

4級アンモニウム化合物QUATの*in vitro*曝露によるマウス胚仔への影響

藤谷 知子, 安藤 弘, 久保 喜一, 大山 謙一, 小縣 昭夫

Embryonic Toxicity of Quaternary Ammonium Sanitizer *in vitro*

Tomoko FUJITANI, Hiroshi ANDO, Yoshikazu KUBO,
Ken-ichi OHYAMA and Akio OGATA

4級アンモニウム化合物 QUAT の *in vitro* 曝露によるマウス胚仔への影響

藤谷 知子^a, 安藤 弘^a, 久保 喜一^a, 大山 謙一^a, 小縣 昭夫^b

家庭用消臭除菌剤に配合される4級アンモニウム系除菌剤 (QUAT), *N*-Alkyl (60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18) Dimethylbenzyl Ammonium Chloride と *N*-Alkyl (68% C12, 32% C14) Dimethyl Ethylbenzyl Ammonium Chloride の等量混合物のマウス胚仔に対する毒性を胚仔培養法で調べた。妊娠8日目のマウス母体から、胚仔を脱落膜と羊膜ごと取り出し、24時間予備培養した後、QUATを40あるいは80 µg/mLになるように加え、さらに24時間培養した。羊膜直径の伸張が80 µg/mL群で有意に抑えられ、心拍数および胚子長が40および80 µg/mL群で有意に抑えられ、体節数が80 µg/mL群で有意に抑えられていた。また、胚仔形が対照群および40 µg/mL群ではすべて正常なG型だったのに比べて、80 µg/mL群ではG型は9匹中2匹しかなかった。QUAT40あるいは80 µg/mLの*in vitro*の曝露は、培養胚仔に発育遅延と致死毒性を引き起こした。

キーワード : 除菌剤, 4級アンモニウム化合物, マウス, 胚仔, QUAT, 発育遅延, 致死毒性

はじめに

近年のアレルギー疾患増加や清潔志向の高まりに対応して、ハウスダスト除去や除菌効果を持つ家庭用品がさかんに開発・販売されている。「ハウスダスト除去」に効果があるとされる一般家庭向け噴霧型製品のうち、毒性に関する情報が得られない数点について安全性試験を実施し¹⁻³⁾、「除菌剤」を含む表示のある製品A¹⁾または製品B²⁾を投与されたマウス新生仔で、投与期間中の死亡や体重増加の抑制と生後21日の臓器重量低下などを認めた。また、製品Aに含まれる除菌成分である4級アンモニウム化合物 *N*-Alkyl (60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18) Dimethylbenzyl Ammonium Chloride と *N*-Alkyl (68% C12, 32% C14) Dimethyl Ethylbenzyl Ammonium Chloride の等量混合物 (通称QUAT, 以後QUATと略す) はマウス成獣よりも新生仔において一般毒性指標に対する影響が大きかった⁴⁾。また、QUATを妊娠9日目のマウス母体に投与して、胎仔および母体に対する影響を検討したところ、100あるいは150 mg/kg体重投与量で胎仔重量の抑制が⁵⁾見られた。そこでQUATの胚仔におよぼす影響を胚仔培養法を用いて検討したので、報告する。

実験方法

1. 被検物質

QUAT は市販の4.5%液, *N*-Alkyl (60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18) Dimethylbenzyl Ammonium Chloride 2.25%および *N*-Alkyl (68% C12, 32% C14) Dimethyl Ethylbenzyl Ammonium Chloride 2.25%含有をエコア(株) (東京) から購入した。製品の性状は粘性のない液体で、振り混ぜると泡立ち、わずかに薬品臭がした。製品の容器に記載されていた成分は上記のみで、容器本体の表示では、50倍希釈して

食器や布製品の除菌に用いるとあった。製品原液はpH 11であったので、塩酸でpH 7に中和して用いた。

2. 動物

妊娠6日のICRマウス雌 (Crj:CD1, 日本チャールスリバー) を購入し、1匹/ケージに収容し、室温23-25°C, 相対湿度50-60%, 照明12時間/日の飼育室で、水と飼料 (CE2, 日本クレア) を自由に摂取させ、以後、当センター動物実験倫理規定に従って扱った。

3. 実験

妊娠8日の母体を帝王切開し、子宮から胚仔および受胎副産物を脱落膜に包まれた状態で摘出し、実体顕微鏡下で、胚仔を、羊膜、卵黄嚢ならびに胎盤が付随する状態で、採取し、羊膜直径と、中の胚仔の心拍数を計測した。これを、56°C30分で不活化したラットIC血清 (Immediately centrifuged serum) に3 mg/mLのグルコースを加えた培養液 2.5 mL (ミリポアフィルターでろ過滅菌) に入れ、ロータリー胚仔培養機 (池本理化(株)) を用いて、37°C, 飽和水蒸気下、25 rpmで回転培養した。気相には20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂の混合ガスを、培養開始から24時間まで (予備培養期間) は毎分20 mLで流した。24時間後に、胚仔心拍数と羊膜血流を確認後、培養液にQUAT中和水溶液を5 µL加えて、最終濃度40あるいは80 µg/mLとして、その後は混合ガスを毎分30 mLの流速で流し、24時間培養した。培養終了時に、羊膜直径と、胚仔の心拍数を計測し、羊膜血流の有無を確認後、羊膜を開いて、胚仔長および体節数を数え、胚仔形を観察した。

4. 統計

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター環境保健部

対照群 (0 µg/mL) と QUAT 曝露群間の差は, Scheffe の多重比較検定および χ^2 検定を用いて分析した.

結果及び考察

QUATの培養胚仔に対する影響をTable 1に示した. 対照群で羊膜直径が順調に伸張したのに比べ, 40 µg/mL群では伸張が抑制の傾向が見られ, 80 µg/mL群では有意に抑制された. 羊膜血流の認められる個体数が, 80 µg/mL群で有意に減少していた. 胚仔心拍数平均が, 40 µg/mL群および80 µg/mL群で有意に抑えられ, 心拍が確認できた胚仔数が有意に低下していた. 胚仔の頭臀長も, 40 µg/mL群および80 µg/mL群で有意に抑えられた. 80 µg/mL群では, 9例中3例で頭臀長が測定出来ない程, 未熟なままであった. 体節数が, 80 µg/mL群で有意に抑制された. 80 µg/mL群では, 9例中4例で体節数の計測が不可能な程, 胚仔が白濁していた. また, 形態学的には, 対照群と40 µg/mL群ではすべて正常なG型の胎仔型であったのに対し, 80 µg/mL群ではG型は9例中2例しか見られず, 未熟なC型が4例, より未熟なI型が3例で, 曝露による顕著な影響を示していた.

40 µg/mL群および80 µg/mL群で心拍の確認できない胚仔は死亡したと考えられる. また, 80 µg/mL群で, 羊膜だけでなく, 中の胚仔まで白濁していたことから, 蛋白の変性が疑われ, QUATが脱落膜か羊膜を通して中まで浸透して作用した可能性が考えられる. 今回の実験では, 40 µg/mL群でも影響が見られたことから, さらに低濃度で実験する必要があると思われた.

文 献

- 1) 藤谷知子, 多田幸恵, 高橋 博, 他: 東京都健安研セ研究年報, **57**, 389-392, 2006.
- 2) 藤谷知子, 小縣昭夫, 高橋 博, 他: 東京都健安研セ研究年報, **58**, 317-321, 2007.
- 3) 藤谷知子, 小縣昭夫, 高橋 博, 他: 東京都健安研セ研究年報, **58**, 323-327, 2007.
- 4) 藤谷知子, 大山謙一, 小縣昭夫, 他: 東京都健安研セ研究年報, **61**, 363-370, 2010.
- 5) 藤谷知子, 大山謙一, 小縣昭夫: 東京都健安研セ研究年報, **62**, 265-268, 2011.

Table 1. Effects of QUAT on the development of mouse embryo

Dose (µg/mL)	0 (control)	40	80
Number of embryo	10	10	9
Yolk sac diameter (mm)			
pre-exposure	3.67 ± 0.65	4.13 ± 0.38	3.96 ± 0.56
post-exposure	5.30 ± 1.03	4.38 ± 0.70	2.92 ± 0.84***
Yolk sac blood flow			
pre-exposure	9	10	9
post-exposure	6	1	0*
Heartbeat (/min.)			
pre-exposure	110 ± 17	114 ± 11	119 ± 12
post-exposure	82 ± 33	20 ± 28***	14 ± 27***
Number of embryo with heartbeat after exposure	10	4*	2**
Crown rump length of embryos (mm)	4.22 ± 0.59	3.60 ± 0.36*	2.88 ± 0.44 (6 ^S)***
Somite pairs	28.9 ± 1.8	27.2 ± 2.3	25.4 ± 3.4 (5 ^V)*
Shape of embryo			
G-type (normal)	10 [#]	10	2**
C-type (immature)	0	0	4**
I-type (markedly immature)	0	0	3

*, ** or ***: $p < 0.05$, 0.01 or 0.001 in Scheffe's multiple comparison or χ^2 analysis.

[#]: Number of embryo of each type.

^S: Crown rump length of 3 embryo in the 80 µg/mL group could not be measured because shape of embryo was extremely abnormal.

^V: Somite pairs of 4 embryo in the 80 µg/mL group could not be observed because embryo was whitened.

Embryonic Toxicity of Quaternary Ammonium Sanitizer *in vitro*Tomoko FUJITANI^a, Hiroshi ANDO^a, Yoshikazu KUBO^a, Ken-ichi OHYAMA^a and Akio OGATA^a

Effects of a widely used quaternary ammonium sanitizer (QUAT), consisting of equal amounts of *N*-alkyl (60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18) dimethylbenzyl ammonium chloride and *N*-alkyl (68% C12, 32% C14) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride, were evaluated using embryo culture system in ICR mice. Embryos with entire yolk-sac membranes and decidure were taken out from the uterus of dam on day 8 of gestation. After 24 hours pre-incubation, embryos were exposed to 0 (control), 40, or 80 µg/mL of QUAT for 24 hours. Yolk-sac diameter in the 80 µg/mL group, heartbeat and embryo length in the 40 and 80 µg/mL groups, and somite pairs in the 80 µg/mL group were significantly reduced as compared to those of the control group. Some of embryos in the 80 µg/mL group were whitened, suggesting protein denaturation. Exposure to QUAT at 40 µg/mL or more *in vitro* resulted in retarded growth or death of embryos of ICR mice.

Keywords: sanitizer, mouse, embryo, QUAT, arrested development, lethal toxicity

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