

# Chronic Effects of Methacrylamide – 12 Month Study of Administration in Drinking Water to Rats and Mice –

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8480">http://hdl.handle.net/2297/8480</a>

# メタクリルアミドの慢性毒性

## —ラットおよびマウスの飲水による12ヶ月投与研究—

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

荒谷 稜 治

化学工業界で今後使用量の増大が予想されるメタクリルアミドの、慢性毒性に関する基礎的知見を得るため、Wistar 系ラットおよび ddY 系マウスに、0, 200, 400, 800 および 1,200ppm の濃度で飲水に溶解したメタクリルアミドを 4, 8, および12ヶ月間投与し、その生体影響をしらべた。12ヶ月投与後一部の動物は、最高12ヶ月飼育を続けて観察をおこなった。水および餌の摂取量は、全投与期間を通じて対照群と投与群の間に有意差はなかった。1,200ppm 投与ラットの体重増加は対照群と比べ抑制傾向が見られた、マウスでは 800 および 1,200ppm で有意な体重増加の抑制があった。ラットの 1,200ppm 群ならびにマウスの 800ppm および 1,200ppm 群で後肢麻痺、異常歩行などの末梢神経障害症状が発現した。ロータロッド法による歩行能検査で、ラット、マウスともに 800ppm と 1,200ppm 群に有意な歩行能の低下が見られた。血液像はすべての群で異常がなかった。ラットでの12ヶ月投与後の血液生化学的検査では、総コレステロール、磷脂質、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性の、用量依存性の増加があり、前二者は統計学的に有意であった。ラットの12ヶ月投与後の尿生化学検査値には、すべての群で異常がなかった。マウスで高率の、しかし用量非依存性の肺腫瘍の発生があり、組織学的には肺胞 II 型上皮細胞性腺腫であった。ラット、マウスともに 800ppm 以上投与群で、膀胱の異常拡大が見られた。12ヶ月の投与群終了後はとくにラットで下半身の汚染と神経症状の進行が観察された。臓器の絶対乃至体重相対重量はいずれの投与群にも変化はなかった。以上の諸知見について中毒学的考察を加えた。

**Key words** methacrylamide, chronic toxicity, neurotoxicity, rats, mice

メタクリルアミド  $[\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2]$  は、アクリルアミドの類似化合物の一つで、水溶性の重合物や共重合物の製造原料として化学工業界での利用が拡大しつつある<sup>1)</sup>。類似化合物のアクリルアミドについては、人間および各種の実験動物における神経障害性がよく知られている<sup>2-4)</sup>。またその誘導体の一部にも神経毒性を示すものがあり<sup>5)</sup>、メタクリルアミドに関しては、すでにマウス<sup>6)</sup>、ラット<sup>7)</sup>、ウサギ<sup>8)</sup>に対する亜急性の神経毒性の研究がある。特にマウスでは<sup>9)</sup>、ロータロッド法<sup>9)</sup>を用いた測定で、アクリルアミドと比較して約1/5の強度の神経障害性が報告されている。また、メタクリルアミドについては、神経毒性以外に、本物質を取り扱う産業現場の衛生管理の観点から、経皮吸収性<sup>10)</sup>に関して、 $^{14}\text{C}$  標識化合物による、マウス、ラットおよびウサギでの研究があり、その水溶液の速やかな吸収性が認められている。メタクリルアミドの変異原性については、サルモネラを用いた研究で<sup>11)</sup>、原化合物には変異原性はないが、この物質の生体内代謝物の一つと想定されているグリンドメタクリルアミドについて陽性の成績が得られている。

メタクリルアミドの使用量の増加にともない、その慢性生体影響に関する情報の必要性が高まっている。類似化合物アクリルアミドの慢性毒性については、すでに多くの研究があるが<sup>12)</sup>、メタクリルアミドについては現在までマウスにおける亜急性投与時の肺腺腫形成<sup>13)14)</sup>、および生殖毒性<sup>15)</sup>以外の情報は得られていない。

今回、メタクリルアミドの慢性生体影響を評価する目的

で、雄性ラットおよびマウスを用いて、飲水に本物質を溶解して最長12ヶ月投与し、水および餌の摂取量、体重、症状、血液像などを経時観測した。一部の動物については12ヶ月投与後も飼育を続け、観察を最長12ヶ月間おこなった。以上の諸成績について報告する。

### 材料および方法

#### I. 試薬類

メタクリルアミドはイーストマン・コダック (Newhaven, USA) 製を用いた。本製品の純度は、ガスクロマトグラフ・日立モデル163 (日立, 東京) による検定で 99% 以上であった。この際 10% ポリエチレングリコール 20M カラムおよび水素炎イオン化検出器を用いた。グルタルアルデヒドは半井化学 (京都)、パラフォルムアルデヒドは和光純薬 (大阪)、その他の試薬類はすべて試薬特級品を用いた。

#### II. 動物および処置

雄性の Wistar 系ラット (実験開始時 5 週齢, 体重平均値  $120 \pm 6\text{g}$ ) および雌性 ddY マウス (実験開始時 5 週齢, 体重平均値  $23.6 \pm 1.3\text{g}$ ) を SLC (静岡) より購入した。これらをラットではプラスチックケージ (40×23×18cm) 1 個あたり 2 匹、マウスでは同ケージ (29×19×14cm) 1 個あたり 5 匹ずつを入れて、室温  $22 \pm 20^\circ\text{C}$ 、相対湿度 60~70% の動物実験室で飼育した。床敷にはホワイト・フレック (日本チャールズリーバー, 神奈川) を用い、これを週 2 回交換した。メタクリルアミドを水道

平成 5 年 9 月 28 日受付, 平成 5 年 10 月 29 日受理

Abbreviations:  $\gamma$ -GTP,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; ID<sub>50</sub>, 50% inhibition dose

水に 0, 200, 400, 800 および 1,200ppm の濃度 (W/V) で溶解し、これを自由にとらせた。この液は週 2 回新しく調整して交換した。餌はオリエンタル MF (オリエンタル酵母, 東京) を自由にとらせた。各投与濃度当りの動物数は 18~22 匹とした。投与開始後 4, 8 および 12 ヶ月後、各投与群の 4 匹から血液を採取したのち、各臓器の肉眼的観察、全身灌流をおこなった上、組織学的検査のための試料を採集した。血液および尿の生化学的検査は 12 ヶ月解剖群についてのみおこなった。12 ヶ月の投与終了後、1 群 6 乃至 10 匹の動物の飼育を続け、一般状態および神経症状の観察を、最長 12 ヶ月までおこなった。

### III. 体重、飲水量および餌摂取量の測定

体重はすべての動物について毎週 1 回、飲水量および餌摂取量は各飼育ケージ毎に毎週 1 回測定した。

### IV. 動物の観察

すべての動物について、日曜日を除く毎日、一般症状および神経障害発生状況を肉眼観察した。

### V. ロータロッド法による歩行能の観察

既報<sup>9)</sup>のロータロッド法を用い、各濃度投与群から予備実験によってラットでは 6 匹、マウスでは 10 匹を選んで、歩行能を投与開始後 8 ヶ月まで観察した。ロータロッドは金沢大学医学部工作係の製作により、動物の歩行時間の測定を自動化したものを使用した。観察回数は投与開始直後 3 週間は週 2 回、その後は週 1 回とした。対照群の歩行能に対して 50% の阻害を示すまでのメタクリルアミド摂取量 (50% inhibition dose, ID<sub>50</sub>) を、飲水量とその中のメタクリルアミドの濃度から推定した。

### VI. 試料採集

血液試料は、動物を解剖予定前日の夕刻より絶食させ、翌朝にネブタール麻酔下にヘパリン処理注射器で右心房より採取した。主要臓器の肉眼的観察をおこなった後、直ちに左心室より 4% パラホルムアルデヒド、続いて 5% グルタルアルデヒドで全身灌流固定をおこなった。灌流量はラットでは各 200ml、マウスでは各 20ml を用い、液圧は約 110mmHg とした。灌流終了後主要臓器を摘出し、重量測定後 10% 磷酸緩衝ホルマリン液中に保存し、次の組織学的検査に備えた。ラットの 12 ヶ月投与群では、投与終了前 3 日間、動物を糞、尿の分離採集可能な代謝ケージ KN-649 (夏目, 東京) に移して採尿した。

### VII. 血液像、血液および尿の生化学的検査

赤、白血球数、赤血球容積、ヘモグロビン濃度は通常の手順で計測した。血液生化学値は自動分析器を用い、尿の生化学値は尿検査用テスト紙 (マルチスティクス, エームズ三共, 東京) を用いて検査した。

### VIII. 組織学的見

ラットおよびマウスの対照群および投与群すべてについて、

解剖後臓器を前述の全身灌流法で固定し、常法に従ってパラフィン包埋後 5~6 $\mu$ m の切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色をおこない光顕観察した。坐骨神経については、既報<sup>7)</sup>の方法で 1 $\mu$ m のエポキシレジン切片を作成し、1% トルイジン染色をした。

### IX. 統計学的検定

得られたデータはすべて平均値士標準偏差で示した。多群間の平均値の差の検定は、一元配置分散分析後 Dunnett の多重比較法<sup>10)</sup>によった。P<0.05 を有意とした。2 群間の率の差の検定には Fisher の直接確率計算方法を用いた。

## 成 績

### I. 水、餌およびメタクリルアミド摂取量

メタクリルアミド投与開始後約 10 週間、単位体重当りの水および餌の摂取量は、徐々に減少した。この期間を過ぎると、摂取量はともに安定し、対照群および投与群に関係なく、水の一匹当りの一日摂取量はラットの総平均値が 14 $\pm$ 2g、マウスでは 5.7 $\pm$ 1.3g、餌の一匹当り 1 日摂取量はラットで 9.8 $\pm$ 2g、マウスで 4.0 $\pm$ 1.1g であった。各濃度群間では、時折摂取量に統計学的有意差の見られる時期があったが、いずれも散発的であった。表 1 には各濃度群における単位体重当りメタクリルアミドの 1 日推定摂取量を示した。ラット、マウスともに、いずれの濃度群についても、最初 3 ヶ月の成長期間中は、その後の 4 ヶ月から 12 ヶ月までの期間にくらべて推定摂取量が多かった。

### II. 体 重

図 1a, b には、実験期間中のラットおよびマウスの体重変化を示した。ラットでは 800ppm 群で、体重増加が他群と比べて抑制される傾向が見られたが、統計学的に有意ではなかった。マウスでは、800ppm 群で約 16 週目以後に、1,200ppm 群では約 6 週目以後に、対照群と比べて有意な体重増加の抑制が見られた。

### III. 一般症状

ラットでは、1,200ppm 群の一部のみに 15 週以後で軽度の後肢麻痺が見られたが、その後 12 ヶ月まで特に症状の増悪は認めなかった。しかし、12 ヶ月間の投与終了後の観察で、800 および 1,200ppm 群の各 2 匹に、後肢麻痺によるひきずり、全身活動性の低下、尿失禁による下半身の汚染などの症状の悪化が観察された。

マウスでは、400ppm 群で 2 匹に 45 週目頃に軽度の後肢麻痺が見られた。800ppm 群では 16 週目頃から異常な鳴き声を発しはじめ、30 週目から後肢麻痺が出現した。1,200ppm 群では、2 週目頃から異常な鳴き声が聞かれ、10 週以後には後肢麻痺が

Table 1. Estimated methacrylamide intake by drinking water per unit body weight per day

Methacrylamide concentration (ppm)	Methacrylamide intake (mg/kg/day)			
	Rat		Mouse	
	Beignning 3 months	4-12 months	Beignning 3 months	4-12 months
200	2.8 $\pm$ 1.0 <sup>a)</sup>	1.2 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 1.3	3.3 $\pm$ 1.4
400	5.0 $\pm$ 1.6	2.3 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 3.7	6.1 $\pm$ 2.1
800	9.6 $\pm$ 3.0	4.6 $\pm$ 1.0	17.5 $\pm$ 4.9	9.5 $\pm$ 4.6
1200	15.2 $\pm$ 4.4	7.1 $\pm$ 1.6	20.2 $\pm$ 6.2	19.3 $\pm$ 9.8

<sup>a)</sup> Mean $\pm$ SD. Number of animals in each group was from 18 to 20.

出現した。その後下半身の汚染も出現した。

#### IV. 回転円筒上での歩行能

図 2a, b にラットおよびマウスのロータロッド法による歩行能検査の成績を示す。ラットでは 800ppm 群で約 4 ヶ月目、1,200ppm 群で 3 ヶ月目に、正常群の歩行能に対する 50% の障害が観察され、マウスでは 800ppm 群で 5 ヶ月目に、1,200ppm 群で 3 ヶ週目に同様の現象が観察された。ロータロッド法による観察はすべての群で 8 ヶ月目に終了した。上記各群におけるメタクリルアミド ID<sub>50</sub> の推定値と投与開始以後の期間を示した (表 2)。ラットでは両濃度群間の ID<sub>50</sub> に大差はなかったが、マウスでは 1,200ppm 群が 800ppm 群にくらべて約 30% の小さい値となった。

#### V. 血液像

ラット、マウス各投与群の投与開始後 4, 8, 12 ヶ月後の血液像には対照群と比べて異常は検出されなかった。

#### VI. 血液生化学値

表 3 にラットでメタクリルアミド投与 12 ヶ月後の、血液生化学検査の一部を示す。24 種類の測定項目のうち、血清総コレステロール、磷脂質、 $\gamma$ -グルタミールトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GTP) が投与濃度依存性の上昇を示し、その上昇は前 2 項目については統計学的に有意であった。

ラットでメタクリルアミド投与 12 ヶ月後の尿の生化学的検査

Table 2. Half maximum inhibition dose (ID<sub>50</sub>) of methacrylamide for rotarod performance

Methacrylamide concentration (ppm)	ID <sub>50</sub> (mg/kg b.w.)	
	Rat	Mouse
800	936 (4) <sup>a)</sup>	1447 (5)
1200	1106 (3)	374 (3 weeks)

<sup>a)</sup> Approximate months when the half maximum inhibition was seen.

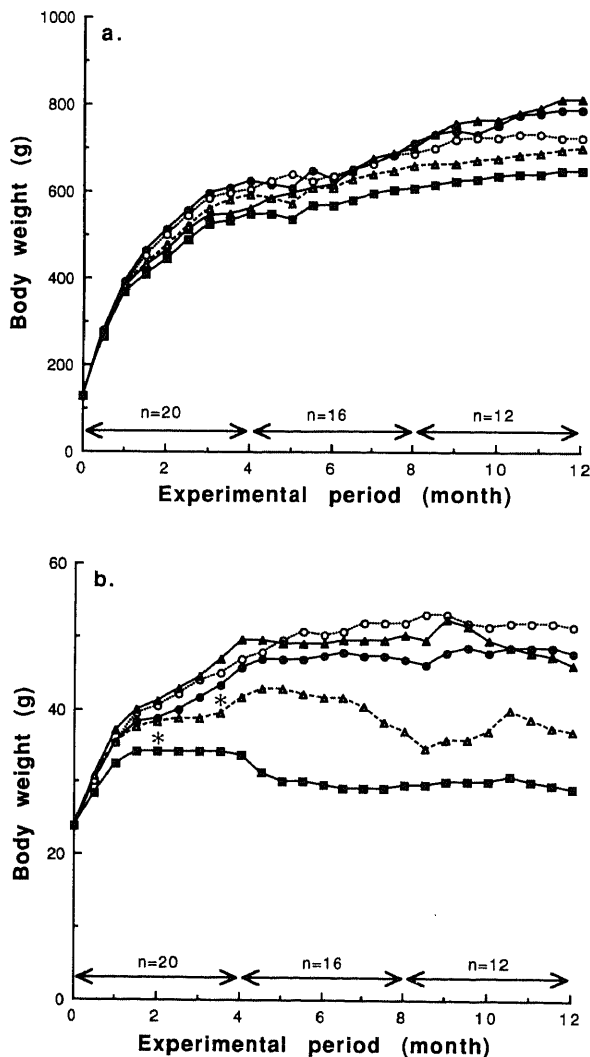


Fig. 1. Body weight after treatment with methacrylamide in rats (a) and mice (b). n, number of animals. —●—, control; ---○---, 200 ppm; —▲—, 400 ppm; ---△---, 800 ppm; —■—, 1200 ppm. \* $P < 0.05$  vs. control by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure. —n—, time period and the number of animals used.

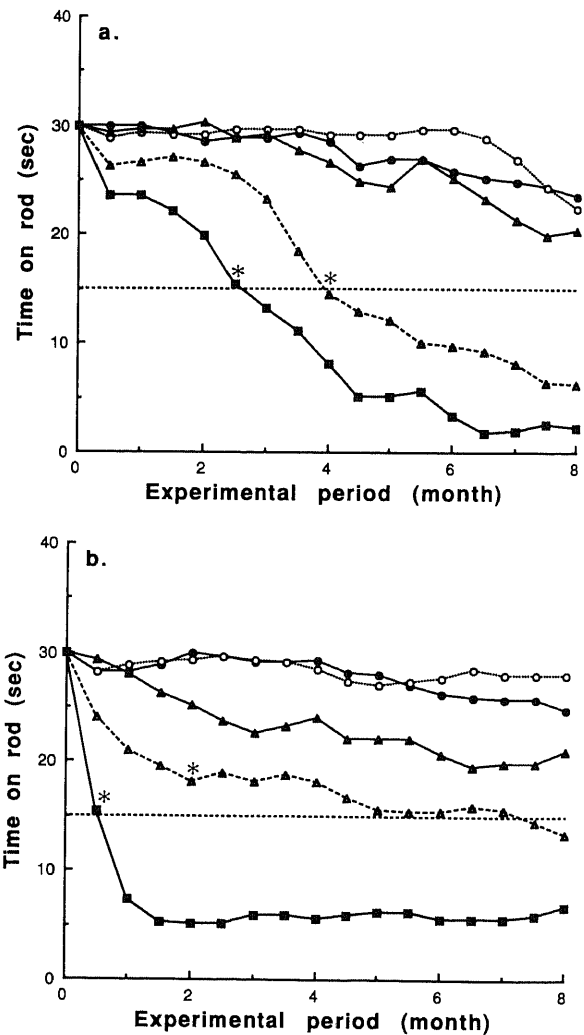


Fig. 2. Rotarod performance after treatment with methacrylamide in rats (a) and mice (b). Number of animals is 6 for each group. —●—, control; ---○---, 200 ppm; —▲—, 400 ppm; ---△---, 800 ppm; —■—, 1200 ppm. -----, level of the half maximum inhibition. \* $P < 0.05$  vs. control by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure.

をおこなったが、いずれの項目にも対照群との差は検出されなかった。

#### Ⅶ. 臓器の肉眼的変化

##### 1. ラット

12ヶ月間の投与期間中には主要臓器に肉眼的変化は認められなかった。投与終了後の観察期間中に、800ppm の1匹、1,200ppm 群の3匹に膀胱の異常拡張が出現した。このほかの異常所見として、脳下垂体の肥大を呈するものがあったが、この所見は対照群のラットにも認められた。

##### 2. マウス

ラットと同様に12ヶ月以後の観察期に、800ppm および1,200ppm 群に各1匹ずつ、膀胱の異常拡張を呈するものがあった。肺では投与開始8ヶ月から小型の腫瘍の発生が認められた。腫瘍は一般に肺表面にやや隆起し、1肺当り1～4個、直径1～8mmの球状で輪郭は明瞭であった。各投与濃度当り12ヶ月間の総解剖数20匹中で、両肺を合わせて1個以上の腫瘍が発生した動物数は、それぞれ200ppm; 13, 400ppm; 12, 800ppm; 14, 1,200ppm; 13匹であり、用量-反応関係は明瞭でなかった。また対照群の1匹にも発生が見られた。

#### Ⅷ. 臓器重量

各投与群間で、絶対重量および体重相対重量の平均値間の一

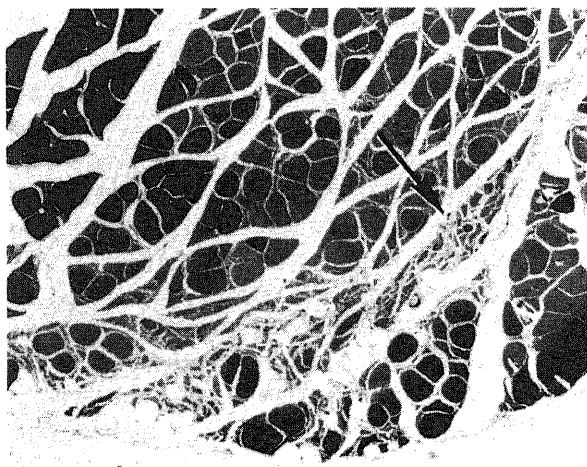


Fig. 3. Group atrophy of the rat gastrocnemius muscle after treatment with methacrylamide at 1200 ppm for 12 months. Reduction of a few muscle fibres or the type of group atrophy is seen (arrow). H-E stain.  $\times 50$ .

部に統計学的有意差を認めたものの、投与量および投与期間との用量-反応関係が一定ではなかった。

#### X. 組織学的変化

##### 1. ラット

##### 1) 神経系

大脳、小脳、脊髄にはどの投与群にも変化は検出されなかった。坐骨神経ではパラフィン包埋標本で800ppm以上、長期投与群に軽度の脱髄性変化が観察された。エポキシ樹脂包埋標本においても、800ppm以上のとくに長期投与群で坐骨神経末梢部に軽度の有髄線維の萎縮、脱髄が観察された。

##### 2) 筋

すべての高濃度のとくに長期投与群で、腓腹筋線維に束状の萎縮像が観察された。萎縮した筋では、一部に多核で細胞質に富む再生線維の存在も確認された。図3に束状萎縮の1例を示した。

##### 3) 甲状腺

1,200ppm, 12ヶ月投与群の2例にコロイド腺腫が認められた。

##### 4) 肝

800ppm以上の長期投与群の一部に肝細胞の巣状壊死が観察された。この部位の肝細胞は、萎縮、腫脹、壊死などを呈していた。しかし、炎症細胞の浸潤は認められなかった。

##### 2. マウス

##### 1) 神経系

大脳、小脳、脊髄には特記すべき変化は観察されなかった。坐骨神経では、400ppm以上の、とくに長期投与群で、エポキシ樹脂包埋標本に有髄線維の萎縮、脱落像が観察された。この変化は末梢部にとくに顕著であった(図4a, b)。

##### 2) 筋

ラットと同様にすべての濃度のとくに長期投与群で、腓腹筋に束状の萎縮像が認められた。

##### 3) 肺

肉眼で観察された腫瘍は肺胞Ⅱ型上皮細胞性腺腫の組織像を呈した。正常組織との境界は明瞭であるが、腺腫に接した周辺部の正常組織には一部圧迫像が認められた。

図5に腺腫の1例を示した。

##### 4) 肝

400ppm以上の長期投与群でラットと同様に壊死巣が認められたが、これは対照群の長期飼育群にも観察された。

##### 5) その他の組織

Table 3. Blood biochemistry after 12 month' dosing with methacrylamide in rats

Methacrylamide concentration (ppm)	Blood biochemistry <sup>a)</sup>		
	TCH (mg/dl)	PL (mg/dl)	$\gamma$ -GTP (IU/l)
0	55.3 $\pm$ 2.7 <sup>b)</sup>	171 $\pm$ 33.4	57.4 $\pm$ 14.6
200	83.6 $\pm$ 21.9	190 $\pm$ 44.5	77.5 $\pm$ 36.6
400	122 $\pm$ 47.7	261 $\pm$ 73.8	74.3 $\pm$ 15.9
800	134 $\pm$ 58.8	266 $\pm$ 63.4	78.1 $\pm$ 48.0
1200	208 $\pm$ 63.1*	378 $\pm$ 88.3*	109 $\pm$ 48.1

<sup>a)</sup> Out of 24 examined, 3 items which had dose-related changes are shown. <sup>b)</sup> Mean  $\pm$  SD. Number of animals is all 4. \* P < 0.05 by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison procedure. Abbreviations: TCH, total cholesterol; PL, phospholipid;  $\gamma$ -GTP,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.

他の組織には特記すべき変化は観察されなかった。

### 考 察

メタクリルアミドはアクリルアミド類似化合物の一つとして、今後合成化学工業などにおける使用の拡大が予測されている物質である<sup>1)</sup>。類似化合物であるアクリルアミドは水溶性ポリマーの原料として化学工業界で広く用いられているが<sup>17)</sup>、このポリマーの主な用途には、現在各種製紙過程における紙質の強化改質剤および工業廃水等の浄化のための凝集剤としての利用がある。メタクリルアミドも水溶性ポリマーの原料として有用で、上記に類似した用途のほか塗料のバインダー、繊維処理剤、皮革仕上剤その他広範囲な利用がある。

アクリルアミドの産業現場での使用はすでに約40年の歴史があり、この物質の急性および慢性毒性、取り扱い上の諸注意、その他産業衛生管理上の問題点については多くの知識が集積されている<sup>4)</sup>。一方、メタクリルアミドの生体影響についての知識はなお極めて少なく、産業衛生上の基礎となる情報、とくに長期暴露時の毒性に関する知見が必要とされている。

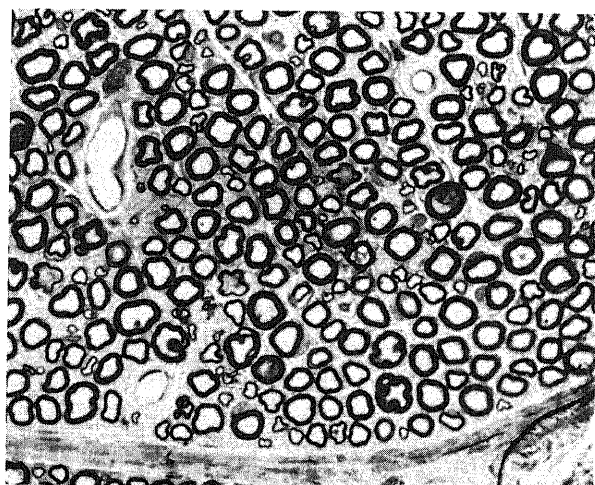
今回、本物質の慢性生体影響評価に関して、ラットおよびマ

ウスを用いた研究の結果、その一般毒性および神経障害性などについての用量-反応関係が一部明らかとなった。一般毒性の重要な指標の一つとして用いられる体重に対して、ラットでは飲水中 800ppm 投与群で、増加の抑制傾向が認められた。マウスでは 800ppm 以上で、対照群と比べて有意の抑制が観察された。単位体重当りの水と餌の摂取量は、各投与群間で、一部に統計学的有意差を示す時期があったが、いずれも一定の傾向がなく、中毒学的意義はないと考えられた。その他の一般症状としてラットの 1,200ppm 群で全身活動性の低下が観察された。

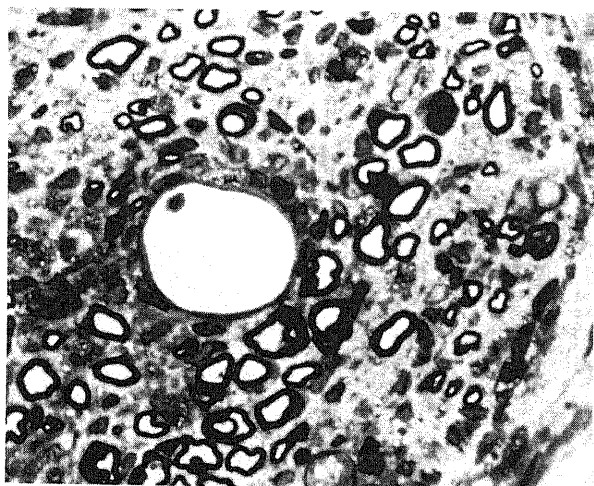
メタクリルアミドの繰り返し投与時における一般毒性については、George ら<sup>18)</sup>のラット母体に妊娠後 6~17日間、連日 0, 30, 60, 120 および 180mg/kg の経口投与を行った観察がある。この結果 120mg/kg 以上で軽度の体重抑制、肝体重比の増加などが認められている。この際の総投与量は約 1,200mg/kg であり、一方著者の今回の研究では、1,200ppm 投与群が、5ヶ月目頃から有意ではないが体重の抑制傾向が認められており、この間のメタクリルアミドの推定総摂取量は 2,500mg/kg に達している。この二つの結果の不一致は、投与方法の違いもあるが、前者が妊娠母体での観察のため、著者の用いた雌性ラットより多少感受性が高いことが考えられる。なお、George ら<sup>18)</sup>は 60mg/kg/日を妊娠母体に対する無作用量と報告しているが、著者の研究では 400ppm がラット、マウスともにこれに相当し、この間の総投与量も両研究間でほぼ同一レベルにあった。

神経学的障害作用の観測には、とくに後肢麻痺の定量法としてよく利用されるロータロッド法<sup>9)</sup>を用いた。この方法による歩行能の検査では、ラットの 800ppm および 1,200ppm 投与群で対照群と比べて有意の障害が検出された。対照群の歩行能に対して、50% 阻害に至るまでの期間は、800ppm で約 4ヶ月、1,200ppm で約 3ヶ月と 1,200ppm では 800ppm の約 70% に短縮されたが、 $ID_{50}$ は 936 および 1,106mg/kg と大差はなかった。ラットの場合、メタクリルアミドがおそらく神経組織のいずれかの部位に徐々に蓄積し、この蓄積量がほぼ一定の値に達したとき、歩行障害を発現させる可能性が考えられる。

一方、マウスでもラットと同様に 800ppm と 1,200ppm で有意の歩行能阻害が観察されたが、 $ID_{50}$ に至るまでの期間は



a



b

Fig. 4. Posterior tibial nerve above the ankle of the control mouse (a) and the methacrylamide-treated mouse (b) at 1200 ppm for 8 months. Shrinkage and loss of myelinated fibres, retraction of myelin and corrugated myelin sheaths are seen in the treated nerve. Toluidine blue stain.  $\times 40$ .

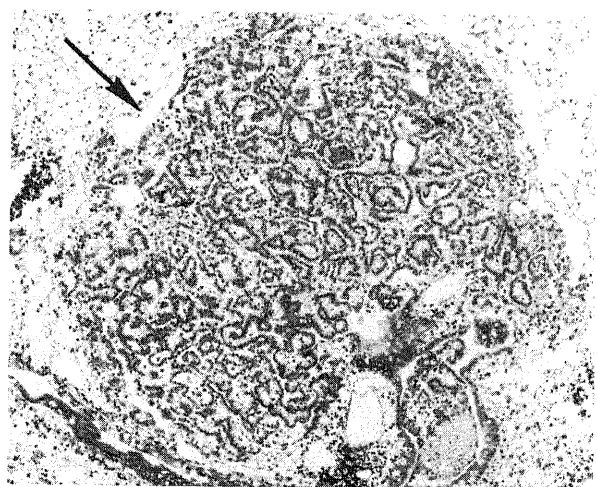


Fig. 5. Mouse lung after treatment with methacrylamide at 1200 ppm for 8 months. Well demarcated adenoma is seen (arrow). H-E stain.  $\times 50$ .

800ppm の約5ヶ月に対し、1,200ppm では約3週間と極めて短く、また  $ID_{50}$  は 800ppm で 1,447mg/kg であるに対して、1,200ppm では 374mg/kg で約1/3にすぎなかった。ラットとマウスでこのように歩行障害のおこり方の用量-反応関係が異なるのは、両動物のメタクリルアミドに対する感受性の差にもとづくものと考えられる。アクリルアミドについては、マウスがラットより感受性の高いことが報告されている<sup>3)</sup>。

ロータロッド法による観測は、投与開始後8ヶ月目で終了したが、歩行能の障害を示した投与群はとくにラットでは12ヶ月の投与終了後に後肢麻痺、後肢ひきずり、尿失禁による下半身の汚染などの神経症状が徐々に増悪する傾向が見られた。マウスの神経症状はラットより早期に出現し、またこれに先立って、異常な鳴き声を発しはじめたが、この鳴き声の中毒性学的意義については不明である。なお、これらのメタアクリルアミドに見られる神経障害は、類似化合物であるアクリルアミドのほかイソプロピルアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、ハイドロキシメチルアクリルアミドなどの誘導体にも同様に観察され<sup>6)</sup>、これらの物質には末梢神経障害をもたらす何らかの共通機構が存在するものと考えられる。

今回得られたラットにおけるメタクリルアミドの神経障害度の結果を、既報のアクリルアミドの長期繰り返し経口投与の成績<sup>8)</sup>と比較すると、後肢麻痺発症に要する日数、累積投与量いずれも、メタクリルアミドはアクリルアミドの約5倍となった。一方、マウスにおける亜急性投与時のロータロッドによる障害度の比較<sup>9)</sup>では、アクリルアミドを100としたときメタクリルアミドは約16で、障害度の比はラットの場合とほぼ同一である。このことから、今後メタクリルアミドも人間での神経毒性を考慮する場合、アクリルアミドの約1/5として大きな間違いはないと考えられる。

12ヶ月投与ラットの血液生化学的検査で、24の測定項目のうち、総コレステロールと磷脂質値が、用量依存的に有意に上昇した。γ-GTP も用量依存的に上昇したが有意ではなかった。これらの変化の意義については、現在不明であるが、後述のようにラット肝では組織学的検索により、高濃度投与群で巣状壊死像が観察されたこととの関連性も考えられ、今後の検索が必要である。

臓器重量については、ラット、マウスともに、各濃度投与間の平均値に有意差の見られるものもあったが、これらには一定の傾向がなく、中毒学的意義は少ないと考えられる。

組織学的変化として、特に明瞭に観察されたのは、ラットおよびマウスともに、800ppm 以上の特に長期投与群における坐骨神経および腓腸筋の変化であった。坐骨神経では末梢部優位の有髄神経線維の萎縮、脱髄像が観察された。これらの組織像はマウスについて、メタクリルアミドの亜急性投与で観察された変化<sup>7)</sup>とはほぼ類似している。腓腸筋では恐らく神経原性と考えられる筋線維の束状の萎縮が、800ppm 投与群において観察された。一方多核で細胞質に富む線維も混在し、これは筋線維の傷害と平衡して再生が進行していることを示唆した。

ラットでは肝に巣状壊死像が観察されたが、この変化と12ヶ月目の血液生化学的検査での、記述の3項目の異常との関連性についてはなお不明である。マウスについても同様の組織変化が見られたが、対照群にもこれが観察されたため、メタクリルアミド投与との関連性についてはなお、疑問が残る。

肺ではマウスのみ小腫瘍の発生があり、この組織像は既

報<sup>3)</sup>と同じく肺胞Ⅱ型上皮細胞由来の腺腫であった。マウス肺においては自然発生の腫瘍形成についての報告が Livingood<sup>10)</sup> 以来多くなされている<sup>20)~25)</sup>。この自然発生腫瘍の頻度はマウスの系統により差があり、最も高率とされるA系では70%にも及ぶが、C57BL系では1%にも達しない<sup>19)</sup>。

今回、メタクリルアミド慢性投与研究に用いた ddY 系マウスの肺腫瘍自然発生率については、資料不足のため明らかではないが、著者の今回の成績では、対照群で20匹中1匹であった。一方、200, 400, 800 および 1,200ppm 群ではそれぞれ13, 12, 17, 14, 13匹であり、いずれも対照群より有意に高率ではあったが、用量-反応関係が明瞭ではなかった。以上の成績から、今回の肺腫瘍の発生とメタクリルアミド投与との因果関係についてはなお今後の研究が必要と考えられる。なお、マウスにおける肺胞Ⅱ型上皮細胞由来の腺腫は、一般に境界が明瞭で、浸潤性、転移性に乏しく、修復的増殖が主で、比較的良性的腫瘍と考えられている<sup>21)</sup>。

上記以外の組織については、特に中毒学的意義のある所見はなかった。

## 結 論

化学工業界などで今後使用量の増大が予測されているメタクリルアミド  $[\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2]$  の慢性生体影響に関する基礎的知見を得る目的で、ラットおよびマウスを用いて、0, 200, 400, 800 および 1,200ppm の濃度について、飲水による最長12ヶ月の投与実験をおこない、以下の成績を得た。

1. 水および餌の摂取量は、いずれの濃度、期間においても対照群との有意差を認めなかった。

2. 体重増加は、ラットの 1,200ppm で他群より抑制される傾向があったが、有意ではなかった。マウスでは 800ppm 群で約16週目以後に、1,200ppm 群で約6週目以後に、対照群と比べて有意に抑制された。

3. 神経障害作用に関して、ラットでは 1,200ppm 群の一部に15週以後軽度の後肢麻痺が見られ、12ヶ月の投与終了後、800 および 1,200ppm 群で後肢麻痺によるひきずり、尿失禁などが増悪した。マウスではラットより低濃度、短期間で後肢麻痺その他の神経症状が出現した。

4. ロータロッド法による歩行能の50% 阻害は、ラットの 800ppm 群で約4ヶ月、1,200ppm 群で約3ヶ月、マウスでは 800ppm 群で約5ヶ月、1,200ppm 群では3週目と、両動物種間で用量-反応関係に差が見られた。

5. 血液像はラット、マウスともに異常所見は観察されなかった。

6. 血液生化学値は、ラットについて12ヶ月後血清総コレステロール、磷脂質、γ-GTP がそれぞれ用量依存的に上昇し、前2者は統計学的に有意であった。

7. 尿生化学値はラット12ヶ月投与後に異常は検出されなかった。

8. 主要臓器の肉眼的変化として、高濃度長期投与群で膀胱の異常拡張が見られた。マウスでは肺に小腫瘍が発生したが、これは対照群にも僅か乍ら見られた。

9. 組織学的変化として、坐骨神経末梢部有髄神経線維の萎縮、脱髄、肝の巣状壊死、肺胞Ⅱ型上皮細胞性腺腫が観察された。

以上、メタクリルアミドの慢性生体影響について、用量-反

応関係および障害性に関する知見が得られた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師橋本和夫教授に深謝いたします。また、研究に御協力をいただきました谷井秀治助教授、血液生化学的検査について御指導をいただきました臨床検査医学橋本琢磨教授、病理学的検査について御指導をいただきました金沢医科大学第二病理学武川昭夫教授、原稿作成に御助力をいただきました出村千恵子さん、瀬戸祐子さんに深謝いたします。

### 文 献

- 1) Singh, H., Vasudevan, P. & Ray, A. R.: Polymeric Hydrogels: Preparation and biomedical applications. *J. Scientific and Industrial Res.*, **39**, 162-171 (1980).
- 2) Spencer, P. S. & Schaumburg, H. H.: A review of acrylamide neurotoxicity. Part I. Properties, uses and human exposure. *Can. J. Neurol. Sci.*, **1**, 143-150 (1974a).
- 3) Spencer, P. S. & Schaumburg, H. H.: A review of acrylamide neurotoxicity. Part II. Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanisms. *Can. J. Neuro. Sci.*, **1**, 151-169 (1974b).
- 4) 橋本和夫: アクリルアミドの毒性. *産業医学*, **22**, 233-248 (1980).
- 5) Barnes, J. M.: Observations on the effects on rats of compounds related to acrylamide. *Br. J. Ind. Med.*, **27**, 147-149 (1970).
- 6) Hashimoto, K., Sakamoto, J. & Tanii, H.: Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Arch. Toxicol.*, **47**, 179-189 (1981).
- 7) Tanii, H. & Hashimoto, K.: Neurotoxicity of acrylamide and related compounds in rats. Effects on rotarod performance, morphology of nerves and neurotubulin. *Arch. Toxicol.*, **54**, 203-213 (1983).
- 8) Drees, D. T., Crago, F. L., Hopper, C. R. & Smith, J. M.: Subchronic percutaneous toxicity of acrylamide and methacrylamide in the newborn rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **37**, 190 (1976).
- 9) Dunham, N. W. & Miya, T. S.: A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **46**, 208-209 (1957).
- 10) Hashimoto, K. & Tanii, H.: Percutaneous absorption of [<sup>14</sup>C] methacrylamide in animals. *Arch. Toxicol.*, **57**, 94-98 (1985).
- 11) Hashimoto, K. & Tanii, H.: Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mut. Res.*, **158**, 129-133 (1985).
- 12) IPCS: Acrylamide, *Environmental Health Criteria* **49**, p43-82, WHO, Geneva, 1985.
- 13) 橋本和夫, 黒坂葉子: Acrylamide 誘導体の肺腫瘍形成. *毒性病理研究会報*, **3**, 40 (1987).
- 14) 松田晴夫: メタクリルアミドの肺腫瘍発生作用に関する研究. *十全医会誌*, **98**, 428-438 (1989).
- 15) George, J. D., Price, C. J., Marr, M. C. & Myers, C. B.: *In* National Toxicology Program (ed.), *Developmental toxicity evaluation of methacrylamide administered by gavage to CD-1 mice on gestational days 6 through 17*. 1st ed., p1-117, NTIS Springfield, 1991.
- 16) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, 482-491 (1964).
- 17) IPCS: Acrylamide, *Environmental Health Criteria* **49**, p23-27, WHO, Geneva, 1985.
- 18) Fullerton, P. M. & Barnes, J. M.: Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *Br. J. Ind. Med.*, **23**, 210-221 (1966).
- 19) Livingood, L. E.: Tumors in the mouse. *Bull. John. Hopk. Hosp.*, **7**, 177-178 (1896).
- 20) Stewart, H. L., Dunn, T. B., Snell, K. C. & Deringer, M. K.: Tumors of the respiratory tract. *In* V. S. Turusov (ed.), *IARC Scientific Publication No. 23. (Pathology of Tumours in Laboratory Animals Vol. II-Tumours of the Mouse)*, 1st ed., p251-267, IARC, Lyon 1979.
- 21) Kauffman, S. L. & Sato, T.: Alveolar type II cell adenoma, lung, mouse. *In* T. C. Jones, U. Mohr & R. D. Hunt (eds.), *Respiratory System* p102-106, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985.
- 22) Stoner, G. D. & Shimkin, M. B.: Strain A mouse lung tumor bioassay. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **1**, 145-169 (1982).
- 23) Shimkin, M. B.: Pulmonary tumors in experimental animals. *Adv. Cancer. Res.*, **3**, 223-267 (1955).
- 24) Shimkin, M. B. & Stoner, G. D.: Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv. Cancer Res.*, **21**, 1-58 (1975).
- 25) Kimura, J.: Progression of pulmonary tumor in mice. I. Histological studies of primary and transplanted pulmonary tumors. *Acta. Pathol. Jpn.* **21**, 13-56 (1971).



**Chronic Effects of Methacrylamide — 12 Month Study of Administration in Drinking Water to Rats and Mice—**  
Joji Aratani, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**,  
720—727 (1993)

**Key words** methacrylamide, chronic toxicity, neurotoxicity, rats, mice

**Abstract**

Chronic toxicity of methacrylamide, whose industrial use had been expanding, was studied by administering it to male Wistar rats and ddY mice in drinking water at 0, 200, 400, 800 and 1200 ppm for 4, 8, and 12 months to obtain basic information for health control in chemical factories. After the 12 month treatment period, some animals were kept for recovery observation, for 12 months in the longest case. Water and food consumptions were not different among control and treatment groups during the treatment period in either animal species. Body weight gain in rats receiving 1200 ppm was slightly but insignificantly suppressed compared to the control during the treatment period, whereas it decreased significantly in mice receiving 800 and 1200 ppm. Symptoms of peripheral neuropathy including hindlimb weakness and abnormal gait were detected in rats receiving the highest dose and in mice receiving 800 and 1200 ppm. Walking performance on a rotating rod decreased significantly in both rats and mice receiving 800 and 1200 ppm. Hemograms did not change significantly in either animal species. In rats, dose-related increases in serum total cholesterol and phospholipid content and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity were seen after 12 months, although the increase in the last item was not statistically significant. Rat urine after 12 months did not show any significant biochemical change. In mice, a high but dose-unrelated incidence of multiple lung tumors, which were diagnosed histologically as alveolar type II adenoma, was observed to be greater in the treatment groups than in the control. Group atrophy of the gastrocnemius muscle was detected in both rats and mice receiving more than 800 ppm. Some rats and mice receiving more than 800 ppm showed a distension of the urinary bladder. During the post administration period, pigmentation of body fur due to urinary incontinence in both rats and mice, and symptoms of neuropathy were advanced, especially in rats receiving the two higher doses. No significant differences in absolute or relative organ weights were seen among groups in either species after either treatment or post treatment periods.