Pseudomonas 属菌產生脂質分解酵素 GA-56 の薬理学的研究

そのⅡ GA-56 の急性毒性実験

田村俊吉, 野崎 茂

東京歯科大学薬理学教室 (主任: 田村俊吉教授)

田村実験医学研究所 (所長: 田村俊吉博士)

(昭和47年8月26日受付〔特〕)

緒 言

脂質代謝改善剤として開発された *Pseudomonas* 属の一新菌株から產生される脂質分解酵素 GA-56 が生体にどのような影響を与えるかまず急性毒性を実験した。

実験方法

1) 実験動物

ラットは田村実験医学研究所で1950年から封鎖的に飼育し、すでに発表した管理方法¹⁾で出産飼養させた Wistar 系 albino rat を用いた。

マウスは *dds* 系を用いた。

家兎は雄性家兎を用いた。

これらの実験動物はいずれも温湿度を調節した動物室内で四方金網籠に入れて観察した。ラットは体重約100 g, マウスは体重約18 g になると雌雄それぞれ1群5匹として、当教室の基礎飼料 (碎小麦80, Casein 15, 塩4, 総合 Vitamin 1) ならびに固型飼料と水を与え1週間以上観察し健康と思われる動物について実験した。家兎は体重2.0~2.5 kg のものを用い、固型飼料を与えラット、マウスと同様に1週間以上観察し、健康であることを確かめて実験に供した。

2) 実験に供した薬物

天野製薬株式会社の Lipase 產生菌である *Pseudomonas* 属に属する一新菌株から產生された脂質分解酵素である。

3) 薬物の投与方法および観察方法

GA-56 はその等比級数的用量を動物体重100 gあたり 0.5~3.0 ml の水溶液として用いた。

ラット、マウスについては経口、皮下、腹腔内いずれかの経路により各1回投与し、7日間体重および諸症状を観察するとともに死亡例はそのつどに、また上記期間生存例は実験終了時に屠殺剖検し病理組織学的に検索した。

家兎については経口投与を行ない7日間体重および諸症状を観察した。

薬物の腸管内直接注入は家兎の腹部をよく消毒し正中線を切開し、腹腔を開き、直腸十二指腸破壁より下行部小腸を結紮し、その上部腸管内に注入した。

4) LD₅₀ の評価

LD₅₀ の評価は薬物投与後、72^h 間の成績を *Van der Waerden* 氏法²⁾ によって測定し、その信頼限界を算出した。

実験成績

1) ラットにおける急性毒性

経口、皮下、腹腔内投与の7日間の体重観察は Table 1-1, Table 1-2 に示す通りであり、また LD₅₀ およ

び信頼限界は Table 2 に示す通りである。

死亡例は、経口投与では技術的に投与可能な最大量である 10.4 g/kg でも雌雄ともに 1 例もみられなかった。また皮下投与でも雌雄ともに技術的に投与可能な最大量である 5.0 g/kg でも死亡例は 1 例もみられなかった。

腹腔内投与の LD₅₀ 値は雄では 855 (727~1008) mg/kg, 雌では 634 (554~725) mg/kg で著しい雌雄差は認められなかった。

体重は、7 日間の増減をみると経口投与の場合は 10.4 g/kg の大量でも雌雄いずれも順調に増加した。皮下投与でも増加するものは雌雄いずれも多くの例に認められたが腹腔内投与では雌雄とも 400~600 mg/kg 以上ではほとんど認められなかった。

一般症状としては、経口投与の場合はなんら異常は認められなかった。皮下投与の場合は投与 24^h 後に投与

Table 1-1. Body wt. change in male rats.

Route	Dose (mg/kg)	No.	Start (g)	Days						
				1	2	3	4	5	6	7
p.o.	10400	1	132	133	138	143	150	156	166	173
		2	136	139	144	148	153	157	151	165
		3	136	136	139	142	145	147	149	150
		4	130	132	136	140	144	150	153	159
		5	131	133	137	140	143	149	152	156
s.c.	5000	1	135	123	113	120	128	135	132	133
		2	133	123	108	98	107	118	120	122
		3	135	118	94	113	115	122	122	128
		4	135	121	108	126	130	138	140	150
		5	128	115	107	110	120	135	135	140
i.p.	580	1	124	120	121	123	126	129	133	136
		2	135	132	136	138	139	140	142	145
		3	137	138	139	140	140	142	143	145
		4	132	130	130	132	136	139	141	144
		5	127	125	126	128	130	131	131	130
	694	1	125	121	115	*				
		2	133	118	110	*				
		3	137	132	128	125	126	130	133	137
		4	128	120	117	116	118	120	125	130
		5	122	116	112	110	113	115	120	126
	833	1	127	120	*					
		2	133	*						
		3	131	125	123	125	127	127	128	127
		4	122	117	117	119	119	120	122	123
		5	146	140	138	141	140	142	145	145
	1000	1	145	*						
		2	125	122	108	97	102	109	110	110
		3	135	*						
		4	125	116	113	108	100	95	95	98
		5	130	*						
	1200	1	136	*						
		2	142	*						
		3	136	130	123	120	115	119	119	118
		4	127	118	110	*				
		5	131	*						
	1440	1	132	*						
		2	145	*						
		3	145	*						
		4	120	*						
		5	131	*						

* death

Table 1-2. Body wt. change in female rats.

Route	Dose (mg/kg)	No.	Start (g)	Days						
				1	2	3	4	5	6	7
p.o.	10400	1	130	130	132	136	139	144	150	157
		2	125	127	129	133	138	142	147	150
		3	128	129	132	136	140	143	148	153
		4	135	138	141	146	150	153	159	165
		5	130	132	136	142	148	153	159	166
s.c.	5000	1	125	116	115	112	115	116	122	125
		2	125	115	110	108	110	111	115	115
		3	117	108	106	100	108	112	123	130
		4	117	114	115	102	100	108	120	122
		5	125	123	117	118	120	121	126	127
i.p.	483	1	148	143	140	145	147	150	150	155
		2	128	135	135	137	139	139	142	142
		3	155	158	160	155	157	159	158	160
		4	140	141	145	140	142	145	147	146
		5	155	155	168	158	160	165	162	166
	580	1	145	135	*					
		2	130	125	*					
		3	135	130	130	135	135	140	142	142
		4	120	111	105	102	101	100	101	102
		5	130	122	110	105	106	105	99	105
	694	1	135	*						
		2	120	105	*					
		3	130	130	124	124	130	128	130	132
		4	140	125	*					
		5	120	105	100	100	100	96	100	102
	833	1	145	135	*					
		2	130	130	*					
		3	145	*						
		4	135	128	*					
		5	130	118	110	105	106	108	112	110
	1000	1	135	*						
		2	125	*						
		3	140	*						
		4	145	*						
		5	130	*						

* death

部位にかなり広範囲の壊死がみられ、自発運動の抑制、立毛、眼瞼下垂を呈し、衰弱の傾向が強く認められたが投与後3～4日頃から回復し体重も増加するものが多かった。腹腔内投与の場合は、死亡例では投与数時間後から自発運動の抑制、立毛、眼瞼下垂を呈し、時間の経過と共に接触刺激に対する反応性は低下し、無関心となり、うずくまり、あるいは横臥位となったまま死亡するものがみられた。死亡を免がれたものは低薬用量からしだいに回復した。

剖検および病理組織学的所見は、本学病理学教室山村武夫教授によれば経口投与の場合、薬物投与部位である胃および腸は正常であり、炎症症状および潰瘍などは何ら認められなかった (Photo. 1～3)。また他の臓器についても何ら異常は認められなかった。皮下投与の場合、皮下の投与局所は広範の部位にわたる出血および壊死がみられ組織学的には皮下組織および筋層に中等度の好中球を主とした細胞浸潤と出血がみられた以外は他の臓器について特記すべき変化はみられなかった。腹腔内投与の場合、投与部位である腹腔内の臓器および他の諸臓器に特記すべき所見は認められなかった。

なおこれらの所見について雌雄間に差異を認めなかった。

Table 2. LD₅₀ values and confidence limits in male and female rats.

Route	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)	Confidence limit (mg/kg, p=0.05)
p.o.	10400	♂ 5	0		
	10400	♀ 5	0		
s.c.	5000	♂ 5	0		
	5000	♀ 5	0		
i.p.	1440	5	5	855	(727~1008)
	1200	5	4		
	1000	♂ 5	3		
	833	5	2		
	694	5	2		
	580	5	0		
	1000	5	5	634	(554~ 725)
	833	5	4		
	694	♀ 5	4		
	580	5	2		
	483	5	0

Photo. 1. Fundus ventriculi of male rat.
(GA-56, 10.4 g/kg, p.o., ×60, H-E stain)

Photo. 2. corpus ventriculi of male rat.
(GA-56, 10.4 g/kg, p.o., ×60, H-E stain)

Photo. 3. Intestine of male rat.
(GA-56, 10.4 g/kg, p.o., $\times 60$, H-E stain)

2) マウスにおける急性毒性

経口, 皮下, 腹腔内投与の7日間の体重観察は Table 3-1, Table 3-2 に示す通りであり, また LD₅₀ および信頼限界は Table 4 に示す通りである.

Table 3-1. Body wt. change in male mice.

Route	Dose (mg/kg)	No.	Start (g)	Days						
				1	2	3	4	5	6	7
p.o.	10400	1	23	23	25	28	28	28	28	27
		2	21	21	21	22	22	22	22	24
		3	21	20	19	20	22	22	22	23
		4	21	21	22	22	23	23	22	23
		5	18	19	19	19	22	22	21	20
s.c.	1400	1	19	20	20	21	22	22	23	24
		2	21	20	19	20	22	22	22	23
		3	21	21	22	22	23	23	22	23
		4	18	19	19	19	22	22	21	20
		5	20	20	20	21	21	21	21	23
	1680	1	22	*						
		2	19	18	18	15	18	18	19	19
		3	23	22	21	18	18	19	19	18
		4	20	19	19	16	18	18	19	19
		5	20	18	17	14	17	17	18	20
	2016	1	20	*						
		2	23	*						
		3	21	20	18	18	19	19	20	21
		4	24	21	20	20	20	21	23	23
		5	20	18	17	17	17	18	18	19
	2419	1	25	*						
		2	25	*						
		3	24	21	*					
		4	21	20	18	*				
		5	20	28	17	17	17	18	19	19
	2903	1	25	22	*					
		2	20	*						
		3	23	*						
		4	20	20	*					
		5	25	21	*					

i.p.	279	1	22	24	25	25	25	26	25	26
		2	24	26	26	26	27	27	27	28
		3	23	21	23	22	23	23	24	24
		4	20	18	18	17	17	18	18	19
		5	24	26	27	27	28	27	27	28
	335	1	21	17	*					
		2	22	25	24	23	22	23	24	25
		3	21	22	23	22	22	23	23	24
		4	25	*						
		5	20	17	16	16	17	17	16	18
	402	1	22	*						
		2	23	20	20	19	19	20	21	21
		3	21	19	*					
		4	25	*						
		5	20	19	18	18	19	20	21	22
	483	1	25	25	24	26	26	26	26	27
		2	24	22	*					
		3	24	*						
		4	20	*						
		5	21	*						
	580	1	25	23	*					
		2	23	20	21	22	23	23	24	24
		3	22	20	*					
		4	20	*						
		5	22	20	*					
	694	1	23	*						
		2	24	*						
		3	23	*						
		4	22	*						
		5	24	*						

* death

死亡例は、経口投与では雌雄ともに技術的に投与可能な最大量である 10.4 g/kg でも 1 例もみられなかった。

皮下投与の LD₅₀ 値は雄で 2.05 (1.80~2.34)g/kg, 雌では 2.55 (2.28~2.85)g/kg であった。

腹腔内投与の LD₅₀ 値は雄では 395 (339~459)mg/kg, 雌では 548 (463~647)mg/kg であった。以上の所見から皮下、腹腔内投与のいずれにおいても著しい雌雄差は認められなかった。

体重は、7 日間の増減をみるとラットの場合と同じように経口投与の場合は 10.4 g/kg の大量でも雌雄いずれも順調に増加した。皮下および腹腔内投与でも死亡例を出さない少薬用量では体重は減少しなかった。

一般症状としては、経口投与の場合はなんらの異常は認められなかった。皮下投与の場合はラットと同様に投与後 24 時間で投与部位に壊死がみられ自発運動の抑制、立毛、眼瞼下垂を呈し、うずくまりあるいは横臥位となったまま死亡した。腹腔内投与の場合は投与後数時間頃から皮下投与と同じように自発運動の抑制、立毛、眼瞼下垂を呈し、時間の経過とともに接触刺激に対する反応性は低下し、無関心となり、うずくまり横臥位となったまま死亡した。

剖検および組織学的所見としては、ラットの場合と同様で皮下投与の場合の投与局所の出血、壊死が認められただけで諸臓器に特記すべき異常所見は認められなかった。

なおこれらの所見に雌雄差は認められなかった。

3) 家兎における急性毒性

技術的に投与可能な最大量 5.0 g/kg を 5 羽の家兎に経口投与したが死亡例は一例もみられず、また一般症状も何等異常を認めなかった。

Table 3-2. Body wt. change in female mice.

Route	Dose (mg/kg)	No.	Start (g)	Days						
				1	2	3	4	5	6	7
p.o.	10400	1	23	23	23	23	24	25	25	26
		2	21	20	23	21	23	24	23	24
		3	24	25	26	26	28	28	27	29
		4	22	23	24	23	26	26	27	27
		5	23	24	25	25	25	26	27	27
s.c.	2016	1	23	20	20	20	18	22	23	24
		2	25	25	24	24	21	25	25	26
		3	23	22	21	22	19	20	21	22
		4	23	20	19	20	20	20	21	23
		5	25	26	25	22	21	21	22	24
	2419	1	21	20	19	19	20	21	21	21
		2	24	21	20	*				
		3	23	*						
		4	25	22	22	21	20	20	21	21
		5	22	20	21	21	22	23	23	23
	2903	1	25	22	*					
		2	25	25	*					
		3	24	23	24	23	25	26	26	27
		4	21	18	*					
		5	22	22	*					
	3483	1	25	*						
		2	23	20	*					
		3	21	*						
		4	24	*						
		5	22	*						
i.p.	335	1	23	22	24	24	23	24	25	25
		2	22	22	24	23	24	24	25	25
		3	24	25	25	25	25	24	25	26
		4	25	24	25	25	26	25	27	27
		5	25	25	25	24	26	26	27	26
	402	1	24	21	23	20	22	23	23	24
		2	24	21	*					
		3	24	23	25	26	28	28	28	29
		4	24	21	23	22	23	23	24	25
		5	22	20	22	22	24	24	23	25
	483	1	25	25	25	27	27	28	30	29
		2	25	22	21	21	22	24	25	25
		3	24	*						
		4	22	20	*					
		5	24	22	23	23	24	23	24	25
	580	1	23	20	*					
		2	23	22	24	23	24	23	24	24
		3	21	20	21	21	20	20	21	21
		4	21	*						
		5	25	*						
	694	1	25	25	24	26	26	26	26	27
		2	23	20	19	18	18	18	19	19
		3	22	20	*					
		4	24	22	*					
		5	21	*						
	833	1	23	*						
		2	25	*						
		3	23	*						
		4	25	23	*					
		5	24	*						

* death

Table 4. LD₅₀ values and confidence limits in male and female mice.

Route	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)	Confidence limit (mg/kg, p=0.05)
p.o.	10400	♂ 5	0		
	10400	♀ 5	0		
s.c.	2903	5	5		
	2419	5	4		
	2016	♂ 5	2	2050	(1800~2340)
	1680	5	1		
	1400	5	0		
	3483	5	5		
	2903	5	4		
	2419	♀ 5	2	2550	(2280~2850)
	2016	5	0		
i.p.	694	5	5		
	580	5	4		
	483	5	4		
	402	♂ 5	3	395	(339~ 459)
	335	5	2		
	279	5	0		
	833	5	5		
	694	5	3		
	580	5	3		
	483	♀ 5	2	548	(463~ 647)
	402	5	1		
	335	5	0		

4) 腸管内直接注入実験

無麻酔家兎を用い、小腸を実験方法で述べたようにとり出して、結紮しその上部腸管内に GA-56 700 mg/ml, 2 ml の液を直接注射器で注入し、1^h 後に空気栓塞で殺して注入部の肉眼的観察および病理組織学的検索を行った。

GA-56 投与群の腸の肉眼的所見および病理組織学的所見は本学病理学教室 山村武夫教授によれば対照群と差異がなく、GA-56 の直接作用として腸管への起炎作用はなかった (Photo. 3, 4)。

Photo. 4. Intestine of rabbit.
(control, ×60, H-E stain)

Photo. 5. Intestine of rabbit.
(GA-56, $\times 60$, H-E stain)

考 察

各投与ルートの結果を観察すると、まず経口的にはラット、マウス、家兎に技術的に投与可能な範囲で毒性は全く認められなかった。すなわち技術的に投与可能な最大量でも死亡例はみられず、また投与部位である胃、腸および他の諸臓器は肉眼的にも病理組織学的にも何ら異常は認められなかった。

非経口的投与では、皮下投与の場合にはラットではやはり技術的に投与可能な範囲で死亡例は認められなかった。マウスでは LD_{50} 値が雄では 2,050 mg/kg, 雌では 2,550 mg/kg であり著しい雌雄差はなく毒性は非常に低かった。投与部位は、病理組織学的には皮下組織および筋層に出血および細胞浸潤が認められたが他の諸臓器には肉眼的にも病理組織学的にも特記すべき所見は認められなかった。

腹腔内投与の場合には、 LD_{50} 値はラットの場合雄では 855 mg/kg, 雌では 634 mg/kg マウスの場合雄では 395 mg/kg, 雌では 548 mg/kg であり著しい雌雄差は認められなかった。病理組織学的には各諸臓器に特記すべき異常所見は認められなかった。

またこのような高度の活性のある酵素を腸管内に大量摂取した後の病理変化は極めて興味深いものであったが 700 mg/ml, 2 ml の投与でもほとんど変化がなかったことから経口的投与は安全であるといえる。

結 論

GA-56 は経口投与ではラット、マウス、家兎には毒性を証明することは全く不可能であった。またこれの腸管内投与も極めて大量で病理組織学的変化をほとんど惹起しないことから経口的には極めて安全な薬物といえる。

謝 辞

拙筆に臨み、病理組織学的検査を行なわれた本学病理学教室山村武夫教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 田村俊吉：日小誌, **66**, 725 (1962).
- 2) Van der Waerden, B. L.: Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., **195**, 389, (1940).

ABSTRACT

TAMURA Shunkichi and **NOZAKI Shigeru**. Department of Pharmacology, Tokyo Dental College, Tokyo, Tamura Research Raboratory for Experimental Medicine, Funabashi, Chiba. *Pharmacological studies of a lipase GA-56 produced by Pseudomonas sp. II. Acute toxicity of GA-56*. Folia pharmacol. japon. **69**, 191~200 (1973).

This paper describes an experimental study of the acute toxicity of GA-56.

In rats, mice and rabbits GA-56 revealed no toxicity with oral administration even when the maximum dose was administrated.

Moreover, no pathological changes were observed intestine following an intraintestinal administration of GA-56 in a large dose.