

Studies on Lung Tumour Formation in Mice by Methacrylamide

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	http://hdl.handle.net/2297/8109

メタクリルアミドの肺腫瘍発生作用に関する研究

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

松 田 晴 夫

(平成1年3月1日受付)

メタクリルアミド (methacrylamide, MTA) の肺腫瘍発生作用とその機序を明らかにするために、主としてマウスを用いて検討した。メタクリルアミドは、1日1回、連続5回腹腔内投与、または1日おき、5回腹腔内投与 (いずれも1回投与量は2.35mmol/kg体重) ののち、6ヶ月間の観察期間中に肺腫瘍の発生を見た。すなわち、連日投与群では57匹中16匹 (30%)、1日おき投与群では38匹中8匹 (21%) でいずれも食塩水のみ投与の対照群での発生率 (48匹中1匹, 2.1%) にくらべて高かった。肺腫瘍は直径1~2mmで、発生マウスの半数が1個のみ、その他では2~4個が観察された。組織学的には、全例が肺胞II型の上皮細胞由来のものであった。¹⁴Cメタクリルアミド投与後の組織内放射能の分布は、腎で最も高く、肝、血液、脾、肺がこれに続いた。組織中放射能の一部は蛋白分画に見出され、結合率は肺では約5%であった。3種の核酸塩基すなわち、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシチジンおよびチミジンにたいするメタクリルアミドの *in vitro* におけるアルキル化反応はすべて陰性であった。内、外因性化学物質の代謝に関与するグルタチオン-S-アラルキルトランスフェラーゼ活性は、ジニトロクロロベンゼンを基質とした場合、マウス肺は肝の約1/10の活性を示すのみであったが、メタクリルアミドを基質とした場合は、肝の約80%の活性を示した。マウス肺ミクロゾームのP450活性は肝に比べて低く、定量可能限界以下であった。マウスおよびラット肺ミクロゾームにおける脂質過酸化活性に対して、メタクリルアミドは、*in vitro*, *in vivo* ともに影響を及ぼさなかった。以上メタクリルアミドの生体内分布、結合性、肺における代謝活性、ならびにそれへの影響を調べた結果、メタクリルアミドによる肺障害性の作用機序として、肺組織蛋白との反応性が関連すると推察された。

Key words methacrylamide, mice, lung-tumour, metabolism, mechanism of action

メタクリルアミド ($\text{CH}_2=\text{CCH}_3\text{CONH}_2$) (methacrylamide, MTA) は、アクリルアミドの誘導体の1つであり、有機合成化学工業において、水溶性ポリマーや共重合ポリマーの原料として、近年生産量が増大している¹⁾。親化合物のアクリルアミドは、人や実験動物で末梢神経障害を引き起こすことが知られている²⁾。この神経毒性は、アクリルアミドの類似物質でもいくつかの報告がなされており、メタクリルアミドに関するものとしては、ウサギ³⁾、マウス⁵⁾、ラット⁷⁾などによる報告がある。Hashimotoらは⁴⁾マウスで、メタクリルアミドの神経毒性は、アクリルアミドに比

較して、ロータロッド法で約16%であるとしている。また、Hashimotoら⁴⁾は、ウサギ、ラットおよびマウス、特にウサギでの速やかな経皮吸収性を、¹⁴Cメタクリルアミドを用いて明らかにした。アクリルアミド類似物質のサルモネラ菌による突然変異原性に関する最近の研究では、いずれも活性が認められていない⁸⁾。一方、グリシドアミド、N,N-2-グリシジルアクリルアミド、グリシジルメタクリルアミドの3つのエポキシド誘導体では、1または2種のサルモネラ株で突然変異性を示した⁹⁾。現在、アクリルアミドの慢性毒性については多くの知見があるが¹⁰⁾、メタクリル

Abbreviations: DNCB, dinitrochlorobenzene; DTNB, di-thio-bis-2-nitro benzoic acid; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione-S-alkyltransferase; MTA, methacrylamide; PB, phosphate buffer; TCA, trichloro-acetic acid

アミドおよび、その他の誘導体の慢性影響についてはまだ十分知られていない。しかし、最近の研究では、アクリルアミド誘導体にマウス肺腫瘍形成が確認された¹¹⁾。そこで、今回は特に、メタクリルアミドの肺に対する作用を明らかにするために、以下の研究をおこなった。すなわち、まず、メタクリルアミドをマウスに繰り返し投与した際の肺腫瘍発現の経過を観察し、ついでマウスにおける¹⁴Cメタクリルアミドの肺、その他の臓器における分布、3種の核酸塩基へのメタクリルアミドの *in vivo* での反応性およびメタクリルアミドのマウス肺組織における *in vitro* および *in vivo* での代謝を調べた。また、内、外因性物質の代謝に関与する肺ミクロゾーム P-450 の活性を肝と比較した。一般に SH 反応剤 (HgCl₂ など) は、組織のミクロゾームと反応して、脂質過酸化に対する増強反応をおこすことが知られている。メタクリルアミドは二重結合をもち、SH 基と反応することが知られているので¹²⁾、この物質による肺における過酸化反応への影響を調べた。このため、マウスおよびラットの肺組織ミクロゾームを調製し、*in vitro* および *in vivo* での反応を観察した。

材料および方法

I. 試薬

メタクリルアミドは、非放射性 (Eastman Kodak Co., USA) および放射性 (2,3-¹⁴C) メタクリルアミド、20 μ Ci/mmol (日本原子力研究所, 東海村) を用いた。2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、チミジンはいずれも生化学用 (和光純薬, 大阪) を、他の試薬はすべて特級を用いた。

II. 動物

ddY 系雄マウス (静岡実験動物, 静岡) (実験開始時 5 週齢) および Wistar 系雄ラット (静岡実験動物, 静岡) (実験開始時 5 週齢) を用いた。実験中動物には、水および固形飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京) を自由に摂らせた。

III. 動物処理法

肺腫瘍形成実験には、マウスに 2.35mmol/kg 体重 (経口 LD₅₀ の 1/2 量) のメタクリルアミドを生食水溶液として、1日1回を5日間連続、または、1日おき5回、腹腔内に投与した。週または月の間隔で解剖し、肺および他の諸臓器の変化を肉眼的に観察した。

生食水のみを腹腔内投与したマウスを対照群とした。

IV. 肺組織の光顕的観察

肺組織は燐酸緩衝10%ホルマリン固定後、パラフィ

ン切片として、H-E 染色により光顕下で観察した。

V. [¹⁴C]メタクリルアミドの体内分布

1 μ Ci/10g 体重 (4.7 μ mol/10g) の [¹⁴C]メタクリルアミドを生食水溶液として、マウス腹腔内に1回投与した。30分後に開胸し、ヘパリン処理注射器で左心室より全身の血液を出来るだけ抜き取ったうえ、諸臓器を採取した。各臓器重量を秤量したのち、一部 (約 50mg) を濾紙カップ (Aloka, 東京) に計量し、サンプルオキシダイザー (Aloka, 東京) で燃焼させた。得られたサンプルを液体シンチレーションカウンター LS Analyser (Aloka, 東京) で1分間計測した (計数効率 67~68%)。残った臓器は、水 3 ml を加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジネートとした。これに10%トリクロル酢酸 (trichloro-acetic acid, TCA) を加え、2,500rpm, 10分間遠心したのち、沈渣を再度 TCA で洗浄した。2回の上清を合わせ、この 0.5ml をとってシンチレータ ACS II (パッカード, 東京) 10ml を加え、先と同様に液体シンチレーションカウンターで計数した (計数効率 90~91%)。

VI. 核酸塩基とメタクリルアミドの *in vitro* での反応

Solomon ら¹³⁾の方法に準じ、13mM の 2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジンおよびチミジンの燐酸緩衝溶液 (0.2N, pH 7.0) に 680mM のメタクリルアミドを加え、37°C で反応させた。1, 2, 5, 10 週後に反応液の 2 μ l を、薄層クロマト (シリカゲル 70 プレート) (和光純薬, 大阪) にスポットし、イソプロパノール/水 (2.3/1) にて常温で展開した。数時間後、Buchanan の方法¹⁴⁾に準じ、0.5% システインの硫酸溶液 (3N) を粉霧したのち、85°C 10分間加熱した。対照物質として、メタクリルアミドの代りにアクリルアミドを反応させた試料についても同様の測定をおこなった。

VII. 肺および肝臓上清およびミクロゾーム分画

0.1M 燐酸緩衝液 (phosphate buffer, PB) (pH 7.4) を用いてマウスの肺および肝臓の 20% ホモジネートを作り、2,000 \times g で 30分遠心したのち、上清を 120,000 \times g で 1時間遠心し、上清 (エンザイム) および沈渣のミクロゾーム分画を得た。

VIII. グルタチオン S-アラルキルトランスフェラーゼ (glutathione-S-aralkyltransferase, GST) 測定

1, 2, 4-ジニトロクロロベンゼン (2, 4-dinitrochlorobenzene, DNCB) を基質とした測定。

Boyland と Chasseaud の方法¹⁵⁾¹⁶⁾に準じ、30mM DNCB, 10mM 還元グルタチオン (reduced glutath-

ione, GSH), 0.2M PB (pH 6.5) およびエンザイム 10 μ l をキューベット中で25°Cにて反応させ、基質-GSH 結合物の形成量を初速度法で求めた (測定波長 340nm).

2. メタクリルアミドを基質とした測定.

10mM メタクリルアミド, 1 mM GSH, および 0.1M PB (pH 6.5) を加え, 37°C, 60分間インキュベートしたのち, 70%過塩素酸を数滴加え, 2,500rpm, 10分間遠心し, その上清に 0.2M PB (pH 6.5) および 40mg/100ml の 5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (5,5'-dithio-bis-2-nitro benzoic acid, DTNB) を加え, 410nm における吸光度を測定した¹⁷⁾.

IX. P-450 の測定

マウス肺または肝臓に 4 倍量 (W/V) の冷却した 0.25M ショ糖液を加え, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジネートとし, 2,000 \times g 30分遠心後, 上清を 120,000 \times g で 1 時間遠心して, 沈渣のマイクロゾーム分画を得た. この分画を用いて Omura & Sato の方法¹⁸⁾ に準じて P-450 量を測定した.

X. 脂質過酸化反応の測定¹⁹⁾

1. in vitro: 正常マウスの肺マイクロゾーム分画に, 最終濃度 10mM のメタクリルアミドを加え, 37°C, 60分間インキュベートしたのち, その一部に 20% TCA, 0.67% 2-チオバルビツール酸を加えた. これを沸騰水浴中で 10分間インキュベートしたのち, 2,500rpm 10分間遠心し, その上清中のマロニルジアリデヒド形成量を 535nm で比色定量した. 脂質過酸化反応の陽性対照物質として, メタクリルアミドの代わりに FeSO₄·7H₂O を最終濃度 0.3mM で加えた試料について, 同様の測定をおこなった.

2. in vivo: 2.35mmol/kg 体重のメタクリルアミドを, マウス腹腔内に 5 日間連続投与したのち, 既述の方法で肺マイクロゾームを調製した. この試料について, 上記と同様の方法で脂質過酸化反応を測定した. この場合, メタクリルアミドの添加および37°Cでのインキュベートはおこなわなかった.

XI. 蛋白定量

エンザイムおよびマイクロゾーム分画の蛋白定量は, Lowry 法²⁰⁾ によった.

XII. 統計学的検定法

百分率の差の検定は, Fisher の直接確率計算法により, 多群間の平均値の差の検定は, 1 元配置分散分析後 Duncan の多重比較法²¹⁾ によった. p<0.05 を有意とした.

成 績

I. メタクリルアミド投与マウスにおける肺腫瘍発生

表 1 は, 食塩水のみ投与の対照群, メタクリルアミドを 1 日 1 回, 連続 5 回腹腔内投与群, および 1 日おき, 5 回腹腔内投与群における肺腫瘍発生率の経時変化を示す. 対照群では観察 6 ヶ月目で解剖した 20 匹中に 1 匹のみ腫瘍の発生を見た. 6 ヶ月間の総発生率は, 1/48 (2.1%) であった. メタクリルアミド 5 回連続投与群では, 3 週目から, 発生率は少ないが腫瘍形成が認められ, 6 ヶ月では 16 匹中に 12 匹, 6 ヶ月間の総発生率は 16/57 (30%) となった. 1 日おき 5 回投与群では, 2 ヶ月目ではじめて発生がみられ, 6 ヶ月では 6 匹中に 6 匹, 6 ヶ月間の総数では 8/38 (21%) となった. メタクリルアミド投与 2 群の総発生率は, いずれも対照群の発生率とくらべて有意に高率であった (p<0.01). なお, 6 ヶ月間の体重, および肺重量には, 3 群間に有意差はなかった.

II. 肺腫瘍の病理学的所見

肺腫瘍は, 肉眼的には, 肺表層部に観察される腫瘍で, 灰白色透明感を呈した. 大きさはいずれも直径 1~2mm の小型で, 発生数は発生マウスの半数が 1 個のみ, その他では 2~4 個が観察された.

組織学的には, 全例が肺胞 II 型の上皮細胞由来の腫瘍で, クララ細胞由来の腫瘍発生はみられず, 気管支上皮細胞の異形成, 過形成も認められなかった. 腫瘍の組織像を図 1 (a, b) に示す.

Table 1. Lung tumor formation after methacrylamide (MTA) administration in mice

	1 W	2 W	3 W	4 W	2 M	3 M	6 M	total
Control	0/5	0/3	0/5	0/5	0/5	0/5	1/20	1/48
MTA I ^a	0/5	0/8	1/9	2/9	1/5	0/5	12/16	16/57**
MTA II ^b	0/5	0/5	0/5	0/6	1/5	1/6	6/6	8/38**

^a 2.35 mmol/kg, once/day, 5 times, ip injection

^b 2.35 mmol/kg, once/two days, 5 times, ip injection

**p<0.01 vs. control by Fisher's exact probability test

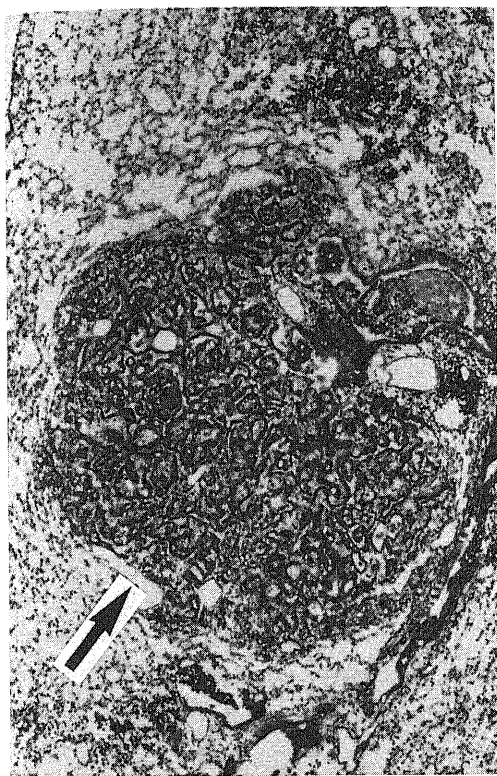


Fig. 1-a Lung tumour (arrow) in mice 6 months after intraperitoneal administration of 2.35 mmol/kg methacrylamide once a day for 5 days. $\times 20$.

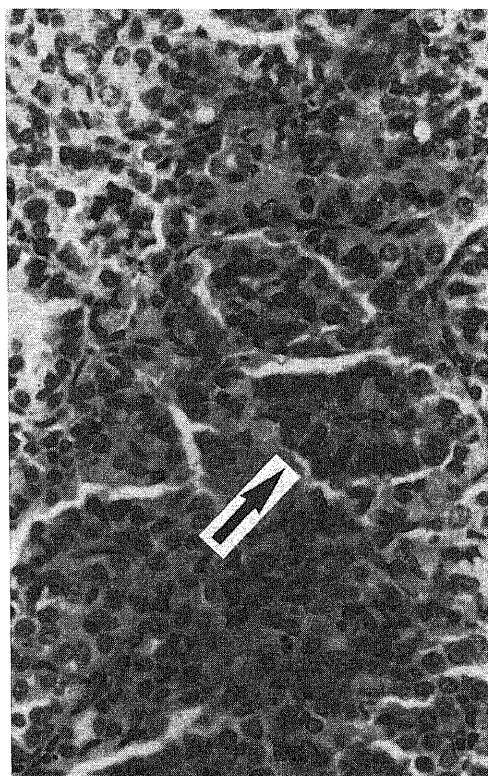


Fig. 1-b Increased magnification of Fig. 1-a. Tumour is comprised of alveolar type II epithelium (arrow), and no Clara cell proliferation is seen. Histopathological diagnosis is adenoma. $\times 200$.

Table 2. Distribution of radioactivity in tissues 3 min after ip [^{14}C]-MTA administration in mice

	Radioactivity g % ^a		
	Total	Supernatant	Protein bound (%)
Blood	11.1 ^b	10.2	8.1
Cerebrum	2.4	1.7	29.2
Cerebellum	2.8	1.7	29.3
Lung	8.0	7.6	5.0
Heart	6.7	5.9	11.9
Liver	12.6	11.3	10.3
Kidney	33.2	26.3	20.8
Spleen	8.3	6.8	18.1
Testis	5.0	4.5	10.0
Gastrocnemius muscle	4.8	4.4	8.3

^a count found per g tissue/count administered per g bodyweight $\times 100$

^b mean of two experiments

III. [14 C] メタクリルアミド投与後放射能の臓器内分布

表2は、マウスでの [14 C] メタクリルアミド1回腹腔内投与後30分における、臓器内放射能の分布を示す。全放射能は腎で最も高く、肝、血液、脾、肺がこれに続いた。神経系、筋肉は比較的低値であった。各臓器における放射能の蛋白結合率をみると、神経系および腎で最も高く、脾、心、肺と続いた。

IV. 核酸塩基に対するメタクリルアミドの *in vitro* でのアルキル化反応

図2は、薄層クロマトグラムの1例を示す。左の3

個のスポットはアクリルアミド、右の3個はメタクリルアミドの、それぞれ3種の核酸塩基との10週間反応後の展開像である。左のアクリルアミドは 2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシチジンとの反応生成物を見るが、メタクリルアミドでは、3種いずれの塩基に対する反応物も検出されなかった。

V. DNCB を基質とした場合の、マウス肺および肝の GST 活性

表3は、肺および肝における、120,000×g 遠心上清(エンザイム)の、DNCB を基質とした場合の GST 活性値を示す。 *in vitro* でメタクリルアミド (10mM)

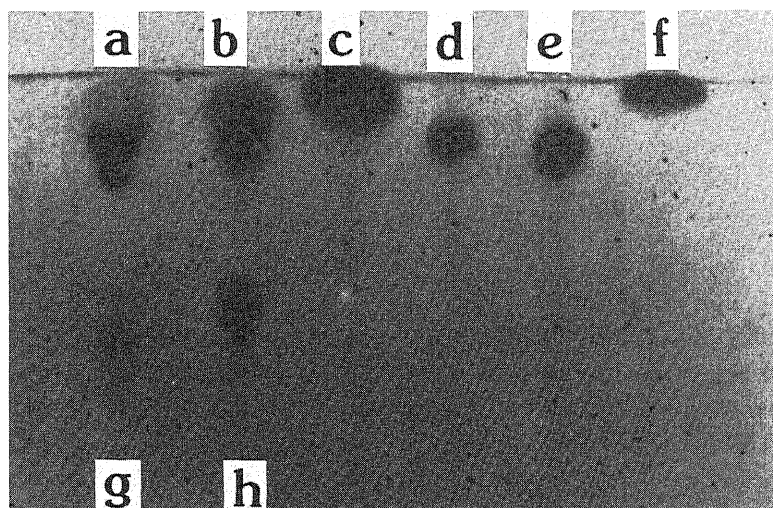


Fig. 2. Thin-layer chromatogram after a direct reaction of 3 nucleosides (each 13 mM) *in vitro* with acrylamide (680 mM) or methacrylamide (680 mM) at 37°C, pH 7.0 for 10 weeks. Two μ l of each reaction mixture was plotted on Silica-Gel 70 plate (Wako, Japan) and developed by isopropanol/H₂O (2.3/1) for several hours at room temperature. Spots are detected by spraying a 5% solution of cysteine hydrochloride in 3 N sulphuric acid and heating for 5 to 10 min at 85 °C. a~c, reaction with acrylamide; d~f, reaction with methacrylamide. a and d, 2'-deoxyadenosine; b and e, 2'-deoxycytidine; c and f, thymidine; g, adduct of acrylamide with 2'-deoxyadenosine; h, adduct of acrylamide with 2'-deoxycytidine. No adduct is detected after reaction with methacrylamide.

Table 3. GST activity in mouse lung and liver with DNCB as substrate

GST activity (mM min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
<i>in vitro</i> ^a		<i>in vivo</i> ^b	
Lung	Liver	Lung	Liver
0.64±0.33(6) ^c	8.98±4.36(6)	0.40±0.04(3)	3.87±0.64(3)

^a normal mice

^b mice treated with MTA

^c mean±SD(n)

と60分インキュベートした。正常マウスの上清、およびメタクリルアミドを1日1回連日5回投与したマウスの上清、いずれの場合にも、GST活性は、肝が、肺の約10倍の値を示した。in vivoでのメタクリルアミド投与群では、両値ともin vitroにくらべて低下がみられた。

VI. メタクリルアミドを基質とした場合の、マウス肺および肝の GST 活性

メタクリルアミドの肺および肝における被代謝活性を知るため、メタクリルアミドを基質とした場合の、肺および肝の GST 活性をしらべた。表4に示すように DNCB を基質とした場合と同様、肝が肺より強い代謝活性を示したが、両者の差は DNCB の場合程ではなかった。また in vitro と in vivo の差も認められなかった。

VII. マウス肺マイクロゾームの P-450 活性

マウス肺マイクロゾームにおける薬物代謝酵素活性を調べるため、P-450量を測定したが、450nmに相当するピークは出現しなかった。同時に測定した肝では、0.372nmol/mg マイクロゾーム蛋白であった。

VIII. マウスおよびラット肺マイクロゾームにおける脂質過酸化に対するメタクリルアミドの影響

メタクリルアミドの肺組織における脂質過酸化活性への影響を調べるため、マウスおよびラット肺マイクロゾームについて、メタクリルアミドの作用を in

vitro および in vivo で観測した。表5に示すように、メタクリルアミドはマウスおよびラットにおいて、in vitro, in vivo ともに、肺マイクロゾームの脂質過酸化に影響を及ぼさなかった。一方、陽性対照物質として用いた FeSO₄ は、in vitro でマウスおよびラットともに強い脂質過酸化の増強作用を示した。

考 察

ビニール系またはアクリル系化合物と称される化合物群は、分子中に所有する二重結合の活発な化学反応性のため、合成化学工業界で各種反応の原料、中間体および最終製品として広く用いられている。一方、この種の化合物は、その性質から生体に対しても障害性が一般に強いことで知られている。その例として、塩化ビニールモノマー取扱者の肝血管肉腫²⁰、アクリルニトリル取扱者の肺癌²¹、アクリルアミド取扱者の多発神経炎²²、その他がある。

今回取りあげたメタクリルアミドは、人間および各種実験動物で神経障害性を示すことが知られているアクリルアミド誘導体の1つである。最近、メタクリルアミドを含めた、アクリルアミド誘導体の中にマウスでの肺腫瘍発生の報告がなされ¹¹、産業衛生上の新しい課題が生じている。今回、著者はメタクリルアミドによるマウスでの肺腫瘍発生を経時的に観察するとともにその発生機序を明らかにするための基礎的研究を

Table 4. GST activity in mouse lung and liver with MTA as substrate

GST activity ($\mu\text{g hour}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)			
in vitro ^a		in vivo ^b	
Lung	Liver	Lung	Liver
9.76±0.56(3) ^c	11.7±4.00(3)	9.88±0.33(3)	11.8±0.55(3)

^a normal mice ^b mice treated with MTA ^c mean±SD(n)

Table 5. Lipid peroxidation by MTA in mouse and rat lung microsomes

	Concentration of malonildialdehyde ^a		
	Mice		Rats
	in vitro	in vivo	in vitro
Control	26.5±3.3(5) ^b	10.5±1.1(5)	8.2±1.02(5)
MTA	25.0±0.3(5)	10.3±1.6(6)	8.3±0.73(5)
FeSO ₄	103±44(5)**	— ^c	19.7±4.5(5)**

^a $\mu\text{mol mg protein}^{-1} \times 100$ ^b mean±SD(n) ^c not determined
 **p<0.01 vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

試みた。

マウス肺における自然発生性の肺腫瘍形成については、Livingood²⁶⁾以来、多くの報告がある²⁶⁾。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²⁷⁾。この腫瘍はまた、種々の外的要因、すなわち物理学および化学的要因で誘発される。このことから、とくにA系マウスの肺腫瘍形成を指標とした、化学発癌性の検査法が Shimkin 一派によって提唱されている²⁸⁾²⁹⁾。

著者の今回の研究では、メタクリルアミドが、正常対照群では殆ど自然発生をみない ddY 系マウスで、肺腫瘍を誘発させ、発生率が経時的に増大することが明らかとなった。この腫瘍は、組織学的にはすべて肺胞II型上皮からなる腺腫であった。しかし、Amaral-Mendes³⁰⁾によると、これらマウスの自然発生性肺腫瘍は、マウスの年齢が2年以上になると、約20%は悪性化に傾くことがあり、これは最初腺腫で発生したものからの変異によると考えられている。Kimura³¹⁾は、II型上皮による腺腫から、乳頭腫に変化し、更に腺癌へと進行する可能性を示唆している。今回の研究では観察期間を6ヶ月までとしたが、先におこなわれた1年後の観察(の結果)では、腺腫の一部に乳頭腫の組織像がみられており¹⁾、メタクリルアミドによる肺腫瘍についても、経時的な組織像の悪性化の可能性が考えられる。メタクリルアミドの合成上での母体であるアクリルアミドについては、皮膚および肺における腫瘍形成の報告がある。すなわち、ICR-Swiss系マウスで、1週当たり3回を2週間、経口投与(総投与量75, 150, 300mg/kg)したのち、2.5 μ gの12-o-tetra-decanoylphorbol-13-acetateを週3回、20週間皮膚塗布した場合、1年後に約30%のマウスで皮膚の乳頭腫あるいは癌が、また40%に肺の腺腫あるいは癌の形成が認められている³²⁾。同様の実験をアクリルアミドの腹腔内投与で観察すると、肺腫瘍発生率が有意に高まることも報告され、アクリルアミドが肺腫瘍発生のイニシエーターとなり得ると考えられている³³⁾。

化学物質による肺腫瘍発生の病理組織的研究は古くから比較的多くの報告があるが、その生化学的発生機序については、なお不明な点が多く残されている。今回著者はまず、放射性メタクリルアミドを用いて、腹腔内投与後の組織内分布と、放射能の蛋白分画への結合率を測定した。この結果、メタクリルアミドの肺における分布量は腎、肝、血液などに続いて、比較的高い値を示した。この分布量の中の組織蛋白への結合率は、大脳、小脳、などの神経組織や腎、脾などにくら

べて低いものの、3時間で約5%の結合が認められた。外来化学物質と組織蛋白との結合の意義については、構造蛋白の失活などの他に、遺伝子発現の調製障害にもとづく発癌性への関与が想定されている³⁴⁾。今回の成績から、肺では未反応のメタクリルアミドも高濃度で残存するが、組織蛋白の機能変化が起こり得ることも示唆された。また、家兎による放射性メタクリルアミドの皮膚接触24時間後の組織蛋白結合率は、肺では肝、血液などと同様、最も高い値(約60%)を示している⁹⁾。このことから、マウスにおいても、この物質の繰り返し投与の場合、更に高い結合率の可能性もあり、肺機能への影響が少なくないと考えられる。化学物質による腫瘍形成の機序として、核酸に対する化学物質のアルキル化反応が知られている³⁵⁾。親化合物のアクリルアミドについては、各種核酸塩基との *in vitro* における結合性が明らかにされ³²⁾、これと動物の皮膚、肺などにみられる腫瘍形成との関連性が論じられている³⁶⁾。しかし、今回メタクリルアミドについて、3種の核酸塩基に限って調べた結果では、結合性はみられず、腫瘍形成との関連性は確認できなかった。

メタクリルアミドの生体内代謝に関与すると想定される GST 活性を、マウス肺および肝について、*in vitro* および *in vivo* で検討した。その結果、DNFBを基質とした場合両実験系ともに、肺は肝にくらべて、約1/10の GST 活性を示した。しかし、メタクリルアミドを基質とした場合は肝にくらべて、GST 活性には大差がなく、肝と同程度に代謝されることが明らかになった。一方、肺組織中のミクロゾームに存在する薬物代謝酵素活性を P-450 の濃度から想定することを試みた。その結果、マウス肝では、既報の文献値³⁷⁾に近い濃度が得られたが、肺においては、測定範囲以下であった。肺組織の P-450 活性の測定については、他の多くの報告も極めて低い値³⁸⁾または、血液の混入による測定妨害³⁹⁾などの結果を示している。このことから、マウス肺におけるメタクリルアミドのミクロゾーム系による代謝は、かつてマウス肝で調べられた活性³⁰⁾にくらべて低率と考えられた。

メタクリルアミドのマウス肺腫瘍形成に関与する生化学的機序について更に検討するために、肺の過酸化脂質反応に対するメタクリルアミドの影響を調べた。一般に、不飽和化合物には脂質過酸化反応の促進効果を示すものが少なくない³⁹⁾。生体中で生成する過酸化脂質の毒性や病態については多くの報告があり⁴⁰⁾、最近では脂質過酸化によるリンパ系組織の特異的な障害と、これによる免疫機能の低下および発癌性などの示唆がなされている⁴¹⁾。過酸化脂質の測定法については、

反応の特異性に関して多少の問題はあるが、感度と操作の簡便さから、従来から用いられているマロンジアルデヒド法¹⁰⁾を用いた。マウスおよびラット肺での *in vitro* および *in vivo*、いずれの場合にも、メタクリルアミドは脂質過酸化反応に影響を及ぼさなかった。一方、陽性対照物質として用いた硫酸第一鉄はこの反応に対して強い促進効果を示した。したがって、今回の成績から、メタクリルアミドの過酸化脂質反応の促進による発癌性への関与については可能性が少ないと考えられた。

以上、メタクリルアミドの肺腫瘍発生機序について、各種の生化学的検討をおこなったが、組織蛋白との結合性に関与する更に詳細な検討がなお今後の課題として残されている。化学発癌剤の多くについて、組織蛋白のアミノ基のカルボキシル基、SH 基、その他へのアルキル化作用が認められている¹¹⁾。メタクリルアミドについても、システイン、グルタチオンを介しての蛋白アルキル化作用の可能性がある。また、親化合物のアクリルアミド¹²⁾および類似構造物のアクリルニトリル¹³⁾についても、*in vivo* の条件で蛋白との直接の結合性が報告されている。前者については、動物における発癌性が、また後者については、人間¹⁴⁾および動物¹⁵⁾における発癌性が報告されている。メタクリルアミドについても、今後蛋白との反応性を中心に、肺腫瘍形成機序解明の可能性がひらかれると考えられる。

結 論

有機合成化学原料として最近用途の拡大しつつある、メタクリルアミド (methacrylamide) の肺腫瘍発生機序を明らかにするため、主としてマウスを用いて検討し、以下の成績を得た。

1. メタクリルアミドは、1日1回、連続5回腹腔内投与、または、1日おき、5回腹腔内投与(1回投与量はいずれも 2.35mmol/kg) 6ヶ月間の観察期間中に30%、および21%に肺腫瘍の発生をみた。腫瘍はすべて肺胞II型上皮細胞由来の腺腫であった。
2. [¹⁴C]メタクリルアミド投与後3時間における組織内放射能の分布は、腎、肝、血液、脾、肺の順に高かった。
3. 肺組織分布量のうち約5%の放射能が肺の蛋白結合性分画に認められた。
4. メタクリルアミドと3種の核酸塩基との *in vitro* での結合性は確認されなかった。
5. 肺上清分画のグルタチオン-S-アラルキルトランスフェラーゼ (GST) 活性は、ジニトロクロロベン

ゼンを基質とした場合、肝の約1/10で、メタクリルアミドを基質とした場合は、肝とほぼ同じ活性を示した。

6. マウス肺マイクロゾームの P-450 活性は、肝にくらべて低く、定量可能限界以下であった。

7. マウス肺マイクロゾームの脂質過酸化反応に対して、メタクリルアミドは、*in vitro*、*in vivo* とともに影響を及ぼさなかった。

8. 以上の成績および従来からの知見から、メタクリルアミドの肺腫瘍形成機序として蛋白との結合性が関与しうると考えられた。

謝 辞

この論文をまとめるに当たり、ご指導をいただきました橋本和夫教授に深謝いたします。研究をおこなうにあたりご協力いただきました教室の皆様方、更に時間的配慮をいただいた職場の関係各位に、感謝いたします。

文 献

- 1) Singh, H., Vasudevan, P. & Ray, A. R.: Polymeric hydrogels preparation and biomedical preparations. *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. Neurol. Sci.*, **1**, 151-169 (1974b).
- 4) Dress, D. T., Crago, F. L., Hopper, C. R. & Smith, J. M.: Subchronic percutaneous toxicity of acrylamide and methacrylamide in the new born rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **37**, 190 (1976).
- 5) Hashimoto, K., Sakamoto, J. & Tanii, H.: Neurotoxicity of acrylamide and their related compounds and their effects on male gonads in mice. *Arch. Toxicol.*, **47**, 179-189 (1981).
- 6) Barnes, J. M.: Observations on the effects on rats of compounds related to acrylamide. *Brit. J. Ind. Med.*, **27**, 147-149 (1970).
- 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) **Hashimoto, K. & Tanii, H.**: Percutaneous absorption of [¹⁴C] methacrylamide in animals. *Arch. Toxicol.*, **57**, 94-98 (1985).

9) **Hashimoto, K. & Tanii, H.**: Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella Typhimurium*. *Mutation Res.*, **158**, 129-133 (1985).

10) **ICPS: Acrylamide**. In Aldridge, W. N. (ed.), *Environmental Health Criteria*, p1-121, WHO, Geneva, 1985.

11) 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).

12) **Hashimoto, K. & Aldridge, W. N.**: Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2591-2604 (1970).

13) **Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F. & Segal, A.**: Direct alkylation of 2'-deoxynucleoside and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.*, **45**, 3465-3470 (1985).

14) **Buchanan, J. G.**: Detection of deoxyribonucleosides on paper chromatograms. *Nature*, **168**, 1091 (1951).

15) **Boylard, E. & Chasseaud, L. F.**: Enzyme-catalyzed compounds. *Biochem. J.*, **104**, 95-102 (1967).

16) **Boylard, E. & Chasseaud, L. F.**: Glutathione S-aralkyltransferase. *Biochem. J.*, **115**, 955-991 (1969).

17) **Ellman, G. L.**: Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).

18) **Omura, T. & Sato, R.**: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964).

19) **Wills, E. D.**: Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In K. Snell & B. Mallock (eds.), *Biochemical Toxicology*, 1st ed., p138-141, IRL, Press, Oxford, Washington DC., 1987.

20) **Lowry, O. H., Rqsebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

21) **Duncan, R. C., Knapp, R. G. & Miller, M.**

C.: *Introductory Biostatics for the Health Science*, 2nd ed., p137-159, John Wiley & Sons, New York, 1983.

22) **Creech, J. L. & Johnson, M. N.**: Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinylchloride. *J. Occup. Med.*, **16**, 150-151 (1974).

23) **O'Berg, M. T.**: Epidemiologic study of workers exposed to acrylonitrile. *J. Occup. Med.*, **22**, 245-252 (1980).

24) **Kuperman, A. S.**: *The Pharmacology of Acrylamide*, p86, Cornell University Graduate School, New York, 1957.

25) **Livingood, L. E.**: Tumours in the mouse. *Bull. John Hopk. Hosp.*, **7**, 177-178 (1896).

26) **Stewart, H. L., Dunn, T. B., Snell, K. C. & Deringer, M. K.**: Tumours of the respiratory tract. In VS. Tursor (ed.), *Pathology of Tumours in Laboratory Animals Vol. II-Tumours of the Mouse*, p251-267, IARC Scientific Publications No.23, Lyon, 1979.

27) **Kauffman, S. L. & Sato, T.**: Alveolar type II cell adenoma, lung, mouse. In Jones, T. C., Mohn, U. & Hunt, R. D. (eds.), *Respiratory System*, 1st ed., p102-106, Springer-Verlag, Berlin, 1985.

28) **Shimkin, M. B.**: Pulmonary tumors in experimental animals, *Adv. Cancer Res.*, **3**, 223-267 (1955).

29) **Shimkin, M. B. & Stoner, G. D.**: Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay. *Adv. Cancer Res.*, **21**, 1-58 (1975).

30) **Amaral-Mendes, J. J.**: Histopathology of primary lung tumours in the mouse, *J. Pathol.*, **97**, 415-427 (1969).

31) **Kimura, J.**: Progression of pulmonary tumor in mice. I. Histological studies of primary and transplanted pulmonary tumors. *Acta Pathol. Jpn.*, **21**, 13-56 (1971).

32) **Bull, R. J., Robinson, M. & Stober, J. A.**: Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Letters*, **24**, 209-212 (1984).

33) **Bull, R. J., Robinson, M., Laurie, R. D., Stoner, G. D., Greisiger, E., Meier, J. R. & Stober, J.**: Carinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.*, **44**, 107-111

(1984).

- 34) **Bernice, L. M.**: Pathophysiology, An Introduction to the Mechanisms of Disease, 2nd ed., p263-268, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- 35) **Holbrook, D. J. Jr.**: Chemical carcinogenesis. In Hodgson E. and Guthrie F. E. (eds.) Introduction to Biochemical Toxicology, 1st ed., p310-329, Elsevier, New York, Oxford, 1980.
- 36) **Dutcher, J. S. & Boyde, M. R.**: Species and strain differences in target organ alkylation and toxicity by 4-ipomeanol. Predictive value of covalent binding in studies of target organ toxicities by reactive metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3367-3372 (1979).
- 37) **Bend, J. R., Hook, G. E. & Gram, T. E.**: Characterization of lung microsomes as related to drug metabolism, *Drug. Metab. Dispos.*, **1**, 358-367 (1973).
- 38) **Tanii, H. & Hashimoto, K.**: Studies on in vitro metabolism of acrylamide and related compounds, *Arch. Toxicol.*, **48**, 157-166 (1981).
- 39) **Utray, H. G., Bernheim, F. & Hochstein, P.**: Effect of sulphhyde reagents on peroxidation in microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 29-32 (1967).
- 40) **永田親義**: 変異原性および発がん: 過酸化脂質と生体 (内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編), 第2版 255-287 頁, 学会出版センター, 東京, 1987.
- 41) **Oarada, M., Ito, E., Terao, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K. & Kaneda, T.**: The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissue in mice. *Biochem. Biophys. Acta*, **960**, 229-235 (1988).
- 42) **Park, D. N.**: The Biochemistry of Foreign Compounds, 1st ed, p30-33, Pergamon Press, Oxford, 1968.
- 43) **Solomon, J. J., Cote, I. L., Wortman, M., Deecker, K. & Segal, A.**: in vitro alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile and thymine and cytosine. *Chem. Biol. Interact.*, **51**, 167-190 (1984).
- 44) **Maltoni, C., Ciliberti, A. & Dimaio, V.**: Carcinogenicity bioassays on rats of acrylonitrile administered by inhalation and by ingestion. *Med. Lab.*, **68**, 401-411 (1977).

Studies on Lung Tumour Formation in Mice by Methacrylamide
Haruo Matsuda, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University,
Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 428—438 (1989)

Key words methacrylamide, mice lung tumour, metabolism, mechanism of action

Abstract

Histopathological and biochemical observations were done to study the mechanism of lung tumour formation in mice by methacrylamide. Methacrylamide was given intraperitoneally either once a day for 5 days or once every other day for 5 times at a dose level of 2.35 mmol/kg. During a 6 month observation period, lung tumour formation was significantly higher both in the former group (16 out of 57 mice, 30%) and in the latter group (8 out 38 mice, 21%), as compared with the controls (1 out of 48 mice, 2.1%). Tumours were all adenoma comprised of alveolar II type epithelium. Concentrations of radioactivity in tissues 3 hours after an intraperitoneal administration of [¹⁴C] methacrylamide were highest in the kidney followed by liver, blood, spleen, and lung. About 5% of the radioactivity in the lung was found in the protein fraction. No direct alkylation of 3 nucleosides was observed following in vitro reaction with methacrylamide. Activity of glutathione-s-alkyltransferase in lung supernatant fraction for 2-nitrochlorobenzene was one-tenth as low as in the liver, but for methacrylamide it was about 80% that of the liver. Concentration of microsomal p-450 in lung was lower than the detectable level by the authentic method. Methacrylamide did not affect the microsomal lipid peroxidation reaction either in mice or in rats. Protein binding of methacrylamide in the lung seemed to have some role in lung tumour formation in mice.