

Table 4 Organ weights of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	348.7±16.9	326.1±23.9	334.0±15.4	325.7±16.8	410.5±19.3	421.3±30.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1896.4±64.6	1916.0±82.1	1923.2±55.9	1919.2±123.1	1976.7±62.4	1986.9±11.8
Thymus	621.5±90.5	580.8±111.9	641.3±162.3	540.3±92.1	545.7±131.1	529.6±76.4
Heart	1259.9±78.8	1086.4±77.3*	1077.0±104.8**	1043.6±65.4**	1230.1±52.8	1254.6±117.5
Liver	10540.8±708.4	9927.4±910.4	10202.5±338.4	9943.1±1170.0	11831.7±963.2	12920.9±1257.9
Kidneys	2623.6±147.5	2444.1±187.2	2449.7±168.9	2473.4±191.5	2749.4±274.7	2839.4±196.4
Spleen	723.7±71.2	669.1±111.1	670.0±127.6	653.0±127.0	755.6±68.0	881.0±111.5
Adrenal glands	58.9±12.9	45.6±5.2	49.6±3.4	55.2±7.0	55.7±3.9	54.9±5.8
Testes	3159.3±294.7	2942.5±122.6	3030.4±128.5	2949.1±158.0	3223.9±395.3	3300.5±266.6
Epididymides	722.8±29.5	695.3±11.4	707.6±51.1	696.0±50.0	953.6±168.5	1067.5±58.9
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.450±0.360	5.895±0.414	5.765±0.266	5.892±0.200	4.818±0.117	4.705±0.380
Thymus	1.778±0.205	1.786±0.345	1.912±0.439	1.658±0.262	1.331±0.326	1.247±0.144
Heart	3.618±0.257	3.336±0.188	3.223±0.255*	3.207±0.195*	2.998±0.106	2.959±0.219
Liver	30.227±1.290	30.411±0.703	30.572±1.119	30.461±2.355	28.824±1.977	30.421±1.413
Kidneys	7.538±0.568	7.514±0.635	7.337±0.456	7.594±0.430	6.705±0.707	6.693±0.096
Spleen	2.082±0.248	2.047±0.284	2.008±0.393	2.000±0.331	1.846±0.213	2.076±0.209
Adrenal glands	0.170±0.041	0.140±0.014	0.149±0.011	0.169±0.015	0.136±0.009	0.129±0.013
Testes	9.083±0.999	9.074±0.917	9.086±0.527	9.058±0.319	7.844±0.797	7.814±0.878
Epididymides	2.079±0.163	2.140±0.145	2.120±0.140	2.140±0.161	2.317±0.361	2.519±0.091
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	214.7±10.8	213.6±25.4	213.2±21.0	211.0±18.8	251.7±14.5	226.2±26.3
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1805.3±70.2	1727.2±69.2	1755.5±65.6	1742.6±92.8	1855.1±98.4	1839.6±108.9
Thymus	499.0±71.5	503.9±108.3	442.2±92.1	446.8±62.9	392.9±55.3	388.9±88.2
Heart	771.3±59.3	748.4±106.6	724.3±54.3	763.0±100.9	815.5±48.7	799.1±97.5
Liver	6499.5±275.6	6351.2±1132.3	6120.9±881.6	6595.1±803.4	7001.4±563.2	6677.6±1024.8
Kidneys	1713.7±80.4	1649.4±222.2	1550.7±72.2	1602.6±135.1	1752.9±88.7	1657.1±292.5
Spleen	521.8±13.2	610.0±212.5	502.5±95.5	452.4±88.2	506.9±66.7	503.3±139.3
Adrenal glands	61.5±8.7	57.3±12.2	55.0±6.1	60.1±4.3	58.8±8.7	62.7±7.8
Ovaries	87.9±12.3	84.4±17.1	77.1±10.3	85.9±11.4	83.4±17.7	79.8±18.6
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	8.416±0.286	8.168±0.915	8.302±0.906	8.299±0.699	7.388±0.554	8.201±0.896
Thymus	2.322±0.290	2.340±0.282	2.097±0.518	2.116±0.222	1.571±0.296	1.704±0.266
Heart	3.594±0.235	3.498±0.154	3.409±0.221	3.616±0.324	3.249±0.285	3.535±0.215
Liver	30.291±0.701	29.593±2.103	28.670±2.220	31.204±1.553	27.812±1.488	29.448±1.890
Kidneys	7.988±0.283	7.714±0.323	7.318±0.643	7.601±0.220	6.994±0.726	7.304±0.695
Spleen	2.438±0.175	2.799±0.710	2.344±0.240	2.133±0.264	2.030±0.386	2.195±0.375
Adrenal glands	0.285±0.028	0.267±0.036	0.258±0.019	0.285±0.014	0.234±0.039	0.277±0.016
Ovaries	0.408±0.043	0.392±0.037	0.364±0.055	0.407±0.042	0.330±0.058	0.352±0.062

Values represent mean±S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p<0.05$ **: Significant difference from 0 mg/kg, $p<0.01$

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Male						Female					
	End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20	0	5	10	20	0	20
Dose (mg/kg)	0	5	10	20	0	20	0	5	10	20	0	20
Number of animals examined (Kidney)	5	5	5	5	5	5	5	0	0	5	0	0
Eosinophilic body, proximal tubule	±	0	0	0	0	2	0			0		
	+	0	0	0	2	1	0			0		
	Total	0	0	0	2	3	0			0		
Basophilic tubule	±	4	3	4	3	4	5	3		2		
	+	0	0	1	0	0	0	0		0		
	Total	4	3	5	3	4	5	3		2		
Cellular infiltration, lymphocyte	±	5	3	5	4	5	5	2		2		
	Total	5	3	5	4	5	5	2		2		
Cyst, cortex	±	0	0	0	0	0	0	0		0		
	+	0	0	0	0	0	0	1		0		
	Total	0	0	0	0	0	0	1		0		
Cast, proteinous	±	2	0	1	0	0	0	0		0		
	+	0	0	0	1	0	0	0		0		
	Total	2	0	1	1	0	0	0		0		
Number of animals examined (Spleen)	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Deposit, pigment, brown	±	0		0			0			0		
	+	5		5			5			5		
	Total	5		5			5			5		
Hematopoiesis, extramedullary	±	3		4			5			3		
	+	2		0			0			1		
	++	0		1			0			0		
	Total	5		5			5			4		
(Heart)												
Myocardial degeneration/fibrosis	±	1		0			0			0		
	+	0		1			0			0		
	Total	1		1			0			0		
Number of animals examined (Testis)	5	0	0	5	1	0						
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	±	0		0	0							
	+	0		0	0							
	++	0		0	0							
	+++	0		0	1							
	Total	0		0	1							
(Epididymis)												
Decrease, sperm, unilateral	±	0		0	0							
	+	0		0	0							
	++	0		0	0							
	+++	0		0	1							
	Total	0		0	1							
Number of animals examined (Eye)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage, vitreous cavity	±			0								
	+			1								
	Total			1								

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe, total: total of positive grade

メタクリルアミドの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Methacrylamide on Bacteria

要約

メタクリルアミドについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加および添加試験のいずれも313~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、メタクリルアミドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与された。

E. coli WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与された。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

2. 被験物質

メタクリルアミドは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号710130、純度99.5%以上(不純物:メタアクリル酸)であり、三井化学(株)(千葉)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

メタクリルアミドは、局方注射用水(ロット番号:K6I94, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

3. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

SA: アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA: 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

*: WP2 *uvrA*用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む。

S9**	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

**：7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製されたS9(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000 μ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無

添加試験および添加試験とも5000 μ g/plateとした。

313~5000 μ g/plateの範囲で公比を2として2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

以上の結果に基づき、メタクリルアミドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性であった⁴⁾。本被験物質の類縁化合物については、簡単な情報検索を行ったが、変異原性に関する情報は得られなかった。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier, North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 62.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
 試験担当者：原 巧, 川上久美子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257-8523
 Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of methacrylamide on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)									
		Base-pair substitution type						Frameshift type			
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0	153 149 152 (151 \pm 2.1)	21 10 12 (14 \pm 5.9)	32 30 23 (28 \pm 4.7)	18 20 20 (19 \pm 1.2)	10 5 8 (8 \pm 2.5)					
	313	159 162 151 (157 \pm 5.7)	15 13 10 (13 \pm 2.5)	18 29 32 (26 \pm 7.4)	23 21 24 (23 \pm 1.5)	14 6 5 (8 \pm 4.9)					
	625	149 128 146 (141 \pm 11.4)	14 18 8 (13 \pm 5.0)	23 26 26 (25 \pm 1.7)	17 25 23 (22 \pm 4.2)	3 9 5 (6 \pm 3.1)					
	1250	138 133 141 (137 \pm 4.0)	12 10 14 (12 \pm 2.0)	27 27 32 (29 \pm 2.9)	23 26 17 (22 \pm 4.6)	9 5 10 (8 \pm 2.6)					
	2500	141 134 165 (147 \pm 16.3)	12 12 16 (13 \pm 2.3)	24 27 17 (23 \pm 5.1)	20 22 20 (21 \pm 1.2)	11 8 3 (7 \pm 4.0)					
	5000	138 152 162 (151 \pm 12.1)	13 17 12 (14 \pm 2.6)	26 30 25 (27 \pm 2.6)	21 14 32 (22 \pm 9.1)	9 7 5 (7 \pm 2.0)					
S9 mix (+)	0	146 139 125 (137 \pm 10.7)	13 8 7 (9 \pm 3.2)	26 23 30 (26 \pm 3.5)	37 26 24 (29 \pm 7.0)	9 11 10 (10 \pm 1.0)					
	313	182 177 166 (175 \pm 8.2)	5 12 7 (8 \pm 3.6)	24 26 36 (29 \pm 6.4)	27 33 35 (32 \pm 4.2)	10 7 8 (8 \pm 1.5)					
	625	152 194 179 (175 \pm 21.3)	14 9 6 (10 \pm 4.0)	46 29 22 (32 \pm 12.3)	25 34 23 (27 \pm 5.9)	16 15 11 (14 \pm 2.6)					
	1250	174 169 167 (170 \pm 3.6)	12 14 13 (13 \pm 1.0)	27 45 43 (38 \pm 9.9)	27 22 28 (26 \pm 3.2)	11 12 9 (11 \pm 1.5)					
	2500	164 184 164 (171 \pm 11.5)	13 8 16 (12 \pm 4.0)	25 28 33 (29 \pm 4.0)	30 27 21 (26 \pm 4.6)	6 7 8 (7 \pm 1.0)					
	5000	168 147 165 (160 \pm 11.4)	15 17 14 (15 \pm 1.5)	39 43 42 (41 \pm 2.1)	40 42 41 (41 \pm 1.0)	5 7 5 (6 \pm 1.2)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA					
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
	Number of colonies/plate	507 506 477 (497 \pm 17.0)	573 557 587 (572 \pm 15.0)	196 190 201 (196 \pm 5.5)	506 545 521 (524 \pm 19.7)	423 361 312 (365 \pm 55.6)					
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA					
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2					
	Number of colonies/plate	1025 1018 998 (1014 \pm 14.0)	377 384 371 (377 \pm 6.5)	824 846 836 (835 \pm 11.0)	449 479 437 (455 \pm 21.6)	379 356 358 (364 \pm 12.7)					

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.
 AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of methacrylamide on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	166 169 146 (160 \pm 12.5)	9 11 8 (9 \pm 1.5)	21 19 28 (23 \pm 4.7)	21 24 25 (23 \pm 2.1)	8 17 12 (12 \pm 4.5)	
	313	148 143 147 (146 \pm 2.6)	16 13 6 (12 \pm 5.1)	22 21 14 (19 \pm 4.4)	14 21 32 (22 \pm 9.1)	3 5 6 (5 \pm 1.5)	
	625	150 138 142 (143 \pm 6.1)	16 11 10 (12 \pm 3.2)	28 24 25 (26 \pm 2.1)	24 15 17 (19 \pm 4.7)	8 10 5 (8 \pm 2.5)	
	1250	122 147 143 (137 \pm 13.4)	14 8 12 (11 \pm 3.1)	26 20 21 (22 \pm 3.2)	21 24 23 (23 \pm 1.5)	10 8 7 (8 \pm 1.5)	
	2500	154 128 136 (139 \pm 13.3)	13 14 14 (14 \pm 0.6)	26 13 16 (18 \pm 6.8)	16 23 16 (18 \pm 4.0)	9 7 9 (8 \pm 1.2)	
	5000	144 161 149 (151 \pm 8.7)	14 17 12 (14 \pm 2.5)	20 14 20 (18 \pm 3.5)	22 27 8 (19 \pm 9.8)	8 12 10 (10 \pm 2.0)	
S9 mix (+)	0	155 198 195 (183 \pm 24.0)	12 18 15 (15 \pm 3.0)	25 30 23 (26 \pm 3.6)	25 29 42 (32 \pm 8.9)	15 21 14 (17 \pm 3.8)	
	313	180 191 171 (181 \pm 10.0)	13 8 13 (11 \pm 2.9)	30 22 21 (24 \pm 4.9)	33 39 30 (34 \pm 4.6)	12 10 12 (11 \pm 1.2)	
	625	192 159 172 (174 \pm 16.6)	15 25 8 (16 \pm 8.5)	31 25 14 (23 \pm 8.6)	21 24 47 (31 \pm 14.2)	20 14 10 (15 \pm 5.0)	
	1250	171 168 190 (176 \pm 11.9)	15 14 13 (14 \pm 1.0)	29 30 31 (30 \pm 1.0)	27 27 29 (28 \pm 1.2)	15 21 14 (17 \pm 3.8)	
	2500	182 193 170 (182 \pm 11.5)	14 17 23 (18 \pm 4.6)	24 37 38 (33 \pm 7.8)	39 20 39 (33 \pm 11.0)	17 15 15 (16 \pm 1.2)	
	5000	201 189 185 (192 \pm 8.3)	12 20 18 (17 \pm 4.2)	29 32 36 (32 \pm 3.5)	40 34 35 (36 \pm 3.2)	11 11 11 (11 \pm 0.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies/plate	538 507 545 (530 \pm 20.2)	569 587 546 (567 \pm 20.6)	200 188 195 (194 \pm 6.0)	604 556 570 (577 \pm 24.7)	316 303 325 (315 \pm 11.1)	
	Number of colonies/plate	1072 1021 1073 (1055 \pm 29.7)	450 430 475 (452 \pm 22.5)	715 781 737 (744 \pm 33.6)	540 504 488 (511 \pm 26.6)	350 367 406 (374 \pm 28.7)	

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Methacrylamide
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリルアミドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で3濃度を設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.45 mg/mL)において、倍数性細胞の出現頻度は1.00%で有意差が認められたが、その頻度が低いことと傾向性検定($p < 0.01$)において有意差が認められなかったことから、陰性と判定した。

以上の結果より、メタクリルアミドは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS:Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュ

ベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

メタクリルアミド(ロット番号:710130, 三井化学(株), 千葉)は、白色結晶で、水、DMSOおよびアセトンに対して50 mg/mL以上で溶解し、水溶性であり、融点112-114°C、沸点215°Cで、純度99.5%以上(不純物としてメタアクリル酸および水分を含む)の物質であった。被験物質原体は、過酸化物、酸化剤、酸、還元剤との接触により重合する。

6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(ロット番号:K7G78, (株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 mg/mL(10 mM)とし、連続処理、S9 mixの非存在

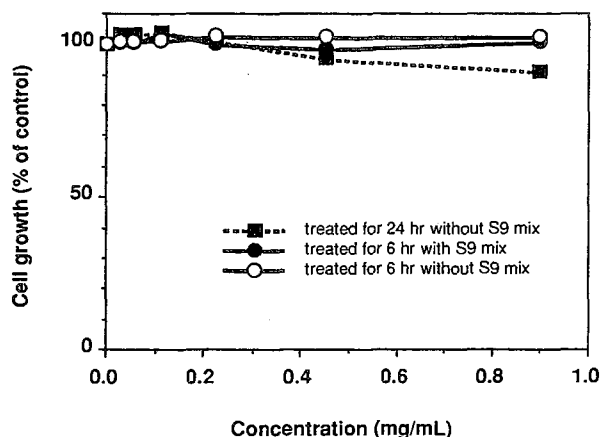


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylamide

下および存在下での短時間処理では公比2で3濃度を設定した。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株)) およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.) は、注射用蒸留水(株)大塚製薬工場) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol% ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹⁾ による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾ により、有意差検定を実施した

($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.01$) を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。メタクリルアミドを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。メタクリルアミドを加えてS9 mix非存在下および存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常誘発作用は認められなかった。また、S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかったが、S9 mix存在下では中濃度(0.45 mg/mL)においてのみ、有意な増加($p < 0.01$)が認められたものの、出現頻度は1.00%と低く、濃度依存性もないことから生物学的には陰性と判定した。

従って、メタクリルアミドは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

また、本物質は細菌を用いる復帰突然変異試験において、変異原活性は認められなかった⁴⁾。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村 功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992, pp. 218-223.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 58.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：日下部博一，佐々木澄志，
高橋俊孝，橋本恵子

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,

Toshitaka Takahashi, Keiko Hashimoto

Hadano Research Institute, Food and Drug Safety
Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methacrylamide (MA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			94.5
MA	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	-	-	87.5
MA	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.0)	0.00			87.0
MC	0.00005	24	200	5	41	89	0	1	10	146	0	97*(48.5)	94*(47.0)	0.00			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0
MA	0.23	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			93.5
MA	0.45	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	87.5
MA	0.90	48	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00			74.0
MC	0.00005	48	200	3	52	222	8	4	30	319	5	142*(71.0)	140*(70.0)	0.38			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. *: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **: Purity was more than 99.5 %

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methacrylamide (MA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0
MA	0.23	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			96.5
MA	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	96.5
MA	0.90	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			90.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			96.5
MA	0.45	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00	-	-	89.5
MA	0.90	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			90.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	8	40	1	0	0	52	0	44*(22.0)	41*(20.5)	0.00			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. *: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **: Purity was more than 99.5 %

メタクリルアミドのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Methacrylamide in Rats

要約

繊維加工剤、接着剤、紙加工剤、凝集剤等の幅広い用途で使用されているメタクリルアミドの0(精製水)、30、100および300 mg/kg/dayを1群雌雄各7あるいは14匹のCrlj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および300 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果、以下の成績を得た。

一般状態では、雌雄の300 mg/kg群でよろめき歩行ならびに後肢の反転を伴う例が認められ、この症状は回復期間の14日間を通して認められた。行動機能観察では300 mg/kg群に投与21あるいは28日に雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、雄で前肢の握力の低下がみられ、100および300 mg/kg群の雌雄ならびに30 mg/kg群の雌で自発運動量の低下が認められた。回復期間にも、300 mg/kg群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、後肢の握力および自発運動量の低下がみられ、雄では後肢の着地開脚幅の低下も認められた。この変化は、投与期間および回復終了時の病理組織学検査において、300 mg/kg群の雌雄の全例で坐骨神経に神経線維の変性、また小脳に小脳脚における軸索膨化(1~2例)がみられたことから、メタクリルアミドによる神経毒性に起因するものであった。この神経毒性に関連して、投与終了時の剖検時に300 mg/kg群の雌雄の1~3例に膀胱の内腔拡張も認められた。

一方、回復終了時の病理組織学検査で1例のみの変化ではあるが、雄の300 mg/kg群にステージIX、Xにおけるステップ19精子細胞のretentionがみられ、軽度な精巢毒性も認められた。この変化との関連は明らかでなかったが、回復終了時に300 mg/kg群の雄の精巢の器官重量および器官体重重量比の増加も認められた。

その他にも、体重では、300 mg/kg群の雌雄で投与2日から体重増加抑制が認められ、投与7日以降にも低く推移し、この体重増加抑制は回復期間中にも認められた。また、投与28日には100 mg/kg群の雌でも認められた。摂餌量では、300 mg/kg群の雌雄で摂餌量の低下が投与2日以降に散見されたが、この摂餌量の低下は回復期間の後半には回復した。また投与4週に300 mg/kg群の雌雄で飲水量の低下がみられ、雌では回復2週にも認められた。血液学検査では、300 mg/kg群の雌雄および100 mg/kg群の雄で貧血傾向が認められたが、回復終了時には雄で血小板数の増加が、雌で血小板数の増加およびプロトロンビン時間の延長が認められたのみであった。

血液生化学検査では、300 mg/kg群の雌雄でアルブミンの増加、 α_1 -グロブリンおよびアルカリホスファターゼの低下がみられ、雄で α_2 -グロブリンの低下、雌でトリグリセリドの増加、尿素窒素およびクレアチニンの低下が認められた。回復終了時では、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミン、カリウムおよび無機リンの増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの低下、雌でアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの増加、総蛋白およびグルコースの低下が認められた。これらの変化はメタクリルアミドの直接の毒性あるいはメタクリルアミドによる神経毒性に関連した変化と考えられた。

以上のことから、本試験条件下での無影響量(NOEL)は雄で30 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/day未満と考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

メタクリルアミド(純度:99.5%, Lot No. 710130, 三井化学(株), 東京)は、白色の結晶で、融点が112~114°Cで、30°Cで水100 gに40.9 g溶解する。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、室温で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。溶媒は日本薬局方精製水(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷蔵庫内遮光下で7日間安定であることから、調製後直ちに遮光できる褐色瓶に入れて冷蔵庫内(3~7°C)に保存し、調製後7日以内に使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crlj:CD(SD)IGS)の雌雄を8日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が152~183 g、雌が128~154 gであった。動物は、温度22~24°C、湿度50~63%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(午前8時から午後8時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は個別で飼育した。飼料は、 γ 線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札

幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに150, 300および600 mg/kgの3用量を1群5匹に14日間投与し, 600 mg/kgで雄に3例, 雌に1例の死亡あるいは切迫屠殺例が認められ, 300 mg/kg以上の投与群で一般状態, 体重, 摂餌量, 血液および血液生化学検査, 剖検, 器官重量等に雌雄いずれもメタクリルアミドの毒性が認められた。150 mg/kg群でも雌雄に体重増加抑制傾向, 雄に尿素窒素の低下および脳重量の低下, 雌に無機リンの増加が認められた。これらのことから, 300 mg/kgを本試験の高用量に設定し, 150 mg/kgでも弱い毒性がみられていることから, 公比約3で除し, 100および30 mg/kgとし, これに日本薬局方精製水を投与する対照群を含めた計4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

動物は, 投与日に一番近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて1日1回, 28日間の計28回, 強制的に胃内に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 行動機能観察(FOB)

投与開始前, 投与7, 14, 21および28日ならびに回復7および14日に雌雄の各群7例のうち4例を用いて, ケージ外から動物のケージ内状態を姿勢, 眼瞼閉鎖, 呼吸, 振戦・痙攣, 常同行動(回転, 旋回)および異常行動(自傷)について, ケージから取り出す時に取り出し易さ, 扱い易さ, 筋緊張, 立毛, 被毛の状態, 皮膚, 眼球, 瞳孔径, 可視粘膜, 流涙, 流涎および体温について, またオープンフィールド装置内で痙攣, 歩行, 覚醒状態, 排尿, 排便, 呼吸, 常同行動(毛繕いおよび匂嗅ぎ)および異常行動(後方突進および発声)について, 検査台上で視覚(棒を接近させた時の反応), 触覚(筆を接触させた時の反応), 聴覚(ガルトン笛に対する反応), 痛覚(尾根部を挟んだ時の反応), 固有受容反応(強制姿勢からの復帰反応)および空中正向反射(30 cm上方から落下させた時の反応)について, それぞれのスコアリング表に従って観察し, スコア付けした。また, 投与4週および回復2週に前肢および後肢の握力(CPUゲージ, アイコーエンジニアリング株), 後肢の着地開脚幅, 10分毎60分間の自発運動量(Actomonitor II, メディカル・エイジェント社)を測定した。

3) 体重および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1, 7および14日

ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28日の体重増加量および体重増加率を算出した。また, 摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

4) 尿検査

投与期間および回復期間の最終週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い, 同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲン, ビリルビン, 潜血反応(以上, マルティステックス, バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し, 21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計, アタゴ)を測定した。

5) 血液学検査

全例について16~21時間絶食させた後, 剖検時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し, EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数, 平均赤血球容積, 血小板数, 白血球数(以上, 電気抵抗法), ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法), (以上, コールターカウンターT660型, コールター), ヘマトクリット値(赤血球数, 平均赤血球容積より算出), 平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数, ヘモグロビン量より算出), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値, ヘモグロビン量より算出)および白血球型別百分率(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また, 3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後, 3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いて, プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上, 血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A, バクスター)を測定した。

6) 血液生化学検査

血液学検査と同時に, 全例について腹部大動脈より採血し, ヘパリン処理した後, 3000 rpmで10分間の遠心分離で得られた血漿を用いてGOT(IFCC法), 乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し, また, 無処理血液を3000 rpmで10分間の遠心分離で得られた血清を用いてGPT(IFCC法), アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法), γ -GTP(包接L- γ グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), 総コレステロール(酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アズビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(Jaffé法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(Fiske-SubbaRow法), 総蛋白(ビウレット法)(以上, 自動分析装置7150形, 日立製作所), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光光度法, コーニング480型炎光光度計), クロール(電量滴定法, クロライドカウンターCL-6M, 平沼産業), 蛋白分画およびA/G比(以上, セルロースアセテート膜電気泳動法, 全自動電気泳動装置CTE-150, 常光)を測定した。

7) 剖検および器官重量測定

投与期間および回復期間終了の翌日に全例について、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、器官重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて器官体重重量比を算出した。

8) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髓を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(腓腹筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃、腺胃、幽門部)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、陰、および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体をブアン液で固定後70%エタノールで保存した。これらの器官・組織を常法に従ってパラフィン包埋後、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色(ボディアン染色、K・B染色、ニューロフィラメント免疫染色)標本を複製し、鏡検した。

5. 統計解析

前肢および後肢の握力、後肢の着地開脚幅、自発運動量、体重、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および器官体重重量比の成績について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析し、等分散を示した場合は、一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合には、Dunnettの検定法により対照群と他群との比較を行った。不等分散を示した場合は、Kruskal-Wallis法で解析し、有意な場合には、Mann-WhitneyのU検定法を用いて対照群との比較を行った。行動機能観察のスコアおよび尿検査の定性的項目の成績については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合はMann-WhitneyのU検定法を用いて対照群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

結果

1. 一般状態

雌雄の300 mg/kg群で投与20あるいは21日からよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められた。この症状は回復期間の14日間を通して認められた。

2. 行動機能観察(Table 1)

投与期間中は、300 mg/kg群で、投与21日に雌で歩行失調がみられ、そのスコアに対照群と比較して有意差が認められた。また投与28日には雌雄に筋緊張の低下お

よび歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。投与4週に雄で前肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で測定開始後の10~20および20~30分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および10~20分のカウント数に有意な低下が認められた。また100 mg/kg群でも、雄で10~20分、雌で0~10分のカウント数に有意な低下が認められ、30 mg/kg群では、雌のみで0~10分のカウント数に有意な低下が認められた。

回復期間中は、300 mg/kg群で、雌雄とも回復7および14日に筋緊張の低下および歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。また、回復2週に雌雄とも後肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で0~10、10~20、20~30および30~40分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および50~60分のカウント数ならびに60分間のカウント数に有意な低下が認められた。雄ではさらに後肢に有意な着地開脚幅の低下も認められた。

3. 体重(Fig. 1)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で有意な体重増加抑制が認められ、投与28日には雄の300 mg/kg群で体重減少が、雌の100 mg/kg群でも有意な体重増加抑制が認められた。

回復期間中も、雌雄の300 mg/kg群で体重が低く推移したが、体重増加量および体重増加率は対照群を上回り回復傾向が認められた。

4. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で投与2日以降に摂餌量の低下あるいは低下傾向が認められた。

回復期間中は、雌雄の300 mg/kg群で回復1あるいは7日まで有意な低下がみられたが、回復14日には有意差はみられなかった。

5. 尿検査および飲水量

尿検査では、投与4週に雌雄の各投与群に変化は認められなかった。回復2週には雌の300 mg/kg群で尿比重に対照群と比較して有意な低下が認められたが、正常範囲内の変動であった。

飲水量では、投与4週に雌雄の300 mg/kg群で対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、回復2週にも雌で有意な低下が認められた。

6. 血液学検査(Table 2, 3)

投与終了時に、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でも低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。一方、雄の30 mg/kg群には平均赤血球容積のみに低下が認められ、その他の項目には変化がみられなかった。

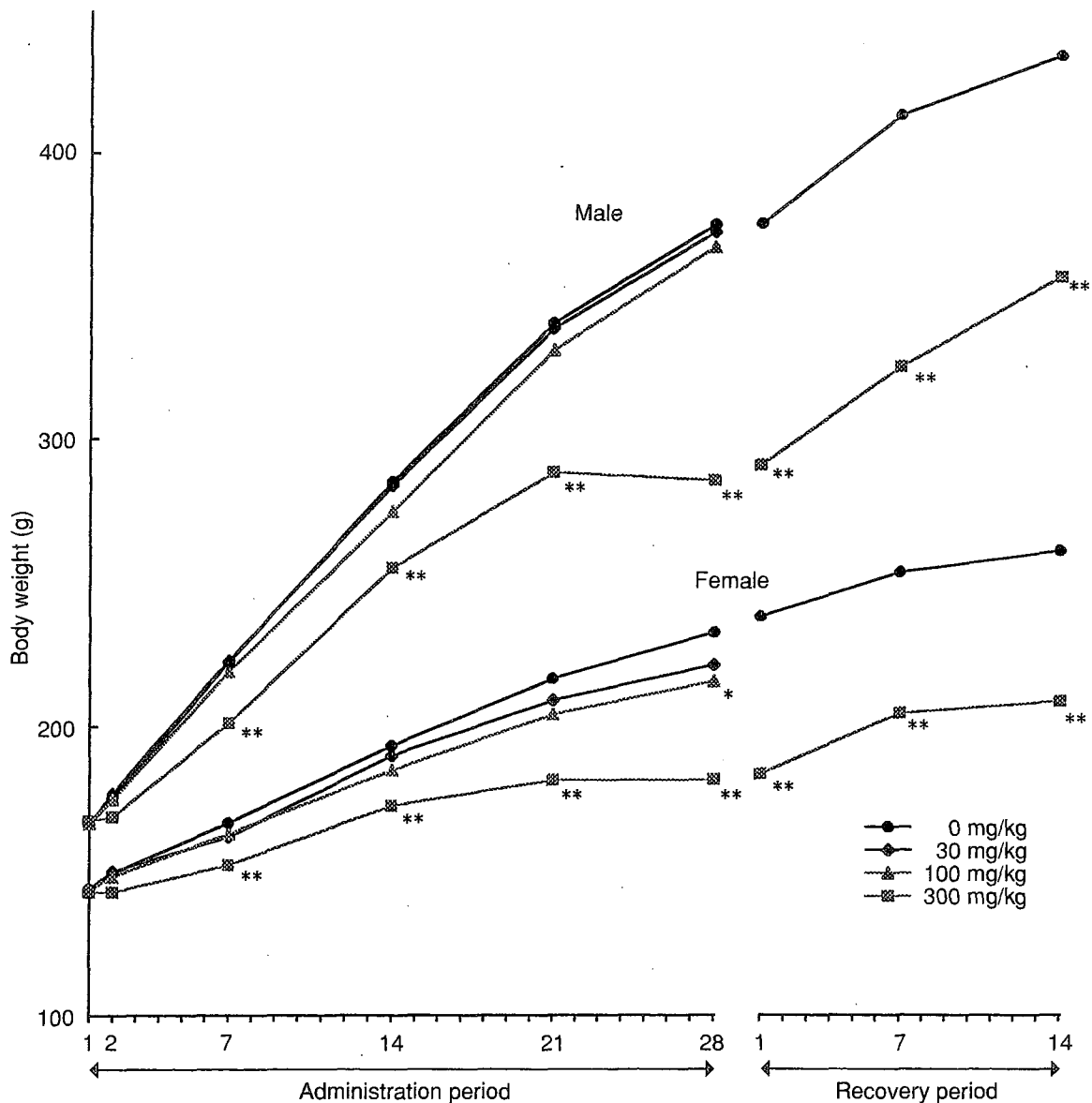


Fig. 1 Body weight change of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test. Significantly different from 0 mg/kg group; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$

回復終了時に、雌雄の300 mg/kg群で血小板数に有意な増加がみられ、雌でプロトロンビン時間に有意な延長が認められた。また、雄で単球に有意な増加がみられたが、正常範囲内の数値であった。

7. 血液生化学検査 (Table 4, 5)

投与終了時に、300 mg/kg群の雄でアルブミンに有意な増加、 α_2 -グロブリンおよびアルカリホスファターゼに有意な低下がみられ、 α_1 -グロブリンには低下傾向が認められた。また、雌ではトリグリセリドに有意な増加、尿素窒素およびクレアチニンに有意な低下がみられ、アルブミンの増加傾向、アルカリホスファターゼおよび α_1 -グロブリンの低下傾向が認められた。100 mg/kg群では、雄に総蛋白の有意な低下が認められたが、用量依存性は認められなかった。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミ

ン、カリウムおよび無機リンの有意な増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの有意な低下が認められた。また、雌ではアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの有意な増加、総蛋白およびグルコースの有意な低下が認められた。一方、雄でクレアチニンに有意な低下が認められたが、対照群の変動範囲内の値であった。

8. 剖検

投与終了時に、300 mg/kg群の雄で3例に膀胱の内腔拡張が認められ、1例に肺の右前葉に暗赤色化、左肺に暗赤色斑が認められ、また雌では1例に膀胱の内腔拡張が認められた。なお、対照群の1例に左肺の暗赤色斑が認められた。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄の1例で肺の右中間葉および左肺に白色斑が認められ、また雌の1例で右腎

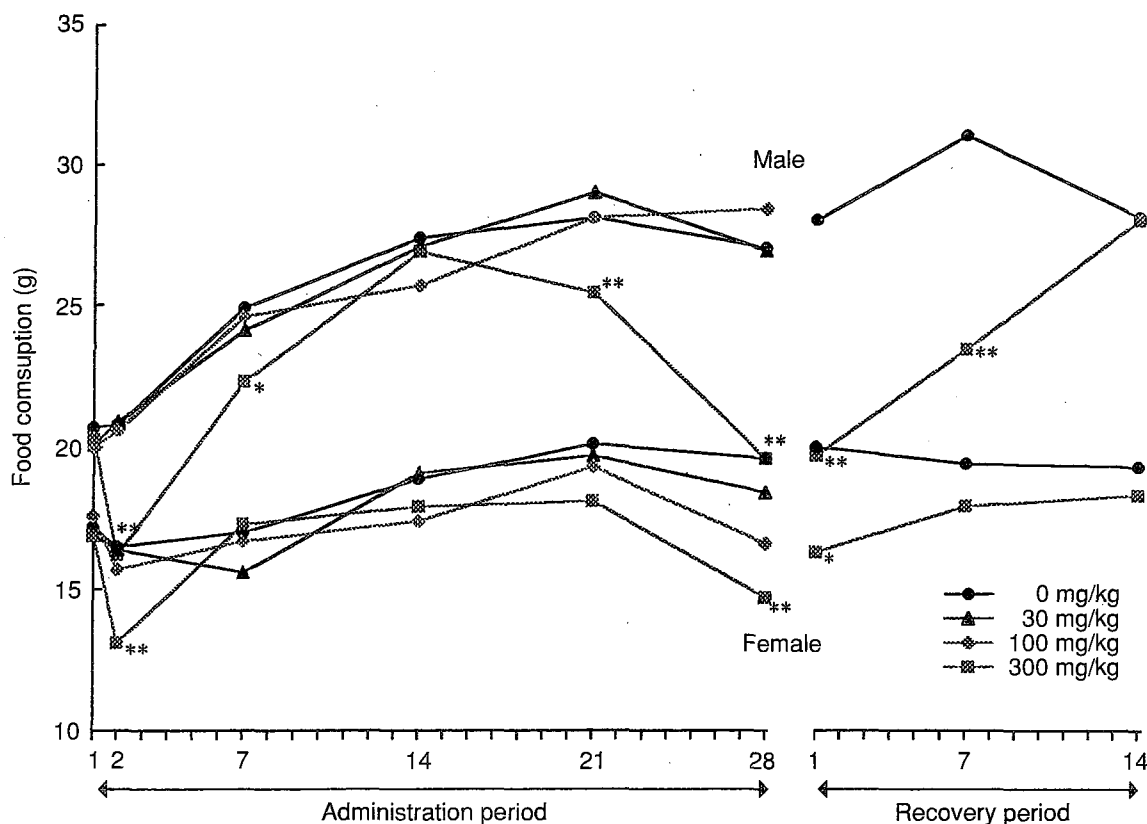


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test. Singificantly different from 0 mg/kg group; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$

臓に腎盂拡張および子宮に嚢胞が認められた。

9. 器官重量および器官体重重量比 (Table 6, 7)

投与終了時および回復終了時のいずれにも、300 mg/kg群の雌雄ともに脳、肺、心臓および肝臓等多くの器官の器官重量が低下し、また器官体重重量比が増加した。しかし、回復終了時に雄の精巣は、器官重量および器官体重重量比のいずれもが増加を示した。

10. 病理組織学検査 (Table 8, 9)

投与終了時に、300 mg/kg群の雌雄ともに1~2例で小脳脚における軸索膨化が軽度に認められ、また全例で坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められた。

回復終了時には、300 mg/kg群の雌雄ともに3~5例で小脳脚における軸索膨化が軽度に認められ、また全例で坐骨神経に軽度~中等度な神経線維の変性が認められた。さらに、雄の1例で精巣にステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞の軽度なretentionが認められた。

対照群および300 mg/kg群で投与終了時および回復終了時にみられたその他の変化にはメタクリルアミド投与との関連性は認められなかった。

考察

メタクリルアミドは、長期投与により神経毒性の発現が知られているアクリルアミドの類縁物質¹⁾であり、メ

タクリルアミドの急性経口投与毒性試験²⁾において中枢神経の変性・壊死等が認められたことから、アクリルアミドと同様に神経毒性の発現が予測された。

一般状態では、300 mg/kg群で投与3~4週から雌雄いずれにもよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められ、これらの神経症状は回復期間中にも継続して観察された。よろめき歩行および後肢の反転はアクリルアミドにおいて報告されている後肢の麻痺³⁾と類似した症状と考えられ、メタクリルアミドではマウスに神経毒性が報告¹⁾されていることから、これらの歩行異常はメタクリルアミドの末梢神経に対する毒性により、後肢が麻痺した結果と推察された。

行動機能観察では、投与期間中に300 mg/kg群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、握力の低下、雄で自発運動量の低下が認められた。この変化はいずれも末梢神経に対する神経毒性を示唆する前述の一般状態の変化とともに認められた。後肢の着地開脚幅の低下については回復期間に認められており、自発運動量の低下についても雌雄とも回復期間中の方がより高頻度に認められた。このことは末梢神経に対する神経毒性が、投与期間終了後も進行したものと推察された。握力の低下については、アクリルアミドの30 mg/kgを5週間投与した試験⁴⁾でも報告されていることから、この変化はメタクリルアミドの影響と考えられた。後肢の握力の低下に関連する病変として病理組織学所見で坐骨神経に神経線維の変性が確認された。前肢の握力の低下については、病理組織学検

査で認められた小脳の小脳脚における軸索膨化との関連が考えられた。雌の30および300 mg/kg群、雌雄の100 mg/kg群では、自発運動量の測定開始後0~10あるいは10~20分に有意な低下が認められた。対照群の動物では測定開始後の自発運動量が時間の経過とともに減少していく傾向がみられており、これは周囲の状況に馴れるに従って運動量が低下していくものと推察された。したがって、60分間の自発運動量に変化がみられないこと、各投与群の自発運動量の低下がいずれも測定開始後の初期にみられたことから、対照群と比較して周囲の状況の変化に対して鈍感であった可能性、あるいは運動活性が低下していた可能性が考えられた。このことは、60分間の自発運動量に有意差がみられている300 mg/kg群でも、測定開始後の初期に対照群と比較して有意差がみられることが多いことから、測定開始後の初期に認められた自発運動量の低下は、メタクリルアミドの影響によるものと推察された。なお、雌雄の30および100 mg/kg群では、一般状態、病理組織学検査において変化はみられなかった。

剖検では、300 mg/kg群で雌雄とも1~3例と少数例ではあるが膀胱に内腔拡張が認められた。この変化は、600 mg/kgを10~13日間投与した予備試験における死亡例にも認められ、メタクリルアミドとの関連が示唆された。また、この変化は、前述の後肢の麻痺に関連して、末梢神経の障害に起因した排尿困難による可能性も考えられた。

病理組織学検査では、300 mg/kg群の雌雄の全例で、坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められ、メタクリルアミドの神経毒性と考えられた。この変化は回復終了時ではその程度を増強し、前述と同様に末梢神経に対する神経毒性が、回復期間にも進行した可能性が推察された。アクリルアミドの50 mg/kgの週3回投与を4週間行った試験では、投与終了後40日には後肢の麻痺が回復し、末梢神経線維の再生像も認められている³⁾ことから、本試験において認められた神経線維の変性は、14日間の回復期間では回復するまでには至らなかったものと考えられた。また、300 mg/kg群の雌雄の小脳に散見された小脳脚における軸索膨化については、アクリルアミドの50 mg/kgの10日間投与においても認められている⁵⁾。なお、30および100 mg/kg群では、これらの神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

一方、300 mg/kg群の1例の精巣で回復終了時に認められたステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞のretentionについては、セルトリ細胞の障害に起因するものと考えられている⁶⁾。メタクリルアミドの急性経口投与毒性試験²⁾においても精巣毒性が示唆され、精母細胞および精子細胞に変化が認められたが、本試験で認められた所見とは異なり、またセルトリ細胞に障害がみられないことから、神経毒性の発現により体重および摂餌量の低下が継続したことに起因して、前述の精子細胞のretentionが起きた可能性も考えられた。しかし、精子細胞のretentionについては、特定のステージにのみ認められていることから精巣毒性の可能性を否定すること

はできなかった。

体重では、300 mg/kg群で雌雄とも投与初期から体重増加抑制が認められ、投与7日以降、回復終了時まで体重が低く推移した。また100 mg/kg群の雌でも投与28日に有意な体重増加抑制が認められた。回復期間には体重増加が認められたが、対照群と同等までの回復には至らなかった。

摂餌量では、300 mg/kgで雌雄とも摂餌量の低下が、投与初期から回復期間の前半まで継続したが、回復期間終了の時点では対照群とほぼ同等まで回復した。

血液学検査では、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でもヘマトクリット値およびヘモグロビン量に低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。この貧血傾向は、雌雄の300 mg/kg群において神経症状が継続して認められたこと、体重の低下が投与7日以降継続して認められ、投与28日には減少あるいは停滞したこと、ならびに摂餌量の低下が継続的に認められたことに関連した二次的な変化と考えられた。しかし、骨髄あるいは脾臓に毒性を示唆する変化は認められず、回復期間には、これら貧血傾向を示唆する変化は認められなかった。また、雌雄の300 mg/kg群に血小板数の増加、雌のプロトロンビン時間の延長が認められ、この変化も、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響によるものと考えられた。

血液生化学検査では、投与終了時に雌雄の300 mg/kg群で α_1 -グロブリンに低下傾向およびアルカリホスファターゼに低下あるいは低下傾向がみられ、雄では α_2 -グロブリンに低下、雌ではトリグリセリドに増加もみられた。この変化も血液学検査の場合と同様に、神経症状ならびに体重および摂餌量の低下が継続したことに起因するものと推察された。雌雄の300 mg/kg群でアルブミンに増加あるいは増加傾向が認められ、回復終了時に雄ではA/G比に増加も認められた。雌の300 mg/kg群では、尿素窒素およびクレアチニンに低下が認められたが、腎臓に病理組織学的な異常は認められなかった。

回復期間に雌雄いずれも総蛋白、グルコースに低下およびカリウム、無機リン等の電解質に増加が認められたが、この変化は、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響が回復していないことに起因するか、あるいは神経毒性が進行したことから神経組織からの逸脱に起因する等の可能性が考えられた。

器官重量および器官体重重量比では、回復終了時の300 mg/kg群で精巣の器官重量および器官体重重量比に増加が認められたが、精子細胞のretentionが認められたのは1例のみであり、その原因について病理組織学所見から明らかにすることは出来なかった。

以上、メタクリルアミドをラットに28日間反復経口投与した場合、雌雄いずれも300 mg/kg投与で神経症状および体重増加抑制が認められ、病理組織学的には神経毒性が認められた。14日間の回復終了後に、この神経

赤性には回復性が認められなかった。また、100 mg/kg 投与でも、雌雄いずれにも自発運動量の低下、さらに雄で貧血傾向および腎臓の器官体重重量比の増加が、雌で体重増加抑制が認められた。30 mg/kg 投与では、雌で自発運動量の低下が認められた。

これらのことから、本試験条件下での無毒性量 (NOEL) は雄で 30 mg/kg/day、雌で 30 mg/kg/day 未満と考えられた。

文献

- 1) K. Hashimoto, J. Sakamoto, and H. Tanii, *Arch. Toxicol.*, **47**, 179(1981).
- 2) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 41.
- 3) B. Veronesi, K. Jones, S. Gupta, J. Pringle and C. Mezei, *Neurotoxicology*, **12**, 715(1991).
- 4) G. E. Schulze and B. G. Boysen, *Fund. Appl. Toxicol.*, **16**, 602(1991).
- 5) D. J. O'Shaughnessy and G. J. Losos, *Toxicol. Pathol.*, **14**, 389(1986).
- 6) D. M. Creasy, *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119(1997).

連絡先

試験責任者：須永昌男
試験担当者：吉田文子, 皆川英俊, 平田真理子,
古川正敏, 山本美代子
株式会社化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Masao Sunaga (Study director)
Ayako Yoshida, Hidetoshi Minagawa,
Mariko Hirata, Masatoshi Hurukawa,
Miyoko Yamamoto
Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Results of grip strength, foot splay, and locomotor activity counts in rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
Male						
Grip strength (g)						
Forelimb	867.5 ± 129.4	761.8 ± 150.7	912.5 ± 196.8	359.0 ± 86.8**	933.0 ± 88.5	777.5 ± 198.2
Hindlimb	369.5 ± 85.9	343.5 ± 111.3	394.3 ± 115.8	192.3 ± 61.4	271.8 ± 69.7	83.3 ± 54.8**
Splay (cm)						
Hindlimb	8.48 ± 1.33	8.15 ± 1.14	9.58 ± 1.52	8.73 ± 2.85	9.70 ± 1.65	5.73 ± 2.54*
Locomotor activity counts						
0'-10'	743.5 ± 143.9	611.3 ± 69.4	612.0 ± 129.1	421.0 ± 265.3	704.3 ± 28.9	240.3 ± 114.2**
10'-20'	519.8 ± 95.0	468.5 ± 26.8	345.3 ± 13.8*	188.8 ± 104.8*	432.5 ± 61.2	186.8 ± 66.5**
20'-30'	407.0 ± 74.1	364.0 ± 141.6	298.8 ± 114.1	123.0 ± 84.3**	290.8 ± 28.7	141.5 ± 27.1**
30'-40'	249.3 ± 43.3	196.3 ± 130.9	261.8 ± 106.2	70.0 ± 93.6	248.0 ± 113.0	57.3 ± 57.4*
40'-50'	254.0 ± 110.9	206.0 ± 151.2	203.3 ± 146.9	65.0 ± 90.0	37.0 ± 20.7	55.8 ± 54.7
50'-60'	224.0 ± 99.3	148.5 ± 121.7	168.3 ± 104.4	88.0 ± 68.1	14.5 ± 12.5	52.8 ± 45.2
Total (0'-60')	2397.5 ± 92.1	1994.5 ± 435.5	1889.3 ± 498.6	955.8 ± 613.9**	1727.0 ± 86.4	734.3 ± 220.6**
Female						
Grip strength (g)						
Forelimb	725.8 ± 152.3	712.5 ± 152.2	772.0 ± 281.3	419.8 ± 207.1	670.8 ± 68.7	549.0 ± 142.9
Hindlimb	316.3 ± 105.8	227.8 ± 52.5	227.0 ± 65.7	185.0 ± 63.9	130.5 ± 27.5	49.3 ± 22.0**
Splay (cm)						
Hindlimb	7.03 ± 2.52	7.15 ± 1.74	9.35 ± 1.29	8.58 ± 2.57	6.08 ± 2.35	6.83 ± 1.80
Locomotor activity counts						
0'-10'	646.0 ± 39.6	465.0 ± 87.7*	453.0 ± 118.8*	286.8 ± 76.2**	573.3 ± 99.4	322.8 ± 119.6*
10'-20'	442.5 ± 78.8	297.5 ± 153.2	269.0 ± 112.6	154.0 ± 105.6*	325.0 ± 61.7	151.0 ± 131.7
20'-30'	354.0 ± 144.6	203.3 ± 139.6	179.3 ± 151.6	116.0 ± 95.5	195.8 ± 76.9	114.8 ± 141.5
30'-40'	228.8 ± 173.1	230.3 ± 162.6	138.0 ± 126.0	136.5 ± 128.9	198.0 ± 45.7	118.0 ± 90.4
40'-50'	103.5 ± 116.1	217.8 ± 170.6	79.3 ± 88.5	149.0 ± 126.8	61.5 ± 36.5	39.3 ± 28.2
50'-60'	163.5 ± 215.8	170.0 ± 128.7	71.5 ± 83.1	54.0 ± 49.2	152.3 ± 77.5	43.5 ± 24.7*
Total (0'-60')	1938.3 ± 569.7	1583.8 ± 792.3	1190.0 ± 638.2	896.3 ± 514.3	1505.8 ± 290.3	789.3 ± 489.8*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; *:p≤0.05, **:p≤0.01

Table 2 Hematological findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.061 \pm 0.433	8.386 \pm 0.341	8.174 \pm 0.316	8.293 \pm 0.355	8.491 \pm 0.400	8.271 \pm 0.349
Hematocrit (%)	51.10 \pm 1.59	51.10 \pm 1.02	49.44 \pm 1.34	49.10 \pm 1.09*	50.74 \pm 2.71	48.93 \pm 1.21
Hemoglobin (g/dL)	16.44 \pm 0.59	16.59 \pm 0.42	15.99 \pm 0.57	15.86 \pm 0.53	16.61 \pm 0.90	15.87 \pm 0.40
MCV (fL)	63.43 \pm 1.75	60.97 \pm 2.13*	60.49 \pm 1.46*	59.23 \pm 1.53**	59.76 \pm 1.72	59.19 \pm 1.64
MCH (pg)	20.41 \pm 0.64	19.77 \pm 0.63	19.56 \pm 0.56*	19.16 \pm 0.58**	19.56 \pm 0.51	19.21 \pm 0.73
MCHC (%)	32.19 \pm 0.55	32.47 \pm 0.34	32.33 \pm 0.60	32.29 \pm 0.61	32.74 \pm 0.22	32.44 \pm 0.71
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	13.59 \pm 3.22	15.27 \pm 3.76	13.06 \pm 3.25	15.69 \pm 4.99	14.81 \pm 2.16	12.07 \pm 3.33
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	1105.1 \pm 68.0	1126.6 \pm 138.3	1100.0 \pm 115.3	1162.0 \pm 107.4	954.0 \pm 147.1	1183.0 \pm 71.7**
PT (sec)	15.43 \pm 1.99	15.74 \pm 1.58	15.79 \pm 1.96	16.47 \pm 2.57	16.30 \pm 2.15	15.16 \pm 0.97
APTT (sec)	23.40 \pm 2.66	23.20 \pm 2.29	21.77 \pm 2.79	23.93 \pm 2.67	29.50 \pm 2.83	29.74 \pm 2.35
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.7 \pm 0.8	0.7 \pm 0.5	0.6 \pm 0.8	0.7 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	1.1 \pm 0.7
Segmented	7.7 \pm 3.9	10.1 \pm 6.2	8.1 \pm 2.2	9.9 \pm 10.2	6.9 \pm 3.3	7.6 \pm 4.0
Eosinophils	0.7 \pm 1.0	0.7 \pm 1.0	0.9 \pm 1.1	1.4 \pm 1.4	0.3 \pm 0.5	0.9 \pm 1.1
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.7 \pm 0.8	1.0 \pm 1.0	0.6 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	1.6 \pm 0.5**
Lymphocytes	90.1 \pm 3.3	87.4 \pm 5.7	89.9 \pm 2.8	87.4 \pm 10.8	91.7 \pm 2.9	88.9 \pm 4.1

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$

Table 3 Hematological findings in female male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.010 \pm 0.457	8.186 \pm 0.296	7.927 \pm 0.292	7.759 \pm 0.296	8.141 \pm 0.263	8.007 \pm 0.230
Hematocrit (%)	48.53 \pm 2.94	49.20 \pm 1.23	47.93 \pm 2.09	45.64 \pm 2.01*	48.19 \pm 1.56	47.97 \pm 2.25
Hemoglobin (g/dL)	16.10 \pm 0.93	16.44 \pm 0.39	16.03 \pm 0.67	15.29 \pm 0.69	15.83 \pm 0.43	15.74 \pm 0.76
MCV (fL)	60.59 \pm 2.00	60.13 \pm 1.76	60.44 \pm 0.97	58.80 \pm 1.18	59.20 \pm 1.64	59.91 \pm 1.59
MCH (pg)	20.11 \pm 0.70	20.11 \pm 0.61	20.21 \pm 0.41	19.70 \pm 0.51	19.46 \pm 0.65	19.64 \pm 0.65
MCHC (%)	33.19 \pm 0.64	33.43 \pm 0.52	33.44 \pm 0.52	33.51 \pm 0.58	32.84 \pm 0.50	32.81 \pm 0.85
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8.16 \pm 1.27	8.70 \pm 3.16	10.36 \pm 2.47	9.56 \pm 3.20	10.41 \pm 2.24	8.81 \pm 3.00
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	1104.7 \pm 297.0	1124.9 \pm 112.0	1183.6 \pm 93.8	1206.7 \pm 115.9	1116.6 \pm 104.2	1275.9 \pm 99.2*
PT (sec)	13.41 \pm 0.93	13.47 \pm 0.79	13.13 \pm 0.98	13.06 \pm 1.16	14.36 \pm 0.37	14.87 \pm 0.35*
APTT (sec)	20.30 \pm 5.00	17.60 \pm 1.21	17.57 \pm 1.23	17.50 \pm 1.02	19.33 \pm 1.51	19.80 \pm 2.02
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.7	1.0 \pm 0.6	0.3 \pm 0.5	0.6 \pm 0.8	0.4 \pm 0.5
Segmented	8.1 \pm 3.1	7.7 \pm 3.6	9.4 \pm 2.7	8.6 \pm 2.8	6.9 \pm 3.7	5.0 \pm 2.4
Eosinophils	0.7 \pm 1.1	1.4 \pm 0.5	1.4 \pm 1.6	1.4 \pm 1.1	0.6 \pm 0.8	0.4 \pm 0.5
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.6 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.7	0.7 \pm 0.8
Lymphocytes	89.7 \pm 2.1	89.7 \pm 4.2	87.6 \pm 3.3	88.9 \pm 3.3	91.1 \pm 4.9	93.4 \pm 2.2

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; *: $p \leq 0.05$

Table 4 Blood chemical findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein(g/dL)	5.77 ± 0.21	5.80 ± 0.13	5.49 ± 0.18*	5.79 ± 0.25	5.77 ± 0.15	5.49 ± 0.23*
A/G	1.190 ± 0.090	1.219 ± 0.069	1.273 ± 0.103	1.317 ± 0.115	1.109 ± 0.108	1.269 ± 0.105*
Protein fraction(%)						
Albumin	54.37 ± 1.76	55.00 ± 1.41	56.04 ± 1.90	56.83 ± 2.12*	52.59 ± 2.37	55.93 ± 1.93*
α-globulin	23.04 ± 1.83	22.60 ± 2.97	21.47 ± 1.62	20.94 ± 1.30	23.79 ± 2.32	21.39 ± 2.21
α ₂ -globulin	10.50 ± 0.81	10.10 ± 0.99	10.21 ± 0.87	9.17 ± 0.88*	8.61 ± 0.23	8.41 ± 0.92
β-globulin	11.06 ± 0.65	11.47 ± 0.97	11.54 ± 0.52	12.24 ± 1.46	13.63 ± 0.71	13.01 ± 0.73
γ-globulin	1.03 ± 0.46	0.83 ± 0.40	0.73 ± 0.19	0.81 ± 0.23	1.39 ± 0.35	1.26 ± 0.80
GOT(IU/L)	65.0 ± 9.6	65.7 ± 10.8	60.3 ± 4.3	58.0 ± 8.2	68.7 ± 10.3	74.0 ± 12.3
GPT(IU/L)	25.1 ± 2.3	27.0 ± 6.2	25.1 ± 3.0	20.9 ± 3.0	33.0 ± 8.7	31.6 ± 3.9
ALP(IU/L)	495.6 ± 97.4	482.4 ± 110.5	447.1 ± 101.3	337.6 ± 57.5*	355.4 ± 123.6	358.6 ± 76.9
LDH(IU/L)	324.1 ± 86.5	304.6 ± 126.7	267.3 ± 56.4	295.6 ± 76.6	227.4 ± 39.2	260.7 ± 45.6
γ-GTP(IU/L)	0.56 ± 0.28	0.51 ± 0.30	0.61 ± 0.29	0.66 ± 0.28	0.54 ± 0.21	0.60 ± 0.24
Total bilirubin(mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose(mg/dL)	156.0 ± 17.9	155.0 ± 21.9	148.7 ± 14.0	160.0 ± 15.9	171.3 ± 12.1	126.9 ± 18.8**
Total cholesterol(mg/dL)	64.4 ± 10.1	57.6 ± 16.3	52.4 ± 11.2	58.6 ± 15.9	65.3 ± 9.8	67.9 ± 9.1
Triglyceride(mg/dL)	34.4 ± 12.1	44.1 ± 16.8	39.9 ± 18.3	32.3 ± 13.6	53.4 ± 25.0	30.0 ± 11.2*
Urea nitrogen(mg/dL)	15.39 ± 1.58	15.90 ± 0.77	15.10 ± 1.50	15.74 ± 1.31	17.23 ± 1.64	16.69 ± 2.13
Creatinine(mg/dL)	0.44 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.40 ± 0.00**
Sodium(mEq/L)	142.29 ± 0.95	142.86 ± 0.69	142.50 ± 1.50	141.29 ± 0.57	143.43 ± 1.10	143.21 ± 1.04
Potassium(mEq/L)	4.781 ± 0.220	4.383 ± 0.416	4.557 ± 0.280	4.777 ± 0.454	4.436 ± 0.356	4.887 ± 0.299*
Chlorine(mEq/L)	105.4 ± 1.9	105.6 ± 1.0	104.7 ± 0.8	106.6 ± 1.0	105.7 ± 1.6	106.9 ± 1.6
Calcium(mg/dL)	9.70 ± 0.22	9.63 ± 0.26	9.47 ± 0.20	9.47 ± 0.24	9.40 ± 0.12	9.20 ± 0.26
Inorganic phosphorous(mg/dL)	8.47 ± 0.33	8.64 ± 0.79	8.61 ± 0.76	7.83 ± 0.33	7.26 ± 0.51	7.94 ± 0.65*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group;*:p≤0.05, **:p≤0.01