

技術情報

## バチルスズブチリスの毒性試験の概要

株式会社エス・ディー・エス バイオテック 技術開発部

(平成18年9月20日受理)

### 薬剤の概要

バチルスズブチリス (*Bacillus subtilis* 和名: 枯草菌) は、自然界に普遍的に生息するグラム陽性桿菌であり、日本の伝統的食品である納豆生産菌でもある。

今般、当社が登録取得したバチルスズブチリス剤は、1995年に米国アグラクエスト社によりカリフォルニア州フレズノの果樹園の土壌から分離された株であり、人為的処理および遺伝子操作を何ら行っていない野生株である。本剤を散布処理することにより、茎葉部に発生する糸状菌、細菌による各種病害に発生抑制作用を示すことが確認された。

当社は2000年より日本植物防疫協会委託試験を開始し、翌年にトマト灰色かび病並びにブドウ灰色かび病に実用性ありの判定を得た。また、哺乳類動物への安全性試験、環境および非標的生物への影響試験を実施し、その安全性を確認した。

バチルスズブチリス剤は、①納豆生産菌であることからわかるようにその安全性が高いこと、②有効成分の芽胞は種々の外的環境の変化から生存するための耐久体であり、保存安定性に優れること、③環境に及ぼす負荷が極めて低い生物防除薬剤である、という特徴を有している。

本剤の微生物分類学上の位置、形態等は次のとおりである。

一般名: バチルスズブチリス QST-713

商品名: インプレッション水和剤

微生物分類学上の位置

界 (Kingdom): 菌界 (Mycota)

亜界 (Subkingdom): 原核菌類 (Prokaryomycota)

門 (Division): 細菌門 (Bacteriomycota)

綱 (Class): 真正細菌類 (Eubacteriomycetes)

目 (Order): 真正細菌目 (Eubacteriales)

科 (Family): 内生孢子生産桿菌 (Bacillaceae)

属 (Genus): バチルス (*Bacillus*)

種 (Species): ズブチリス (*subtilis*)

株 (Stain): QST-713 (QST-713)

性状および生理学的性質:

- i) グラム陽性桿菌
- ii)カタラーゼ (+)
- iii) 芽胞形成 (+) 卵形芽胞
- iv) 栄養細胞の幅  $\leq 0.9 \mu\text{m}$
- v) AMCの生産 (+)
- vi) 絶対好気性
- vii) 硝酸塩の還元 (+)
- viii) スターチの加水分解 (+)

以下に本剤の毒性試験の概要を示す。

### 各種毒性試験

#### 1. 原体のラットにおける単回経口投与試験

1群雌雄各15匹のラット (SD系) を約17時間絶食させた後、原体の生菌水懸濁液 1 mL/匹を単回強制経口投与した。生菌水懸濁液 1 mL 中の生菌数は  $1.13 \times 10^8$  コロニー形成単位 (CFU) であった。

動物の生死および一般状態観察を14日間毎日行い、投与日 (試験0日)、試験3、7および14日に体重測定を行った。また、試験0、3、7および14日に各群とも雌雄各3匹をと殺し、剖検、臓器重量測定 (脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓、腸間膜リンパ節、胃および小腸、盲腸)、本菌の体外への排泄状況および体内における生残状況を調べた。

死亡動物は認められず、一般状態、体重、剖検、臓器重量にも異常は認められなかった。

本菌の体外への排泄状況については、と殺したすべての動物の糞、体内における生残状況については、と殺したすべての動物の血液および重量測定臓器を採取し、本菌の計数を行った。試験0、3および7日の雌雄の糞から本菌が検出されたが、試験14日には検出されなかった。また、試験0日に雌雄の胃および小腸、並びに盲腸、雌の肺、肝臓および腸間膜リンパ節から本菌が検出されたが、試験3日には雌雄とも胃および小腸、並びに盲腸からの検出となり、試験14日には検出されなくなった。

以上の結果から、本試験条件下では  $LD_{50}$  値は雌雄とも  $1.13 \times 10^8$  CFU/動物より大きく、本菌は感染性、病原性、体内生残性および毒性を示さないと結論した。

(IIT Research Institute, 1998 年)

## 2. 製剤のウサギにおける単回経皮投与試験

1 群雌雄各 5 匹の日本白色種ウサギ（雌は非経産、非妊娠）を用い、製剤 2 g に 4 mL の滅菌生理食塩水を添加したガーゼパッチを刈毛部皮膚に 24 時間閉塞貼布し、投与した。

動物の生死および一般状態を投与後 1 および 3 時間に、その後は 1 日 1 回、14 日間観察した。体重は投与直前、投与後 7、14 日に測定した。皮膚刺激性については、パッチ除去直後、48、72 時間後およびその後 1 日 1 回、試験終了時まで投与部位の皮膚反応を観察した。試験終了時には剖検を行った。

死亡例は認められず、一般状態、体重および剖検においても異常は認められなかった。皮膚刺激性の評点はパッチ除去直後では 0.5、48 時間では 0.3 であったが、72 時間後には 0.0 となった。

以上の結果から、本試験条件下では  $LD_{50}$  値は 2 g/動物より大きく、検体は全身毒性を示さず、弱い皮膚刺激性のみが示された。

(三菱化学安全科学研究所, 2002 年)

## 3. 原体のラットにおける単回経気道投与試験

1 群雌雄各 20 匹のラット (SD 系) に、原体の生菌水懸濁液 0.1 mL/匹を単回経気道投与した。水懸濁液 0.1 mL 中の生菌数は  $1.2 \times 10^8$  CFU であった。

動物の生死および一般状態観察を 35 日間毎日行い、投与日 (試験 0 日)、試験 7、14、21、28 および 35 日に体重測定を行った。また、試験 0、7、21 および 35 日に雌雄各 5 匹をと殺し、肉眼的病理検査、臓器重量測定 (脳、肺および肺門リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、盲腸)、本菌の体内における生残状況を調べた。

死亡例は認められなかった。一般状態では、試験 0 日に粗毛が雄 1 例に認められたのみで、その他に異常はみられなかった。体重では、試験期間中を通して有意な影響は認められなかった。剖検では、肺の斑状病変が試験 0 日に認められたが、それ以後異常は認められず、その他の臓器にも異常は認められなかった。臓器重量では、肺および肺門リンパ節の相対重量 (比体重値) の有意な増加が試験 0 日 (雌雄) および試験 7 日 (雄のみ) に認められたが、それ以後異常は認められなかった。

本菌の体内における生残状況については、と殺したすべての動物の血液、脳、肺および肺門リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、盲腸を採取し、本菌の計数を行った。雌雄の肺およ

び肺門リンパ節から検査したすべての日 (試験 0、7、21 および 35 日) に本菌が検出されたが、菌数は試験 0 日と比較して試験 21 日までに統計学的に有意に減少した。また、本菌は肝臓および腎臓 (雌雄)、脾臓 (雄のみ) に試験 0 日、脾臓および肝臓 (雌雄) に試験 7 日に検出されたが、試験 21 日までに検出されなくなった。

以上の結果から、本試験条件下では  $LD_{50}$  値は  $1.2 \times 10^8$  CFU/動物より大きく、本菌はラット雌雄に対し病原性および毒性を示さないと結論した。

(IIT Research Institute, 1998 年)

## 4. 原体のラットにおける単回静脈内投与試験

1 群雌雄各 12 匹のラット (SD 系) に、原体の生菌水懸濁液 0.5 mL/匹を単回静脈内投与した。水懸濁液 0.5 mL 中の生菌数は約  $9.4 \times 10^6$  CFU であった。

動物の生死および一般状態観察を 35 日間毎日行い、投与日 (試験 0 日)、試験 7、14、21、28 および 35 日に体重測定を行った。また、試験 0、7、21 および 35 日に雌雄各 3 匹をと殺し、剖検、臓器重量測定、本菌の体内における生残状況を調べた。

死亡例は認められず、一般状態にも悪影響は認められなかった。体重および剖検においても、異常は認められなかった。臓器重量を測定 (脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓、腸間膜リンパ節および盲腸) したが、有意な影響は認められなかった。

本菌の体内における生残状況については、と殺したすべての動物の血液、脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓、腸間膜リンパ節および盲腸を採取し、本菌の計数を行った。試験 0 日に肺および肺門リンパ節から、また一時的に脾臓、肝臓および腎臓から本菌が検出されたが、試験 21 日までに肺および肺門リンパ節に残存する本菌は有意に減少し、脾臓、肝臓および腎臓からは排出されることが示された。

以上の結果から、本試験条件下では  $LD_{50}$  値は  $9.4 \times 10^6$  CFU/動物より大きく、本菌はラット雌雄に対し病原性および毒性を示さないと結論した。

(IIT Research Institute, 1998 年)

## 5. ウサギにおける眼一次刺激性試験

非洗眼群は 1 群 6 匹、洗眼群は 1 群 3 匹の日本白色種ウサギを用い、製剤 0.1 g ( $7.0 \times 10^9$  CFU)/眼を右眼に投与した。洗眼群は投与 30 秒後に 45 mL の精製水で 30 秒間洗眼した。両群とも左眼は投与せずに対照とした。投与 24 時間後に両眼を精製水で洗眼した。投与後 1、24、48、72 時間、4 および 7 日に眼刺激性反応の有無を観察した。また、症状が認められた動物については、投与後 10、13、16 日にも観察を行った。一般状態は毎日観察した。体重は投与直前および投与後 7 日に測定した。

その結果、本試験条件下では一般状態と体重に異常は認められず、本製剤はウサギの眼粘膜に対し可逆性の弱い刺激性を有すると考えられた。

(三菱化学安全科学研究所, 2002年)

#### 6. モルモットにおける皮膚感作性試験

感作群, 感作陰性対照群とも1群10匹の雄性ハートレー系モルモットを用い, 滅菌生理食塩液で0.03 w/v%に調製した製剤を, あらかじめ刈毛した左側腹部に初回は0.05 mL, 2回目以降は0.1 mLずつを皮内投与した。この操作を隔日ごとに合計10回実施し, 感作した。感作陰性対照群には滅菌生理食塩液のみを投与した。最終感作後14日に, 感作群, 感作陰性対照群とも前日刈毛した右側腹部に0.03 w/v%の製剤0.05 mLを皮内投与し惹起した。惹起投与後24および48時間に発赤, 硬結並びに壊死の有無を肉眼的に観察した。一般状態は試験期間中毎日観察した。体重は感作直前(0日), 感作開始後7, 14, 21, 28日および惹起後48時間(34日)に測定した。

感作群では, 惹起後24および48時間に全例で皮膚反応が認められ, 感作陽性率は100%であった。感作陰性対照群では, 皮膚反応は全く認められなかった。死亡例は認められず, 一般状態および体重についても異常は認められな

かった。

以上の結果から, 本試験条件下では本製剤はモルモットに対し皮膚感作性を有すると判断した。

(三菱化学安全科学研究所, 2002年)

#### 要約

バチルスズブチリスQST-713の安全性評価のために毒性試験を実施した。

実施した単回経口投与試験, 単回経気道投与試験, 単回静脈内投与試験の成績から, 本菌は感染性, 病原性, 体内生残性および毒性を有さないと考えられた。

また, 実施した本菌製剤の単回経皮投与試験, 眼一次刺激性試験および感作性試験成績から, 皮膚および眼粘膜に対する弱い刺激性と皮膚感作性を有すると考えられた。

バチルスズブチリスQST-713は2003年5月に殺菌剤として農薬登録された。

#### 問合せ先

株式会社エス・ディー・エスバイオテック  
技術開発部 登録グループ

〒103-0004 東京都中央区東日本橋1丁目1番5号