

技術情報

バチルス・チューリンゲンシスの産生する 結晶毒素の毒性試験の概要

東亜合成化学工業株式会社生化学研究部

(平成元年5月20日受理)

薬剤の概要

バチルス・チューリンゲンシスの産生する結晶毒素(別名: δ -endotoxin)は、本菌が分裂増殖した後芽胞形成時に菌体内に産生する殺虫性のタンパク質粒子であり、東亜合成化学工業株式会社により開発された殺芽胞BT剤(商品名: トアロー水和剤CT)はこれを有効成分とした微生物源殺虫剤である。本剤については、昭和46年より、アブラナ科野菜のアオムシ、コナガ、ヨトウムシ、リンゴのハマキムシ類、ヒメシロモンドクガ、チャのコカクモンハマキ、タバコのアオムシ、ヨトウムシ、サクラ・プラタナスのアメリカシロヒトリ、ストックのコナガ、ツバキのチャドクガなど食葉性鱗翅目害虫に対する防除効果試験を実施し、これらの害虫に有効なことが確認された結果、昭和56年3月に農業登録された。

本有効成分は、上記の諸害虫に対して経口的のみを用い、それらの天敵類にはまったく影響がないという特長をもつ上、適用した害虫に抵抗性が発達しにくいといわれている。また、作物に対する薬害のおそれがない。

本有効成分の物理化学的性質等は以下に示すとおりである。

一般名: バチルス・チューリンゲンシスの産生する結晶毒素

構造式: (タンパク質であるが、アミノ酸の配列順序は未確定)

分子式: (未確定)

分子量: 約135,000

性状: 短軸0.5~1.0 μm 、長軸1~2 μm の両錐形結晶

比重: 1.27

融点: なし

沸点: なし

溶解性: 水および有機溶媒に不溶

安定性: 室温で安定、煮沸により失活、230~250°Cで焦げ始める。紫外線により徐々に分解する。また、強酸、強アルカリにより分解してアミノ酸となる。

急性毒性試験

Wistar系ラットおよびddy系マウスを用いた7%水和剤の各投与経路による急性毒性試験の結果を以下に示す。

| 動物種 | 投与経路 | 性別 | LD ₅₀ (mg/kg) | 試験機関 (報告書作成年) |
|-----|------|------|-----------------------------|-------------------|
| ラット | 経口 | ♂ | >8000 | 名古屋市立大学 (1972) |
| | | ♂, ♀ | >2000 | 生物医学研究所 (1988) |
| | 皮下 | ♂, ♀ | >2000 | " |
| | | ♂ | >8000 | 名古屋市立大学 (1972) |
| マウス | 経口 | ♂ | 1800 | " |
| | | ♂ | >17,300 | " |
| | 皮下 | ♂ | 12,100 | " |
| | | ♂ | 1520 | " |

* 30% 原体投与

一次刺激性試験

1. 眼一次刺激性試験

ニュージーランドホホワイト系ウサギ雄9匹(非洗眼群6匹、洗眼群3匹)の各右眼に検体(7%水和剤)0.1gを投与し、投与後1, 24, 48, 72時間および7日に角膜、虹彩および結膜における異常の有無を観察した。

その結果、角膜および虹彩には異常が見られなかったが、結膜には軽度の血管拡張、後に限局的な軽度の出血が認められた。しかし、これらの症状は洗眼群で72時間以内に、非洗眼群で7日以内に消失した。このことは

眼に軽度の刺激性を示す結果ではあるが、この程度の刺激性は農薬ガイドラインの判定基準から陰性と判断され、Draizeの採点法によっても本検体は無刺激物に属した。(環境保健衛生研究センター, 1986年)

2. 皮膚一次刺激性試験

ハートレイ系モルモット雄8匹を用い、刈毛した背中 of 皮膚に検体(7%水和剤)を蒸留水で湿らせて(25 mg/0.1 ml)塗布し、以降隔日に9回同様に塗布し、ついで2週間の正常飼育の後、最終回として50 mg/0.2 mlを塗布した。初回塗布後48時間経過時点まで、および11回目塗布後48時間経過時点まで、刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)の有無を観察した結果、変化はまったく認められなかった。

以上から、本検体はモルモットの皮膚に対し刺激性を有しないと判断された。

(日本バイオテスト研究所, 1972年)

皮膚感作性試験

1. モルモットを用いた試験

ハートレイ系モルモット雄(1群10匹)を用いて皮内感作注射により皮膚感作性の有無を調査した。検体(30%原体)を生理食塩水にとかし、その1 mg/ml液および10 mg/ml液を、各群の刈毛、剃毛した個所に、初回に0.05 ml、その後隔日に週3回、3週間にわたって0.1 mlずつを注射し、合計10回の感作投与を行ない、さらにその2週間後に最終惹起注射を行なった。毎回の感作注射および最終惹起注射のそれぞれ24時間、48時間経過時点で、両投与群ともに投与部位に紅斑および浮腫の発生が観察された。

以上から、本試験の結果をDraizeの方法に従って採点して、本検体は弱い皮膚感作性を有すると判断された。

(残留農薬研究所, 1984年)

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた試験

(A): 検体(7%水和剤)を0, 400, 2000, 10,000および50,000 ppm含有した飼料を1群雄雌各15匹のS・D系ラットに13週間摂食させた。

その結果、各投与群とも体重に変化は認められず、摂餌量にも差異がなかった。投与開始後13週の時点における血液学的検査ではすべて正常生理範囲内にあり、群間に有意な差は認められなかった。また、血液生化学検査では10,000 ppmおよび50,000 ppm投与群で、対照群と比して総タンパクおよびアルカリホスファターゼの減少とGOTの増加が若干認められた。13週間の試験

終了後に尿検査と各臓器重量の測定を行なったが、各投与群とも正常生理範囲内であった。さらに、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によっても全臓器に特筆すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験における本検体の最大無作用量は50,000 ppm(雄3868 mg/kg/day, 雌4064 mg/kg/day)と判断された。(奈良県立医科大学, 1972年)

(B): 検体(7%水和剤)を0, 400, 2000, 10,000および50,000 ppm含有した飼料を1群雄雌各15匹のWistar系ラットに13週間摂食させた。

その結果、各投与群とも体重に明らかな変化は認められず、摂餌量にも差異がなかった。投与開始後13週の時点における血液学的検査で、400 ppm投与群の雌で赤血球、白血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット値が上昇したが、2000 ppmおよび10,000 ppm投与群では対照群と差がなく、薬量相関性のない変化であった。また、血液生化学検査ではGOTが全般的に上昇したが、薬量に相関しない変化であった。13週間の試験終了後に尿検査と各臓器重量の測定を行なったが、各投与群とも正常生理範囲内であった。さらに、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によっても全臓器に変化はまったく認められなかった。

以上の結果から、本試験における本検体の最大無作用量は50,000 ppm(雄4228 mg/kg/day, 雌3955 mg/kg/day)と判断された。

(日本バイオテスト研究所, 1972年)

2. マウスを用いた試験

(A): 検体(7%水和剤)を0, 400, 2000, 10,000および50,000 ppm含有した飼料を1群雄雌各15匹のICR系マウスに13週間摂食させた。

その結果、各投与群とも体重に変化は認められず、摂餌量にも差異がなかった。投与開始後13週の時点における血液学的検査で各投与群と対照群の間に統計学的に有意差の見られる項目がかなりあったが、変動率と薬量の相関性は認められなかった。また、血液生化学検査ではアルカリホスファターゼが高薬量群ほど上昇する傾向が見られたが、その他の項目では正常生理範囲内にあった。13週間の試験終了後に尿検査と各臓器重量の測定を行なったが、各投与群ともほぼ正常生理範囲内であった。さらに、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によっても全臓器に特筆すべき変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験における本検体の最大無作用量は50,000 ppm(雄8005 mg/kg/day, 雌7214 mg/kg/day)と判断された。(奈良県立医科大学, 1972年)

(B): 検体(7%水和剤)を0, 400, 2000, 10,000

および 50,000 ppm 含有した飼料を 1 群雌雄各 15 匹の ddy 系マウスに 13 週間摂食させた。

その結果、各投与群とも体重に明らかな変化は認められず、摂餌量では 10,000 ppm および 50,000 ppm 投与群の雌にやや低下が見られた。投与開始後 13 週の時点における血液学的検査で 50,000 ppm 投与群が血小板にやや有意に低い値を示したが、その他の項目においては有意差が認められなかった。また、血液生化学検査では 50,000 ppm 投与群の雄で血糖およびアルカリホスファターゼの各値が対照群に比して有意に低かったが、その他には投与群全体としての薬量相関性は認められなかった。13 週間の試験終了後における尿検査では異常所見は得られなかった。また、各臓器の重量には有意差のあるものがかなりあったが、薬量との相関に一貫性がなく、主要臓器への本検体投与による影響があるとは結論できなかった。さらに、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によっても全臓器に変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験における本検体の最大無作用量は 10,000 ppm (雄 1812 mg/kg/day, 雌 1994 mg/kg/day) と判断された。

(日本バイオテスト研究所, 1972 年)

慢性毒性・発がん性試験

1. ラットを用いた試験

検体 (30% 原体) を 0, 3000, 10,000 および 30,000 ppm 含有した飼料を 1 群雄雌各 70 匹の Fischer 344 系ラットに 104 週間にわたり摂食させた。

その結果、一般状態および試験終了時の死亡率に検体投与を起因すると考えられる影響は見られなかった。体重は雌の 30,000 ppm 投与群にのみ投与開始後 11~25 週の間および 38~60 週の間で対照群と比して軽微な減少を示した。しかし、摂餌量および食餌効率には特筆すべき変化はなかった。

投与開始後 52, 78 および 104 週時に以下の検査を行った。血液学的検査ではヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球数等には一貫性のある変化はなく、検体投与による影響は認められなかったが、血液生化学検査では、雄の 30,000 ppm 投与群で投与開始後 52 週時においてコレステロール、総タンパク、クレアチニンの減少とカルシウムおよび無機リンの増加、78 週時においてコレステロール、総タンパク、尿酸の減少と GOT の増加、104 週時において尿酸の減少などが散発的に現われ、また、雌の 10,000 ppm と 30,000 ppm 投与群で 78 週時において尿酸および GOT の減少、104 週時において総タンパクの減少、雌の 30,000 ppm 投与群で 104 週時にお

いて尿酸の減少と血糖の増加が見られたが、総合的に見て毒物学的に意味のある変化は少なかった。52, 78 および 104 週時における尿検査では検体投与による影響と考えられる異常は認められなかった。また、臓器重量およびその体重比の測定では雄の 30,000 ppm 投与群にのみ 52 および 78 週時に腎重量とその体重比に増加が見られたが、それ以外の変化は検体投与による影響とは考えられなかった。なお、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によって全臓器に特筆すべき変化は認められず、腫瘍発生頻度および腫瘍病変一般についても全投与群ともとくに注目される増加を示さなかった。

以上の結果、本検体の 104 週間投与による慢性毒性・発がん性試験において、30,000 ppm 投与群では雄雌とも血液生化学検査で軽微な変化が認められ、さらに雄では腎重量の増加が、雌ではわずかながら体重増加抑制が見られたことから、30,000 ppm は中毒量と考えられた。また、10,000 ppm 投与群では毒物学的に意味のある変化が認められなかったことから、10,000 ppm を無作用量とした。したがって、本試験における本検体の最大無作用量は 10,000 ppm (雄 665 mg/kg/day, 雌 714 mg/kg/day) と判断された。また、催腫瘍性はないものと考えられた。(食品農医薬品安全性評価センター, 1986 年)

2. マウスを用いた試験

検体 (30% 原体) を 0, 3000, 10,000 および 30,000 ppm 含有した飼料を 1 群雄雌各 70 匹の B6C3 F₁ 系マウスに 104 週間にわたり摂食させた。

その結果、一般状態および試験終了時の死亡率に検体投与を起因すると考えられる影響は見られなかった。体重は雄の 30,000 ppm 投与群にのみ対照群と比して軽微な減少を示した。しかし、摂餌量および食餌効率には特筆すべき変化はなかった。

投与開始後 52, 78 および 104 週時に以下の検査を行った。血液学的検査ではヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球数等には各投与群とも検体投与による影響は認められなかったが、血液生化学検査では、投与開始後 52 週時にとくに雌の各投与群に対照群にくらべて GOT など有意差を示す項目が多く見られたが、薬量と相関がなく、総じて検体投与による影響とは認められなかった。52, 78 および 104 週時における尿検査で、雄では各投与群とも対照群と差異がなかったが、雌の 30,000 ppm 投与群のみはいずれの時期にもビリルビンを検出する動物が多かった。なお、諸臓器の肉眼的観察および検鏡によって 78 週時にとくに雌の 30,000 ppm 投与群で肝細胞の過形成および腺腫の発生数の増加が見られたが、各投与群の腫瘍発生頻度には検体投与による影響は

ないものと考えられた。

以上の結果、本検体の104週間投与による慢性毒性・発がん性試験において、30,000 ppm 投与群では雄で体重増加抑制等、雌で尿検査でのビリルビン陽性動物数の増加、および腺腫発生数の増加などが見られたことから、30,000 ppm は中毒量と考えられた。また、10,000 ppm 投与群では毒物学的に意味のある変化が認められなかったことから、10,000 ppm を無作用量とした。したがって、本試験における本検体の最大無作用量は10,000 ppm (雄 1740 mg/kg/day, 雌 2198 mg/kg/day) と判断された。また、催腫瘍性はないものと考えられた。

(食品農医薬品安全性評価センター, 1986年)

繁殖性および催奇形性試験

1. ラットを用いた繁殖性試験

検体(30%原体)を0, 6000 および 30,000 ppm 含有した飼料を1群雄雌各25匹のWistar系ラットにF₀からF₂まで3世代にわたって摂食させ、繁殖に及ぼす影響について調査した。

全動物の全期間にわたる一般状態および生死を毎日観察したほか、F₀, F₁ および F₂ では繁殖性、臓器重量、病理解剖学的所見ならびに病理組織学的所見について、また、F₁ および F₂ では帝王切開による生存胎仔数、胎仔重量、胎仔の外表、内臓、骨格の検査などを行なったが、検体投与による考えられる影響は認められなかった。

ただ、体重に6000 ppm 投与群で増加抑制傾向が、30,000 ppm 投与群で増加抑制が見られたが、これは検体のかなりの割合での混餌のために対照群にくらべて投与群は栄養分の摂取量が少なかったことによるものと推測された。

なお、交尾率、妊娠率、分娩率から見て、親動物の交配能力と繁殖能力に各世代、各交配で一定した変化がなかったことから、検体投与による影響はないものと考えられた。

以上の結果、最高濃度群においても繁殖性および仔動物に病理組織学的な異常が見られなかったことから、本試験における本検体の繁殖性に関する最大無作用量は30,000 ppm (雄 1873 mg/kg/day, 雌 2295 mg/kg/day) と判断された。(化学品検査協会, 1985年)

2. ラットを用いた催奇形性試験

検体(30%原体)を0, 6000 および 30,000 ppm 含有した飼料を1群12匹のWistar系妊娠ラットに母体離乳日から妊娠20日目まで摂食させ、胎仔毒性および催奇形性について調査した。

この試験で、母体は検体投与群に体重増加抑制傾向があったものの、妊娠20日目に帝王切開の結果、黄体数、着床数、生存胎仔数には対照群との間に有意な差が見られなかった。また、胎仔動物の体重、外表、骨格、内臓などにおける異常出現の度合は対照群と大同小異であり、仔動物の哺乳期生育状態の観察においても検体投与群と対照群の間に有意な差が見られなかった。

以上の結果から、本検体は最高濃度群30,000 ppm (雌 2295 mg/kg/day) においても母動物および胎仔に対して催奇形性はないものと判断された。

(化学品検査協会, 1985年)

変異原性試験

1. DNA 修復試験

Bacillus subtilis の組換修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、rec-assay法でDNA損傷誘発性について調査した。検体(30%原体)を懸濁させるためにジメチルスルホキシドを用い、懸濁液の検体濃度は10~2000 μg/disk とした。

この試験で、本検体はその溶解限度である最高濃度(2000 μg/disk)においても両株にまったく生育阻止帯を示さず、陰性対照として用いたkasugamycinでは両株に同程度の生育阻止帯を示したが、一方、陽性対照として用いたmitomycin Cでは両株の間に明らかに生育阻止帯に差を生じた。

以上の結果より、本検体にはDNA損傷誘発性はないと判断された。(残留農薬研究所, 1983年)

2. 復帰変異原性試験

Salmonella typhimurium のTM 677株での8-azaguanine感受性(8-AG^s)から耐性(8-AG^r)への突然変異を検出する系、およびTA 100株でのstreptomycin依存性(Sm^d)から非依存性(Sm^{ind})への突然変異を検出する系を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)の存在下で、Amesらの方法により変異原性を検討した。検体(30%原体)を懸濁させるためにジメチルスルホキシドを用い、懸濁液の検体濃度は1~1000 μg/plate とした。

この試験で、陽性対照のAF-2ではS-9 Mixの添加なしで、2-AAではS-9 Mixの添加により突然変異頻度の著しい上昇が見られたが、本検体では投与限界の1000 μg/plateの濃度においても突然変異頻度の上昇は認められなかった。

以上の結果より、本検体には復帰変異原性はないと判断された。(残留農薬研究所, 1983年)

要 約

バチルス・チューリンゲンシスの産生する結晶毒素(別名: δ -endotoxin)の安全性評価のため各種の毒性試験を実施した。

その結果、本有効成分の哺乳動物に対する急性毒性はきわめて低く、普通物相当であり、眼および皮膚に対する刺激性は認められなかった。しかし、弱い皮膚感作性は有した。一方、亜急性毒性はきわめて弱く、慢性毒性試験では高投与群(30,000 ppm)で、血液生化学検査における軽微な変化や、体重の増加抑制傾向が若干見られ

はしたが、特定の病変はなく、発がん性も認められなかった。また、繁殖に及ぼす影響および催奇形性も認められず、変異原性も陰性であった。

以上より、バチルス・チューリンゲンシスの産生する結晶毒素はきわめて安全性の高い物質に属するものであり、農業用資材として有用であると考えられる。

問合せ

東亜合成化学工業株式会社生化学研究部

〒105 東京都港区西新橋1-14-1