新抗生物質農薬ブラストサイジンS の毒性に関する研究

第1編 ブラストサイジンSの 急性毒性について

高 木 茂*

Studies on Toxicity of Blasticidin S, a New Antibiotic (BcS-series I)

Report I Acute Toxicity of Blasticidin S

Shigeru TAKAGI*

Blasticidin S is a new antifungal substance isolated from the culture broth of streptomyces griseochromogenes Fukunaga by Takeuchi, S., Hirayama, K., et al. in 1957. This antibiotic is remarkably effective against the rice blast both in its control and treatment. It was approved by the government in 1961, and has been put to practical use since then in Japan.

The toxicity of BcS for mammals, however, is rather strong. The chemical has the property to attack selectively mucosa, particularly that of intestine and conjunctiva and cornea of the eye. As a result, some of the workers in manufacturing plants of BcS and the farmers spraying it have come to complain of the eye irritation or disturbances of the digestive organs. For the purpose of reducing such occupational hazards the author made experiments on the acute toxicity of several BcS derivatives and eye and dermal irritations for laboratory animals.

The result was that the acute toxicity was strongest in BcS-free base, moderate in BcS-C (laurylsulfonate salt), and lowest in BcS-3 (benzylamino benzene sulfonate salt).

As the symptoms of BcS poisoning, nasal hemorrhage and diarrhea were noticed.

At necropsy, exsudate was found in the abdomen in most cases of the mice, suggesting the peritonitis; and as histo-pathological findings, spleen showed acute inflammation, liver appeared rather degenerative, and in kidneys congestion was marked.

Blasticidin S (以下 BcS) は竹内、平山ら¹⁾によって

*東京歯科大学衛生学教室 (主任: 上田喜一教授)

昭和40年12月11日受付, 普通掲載

*From the Dept. of Hygiene (Director: Prof. K. Ueda), Tokyo Dental College.

Received for publication, Dec. 11, 1965.

Streptomyces griseochromogenes Fukunaga²⁾ の培養液より抽出された新抗生物質で、イネのイモチ病に対し、顕著な防除ならびに治療効果を示すことが明らかにされた³⁾。抗生物質を農薬、とくに抗カビ剤、または抗菌剤として利用しようとする研究が始められたのは、比較的近年になってからのことであるが、今日では、アグリマイシン、アグリストレップ、アクチジオン、ストレプトマイシン等が使用されるに至り、この方面の研究は急速に進展した。

その主な理由は、吸収された薬剤が局所のみでなく、植物全体にゆきわたること、しかも植物体中で分解され、たとえ動物に毒性のあるものであっても、その毒性を収獲物に残さない利点があるためである⁴⁾。ただし、抗生物質の共通の性質として、やがて病原菌が抵抗性を獲得してくるという欠点がある。この耐性の問題は今後の研究課題として残されようが、いずれにしても、抗生物質ブラストサイジンSを農薬として、イネのイモチ病に応用、実用化しようとする企ては、わが国はもちろん、世界でも初めての試みとして注目されている。

従来、イネのイモチ病に対する治療剤として、慣用、奨用されているものに有機水銀剤、とくに酢酸フェニール水銀製剤があるが、BcSと有機水銀剤とはその阻害機序を多少異にし、前者は菌糸の生育を阻害する方向に主として作用し、後者は孢子の発芽を抑制しようとする方向に主として働く。即ち有機水銀剤は予防効果において優れ、BcSは治療効果において勝るといふ各々の利点があると言われる¹²⁾。しかし有機水銀剤はその原料を主として輸入に依存している関係上、これを農薬として使用することは経済上の損失が大ききばかりでなく、重金属は分解されても毒性を失うことなく植物中に残留し、経口的に人間の体内に介入する可能性が強いことなどの欠点を有するため、これをBcSによって代替しようとする試みは、経済上はもちろん、食品衛生上の見地からも望ましいものと考えられる。

BcSの物理化学的性質は竹内¹⁾、米原⁵⁾らによれば白色針状結晶で、その融点はBcS-遊離塩基で235~236°C、BcS塩酸塩224~225°C、ピクリン酸塩が200~202°C、旋光度は $[\alpha]_D^{110} = +108.4$ (C=1.0%水)、分子量はPerchloric acidを用いた滴定法、塩化白金法、Bergman-Akiya法等によると、それぞれ、356, 356および300-450なる値が得られた。元素分析値は、理論値はC: 47.72, H: 5.72, N: 23.85, O: 22.70, 実測値ではC: 47.11, H: 5.83, N: 24.46, O: 22.58で、S, P, ハロゲン等は含まれていない。水に対する溶解度はBcS-遊離塩基 (pH

9.3) 8,300 $\mu\text{g/ml}$, BcS-ラウリル硫酸塩 (pH 6.0) 235 $\mu\text{g/ml}$, BcS-ベンジルアミノベンゼンスルフォネート (pH 6.0) 1380 $\mu\text{g/ml}$ で、0.1 N HCl 性の60%醋酸水に対しては約 25,000 $\mu\text{g/ml}$ 溶解するが、メタノール、アセトン等の有機溶媒には難溶である。また紫外線照射実験の結果、ケミカルランプ直下で、24時間後も失活せず、加熱安定度試験の結果では100°C 10分間加熱の場合、pH 5~6の場合、最も安定で、pH 4附近で最も不安定、pH 2.0および8.0~9.0の強酸、強アルカリではpH 4.0に比すれば、やや安定である¹⁾。また化学構造も最近の研究によりほぼ決定され、公表された¹⁶⁾。

BcS 製剤は1961年度から市販が許可され、全国的に実用に供せられ、とくに東北、北陸地区の使用量が著しく多い。しかし BcS の哺乳動物に対する毒性は、かなり強いものがあり、とくに結・角膜および粘膜組織を特異的に侵襲する性質を有し、本剤の製造過程に直接関与する従業員および農薬散布者等の間に、眼および消化器官に対する障害を訴えるものが多数現われている。従って BcS の毒性軽減をはかることが今後の先決問題であり、同時にその侵襲機序を明らかにし、これに対する障害の医学的予防対策を確立することが急務とされている。著者は BcS の毒性軽減および、眼ならびに皮膚に対する

障害およびその治療について、動物実験を行なった。

I BcS の毒性

BcS の小動物に対する毒性は下記のように相当に強いが、植物に対して応用した場合の薬害も、原体のままでは強く、実用上難点があった。その結果、薬害軽減の方法が研究されたが、現在のところ、最も有効な方法はアニオン表面活性剤との結合体に導くことで、効力を落さずに薬害を数分の1に低減し得た。そこで、動物に対する毒性もはたして低減されたかどうかを知るために、毒性の高い BcS-遊離塩基および毒性を軽減した誘導体 BcS-C (ラウリル硫酸塩)、BcS-3 (ベンジルアミノベンゼンスルフォン酸塩) について、経口ならびに経皮、皮下急性毒性ならびに亜急性毒性について動物実験を行なった。

1. BcS 遊離塩基型の急性毒性 (LD₅₀)

A) ハツカネズミに対する LD₅₀

1) 急性経口毒性

実験方法：試験試料は BcS-遊離塩基を水溶液とし、1/10 N HCl を加えて乳濁を消失せしめた後使用、実験動物は dd 系ハツカネズミの雄、体重15~20 g のものを

Tab. 1 Acute Oral Toxicity of BcS (free base) for Mice

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	50	3/8	"	5/8	6/8	"	8/8	8/8	100	10.1 (6.9~14.7)*
2	33.3	2/8	3/8	5/8	7/8	"	"	8/8	100	
3	22.2	2/8	3/8	6/8	"	"	7/8	7/8	87.5	
4	14.8	2/8	4/8	"	"	5/8	"	5/8	62.5	
5	9.9	1/8	2/8	3/8	"	"	4/8	4/8	50.5	
6	6.6	0/8	"	1/8	"	"	2/8	2/8	25.0	
7	4.4	0/8	"	"	"	"	"	1/8	12.5	
8	2.9	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

* 95% confidence limits

Tab. 2 Acute Dermal Toxicity of BcS (free base) for Mice

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	200	5/8	"	7/8	8/8	"	"	8/8	100	69.5 (50~96.6)
2	133.3	2/8	3/8	"	5/8	6/8	"	7/8	87.5	
3	88.9	3/8	"	"	4/8	5/8	"	5/8	62.5	
4	59.3	1/8	"	"	2/8	"	3/8	3/8	37.5	
5	39.5	0/8	"	"	"	1/8	"	1/8	12.5	
6	26.3	0/8	"	"	1/8	"	"	1/8	12.5	
7	17.5	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

使用した。1薬量レベルに対し8匹を用い、レベル比は1.5とし、表1のように8レベルをとり、上記水溶液を体重20gに対し、0.2 mlを金属製ゾンデで胃内に注入、1週間観察した。LD₅₀ 値の算出は Litchfield-Wilcoxon⁶⁾ の図計算 Probit 法によった。

実験成績：表1のように、LD₅₀ 10.1 mg/kg (95%信頼限界6.9~14.7 mg/kg) で特異な中毒症状は認められず、動作緩慢、呼吸困難、軟便となり、死亡したものは腹部膨満のみられるものが多かった。

2) 急性経皮毒性

実験方法：試料は純アルコール8、水1、1/10 N HCl 1の割合で混じた塩酸アルコール溶液に溶解したものを使用。実験動物は dd 系ハツカネズミの雄18~21 g のものを使用。動物の背部肩胛骨中間部を2×2 cm² にわたり剪毛し、体重20 gに対し、薬液0.1 mlを均等に塗布、

乾燥せしめ、1週間観察した。レベル比は1.5、7レベルをとった。

実験成績：経日死亡率は表2のとおりで、LD₅₀ 69.5 mg/kg、95%信頼限界50~96.6 mg/kgであった。中毒症状は急性経口毒性とほとんど同じである。

3) 急性皮下毒性

実験方法：BcS 遊離塩基に1/10 N HCl を加え、水溶液としたものを使用。実験動物は dd 系ハツカネズミ20~30 g のものを使用、薬液を体重20 gに対して、0.1 mlを皮下に投与、1週間観察した。レベル比は1.5、6レベルをとった。

実験成績：LD₅₀ 1.6 mg/kg、95%信頼限界1.1~2.4 mg/kg で、中毒症状は経口毒性とほぼ同様であるが、高濃度群では注射部付近に潰瘍を生じ、脱毛するものもある。

Tab. 3 Acute Subcutaneous Toxicity of BcS (free base) for Mice

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	4.5	0/8	2/8	5/8	8/8	"	"	8/8	100	1.6 (1.1~2.4)
2	3.0	0/8	"	2/8	4/8	7/8	8/8	8/8	100	
3	2.0	0/8	"	"	1/8	3/8	4/8	5/8	63	
4	1.3	0/8	"	"	"	"	1/8	3/8	38	
5	0.87	0/8	"	"	"	1/8	"	1/8	13	
6	0.58	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

Tab. 4 Acute Oral Toxicity of BcS (free base) for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	45	2/8	7/8	8/8	"	"	"	8/8	100	16.3 (12~25.6)
2	30	0/8	4/8	5/8	"	6/8	"	6/8	75	
3	20	0/8	2/8	"	3/8	5/8	"	5/8	62.5	
4	13.3	0/8	2/8	"	"	"	3/8	3/8	37.5	
5	8.9	0/8	"	"	1/8	2/8	"	2/8	25	
6	5.9	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

B) シロネズミに対する LD₅₀

1) 急性経口毒性

実験方法：BcS 結晶に1/10 N HCl を注加し、完全溶解してから全量100 mlとし、原液とする。これを1.5倍宛希釈し、各レベルの濃度溶液を調製、6レベルとする。実験動物はシロネズミの雄68~75 g のものを使用。薬液を体重70 gに対して0.2 ml宛胃内に注入、1週間観察した。LD₅₀ の算出は Litchfield-Wilcoxon によった。

実験成績：表4に示すように LD₅₀ 16.3 mg/kg、95%

信頼限界12.0~25.6 mg/kgであった。中毒症状は呼吸困難、鼻出血、下痢とうを示し、死亡したものにはほとんど腹部膨満が観察された。

2) 急性経皮毒性

実験方法：試料の調整はハツカネズミの経皮急性毒性試験と同様のものを使用。実験動物はシロネズミの雄70~75 g のもの、各濃度群とも8匹ずつを使用。動物の背部肩胛骨中間部を2×3 cm² にわたり剪毛し、体重70 gに対して薬液0.2 mlを均等に塗布、乾燥せしめ、1週間観察した。

Tab. 5 Acute Dermal Toxicity of BcS (free base) for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	150	2/8	"	4/8	5/8	"	7/8	8/8	100	75.5 (57.1~99.7)
2	100	2/8	"	"	"	4/8	6/8	6/8	75	
3	66.7	0/8	"	"	1/8	3/8	"	3/8	37.5	
4	44.5	0/8	"	"	"	"	1/8	1/8	12.5	
5	29.3	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

Tab. 6 Acute Subcutaneous Toxicity of BcS (free base) for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	10.2	1/6	6/6	"	"	"	"	6/6	100	3.1 (2.4~4.0)
2	6.8	0/6	5/6	"	"	"	"	6/6	100	
3	4.5	0/6	"	"	3/6	5/6	"	5/6	83	
4	3	0/6	"	1/6	"	"	2/6	2/6	33	
5	2	0/6	"	"	"	1/6	"	1/6	17	
6	1.3	0/6	"	"	"	"	"	0/6	0	
7	0.9	0/6	"	"	"	"	"	0/6	0	

実験成績：表5に示すように LD₅₀ 75.5 mg/kg, 95% 信頼限界 57.1~99.7 mg/kg で、中毒症状はハツカネズミの経皮急性毒性とはほぼ同様である。

3) 急性皮下毒性

実験方法：薬液の調整は、1) 経口急性 の項と同様で、薬液をシロネズミ (体重100~120 g) の雄、体重100 g に対して0.1 ml を皮下に投与、1週間観察した。

実験結果：表6に示すように LD₅₀ 3.1 mg/kg, 95% 信頼限界 2.4~4.0 mg/kg で、中毒症状は呼吸困難、振顫、歩行障害等を示し、注射局所付近に脱毛、潰瘍を生ずるものもある。

2. BcS-C (プラストサイジン・ラウリル硫酸塩) の急性毒性 (LD₅₀)

A) ハツカネズミに対する LD₅₀

1) 急性経口毒性

実験方法：BcS-C は難溶性なので、4%澱粉溶液に懸濁したものを使用、実験動物は dd 系ハツカネズミの雄、体重16~21 g のものを使用した。

実験成績：表7に示すように LD₅₀ 13.5 mg/kg, 95% 信頼限界 9.6~19.2 mg/kg であった。中毒症状はBcS 遊離塩基型の投与によるそれとはほぼ同様であるが、とくに下痢が著明であった。

B) シロネズミに対する LD₅₀

1) 急性経口毒性

実験方法：薬液の調製はハツカネズミの経口毒性の場合と同様で、体重100 g に対して0.2 ml の薬液を金属製ゾンデで胃内に注入、1週間観察した。

実験成績：経日死亡率は表8のとおりで、LD₅₀ 39.5

Tab. 7 Acute Oral Toxicity of BcS-C (laurylsulfonate salt) for Mice

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	45	0/8	4/8	7/8	8/8	"	"	8/8	100	13.5 (9.6~19.2)
2	30	0/8	"	3/8	4/8	"	6/8	7/8	87.5	
3	20	0/8	"	1/8	"	3/8	5/8	5/8	62.5	
4	13.3	0/8	"	"	1/8	3/8	"	4/8	50	
5	8.9	0/8	"	"	1/8	"	"	2/8	25	
6	5.9	0/8	"	"	"	"	1/8	1/8	12.5	

Tab. 8 Acute Oral Toxicity of BcS-C for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	150	7/8	"	8/8	"	"	"	8/8	100	39.5 (25~62.4)
2	100	4/8	5/8	"	7/8	"	"	7/8	87.5	
3	66.7	1/8	"	3/8	4/8	"	5/8	5/8	62.5	
4	44.5	0/8	"	2/8	"	4/8	"	4/8	50	
5	29.7	1/8	"	"	2/8	"	3/8	3/8	37.5	
6	19.8	0/8	"	"	1/8	2/8	"	3/8	37.5	
7	13.2	0/8	"	"	1/8	"	"	1/8	12.5	

Tab. 9 Acute Dermal Toxicity of BcS-C for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD ₅₀ mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	900	4/8	6/8	7/8	"	8/8	"	8/8	100	220 (116~418)
2	600	5/8	"	"	6/8	"	7/8	7/8	87.5	
3	400	2/8	"	3/8	"	5/8	"	5/8	62.5	
4	266.7	0/8	3/8	"	4/8	"	"	5/8	62.5	
5	177.8	1/8	"	"	2/8	3/8	"	3/8	37.5	
6	118.5	0/8	"	"	1/8	"	2/8	2/8	25	
7	79	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	
8	52.7	0/8	"	"	1/8	"	"	1/8	12.5	

mg/kg, 95%信頼限界 25.0~62.4 mg/kg で, 中毒症状は呼吸困難, 過敏, 鼻出血, 下痢等で, 腹部膨満が認められた。

2) 急性経皮毒性

実験方法: 薬液は4%澱粉溶液に懸濁したものを使用, 動物の背部肩胛骨中間部を2×3 cm²にわたり剪毛し, 体重100 g に対し, 0.2 ml の薬液を塗布, 乾燥せしめ, 油紙でおおい, テープで固定し, 1週間観察した。

実験成績: 表9に示すとおり, LD₅₀ 220 mg/kg, 95%信頼限界 116~418 mg/kg で, 中毒症状はBcS-遊離塩基

型のシロネズミにおける経皮毒性と同じである。

C) モルモットに対する急性経口毒性

実験方法: BcS-C 粉末を4%澱粉溶液に懸濁したものを試料とし, 動物は体重290~320 g の雄を使用, 体重100 g に対し, 0.2 ml を金属製ゾンデで胃内に注入, 24時間観察した。LD₅₀ の算出には Brownlee⁷⁾ の Up and down 法によった。観察期間は24時間である。

実験成績: 表10に示すとおり, LD₅₀ 32.1 mg/kg で, 中毒症状はシロネズミ, ハツカネズミのそれとほぼ同様である。

Tab. 10 Acute Oral Toxicity of BcS-C for Guinea Pigs

i	log D (y)	Dose mg/kg	Runs (n)										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	1.667 (y ₀ +2d)	47.5					×						
1	1.577 (y ₀ +d)	37.8		×		○		×					
0	1.477 (y ₀)	30	○		○				×		×		□
-1	1.377 (y ₀ -d)	23.8								○		○	
-2	1.277 (y ₀ -2d)	15.9											

By Brownlee's up and down method

(y₀=1.477 d=0.1 ×……dead, ○……alive)

$\bar{\mu}=c/n=0.3$

log ED₅₀=y₀+ $\bar{\mu}$ d=1.507

∴ED₅₀(oral)=32.1 mg/kg

Tab. 11 Acute Oral Toxicity of BcS-C for Rabbits

i	log D (y)	Dose mg/kg	Runs (n)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
2	1.9 (y_0+2d)	79.4								
1	1.8 (y_0+d)	63.1		×						
0	1.7 (y_0)	50	○		×		○	×		□
-1	1.6 (y_0-d)	39.8				○			○	
-2	1.5 (y_0-2d)	31.6								

By Brownlee's up and down method

 $(y_0=1.7 \quad d=0.1 \quad \times \cdots \cdots \text{dead} \quad , \quad \circ \cdots \cdots \text{alive})$ $\bar{u}=c/n=-0.143$ $\log ED_{50}=y_0+\bar{u}d=1.686$ $\therefore ED_{50}(\text{oral})=48.5 \text{ mg/kg}$ **D) 家兎に対する急性経口毒性**

実験方法：モルモットの経口毒性と全く同様で、動物は体重 2,500~2,800 g の雄を使用、 LD_{50} の算出も同じく Brownlee の Up and down 法によった。

実験成績：表11に示すように、 LD_{50} 48.5 mg/kg で、とくに著しい中毒症状は認められなかった。

3. BcS-3 (プラストサイジン・ベンジルアミノベンゼンスルホン酸塩) の急性毒性**A) ハツカネズミに対する LD_{50}**

1) 急性経口毒性

実験方法：BcS-3 粉末を 2% 澱粉溶液に懸濁したものを試料とし、動物は体重 17~20 g の dd 系ハツカネズミの雄を使用、体重 20 g に対して、薬液 0.1 ml を胃内に注入、1 週間観察した。またレベル比は 1.5 とし、7 レベルをとった。

実験成績：表12に示すとおり、 LD_{50} 33 mg/kg、95%信頼限界 18.4~59.1 mg/kg であった。中毒症状は振顫、動作緩慢を示し、体毛は光沢を失い、灰色を帯び、汚染し、下痢を起すものが多い。剖検所見では腹腔内に淡黄色の浸出液の貯溜を認めた。

Tab. 12 Acute Oral Toxicity of BcS-3 (benzyl-amino benzene sulfonate salt) for Mice

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD_{50} mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	90	0/8	3/8	5/8	"	8/8	"	8/8	100	33.0 (18.4~59.1)
2	60	0/8	2/8	3/8	4/8	5/8	6/8	6/8	75	
3	40	0/8	"	"	1/8	2/8	3/8	4/8	50	
4	26.7	0/8	"	"	1/8	3/8	"	4/8	50	
5	17.8	0/8	"	"	"	2/8	"	2/8	25	
6	11.9	0/8	"	"	1/8	"	"	1/8	12.5	
7	7.2	0/8	"	"	"	"	"	0/8	0	

Tab. 13 Acute Oral Toxicity of BcS-3 for Rats

Level No.	Dose mg/kg	Cumulative death rate for 7 days							%	LD_{50} mg/kg
		1	2	3	4	5	6	7		
1	120	3/6	6/6	"	"	"	"	6/6	100	53.3 (39.2~72.5)
2	80	1/6	4/6	6/6	"	"	"	6/6	100	
3	53.3	1/6	"	3/6	"	"	"	3/6	50	
4	35.5	1/6	"	"	"	"	"	1/6	16.7	
5	23.6	0/6	"	"	"	"	"	0/6	0	

B) シロネズミに対する LD₅₀

1) 急性経口毒性

実験方法：試料として BcS-3 粉末を 2% 澱粉溶液に懸濁したものを、ウィスター系シロネズミ（体重 95～110 g）の雄に、体重 100 g に対し 0.2 ml になるよう、薬液を胃内に注入、1 週間観察した。

実験成績：表 13 に示すように、LD₅₀ 53.3 mg/kg, 95% 信頼限界 39.2～72.5 mg/kg で、中毒症状は動作緩慢となり、やがて鼻出血、流涎を示し、体毛は光沢を失い、汚染され、腹部膨満し、軟便、下痢症状を示して死亡する。シノテスト試験法による尿中潜血反応は陽性で、腎

組織における障害が疑われた。

4. BcS-3 の亜急性経口毒性

実験方法：実験動物としてウィスター系シロネズミの雄、体重 120～140 g を用いて、BcS-3 の LD₅₀ 量 (53.5 mg/kg) の 1/4 (13.4 mg/kg), 1/8 (6.7 mg/kg), 1/16 (3.3 mg/kg) 量の 3 群および対照群に分けて、BcS-3 を 2% 澱粉溶液に懸濁した検液を、体重 100 g につき 0.2 ml のわりで、金属製ゾンデで毎日胃内に注入して症状を観察し、あわせて体重の変化も測定した。飼育条件は急性毒性の時と全く同様にした。

Tab. 14 Subacute Oral Toxicity of BcS-3 for Rats (Daily change of body weight)

Dose mg/kg	Days Anim. No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	20
13.2	1	133	dead								
	2	132	114	dead							
	3	135	131	118	—	dead					
6.7	4	120	112	dead							
	5	133	125	111	—	100	88	dead			
	6	130	128	126	—	dead					
3.3	7	120	115	125	—	113	125	128	137	141	172.2
	8	138	141	143	—	128	143	140	134	136	176
	9	131	132	131	—	115	119	108	100	98	dead*
Cont.	10	145	143	147	—	149	163	167	167	168	199
	11	136	134	146	—	141	154	157	165	167	227.6
	12	139	134	145	—	139	154	153	159	158	180

* Dead at the 13th day

実験成績：経口亜急性毒性の成績を表 14 に示す。すなわち LD₅₀ 量 1/16 では、3 匹中 2 匹は 20 日を経過しても死亡しなかった。中毒症状は経口急性の場合とほぼ同様であるが、とくに軟便、下痢が著明である。

5. 病理組織所見

BcS-遊離塩基型投与による急性経口、亜急性経口、および急性皮下中毒によって死亡したハツカネズミについて病理組織標本を作製し、脾、腎および肝について、それぞれ、その変化を検索した。

写真 1 は BcS-free base 70 mg/kg 経口投与後、第 1 日目に死亡したハツカネズミの肝で、核の膨大および変性が著明で、グリソン鞘に好中球あるいは小円形細胞の浸潤を認める。写真 2 は腎で、糸球体および細尿管にうっ血を認める。写真 3 はハツカネズミに BcS-free base を

300 mg/kg 皮下に投与、第 1 日目に死亡した動物の脾で、脾髄における髄索と脾竇の区別不明瞭で、写真 1 より強度である。写真 4 は肝で、核の膨大と変性を認め、軽度の核消失を認める。写真 5 は腎で、全体にうっ血を認め、とくに細尿管で著明である。写真 6 は BcS-free base 3 mg/kg を連日経口投与、7 日目に死亡した動物の肝で、核は増多し、肝全体はうっ血し、肝細胞に軽度の萎縮が認められる。写真 7 は腎で、全体にうっ血を認めるが、とくに糸球体、細尿管に著明である。写真 8 は 5 mg/kg 連日経口投与後、7 日目に死亡した動物の肝で、肝細胞の核は消失し、一部に脂肪変性および壊死を認める。

病理組織所見の総括

1) 腎はいずれも糸球体および細尿管におけるうっ血が著明である。

Photo 1 Liver (mouse, BcS 70 mg/kg orally).

Photo 2 Kidney (mouse, BcS 70 mg/kg orally).

Photo 3 Spleen (mouse, BcS 300 mg/kg dermally).

Photo 4 Liver (mouse, BcS 300 mg/kg dermally).

- 2) 肝は核の膨大、脂肪変性等の退行性変化が認められた。
- 3) 脾は軽度および中等度の出血性脾炎の像が認められた。

6. 眼に対する障害

BcS が哺乳動物の皮膚および粘膜組織に特異的に炎症を起させることはすでに述べたが、内田⁸⁾は BcS 原体製造工場における原体結晶の取扱者の眼に対する障害例を報告し、主として毒物性の眼瞼縁炎、結膜炎、角膜炎の形をとると述べている。また米山⁹⁾らによれば、同じブラエスM粉剤を水田で散布したところ、従業者9名全員に眼障害を生じ、うち5名は角膜損傷を伴う重症型であったという。渥美¹⁰⁾はブラエスM粉剤による眼障害患者総数36名中、全例が結膜に充血、水泡、びらん等の症状を現わし、14例には角膜炎が認められ、32例は眼瞼縁炎を起したことを報告している。林¹⁴⁾は臨床報告3例および動物実験例を報告しているが、臨床例においては3例と

も、角膜浮腫、混濁をきたし、角膜上皮剥離に及ぶ重症型である。家兎を使用した動物実験では、ほぼ人の場合と同様の経過をたどるが、薬剤使用後における洗顔効果は作用後直ちに洗眼した場合が最も有効であるといい、桐沢¹¹⁾らの指摘する点とほぼ一致している。他に動物を使って眼障害を起させた実験例には桐沢¹¹⁾、小島¹⁵⁾らの報告があるが、小島は家兎の眼障害を臨床的に追求すると同時に、病理組織学的検索を行い、角膜および輪部の浮腫、炎症性細胞浸潤、血管の新生および内皮細胞の腫大等、非特異性炎症所見の見られることを報告している。以上の人および動物における眼障害例に共通していることは、その炎症が表在性で深部組織にまで及ぶことは希で、適当な処置をほどこすことにより、時間の経過と共に後遺症を残すことなく治癒する場合が多いようである。実験動物としてはウサギを使用するのが普通であるが、多数例を行う必要上、本実験ではシロネズミを用いたが、観察上の多少の不便をしのべば、実験の性質によっては十分実用になると認めたので、ここでは BcS-3:

Photo 5 Kidney (mouse, BcS 300 mg/kg dermally).

Photo 6 Liver (mouse, BcS 3 mg/kg orally for 7 days).

Photo 7 Kidney (mouse, BcS 3 mg/kg orally for 7 days).

Photo 8 Liver (mouse, BcS 5 mg/kg orally for 7 days).

と BcS-C との眼に対する障害の程度、および BcS-3 点眼による反応と濃度との関係を明らかにするために、本実験を行なった。

A) BcS 点眼後、24時間後の反応と濃度との関係

実験方法：試料は BcS-3, BcS-C とともに 5% アセトン溶液に懸濁したものを使用。実験動物はウィスター系シロネズミの雄、体重 70~90 g のものを使用。濃度は各群とも 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1% の 5 群に分け、各濃度 0.02 ml (それぞれ、60, 50, 40, 30, 20 μ g に相当する) をザリーピペットで動物の左眼に点眼し、24 時間後に症状の判定を行なった。動物は各群とも 3 匹ずつを使用、環境温度は 20~25°C であった。実験結果の判定基準は渥美⁹⁾、桐沢¹¹⁾らの症例報告および分類方法に準じて、以下に示すような基準によって判定した。

判定基準：

腫脹 一；正常，+；眼瞼が十分開かないもの、

⚡；開瞼不能のもの。

眼脂 一；正常，+；眼角部に限局しているもの、

⚡；眼球全体にわたって認められるもの。

結膜の充血または出血

一；正常，+；充血または出血が限局性に認められるもの，⚡；充血または出血が結膜全体におよんでいるもの。

角膜の混濁 一；正常，+；混濁が角膜の一部に限局しているもの，⚡；角膜全体におよんでいるもの。

実験成績：実験結果は表 15, 16, 17 に示すとおりであった。すなわち、比較的低濃度で眼症状が発現する場合は眼瞼の腫脹のみ、あるいは軽度の充血をみる程度で、時には眼脂を伴う場合もある。濃度が高まるにつれて眼症状は強く現われ、眼瞼の高度の腫脹、充血、出血および涙腺からの分泌が著明になる。BcS-3 と BcS-C との間には、症状の型についてはとくに差異は認められないが、BcS-C の方が症状が強く発現する傾向があり、BcS-3 は 50 μ g で眼瞼の腫脹および結膜充血が現われるのに対して、BcS-C は 40 μ g で、すでに以上の諸症状が

Tab. 15 Eye Irritation Test of BcS-C Suspension for Rats (observation 24 hrs.)

Symptom	Anim. No.	Dose 20 μ g			30			40			50			60			Cont.		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Swelling		-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Congestion		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Lachrymation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Corneal opacity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corn ulcer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BcS-C was suspended in 5% acetone solution.

Tab. 16 Eye Irritation Test of BcS-3 Suspension for Rats (after 24 hrs.)

Symptom	Anim. No.	Dose 20 μ g			30			40			50			60					
		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
Swelling		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+			
Congestion		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+			
Lachrymation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-			
Corneal opacity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Corn ulcer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Tab. 17 Eye Irritation Test of BcS-3 Solution for Rats (observed for 24 hrs.)

Symptom	Anim. No.	Dose 20 μ g			30			40			50			60			Cont.		
		34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Swelling		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Congestion		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lachrymation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corneal opacity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corn ulcer		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BcS-3 was dissolved in mixed solvent of 5% acetone and 5% acetic acid.

Tab. 18 Eye Irritation Test of BcS-3 for Rats in Consecutive Daily Administration

Anim. No.	Days BcS-3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
11	0.05%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Solution
12	0.05	-	-	-	-	±	+	+	±	±	±	
13	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	
14	0.10	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	
15	0.20	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	
16	0.20	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	
17	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
18	0.30	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	
19	0.30	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	
20	1.0	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	Suspension
21	1.0	+	+	+	+	+	dead	+	++	++	++	
22	1.0	±	+	+	+	+	+	+	++	++	++	
23	1.0	±	±	±	+	+	+	+	++	++	++	
24	Cont.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	Cont.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

認められた。一方、アセトン、醋酸混合溶液は30~60 μg 各濃度いずれにも全く症状の発現をみず、これは溶液と懸濁液との差によるものと思われる。

B) BcS-3 の連日点眼による反応と濃度との関係

実験方法：ウィスター系シロネズミの雄、体重140~170 gについて実験を行なった。点眼には BcS-3 を5%醋酸溶液に溶解または懸濁した液を、毎日0.02 ml ずつ1回使用した。濃度はそれぞれ0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 1%の5種に分け、各濃度は BcS-3 の量がそれぞれ10, 20, 40, 60, 200 μg に相当する。

実験成績：以下に示すような判定基準によって判定した成績は表18のとおりであるが、10~40 μg 群において5日目より9日目までに軽度の症状をあらわすようになり、60 μg 以上になると、1日目または2日目に症状が発現する。

判定基準：

—；正常。 土；流涙。

十；流涙および結膜の充血。

廿；高度の眼瞼腫脹、充血、出血、潰瘍形成。

7. 皮膚に対する障害

BcS の人の皮膚に対する障害報告例はあまり見当たらない。これは、皮膚は生理的、解剖的に粘膜組織よりも抵抗性が大であるうえ、たとえ皮膚に接触しても、入浴、洗滌、その他、機械的に除去される機会が多いためと考えられる。しかし、BcS 製造工場では皮膚の傷が癒りにくいといわれる。また動物に対する経皮毒性が比較的強く発現する点にかんがみても、BcS の皮膚に作用する量的多寡によって、皮膚に何らかの障害を及ぼすであろうことは容易に想像される。そこで著者は、動物を用いて BcS の濃度と皮膚反応との関係を明らかにしようとした。

Tab. 19 Skin Reaction Test of BcS-3 for Rats in Consecutive Daily Administration

Anim. No.	Days BcS-3 %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
2	0.05	—	—	—	—	+	+	+	+	++	++	++
3	0.10	—	—	—	—	—	±	±	±	+	+	+
4	0.10	—	±	+	+	+	+	+	+	+	++	++
5	0.20	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	0.20	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
7	0.30	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
8	1.0	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
9	Cont.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	Cont.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tab. 20 Toxicity Table of Blasticidin S Derivatives for Laboratory Animals

Sample	Animal	LD ₅₀ mg/kg (oral)				LD ₅₀ mg/kg (dermal)		LD ₅₀ mg/kg (subcutaneous)	
		Mouse	Rat	Guinea pig	Rabbit	Mouse	Rat	Mouse	Rat
BcS-base		10.1 (6.9~14.9)	16.3 (12.0~)			69.5 (50.0~96.6)	75.5 (57.1~99.7)	1.6 (1.1~2.4)	3.1 (2.4~4.0)
BcS-C		13.5 (9.6~19.2)	39.5 (25.0~62.4)	32.1	48.5		220 (116~418)		
BcS-3		33.0 (18.4~59.1)	53.3 (39.2~72.5)						

BcS-C : Laulylsulfonate salt

BcS-3 : Benzylaminobenzene sulfonate salt

実験方法：実験動物には ウィスター系シロネズミの雄、体重140~170 gを使用。BcS-C を5%醋酸溶液に溶解または懸濁し、それぞれ0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 1

%の5濃度群に分け、シロネズミの右側背部約4 cmの範囲に毛筆で、各濃度群とも連日0.1 ml ずつ塗布して、皮膚反応を観察した。

実験成績：以下に示すような判定基準によって皮膚反応を判定した結果，50 μg では5～9日目，100 μg では2～6日目，200 μg では1～3日目，300～1000 μg では1日目で反応を示した。反応の一般的症状は，軽度のものは局所に淡黄色の色素斑が僅かに認められる程度であるが，やや強く反応すると，黄褐色の点状痂皮が1乃至数コ現われ，触れてみると，表面は硬く，乾燥している。強度のものは局所全体に赤褐色の痂皮を形成，痂皮の周辺に出血斑を認める場合が多い。しかし，時日の経過とともに漸次，治癒の傾向を示し，痂皮は一部または全体が剥離し，表面は滑沢で，最初は赤褐色の色素斑を残すが，漸次，消失し，軽度の癍痕組織を残して自然治癒する。なお塗布後1カ月以上経過したものは局所に毛が再生し，完全に治癒した。

判定基準：

- 一；正常。
- 土；局所に淡黄色の色素斑が僅かに認められるもの。
- ＋；局所に黄褐色の点状痂皮が1乃至数コ現われるもの。
- ＋＋；局所全体にわたり，赤褐色の痂皮乃至潰瘍，出血を認めるもの。

II 考 察

ネズミの眼に対する刺激作用も，BcS-3が50 μg 点眼で眼瞼の腫脹，結膜充血が現われるのに比し，BcS-Cはより低い濃度，即ち40 μg で同様の症状を呈した。

もちろん，まだ十分に低毒とはいえないが，現在までに知られた誘導体のなかでも BcS-3 即ち Benzylamino-benzene sulfonate 塩が最も有望として実用化に向けて取り上げられ，昭和 38, 39年の市販品はこれを有効成分としている。実際には有機水銀のイモチ菌に対する予防効果をも利用するために，BcS-3 1%，醋酸フェニール水銀1%の混合粉剤がブラエスMという商品名で市販されているわけである。

ブラストサイジンの中毒の本態は表在性の局所刺激作用のように見える。したがって実際の中毒症状は，外界と接触する面，即ち粘膜，皮膚に現われる。このうち，結膜，角膜に対する刺激作用が最も敏感で，消化管粘膜に対しては下痢，皮膚には発疹，浅い潰瘍の形で現われる。もし粉塵を吸入すれば，呼吸器系にも刺激症状が現われるであろう。

それらの症状は急性炎症の形で，病理組織像も，経口投与の場合も脾の出血性脾炎，肝の退行性変化，腎のうっ

血が見られた程度で，症状，病理所見とも特異なものは認められなかった。

本物質の化学構造上，どの部分が上記の起炎性に関係しているかは，今後の研究で明らかになると思うが，その基を誘導体に導き，薬効を失わずに，しかも副作用を極微に抑えることも将来は可能になると思われる。

しかし，実用化を急ぐ目的で，次善の策として上記の BcS-3 で出発し，散布時に簡易な保護眼鏡の使用を奨励することを昭和38年度の目標としたわけである。

一方，散布によって起った眼障害，その他の中毒を早期に治療することも，緊急な研究課題であり，もし本物質に対する特效解毒剤が発見されれば，さらに望ましいことである。次報はこの治療実験について報告する。

III 小 括

1) イネの病害，イモチ (rice blast) 菌に有効な新抗生物質ブラストサイジン S の毒性試験を行なった。

2) 遊離塩基の経口急性毒性 (LD_{50}) はマウスに対し10.1，ラッテに対し16.3 mg/kg，経皮毒性はそれぞれ69.5および75.5 mg/kgで，皮下毒性は1.6および3.1 mg/kgであった。

3) 毒性軽減を計るため，表面活性剤との塩が試験され，ラウリル硫酸塩 (BcS-C) およびベンジルアミノベンゼン・スルホン酸塩 (BcS-3) が最も有望であったが，とくに BcS-3 の経口毒性はマウスに対し33.0，ラッテに対し53.3 mg/kg となったので，現在，実用化されている。

4) 中毒症状は下痢，腹部膨満，鼻出血，振顫などが顕著であって，剖検により腹腔内に浸出液を認めた。

5) ネズミの点眼試験で，BcS-3 は一眼当り 50 μg から眼瞼炎，結・角膜炎が起った。懸濁液の方が完全な溶液より局所刺激作用が強かった。

6) 皮膚変化は塗布面の変色 (淡黄色) から出血，浅い潰瘍，痂皮形成まで，塗布量に比例して反応の度が異なるが，自然治癒傾向が強い。

7) 病理組織像には脾炎，肝の退行性変化，腎の尿細管のうっ血などが見られた。

文 献

- 1) Takeuchi, S., Hirayama, K., Sakai, H. and Yonehara, H.: J. Antibiotics, Ser. A, II; I, 1958.
- 2) Fukunaga, K., Misato, T., Ishii, I. and Asakawa, M.: Bul. Agr. Chem. Soc. Japan, 19; 181, 1955.
- 3) 見里朝正, 石井 至, 浅川 勝, 沖本陽一郎, 福永一夫: 日植病報 24; 302, 1959.

- 4) 住木論介：抗生物質（上）東大出版会，751，1961.
- 5) Yonehara, H., Takeuchi, S., Otake, N., Endo, T., Sakagami, Y. and Sumiki, Y.: J. Antibiotics, 16; 195, 1963.
- 6) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 96; 99, 1949.
- 7) Brownlee, K.A., Hodges, J.L. Jr. and Rosenblatt, M.: J. Am. Sta. Assoc., 48; 262, 1953.
- 8) 内田幸男：プラストサイジン-S参考資料，プラストサイジン研究会，25，1962.
- 9) 米山高道，米山杏子：眼科臨床医報 56; 803, 1962.
- 10) 渥美健三：日本農村医学会雑誌 11; 151, 1962.
- 11) 富沢俊一：プラストサイジン-S参考資料，プラストサイジン研究会，37，1962.
- 12) 桐沢長徳，小島宮子：プラストサイジン-S参考資料，プラストサイジン研究会，41，1962.
- 13) 見里朝正：プラストサイジン-S，日本植物防疫協会，17，1961.
- 14) 林日出人：眼科臨床医報 58; 112, 1964.
- 15) 小島宮子：臨床眼科 18; 813, 1964.
- 16) Otake, N., Takeuchi, S., Endo, T. and Yonehara, H.: Tetrahedron letters 19; 1411~1419, 1965.

(41ページより)

の動物による吸入実験を行い，呼吸機能，尿中硫酸排泄量，血液変化などを観察した。

1) テトロンフィルムバッグに一定濃度のEtSH ガスを作り，特製のマスクで家兎に吸入せしめ，呼吸量（肺活量計で測定），呼吸数を測定した。

① 1000 ppm のガスを吸入させると，吸入中は呼吸量，呼吸数共に減少するが，呼吸深度は増加する。30分前後を要して，10 l 吸入せしめたのち吸入を中止すると，呼吸量，呼吸数，呼吸深度共に増加し，恢復に30分位要した。② 100 ppm の吸入では，呼吸量にはほとんど変化がないが，呼吸数はやや減少し，従って呼吸深度がやや増加する。③ 10 ppm 吸入の場合は，呼吸量がやや増加の傾向を示した。

2) 家兎に1000 ppmのガスを1日10 l，9日間（中1日休止）吸入せしめ，2日毎の蓄尿について，尿中総硫

酸，無機硫酸，エーテル硫酸量を測定したが，対照に較べて著明な変化がみられなかった。

3) 上記と同じ家兎について，赤血球数，白血球数，白血球分類を2日毎に測定した結果，白血球数が，吸入開始直後やや増加し，吸入第5～7日目に，一時的にかなり減少を示した。その他の検査には著変がみられなかった。

追加 エチルメルカプタンガスの人体吸入実験(40～112 ppm)を行い，次の結果を得た。

1) 分時呼吸量は，吸入中かなり増加した。2) 呼吸数は一時的にやや減少した。3) 脈搏数は開始直後，一時的に増加した。4) 50 ppm のガスを1時間吸入し，呼吸濃度を測定したが，吸入濃度の約20%程度で，吸入時間中，ほとんど同じレベルを維持した。