Originals

Lentinan のマウスおよびラットにおける急性毒性試験

味の素株式会社中央研究所, 生物科学研究所

森雪弘文, 市村正道

ACUTE TOXICITY OF LENTINAN IN MICE AND RATS

Hirofumi MORIYUKI and Masamichi ICHIMURA

Life Science Laboratory Central Research Laboratories

Ajinomoto Co., Inc.

214 Maeda-cho, Totsuka-ku, Yokohama 244, Japan

Abstract.....A new anti-tumor polysaccharide, lentinan (β -1, 3 Glucan) was studied on the acute toxicities using both sexes of mice (ICR) and rats (CD) treated by intravenously (i. v.), intraperitoneally (i. p.), subcutaneously (s. c.) and orally (p. o.). LD50 values in mg/kg body weight were essentially the same regardless of species as well as sexes and estimated as follows : 250-500 (i. v.), > 2500 (i. p., s. c., and p. o.).

Cyanosis, convulsion and death were observed in both species of animals administered (i. v.) with only higher dosages of lentinan. No remarkable toxic signs being specific from lentinan were observed in any cases of treatment, i. p., s. c. and p. o.

Gross findings : enlargement of the spleen (i. v., i. p., s. c.) and coarse nodular surface of the kidneys (i. v.) in the both species of animals, erythema of the ears (i. v., i. p., s. c.) in mice, petechial hemorrhage of the lung and abdomen (i. v.), enlargement of the mesentric lymphonodes (i. v.) and edema of the diaphragm and intestine (i. p.) in rats were observed. In parallel, another sample of lentinan for clinical use prepared by freeze-dried procedure was tested in both sexes of mice and rats treated by i. v. alone, comparing with a original sample mentioned above. So far as the acute toxicities of lentinans concerned, no significant differences between two preparations were observed.

Key words : Lentinan, Acute toxicity.

連絡先: ☎ 244 神奈川県横浜市戸塚区前田町 214 味の素(株)中央研究所・生物科学研究所
森雪弘文

結 言

Lentinan はシイタケ子実体の熱水抽出物を精製して得た主鎖として $\beta(1 \rightarrow 3)$ 結合を有するグルカンであり、マウス皮下に移植した Sarcoma-180 腫瘍の成長を阻害することが見いだされて以来 (Chihara et al., 1969) 癌の非特異的免疫療法剤として種々検討され (Maeda et al., 1971, Shiio et al., 1975) その臨床効果が期待されている。

今回 lentinan の安全性研究の一環として、マウスおよびラットにおける急性毒性試験を行なったので報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質

Lentinan は味の素株式会社で調製されたもので、無味無臭の白色無晶性の粉末である。

2. 使用動物および飼育条件

使用動物は ICR 系マウスおよび SD 系ラットの雌雄 (日本チャールスリバー) を 3 週令で購入し、1 週間予備飼育後使用した。投与時の体重はマウスで 17~24 g, ラットで 80~100 g であった。飼育は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 10\%$ の飼育室で行ない、飼料は固型飼料 (CE-2, 日本クレア) を、水は水道水を自由に摂取させた。

なお、マウスおよびラットは 1 群 10 匹としマウスはポリケージ、ラットは金鋼ケージでそれぞれ 10 匹、5 匹収容して実験を行なった。

3. 投与方法および投与量

投与は静脈内、経口、皮下および腹腔内の 4 経路で 1 回投与とした。

1) 静脈内投与

次に示した 2 種の試料について行なった。

① Lentinan 原末 lentinan をマンニトール 2.5% および塩化ナトリウム 0.5% を含む水溶液に加えプロペラ型ホモゲナイザーを用いて 0.5% の lentinan 溶液とした。この溶液をマウスおよびラットとも体重 100 g あたり 2.5, 5 または 10 ml (125, 250 および 500 mg/kg) を尾静脈内に投与した。

② Lentinan 製剤 lentinan 凍結乾燥製剤 (組成, lentinan. 15 mg, mannitol. 300 mg, dextran40. 30 mg) を 3 ml の注射用蒸留水にとかし、0.5% の lentinan 濃度で投与容量を変えて尾静脈内に投与した。

なお、原末および製剤とも注射速度をマウスで 2 ml/分, ラット 5 ml/分で行なった。

2) 経口投与

Lentinan 原末をイオン交換水に懸濁し技術的に投与可能な 2.5 w/v% とし、マウスおよびラットとも体重 100 g あたり 2.5, 5 および 10 ml (625, 1250 および 2500 mg/kg) を金属製胃ゾンデを用いて胃内に強制投与した。

3) 皮下および腹腔内投与

Acute toxicity of Lentinan in mice and rats

Lentinan 原末を生理食塩液に懸濁し 2.5w/v% とし、マウスおよびラットとも体重 100 g あたり 2.5, 5 および 10 ml を背部皮下または腹腔内に注射した。

なお、各経路の対照として静脈内、皮下および腹腔内投与には生理食塩液、経口投与にはイオン交換水を投与し、投与容量は、各経路の最高投与量とした。

4. 検査項目

1) LD₅₀ 値

投与直後から 2 週間までの累積死亡数から Litchfield-Wilcoxon 法 (Litchfield et al. 1948.,) により LD₅₀ 値を算出した。

2) 中毒症状

投与直後から約 2 時間までの中毒症状と以後 2 週間後までの生死を観察した。

3) 体重

投与前、投与 1 日後、1 週間後および 2 週間後に体重を測定した。

4) 剖検

投与後まもなく死亡した例はすみやかに剖検し、生存例は、2 週間後にエーテル麻酔により屠殺し、主要臓器（主に胸腔内および腹腔内臓器）の肉眼的変化を観察した。

実 験 成 績

1. LD₅₀ 値

マウスおよびラットの各投与経路における LD₅₀ 値を Table 1 および Table 2 に示した。

Lentinan 原末の静脈内投与での LD₅₀ 値は、マウスおよびラット雌雄とも 250~500 mg/kg であった。また lentinan 製剤では、マウスの雌雄でそれぞれ 200, 230 mg/kg, ラット雌雄でそれぞれ 185, 180~260 mg/kg であった。lentinan 原末の経口、皮下および腹腔内投与の LD₅₀ 値は、雌雄とも各経路で 2500 mg/kg 以上であった。従って静脈内投与は他経路にくらべ毒性が強く、特に種差および性差は認められなかった。

2. 中毒症状

投与後約 2 時間以内に発現した症状を Table 3 に示した。

1) 静脈内投与

① Lentinan 原末 マウス：雌雄による著明な差は認められず、対照群とくらべ 125 mg/kg で投与後 10 分頃より鎮静、チアノーゼ、失調性歩行がみられ、250 mg/kg 以上で前記症状に加えて眼球突出、跳躍、旋回、振せんおよび捻転がみられ、約 20 分後には間代性痙攣後死亡する個体がみられた。

ラット：雌雄による著明な差は認められず、対照群とくらべ 5 分頃より耳殻、四肢の発赤がみられ鎮静が継続した。250 mg/kg 以上では前記症状に加えて眼球突出、失調性歩行、30 分頃に強度な鎮静下での死がみられた。

② Lentinan 製剤 マウス：雌雄による著明な差は認められなかった。130 または 135 mg/kg では著明な変化は認められなかった。155~200 mg/kg では投与後まもなく眼球突出、腹臥

Table 1 LD₅₀ values of lentinan and relationships between dosage levels and mortalities in mice.

Sample	Route	Dosage mg/kg		Mortality		LD ₅₀ mg/kg (95% confidence limits)	
				Male	Female	Male	Female
Lentinan powder	i.v	0		0/10	0/10		
		125		0/10	0/10	250-500	250-500
		250		2/10	0/10		
		500		10/10	10/10		
Lentinan freeze-dried powder	i.v	M	F				
		0	0	0/10	0/10		
		135	130	0/10	0/10		
		165	155	0/10	2/10	230 (203-261)	200 (175-228)
		200	185	3/10	4/10		
		240	220	5/10	6/10		
		290	265	9/10	9/10		
		345	320	10/10	10/10		
		415	-	10/10	-		
Lentinan powder	p.o	0		0/10	0/10		
		1250		0/10	0/10	> 2500	> 2500
		2500		0/10	0/10		
	s.c	0		0/10	0/10		
		625		0/10	0/10	> 2500	> 2500
		1250		0/10	0/10		
		2500		0/10	0/10		
	i.p	0		0/10	0/10		
		625		0/10	0/10	> 2500	> 2500
		1250		0/10	0/10		
		2500		0/10	0/10		

姿勢, チアノーゼおよび鎮静がみられ, 220~415 mg/kg では前記症状に加えて呼吸促迫, 痙攣, 立毛, 失調性歩行および死がみられた。415 mg/kg では投与中に興奮した状態での死がみられた。

ラット：雌雄による著明な差は認められず, 対照群にくらべ 125~150 mg/kg では, 投与後まもなく耳殻, 四肢の発赤と浮腫がみられ, さらにチアノーゼ, 失調性歩行および鎮静がみられた。180~215 mg/kg では前記症状に加えて捻転, 旋回を示す例が散見され, 70 分頃に鎮静下での死がみられた。

投与 1 日後にはほぼ正常な動作を示していたが, 途中死亡例が原末および製剤でそれぞれ投与 1~2 日後, 2~3 日後にみられマウスおよびラットとも消瘦していた。またマウス雌雄で投与

Acute toxicity of Lentinan in mice and rats

Table 2 LD₅₀ values of lentinan and relationships between dosage levels and mortalities in rats.

Sample	Route	Dosage mg/kg	Mortality		LD ₅₀ mg/kg (95% confidence limits)	
			Male	Female	Male	Female
Lentinan powder	i.v.	0	0/10	0/10		
		125	0/10	0/10	250-500	250-500
		250	2/10	0/10		
		500	10/10	8/10		
Lentinan freeze -dried powder	i.v.	0	0/10	0/10		
		125	—	0/10		
		150	0/10	2/10	180-260	185 (163-210)
		180	4/10	4/10		
		215	5/10	7/10		
		260	6/10	9/10		
Lentinan powder	p.o.	310	10/10	10/10		
		0	0/10	0/10		
		625	0/10	0/10	> 2500	> 2500
		1250	0/10	0/10		
	s.c.	2500	0/10	0/10		
		0	0/10	0/10		
		625	0/10	0/10	> 2500	> 2500
		1250	0/10	0/10		
	i.p.	2500	0/10	0/10		
		0	0/10	0/10		
		625	1/10	0/10	> 2500	> 2500
		1250	2/10	1/10		
		2500	1/10	0/10		

1 日後より耳殻の発赤が多くみられ実験終了まで継続した。

2) 経口投与

マウスおよびラット雌雄とも 2500 mg/kg で投与後まもなく自発運動の減少を示し、約 20 分頃より鎮静がみられたが 1 日後には回復していた。

3) 皮下投与

マウスおよびラットとも特に中毒症状は認められなかったが、静脈内投与と同様マウスで耳殻の発赤がみられた。

4) 腹腔内投与

マウスおよびラット雌雄とも対照群とくらべ 1250 mg/kg 以上の投与量で投与後まもなく自発運動の減少 20 分頃より鎮静が継続した。マウス雌雄では 30 分頃より 625 mg/kg 以上の投与量

Table 3 Acute toxic signs of lentinan during 2 hrs after dosing in mice and rats.

Sample	Route	Dosage mg/kg	Acute toxic signs
Lentinan powder	i.v.	125	sedation, cyanosis, staggering gait (M), redening and edema (ear, foot) (R).
		250	sedation, staggering gait, cyanosis, jumping (M), abdominal posture, circling (M), tremore (M), redening and edema (ear, foot) (R)
		500	exophthalmus, circling (M), abdominal posture, sedation, jumping (M), cyanosis, rolling (M), convulsion, staggering gait, death (M), redening and edema (ear foot) (R).
Lentinan freeze -dried powder	i.v.	130-135	no remarkable change.
		(125-150) (R)	cyanosis, redening and edema (ear, foot) staggering gait.
		155-200	exophthalmus, abdominal posture, cyanosis.
		(180-215) (R)	staggering gait, redening and edema (ear, foot), cyanosis, sedation convulsion, death.
		220-415	exophthalmus, sedation, abdominal posture, cyanosis, piloerection, staggering gait, tremor, death during dosing.
Lentinan powder	p.o.	(260-310) (R)	sedation, abdominal posture, cyanosis, staggering gait, rolling redening and edema (ear, foot).
		625 (R)	
		1250	no remarkable change.
		2500	accelerative respiration, sedation.
Lentinan powder	s.c.	625 (R)	
		1250	no remarkable change.
		2500	
	i.p.	625	writhing (M)
		1250	sedation, writhing (M) abdominal posture (M).
		2500	writhing(M), abdominal posture (M), sedation, staggering gait (M).

(M) : Mice only, (R) : Rat only.

で Writhing, 失調性歩行, 一部に下痢がみられた。投与 1 日後にはほぼ正常な動作を示していたが途中死亡例がラットで 2~3 日後にみられ, いずれも消瘦していた。また静脈内投与と同様

マウスに耳殻の発赤がみられた。

3. 体重

1) 静脈内投与

① Lentinan 原末 マウスでは特に変化はみられなかった。ラットでは雌雄とも 250 mg/kg で若干の体重増加の抑制がみられた。

② Lentinan 製剤 マウスでは雄の 240 mg/kg, 雌の 220 mg/kg 以上で投与 1 日後より体重増加の抑制がみられ 14 日後まで継続した。ラットでは雌雄とも 150 mg/kg より体重増加の抑制傾向がみられた。

2) 経口投与および皮下投与

マウスおよびラット雌雄とも特に変化は認められなかった。

3) 腹腔内投与

マウスでは雄の 2500 mg/kg で投与 1 日後に投与前体重より低下したが 7 日後には回復した。マウス雌とラット雌雄では特に変化は認められなかった。

4. 剖検

1) 静脈内投与

① Lentinan 原末

マウスおよびラット雌雄の 500 mg/kg の死亡例について剖検したところ、肝および腎の腫脹、腎の全体的な帯白色色調とマウスでは空腸から回腸、ラットでは胃から回腸に散在性の出血がみられた。

生存例ではマウス雌雄の 125, 250 mg/kg に耳殻の発赤、脾の腫脹、250 mg/kg で肺に散発的な陳旧性の点状出血斑と腎の粗面化がみられた。ラット雌雄の 125, 250 mg/kg では肺に点状出血斑、脾および腸間膜リンパ節の腫脹がみられ、250 mg/kg の少数例に脾と腎の癒着、小腸部の出血がみられた。

② Lentinan 製剤

マウスおよびラットの高投与群量群でみられた死亡例は lentinan 原末と同様であった。

生存例ではマウス雌雄の低投与量群で耳殻の発赤、脾の腫脹がみられ、投与量増加にともない前記変化に加えて腎の粗面化がみられた。ラット雌雄では低投与量群より肺の点状出血、脾の腫脹、腹部皮下の出血斑がみられ投与量増加にともないその頻度は増加した。また、小腸およびパイエル板の出血もみられた。

2) 経口投与

マウスおよびラットとも特に変化は認められなかった。

3) 皮下投与

マウス雌雄の各 lentinan 投与群に耳殻の発赤、脾の腫脹がみられた。また背部皮下に試料液の貯留がみられ一部皮膚の潰瘍がみられた。ラット雌雄では、脾の腫脹と背部皮下に試料液の貯留がみられ、投与量増加にともない痂皮または潰瘍がみられた。

4) 腹腔内投与

各 lentinan 投与群に変化がみられマウス雌雄では耳殻の発赤, 脾の腫脹, 腹腔内に不定形白色粒状の試料の残留がみられた。また高投与群では肝と胃の癒着がみられた。ラット雌雄では, 試料の残留, 脾の腫脹, 横隔膜の肥厚, 腸の浮腫および肝と胃などの癒着がみられた。

考察および総括

Lentinan 原末のマウスおよびラット雌雄の静脈内投与での LD₅₀ 値は, いずれも 250~500 mg/kg であり, 製剤では約 200 mg/kg であった。製剤などに用いたマンニトールおよびデキストラン 40 の LD₅₀ 値はマウスにおいてそれぞれ 16.2 g/kg (FAO. Nutr. Meet.), 42 g/kg (Gelin et al) であることから lentinan による毒性がみられた。高投与量群でみられた死は, 中毒症状でチアノーゼ, 跳躍, 旋回, 振せん, 捻転がみられ約 20 分後に間代性痙攣後死亡すること, 剖検所見で肝, 腎の腫脹, 腎の帯白色色調を示すことから, 生理的範囲を越えた投与容量とあいまって Lentinan による急性腎不全, 循環機能への影響によったものと考えられる。また生存例の剖検所見で肺, 脾, 腎および腸に変化がみられている。これは lentinan の主鎖である β (1→3) 結合を加水分解する酵素が植物, バクテリアには広く存在するが (里村, 1964.,) 高等動物には腸間以外に存在していないこと, 他の多糖 mannan (Kumano et al. 1976.,), dextran (Gray. 1953.,), zymosan (Fitzpatrick. 1964.,) と同様網内系細胞に富む組織に多くとりこまれていること, 皮下および腹腔内投与で試料の残留が認められることから, 高分子で代謝されにくいことによる変化と考えられる。

経口投与ではマウスおよびラットとも LD₅₀ 値が 2500 mg/kg 以上であり, 中毒症状, 剖検所見でも著明な変化がみられないことから急性毒性は低いものであった。

腹腔内および皮下投与での LD₅₀ 値は, マウスおよびラットとも 2500 mg/kg 以上であったが代謝されにくいことに起因する変化として, 試料の残留, 腹腔内臓器の癒着および皮膚の潰瘍がみられた。また非経口投与でマウスに耳殻の紅斑がみられたがその理由については不明である。

Lentinan の通常の臨床使用法は, 静脈内投与で 0.01~0.1 mg/kg であることから急性毒性的に毒性は低いものと考えられる。(実験期間: 昭和54年 6 月20日~昭和55年 6 月20日)

文 献

- Chihara. G, Maeda. Y. Y, Hamuro. J, Sasaki. T, Fukuoka. F, (1969): Inhibition of mouse sarcoma -180 by polysaccharide from lentinus edodes (Berk) sing. Nature (Lond). 222. 687-688.
FAO. Nutr. Meet. Rep. Ser. No. 40, WHO/Food Add/67, 29. 160 (1967).
Fitzpatrick. F. W, (1964): Zymosan Annals of the newyork academy of sciences 118. 233-262.
Gelin. L. E, Ingelman. B. (1961): Rheomacrodexa new dextran solution for rheological treatment of impaired capillary flow. Acta Chir. Scand, 122. 294-302.
Gray. I, (1953): Metabolism of plasma expanders studied with Carbon-14-labeled dextran. Am. J. Physiol., 1174. 462-466.
Kumano. N, Kurita. K, Ishikawa. T, Nakai. Y, Konno. K, (1976): Antitumor yeast polysaccharide in the liver and the spleen of mice. Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ-c. 23. 1-4.

Acute toxicity of Lentinan in mice and rats

- Litchfield. J. T, Wilcoxon. F (1948): A simplified method of evaluating dose-effect experiment. J. Pharmacol. Exp. Ther., **96**. 99.
- Maeda. Y. Y, Hamuro. J, Chihara. G, (1971): The mechanism of action of antitumor polysaccharides. I. The effect of antilymphocyte serum on the antitumor activity of lentinan. Int. J. Cancer **8**. 41-46.
- 椎尾 剛, 吉浜 隆, 弓狩康二, (1975): 抗腫瘍性多糖レンチナンの生体免疫機能に対する効果および化学療法剤との併用. 癌と化学療法, **2**. 45-41.
- 里村幸男, 江幡淳子, (1964): β -1.3-グルカナーゼ. 醗酵協会誌, **22**. 162. 169 (1964).