

塩化ベンザルコニウム投与の妊娠マウスに及ぼす影響

門馬純子・高田幸一・会田喜崇・高木篤也・吉本浜子
鈴木康雄・中路幸男・黒川雄二・戸部満寿夫

Effects of Benzalkonium Chloride on Pregnant Mice

Junko MOMMA, Koichi TAKADA, Yoshitaka AIDA, Atsuya TAKAGI, Hamako YOSHIMOTO,
Yasuo SUZUKI, Yukio NAKAJI, Yuji KUROKAWA and Masuo TOBE

Benzalkonium chloride (BK-Cl), which is known as one of the cationic surfactants, was examined for its effects on both dams and fetuses of mice.

In the first experiment, relatively high doses of BK-Cl (3, 10 and 30 mg/kg) were given by gavage daily at an early stage of pregnancy (0-6 days). Animals were sacrificed on the 13th day. Significant changes were not found in body weight, food consumption and general appearance in dams. Also the number of implantations, number of live fetuses, sex ratio and body weight in fetuses were not significantly changed. However, there was a tendency toward a slight decrease in the pregnancy rate of dams in the groups treated with 10 and 30 mg/kg and a slight increase in the number of dead or resorbed fetuses in the group treated with 30 mg/kg.

In the second experiment, groups of animals were treated with BK-Cl at the lower doses (1, 50 and 100 μ g/kg) during pregnancy (0-6 days), while other groups were treated with 1 and 50 μ g/kg throughout the entire pregnant period (0-18 days). Significant changes were not observed in both treated groups when compared with controls for dams and fetuses.

These results indicate that BK-Cl can cause implantation disturbance and/or abortion at a relatively high dose (30 mg/kg) but that it has no effect on reproductive functions at lower dose levels (less than 100 μ g/kg).

(Received May 30, 1987)

緒言

界面活性剤は、洗剤を始め繊維、金属、皮革、医薬品、塗料、写真、食品、などに広く利用されており、その種類も少なくない。

我々は、殺菌、消毒剤として用いられている第4級アンモニウム塩の陽イオン界面活性剤（逆性石鹸）である Benzalkonium Chloride（塩化ベンザルコニウム；以下 BK-Cl と略す）の安全性を調べる目的で、マウスを用い、妊娠に及ぼす影響について検索した。

実験方法

1. 被験物質

BK-Cl は日本薬局方 50% 塩化ベンザルコニウム液（市販サニゾール C, KAO-ATLAS 社製, Lot. No. 1343）を使用した。投与に際し、精製水で設定濃度に希釈して投与した（1 μ g~30 mg/kg/20 ml/day）。構造式を Fig. 1 に示す。

2. 使用動物および飼育条件

動物は7週齢の ICR/JCL 系 SPF マウス（静岡実

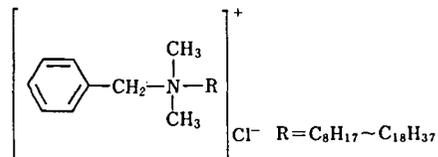


Fig. 1. Chemical structure of benzalkonium chloride

験動物農業協同組合）雌（27~29 g）および雄（30~32 g）を使用した。雌雄とも2週間の予備飼育を行った後実験に供した。

動物は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、午前5時から午後5時まで、12時間の人工照明下に制御された飼育室内で、マウス飼育用固型飼料（船橋農場製 MM-1）と水道水を自由に摂取させて飼育した。

3. 交配方法

妊娠母体を得るために8週齢の未経産雌と雄（2:1）を一夜（約16時間）同居させて交配し、翌朝腔栓形成の認められたものを妊娠母体とみなし、マウス用プラスチック製ケージにて個別飼育した。なお、この腔栓形成の認められた日を妊娠0日として起算した。

4. 統計処理

実験成績は母体を評価の単位として、母マウスの妊娠率には χ^2 検定¹⁾、母マウスの体重、摂餌量、着床数、生存胎仔数および生存胎仔体重は、等分散を Bartlett²⁾ の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析³⁾ を行い、等分散でない場合は、Kruskal-Wallis³⁾ の方法によって順位と検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は、例数が揃っている場合は Dunnett 型^{4,5)} で、不揃いの場合は Scheffé 型⁶⁾ で、それぞれ対照群と各処置群との有意差検定を行った。さらに、胎仔の死亡率（死亡吸収胚数）には順位和検定⁷⁾ を用いた。

実験 I. 高濃度における影響

妊娠初期投与の母体および胎仔に及ぼす影響

a. 薬物の投与濃度および投与方法

BK-Cl の投与濃度は、マウスでの経口 LD₅₀ 値が 340 mg/kg と報告⁸⁾ されていること、また、我々が行った予備実験で、50 mg/kg 投与群に死亡および不妊動物が認められたことなどを参考にし、LD₅₀ 値の 1/10 量を最高濃度とし、3、10 および 30 mg/kg の 3 用量とした。対照群には精製水を投与した。投与は 1 群 9～12 匹の妊娠マウスに対し、妊娠 0 日から 6 日目までの 7 日間、1 日 1 回胃ゾンデを用いて強制経口投与を行った。

b. 観察ならびに検査項目

母体については、各群とも妊娠 13 日目まで毎日、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行った。また、各群の全妊娠母体は妊娠 13 日目にエーテル麻酔下で開腹し、主要臓器を肉眼的に観察した後、子宮を摘出し、重量を測定後直ちに切開して、着床数、生存胎仔数ならびに死亡吸収胚数とその状態を観察した。なお、生存胎仔については、個別に体重を測定し、さらに、外形異常の有無を調べた。

実験 II. 低濃度における影響

1. 妊娠初期投与の母体および胎仔に及ぼす影響

a. 薬物の投与濃度および投与方法

BK-Cl の投与濃度は、日本薬局方（第 10 改正）に掲載されていた最低適用濃度（0.0025～0.005%）を参考にし、0、1、50 および 100 μ g/kg とした。対照群には精製水を投与した。投与方法および投与期間については、実験 I の a と同様に行った。なお、1 群 5～7 匹の妊娠マウスを用いた。

b. 観察ならびに検査項目

母体の観察および胎仔の観察については実験 I の b

と同様に行った。

2. 妊娠全期間投与の母体および胎仔に及ぼす影響

a. 薬物の投与濃度および投与方法

BK-Cl の投与濃度は、0、1 および 50 μ g/kg とし、対照群には精製水を投与した。投与方法は、実験 I の a と同様に行った。なお、投与は各群 20 匹の妊娠マウスに対し、妊娠 0 日から 18 日目までの妊娠全期間にわたって行った。

b. 観察ならびに検査項目

母体については、各群とも妊娠全期間を通して、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行った。また、各群の全妊娠母体は分娩予定日の前日（妊娠 18 日目）にエーテル麻酔下で開腹し、主要臓器および胎仔の観察を実験 I の b（性別の判定が加わる）と同様に行った。

実験結果

実験 I. 高濃度における影響

妊娠初期投与の母体および胎仔に及ぼす影響

1. 母体に及ぼす影響

a. 一般状態ならびに死亡

対照群および各処置群とも一般状態に著変は認められず、また、死亡例も認められなかった。

b. 体重の推移

Fig. 2 に各群の母体平均体重の推移を示した。各処置群においても対照群同様、順調な体重増加を示し、各群間に差は認められなかった。

c. 摂餌量の推移

対照群および各処置群とも 5～8 g の摂餌量を示し、差は認められなかった。

d. 妊娠率

Table 1 に示すように、膣栓 (plug) が認められたマウスで、その後妊娠を確認できた母体は、対照群では 91.7%、3 mg/kg 群では 100% であった。一方、10 mg/kg 群では 70.0%、30 mg/kg 群では 60.0% と

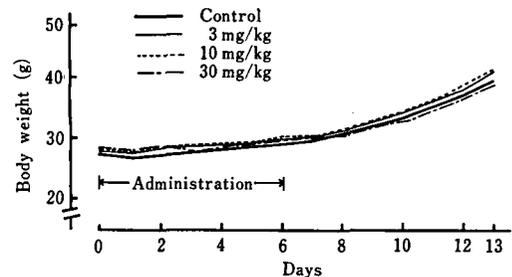


Fig. 2. Effects of benzalkonium chloride on body weight of pregnant mice

Table 1. Effects of benzalkonium chloride at high doses on the fetuses and dams of pregnant mice

Dose (mg/kg)	0	3	10	30
No. of females with vaginal plug	12	9	10	10
No. of dams confirmed implantation (rates of pregnancy)	11 (91.7)	9 (100)	7 (70.0)	6 (60.0)
No. of implantations (mean±S.D)	152 (13.82±1.66)	125 (13.89±2.32)	106 (15.14±1.68)	87 (14.50±1.97)
No. of live fetuses (mean±S.D)	136 (12.36±2.01)	119 (13.22±2.59)	100 (14.29±2.29)	72 (12.00±5.29)
Body weight of fetuses (mean±S.D) (mg)	(156.4±16.3)	(156.7±15.0)	(177.1±46.8)	(183.3±67.7)
No. of dead or resorbed fetuses (%)*	16 (10.5)	6(4.8)	6(5.7)	15 (17.2)
early death	15	5	6	14
late death	1	1	0	1

*: (%) indicates the ratio to total implantations.

減少を示したがいずれも統計学的に有意の差を認めなかった。

e. 剖検所見および子宮重量

各群において主要臓器に異常は認められなかった。また、胎子を含む子宮重量にも差を認めなかった。

2. 胎子に及ぼす影響

Table 1 に示すように、着床数および生存胎子数については、対照群と各処置群との間に有意な差を認めなかったが、生存胎子平均体重では 10 および 30 mg/kg 群においてむしろ増加傾向を示した。また、死亡吸収胚数については 30 mg/kg 群で増加傾向がみられたが、対照群と比較して有意な差は認められなかった。なお、外形異常はいずれの群にも全く認められなかった。

実験 II. 低濃度における影響

II-1. 妊娠初期投与の母体および胎子に及ぼす影響

1. 母体に及ぼす影響

a. 一般状態ならびに死亡

対照群および処置群とも一般状態に著変は認められず、また、死亡例も認められなかった。

b. 体重の推移

Fig. 3 に各群の母体平均体重の推移を示した。各処置群においても、対照群同様、順調な体重増加を示し、各群間に差は認められなかった。

c. 摂餌量の推移

対照群および各処置群とも 5~8g の摂餌量を示し、差は認められなかった。

d. 妊娠率

Table 2 に示すように、妊娠を確認できた母体は、

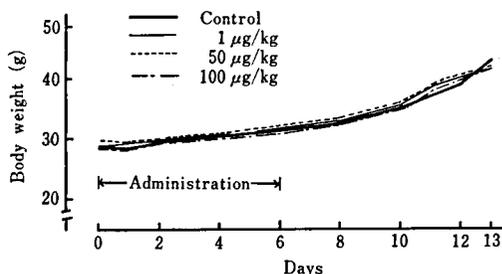


Fig. 3. Effects of benzalkonium chloride on body weight of pregnant mice

対照群で 71.4%，1 および 100 µg/kg 群で 80.0%，50 µg/kg 群では 100% であり、対照群と各処置群との間に有意差は認められなかった。

e. 剖検所見および子宮重量

各群において主要臓器に異常を認めなかった。また、胎子を含む子宮重量においても差を認めなかった。

2. 胎子に及ぼす影響

Table 2 に示すように、着床数、生存胎子数、生存胎子平均体重および死亡吸収胚数は対照群と各処置群との間に有意な差を認めなかった。また、外形異常も認められなかった。

II-2. 妊娠全期間投与による母体および胎子に及ぼす影響

1. 母体に及ぼす影響

a. 一般状態ならびに死亡

対照群および処置群とも一般状態に著変は認められず、また、死亡例も認められなかった。

b. 体重の推移

Fig. 4 に各群の母体平均体重の推移を示したが、各

Table 2. Effects of benzalkonium chloride at low doses on the fetuses and dams of pregnant mice

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	1	50	100
No. of females with vaginal plug	7	5	5	5
No. of dams confirmed implantation (rates of pregnancy)	5 (71.4)	4 (80.0)	5 (100)	4 (80.0)
No. of implantations (mean \pm S.D)	72 (14.40 \pm 3.13)	63 (15.75 \pm 2.06)	79 (15.80 \pm 1.48)	60 (15.00 \pm 1.41)
No. of live fetuses (mean \pm S.D)	66 (13.20 \pm 3.27)	56 (14.00 \pm 2.45)	75 (15.00 \pm 3.02)	55 (13.75 \pm 1.26)
Body weight of fetuses (mean \pm S.D) (mg)	(161.2 \pm 9.31)	(155.3 \pm 10.8)	(163.0 \pm 12.0)	(169.0 \pm 18.4)
No. of dead or resorbed fetuses (%)	6 (8.3)	7 (11.1)	4 (5.1)	5 (8.3)
early death	5	7	4	3
late death	1	0	0	2

*: (%) indicates the ratio to total implantations.

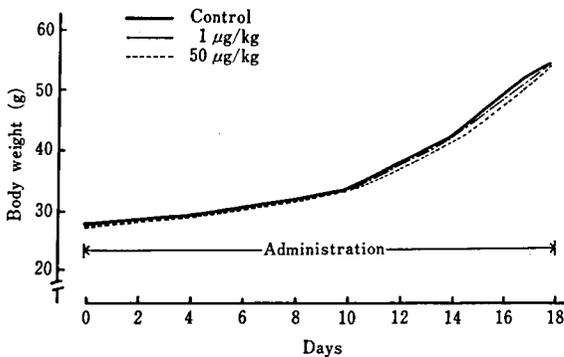


Fig. 4. Effects of benzalkonium chloride on body weight of pregnant mice

処置群は対照群と同様な体重増加を示し、各群間に差は認められなかった。

c. 摂餌量の推移

対照群および各処置群とも 5~8g の摂餌量を示し、差は認められなかった。

d. 妊娠率

Table 3 に示すように、対照群85.0%に対し、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では75.0%と減少がみられたが、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では90.0%であり、各処置群と対照群との間に有意の差は認められなかった。

e. 剖検所見および子宮重量

各群において主要臓器に異常を認めなかった。また、胎子を含む子宮重量においても差を認めなかった。

2. 胎子に及ぼす影響

Table 3 に示すとおり、着床数、生存胎子数、生存胎子体重および死亡吸収胚数は各処置群とも対照群との間に差は認められなかった。なお、外形異常として、

対照群および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群に眼瞼開離が各々 1 例ずつに認められたがその出現率は我々の研究室におけるバックグラウンドデータの範囲内であった。

考 察

BK-Cl の毒性に関しては、急性毒性、亜急性毒性ならびに慢性毒性について多くの報告がみられるが、生殖機能に対する毒性についての報告は見当たらない。BK-Cl の経口急性毒性は、LD₅₀ 値がマウスでは 340 mg/kg⁸⁾、ラットでは 400 mg/kg⁹⁾ とされている。いずれの動物においても急性および亜急性毒性の一般状態として摂餌量の低下、下痢などがみられており、また、死亡動物の剖検所見においては、胃や腸の粘膜に対し刺激性が認められている。ラットの慢性毒性においても同様に胃、腸粘膜に対し刺激性を現わすが、0.25%以下の量では体重減少や胃腸障害は認められないとの報告がある¹⁰⁾。

今回実施した BK-Cl の高濃度における影響の実験では、LD₅₀ 値の 1/10 量を最高濃度とし、各々、3、10 および 30 mg/kg を設定した。なお、50 および 100 mg/kg を妊娠マウスに投与した我々の予備実験で、50 mg/kg の投与では 3 匹中 1 例、100 mg/kg 投与では 3 匹中 2 例が死亡し、さらに、残りの動物では腔栓が認められたにもかかわらず、子宮内に胎子および付属物の痕跡もなく、また、子宮壁に着床痕跡も認められなかった。

BK-Cl は消化管粘膜以外に対しても刺激性のあることが知られており、ウサギを用いた試験ではその閾値が皮下で 0.0833%、眼粘膜で 0.0208% と報告されている¹¹⁾。しかし、ヒトでは 0.01% でも障害があること

Table 3. Effects of benzalkonium chloride at low doses on the fetuses and dams of pregnant mice

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	1	50
No. of females with vaginal plug	20	20	20
No. of dams confirmed implantation (rates of pregnancy)	17 (85.0)	15 (75.0)	18 (90.0)
No. of implantations (mean \pm S.D)	226 (13.29 \pm 3.62)	215 (14.33 \pm 2.16)	236 (13.11 \pm 3.14)
No. of live fetuses (mean \pm S.D)	207 (12.18 \pm 4.03)	189 (12.60 \pm 2.38)	214 (11.89 \pm 3.03)
Sex ratio (male/female)	96/111	95/94	113/101
Body weight of fetuses (mean \pm S.D) (g)	(1.40 \pm 0.09)	(1.39 \pm 0.10)	(1.38 \pm 0.12)
No. of dead or resorbed fetuses (%) early death late death	19 (8.4) 13 6	26 (12.1) 15 11	22 (9.3) 12 10
No. of fetuses with malformation (%)	** a) 1 (0.5)	0	a) 1 (0.5)

*: (%) indicates the ratio to total implantations.
 **: (%) indicates the ratio to total live fetuses.
 a): open eyelids

が報告されている¹²⁾。日本薬局方によれば腔、膀胱および尿道の洗浄には0.0025~0.005%液を使用するとして掲載されている¹³⁾。本実験における低濃度の影響の評価に際しては、ヒトに暴露される時のリスクアセスメントの立場から、臨床での使用経験を参考にし、1, 50 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を設定したが、これらは各々0.00001%, 0.0005%, 0.001%に相当する。

種々の界面活性剤投与による着床阻害および流産に関する報告はいくつかかなされている。野村らは¹⁴⁾、2%および20%のナトリウムアルキルサルフェートを妊娠2日目から18日目まで毎日背部皮膚に塗布し、20%群で妊娠率の低下を認めている。また、20%塗布群を妊娠7日目に屠殺し、子宮内を観察した結果、着床痕は認められなかったとしている。しかし、同用量を妊娠13日目から18日目まで塗布した場合には、妊娠率の低下は認められていない。このことから妊娠初期に皮膚塗布すると着床阻害を起こす可能性が強いと報告している。また、西村ら¹⁵⁾も4, 20および40%の高級アルコールエステルサルフェート(AES)洗剤をマウスの妊娠0日目から18日目まで、あるいは、妊娠8日目から15日目まで背部皮膚に塗布し、前者の40%群に着床阻害を認めたが、後者にはその作用がなかったことを報告している。これらの報告でわかるように、界面活性剤の妊娠に対する影響は、妊娠初期における薬物の動態に問題があると思われる。今回の実験においては、このような観点から妊娠初期での投与を必須とし

て実験を行った。また、低濃度での影響をみる実験では、ヒトへのリスクアセスメントを考慮し、これに加え妊娠全期間にわたる投与を追加した。

今回実施した妊娠初期および全期間投与実験で、腔栓を認めたにもかかわらず妊娠しない。いわゆる不妊動物が対照群を含む各群に数例ずつ認められた。妊娠率においては、いずれの実験でも対照群と各処置群との間に有意の差は認められなかったが、高濃度における実験で、対照群の91.7%に対し、10 mg/kg 群で70.0%、30 mg/kg 群では60.0%と高用量になるにつれて減少傾向を示した。また、30 mg/kg 群では、死亡吸収胚数の増加傾向が認められた。妊娠率の低下および死亡吸収胚数の増加傾向の理由として、全く受胎しなかったのか、あるいは強制経口投与などによる物理的影響なのか、または、BK-Clによる子宮粘膜での胚の着床阻害によるものなのか明らかではなかった。Palmer ら¹⁶⁾は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)およびアルコール硫酸塩(AS)を、ラットおよびマウスでは妊娠6日目~15日目まで、また、ウサギでは妊娠6日目~18日目まで、それぞれの動物の器官形成期に強制経口投与したところ、マウスでは、LASを300および600 mg/kg 投与した群にそれぞれ妊娠母体の死亡や流産(または全吸収胚)が認められたと報告している。また、野村ら¹⁴⁾も20%のナトリウムアルキルサルフェートをマウスの妊娠初期に皮膚塗布した結果、明らかな着床阻害を認めたことを報告し

ている。さらに、Isomaaら¹⁷⁾は10.5および35.0 mg/kgの陽イオン系界面活性剤 (CTAB) をマウスに8日目から14日目まで隔日に腹腔内に投与し、35 mg/kg 群で吸収胚数の増加を認めたと報告している。以上のことから、今回の我々の実験成績にみられた妊娠率の低下および死亡吸収胚数の増加傾向は、妊娠初期にBK-Clを大量投与した結果、着床阻害および流産を引き起こした可能性を示唆するものと思われるが、その発現機序については被験物質のもつ非特異的な刺激作用が関与している可能性も考慮すべきものと思われる。

ま と め

陽イオン系界面活性剤の1つである塩化ベンザルコニウム (BK-Cl) の妊娠マウスの母体および胎仔に及ぼす影響について検索した。

実験Iでは、高濃度のBK-Clの、3, 10および30 mg/kgを妊娠初期0日目から6日目まで毎日1回強制経口投与し、妊娠13日目に屠殺した。その結果、母体の体重、摂餌量および一般状態に影響は認められなかった。また、着床数、生存胎仔数、性比および生存胎仔体重にも変化は認められなかった。しかしながら、10および30 mg/kg 処置群では妊娠率の低下傾向が、また、30 mg/kg 処置群では死亡吸収胚の増加傾向がみられた。実験IIは2つの実験群よりなり、1つの群には低濃度のBK-Clの1, 50および100 μ g/kgを妊娠0日目から6日目までの妊娠初期に投与した。また、もう1つの群には1および50 μ g/kgを妊娠0日目から18日目までの妊娠全期間にわたり投与した。いずれの実験群でも対照群と各処置群との間に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、BK-Clは高濃度の30 mg/kg群において着床阻害あるいは流産を引き起こす可能性が示

唆されたものの、100 μ g/kg以下の低濃度においては、生殖機能に対して何ら影響を及ぼさないものと考えられた。

文 献

- 1) 佐久間昭：生物検定，p. 234 (1975)，東大出版
- 2) 畑村又好ら：統計的方法，p. 282 (1980)，岩波書店
- 3) W. H. Kraskal, W. A. Wallis: *J. Am. Statist. Assoc.*, **47**, 583 (1952)
- 4) C. W. Dunnett: *J. Am. Statist. Assoc.*, **50**, 1096 (1955)
- 5) C. W. Dunnett: *Biometrics*, **20**, 482 (1964)
- 6) H. Scheffé: *Biometrics*, **40**, 87 (1964)
- 7) 佐久間昭：簡便統計手法，p. 5 (1965)，日本レダリー
- 8) H. E. Cristensen: "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances," (1976), NIOSH, USA
- 9) L. M. Cummins, E. T. Kimura: *Toxicol. Appl. Pharm.*, **20**, 89 (1971)
- 10) B. V. Alfredson *et al.*: *J. Am. Pharm. Ass.*, **40**, 263 (1951)
- 11) L. J. Casarett, Doull *et al.*: "Casarett and Doull's Toxicology," 2nd ed., p. 539 (1980), Macmillan Publishing Co., Inc., New York
- 12) R. H. Riddell: "Pathology of Drug-induced and Toxic Diseases". p. 403 (1982), Churchill Livingstone Inc., New York
- 13) 朝比奈正人ら：“第10改正 日本薬局方解説書”，P. C-347 (1981)，広川書店
- 14) 野村大成：厚生省食品化学レポートシリーズ，**7**, 48 (1981)
- 15) 西村秀雄ら：合成洗剤に関する研究成果報告書 (科学技術庁研究調整局)，p. 114 (1978)
- 16) A. K. Palmer *et al.*: *Toxicology*, **3**, 91 (1975)
- 17) B. Isomaa, K. Ekman: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **13**, 331 (1975)