyl dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride (68% C12, 32% C14). The immunotoxicity of QUAT was studied in ICR female mice. ICR mice were administered 0, 50, 100, or 200 mg/kg of QUAT by gavage as a single dose on day 0. Control mice received only water as the vehicle. Body and organ weights and the number of lymphocyte subsets in the thymus, spleen, and peripheral blood were measured on day 2. Body and organ weights did not change. Lymphocyte subsets in the thymus and spleen did not change. The number of B cells in peripheral blood decreased in a dose-dependent manner, but the number of T cells in peripheral blood did not change. ICR mice were administered 0, 50, 100, or 200 mg/kg of QUAT by gavage and subsequently immunized intraperitoneally with alum-precipitated ovalbumin (OVA) the next day. OVA-specific antibodies in the serum were evaluated on post immunization day 8. Consistent with the decrease in B cells in peripheral blood, OVA-specific IgM formation was significantly decreased at a dose of 200 mg/kg of QUAT administration. Spleen cells from mice administered 200 mg/kg of QUAT expressed smaller amounts of IL6 and IL10 cytokines. These cytokines originate from T cells. These results suggest that in ICR mice, QUAT may impair the immune system through a T cell-dependent immune response.

**Keywords:** quaternary ammonium compounds, QUAT, antimicrobial agent, immunotoxicity, mouse

---

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* former Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan