

蘇力菌素對大鼠口服及肺毒性之評估

* 蔡三福 廖俊旺 王順成

台灣省農業藥物毒物試驗所 應用毒理系 台中縣
(收稿日期: 87 年 6 月 26 日。接受日期: 87 年 8 月 12 日)

Acute Oral and Pulmonary Toxicity of Thuringiensin in Rats

San-Fu TSAI, Jiunn-Wang LIAO and Shun-Cheng WANG

Department of Applied Toxicology, Taiwan

Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC

(Received: June 26, 1998. Accepted: August 12, 1998.)

抽印自中華民國獸醫學會雜誌第 24 卷第 3 期

中華民國 87 年 9 月

Reprinted from Journal of the Chinese Society of Veterinary Science

Taipei, Taiwan, ROC

Vol.24 No.3, September 1998

蘇力菌素對大鼠口服及肺毒性之評估

* 蔡三福 廖俊旺 王順成

台灣省農業藥物毒物試驗所 應用毒理系 台中縣
(收稿日期: 87年6月26日。接受日期: 87年8月12日)

摘要 本研究主要目的乃針對蘇力菌素 (thuringiensin) 開發過程中使用不同萃取物 (cetylpyridinium chloride, CPC 或澱粉萃取物) 所純化出之產物對哺乳動物之急毒性評估, 並比較其口服及肺急毒性之差異。以單一劑量胃管投予大鼠每公斤體重 0, 10, 30, 50, 70 及 90 mg/kg 之 5.87% 蘇力菌素 (以 CPC 萃取) 或 0, 500 及 1,090 mg/kg 之 7.20% 蘇力菌素 (以澱粉萃取), 並以 0 及 250 mg/kg CPC 作為萃取物對照組, 投藥後連續觀察 21 天。結果顯示 5.87% 蘇力菌素及 CPC 組, 處理鼠隻呈現遲鈍、皮毛粗剛、抽搐或死亡等症狀, 5.87% 蘇力菌素組之口服半致死劑量 (LD_{50}) 為 53.9 mg/kg。而 7.20% 蘇力菌素組則無任何中毒症狀, 可知以澱粉萃取製成之 7.20% 蘇力菌素為一較安全製劑, 本實驗另以此劑型進一步探討其肺急毒性。以氣管投予大鼠每公斤體重 0, 5, 20, 50 及 100 mg/kg 之 7.20% 蘇力菌素並連續觀察 21 天。於投藥後大鼠出現明顯呼吸音, 體重及體溫降低、俯臥、皮毛粗剛及死亡等現象, 其 LD_{50} 為 71.8 mg/kg。肺急性處理死亡鼠隻之肺臟出現明顯充血, 組織切片下呈現瀰漫性出血、水腫及氣腫、小支氣管炎及肺泡局部壞死等傷害, 經 21 天後存活之鼠隻肺臟則有局部纖維化病變。綜合以上結果顯示, 僅含 CPC 或以 CPC 萃取之 5.87% 蘇力菌素對大鼠均具有較強之口服急毒性, 而以澱粉萃取之 7.20% 蘇力菌素則否, 其對大鼠口服急毒性大於 1,090 mg/kg, 但其具有急性肺毒性造成肺部慢性纖維化等傷害。故商品化之蘇力菌素產品應避免製成粉劑劑型, 改以粒劑或水溶性粒劑等劑型, 可降低對人類及動物之潛在毒性。[* 蔡三福、廖俊旺、王順成。蘇力菌素對大鼠口服及肺毒性之評估。中華獸醫誌 24 (3): 203-211, 1998。* 聯絡人 TEL: 04-330 2101, FAX: 04-332 3073]。

關鍵詞: 蘇力菌素, 口服毒性, 肺毒性, 大鼠

緒 言

近年國際植物保護的趨勢為積極的開發生物性農藥, 以替代部分化學性農藥之使用。目前生物農藥應用於防治者, 以細菌類的蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 最為顯著, 部分已成功的控制或減低田間作物病蟲害之發生 [12,13,17,22]。蘇力菌所產生的殺蟲性毒素已知者有八種 [8,10,14,19,20], 其中以蘇力菌素 (thuringiensin; 或稱 β -外毒素) 及內毒素 (endotoxin) 最具生物防治潛能。蘇力菌素之作用機制為 ATP 競爭同一酵素之結合位置, 抑制 DNA-dependent RNA-polymerase 的作用, 進而阻斷昆蟲的 RNA 合成 [15,21]。在家蠅幼蟲之實驗發現, 被蘇力菌素抑制的幼蟲在 3 天後可引起死亡及造成畸形的症狀 [21], 顯見蘇力菌

素之殺蟲效果具有相當大的應用潛能。唯目前生物農藥, 包括生物之生物本質及其發酵產生的毒素, 對哺乳類動物的安全性評估, 國內外相關之報告甚少, 其中有關蘇力菌素對溫血動物之安全評估報告更少或闕如; Barjac 等 [7] 用蘇力菌素腹腔注射小鼠的 LD_{50} 值為 13.3 mg/kg, 皮下注射 LD_{50} 值為 16.6 mg/kg, 此結果與 Sebesta 等 [21] 的 18 mg/kg 相近, 而在小鼠連續餵食蘇力菌素 200 mg/kg 八天後, 可引起部分鼠隻的死亡 [21], 且至目前此類報告均著重在求得不同途徑投予後比較其 LD_{50} 值, 未完全從應用毒理的觀點進行研究探討。由於蘇力菌素正在開發應用的階段, 此方面的評估資料急待建立, 以確保上市產品之安全性。目前上市的蘇力菌微生物製劑產品以粉末狀為主, 而蘇力菌素易水溶特性加上成本上的考量, 其產品的應用若沿用此狀態, 極易進入動物及人體呼吸系統, 對

肺臟可能產生影響。因此本研究之目的，乃針對蘇力菌素，進行口服及肺急毒性，以期建立基本的蘇力菌素安全評估模式，並進一步瞭解在純化、萃取及沈澱過程中使用不同的萃取物質時，其對動物體的相關器官可能產生的影響，俾供開發過程製劑配方改良方向及提供目前管理法規所需註冊登記的毒理資料 [1]，並協助政府對具生物防治效果的生物技術產物安全管理之參考。

材料與方法

供試藥劑 蘇力菌素 [2] 分 5.87% 及 7.20% 兩批，從蘇力菌發酵液中，分別以氯化十六烷基吡啶 (cetylpyridinium chloride, CPC, Sigma) 及澱粉 (瑞中，臺灣) 進行純化萃取，此由東華大學生物技術研究所提供。蘇力菌發酵液 [11] 由清華大學化工研究所，採用巴斯德研究所 (Pasteur Institute, Paris, France) 提供的 HD-199 菌株 (*Bacillus thuringiensis subsp. darmstadtensis*) 置發酵槽中培養。另以 CPC (Sigma) 作為萃取物對照組。

供試動物 五週齡大之 Wistar 品系大鼠購自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心，在本所 SPF 動物飼育室觀察一週後，取雌雄鼠體重各為 $220 \pm 10\text{g}$ 及 $190 \pm 10\text{g}$ ，且經檢疫合格 [3,4,5] 之同一批健康成鼠進行試驗。試驗動物除了在處理前 3 小時及處理後 4 小時禁食外，平時給予充足之飼料 (Purina Laboratory Chow[®] 5001, USA) 及一次蒸餾水飲用。動物飼育室控制狀況為溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、濕度 50-70% 及 12 小時光/12 小時暗之光照週期。

實驗設計 試驗動物分組及劑量選擇，依據美國環境保護署頒佈之農藥毒性評估測試及生物製劑對溫血動物肺急毒性評估測試規範進行 [23, 24]。

一、口服急毒性試驗 每一劑量組 10 隻大鼠 (5 雌, 5 雄)，第一項試驗使用 5.87% 蘇力菌素，劑量分 0、10、30、50、70 及 90 mg/kg。第二項試驗使用 7.20% 蘇力菌素，劑量分 0、500 及 1,090 (最大溶解度) mg/kg。第三項試驗以 CPC 作為萃取物對照組，劑量分 0 及 250 mg/kg。

二、肺急毒性試驗 依據口服急毒性試驗結果顯示 CPC 對大鼠具毒性，因此肺急毒性試驗只選取批次為 7.20% 蘇力菌素。每一劑量組 10 隻大鼠 (5 雌, 5 雄)，劑量分 0、5、20、50 及 100 mg/kg。

試驗步驟及觀察項目 試驗劑量均以生理鹽水緩衝液 (Gibco, USA) 進行藥劑配製，在口服急毒性方面以塑膠注射針筒 (Terumo, Tokyo, Japan) 套上長 100 mm 不銹鋼胃管 (Fine Science Tools, USA)，將蘇力菌素強迫餵食大鼠，每隻灌注之液體量為 10 mL/kg [9]。肺急毒性方面以哈樂仙 (Halothan, Sigma, MO, USA) 進行全身性呼吸麻醉，將大鼠門齒掛於壓克力網架上，取 1mL 塑膠注射針筒套上長 110mm 不銹鋼接種針 (Hamilton 91072, USA)，透過耳鏡 (Hene, Germany) 經喉頭進入氣管各灌注之液體量為 1.0 mL/kg [23]。觀察項目包括臨床症狀、體重變化、溫度變化、病理變化、血液值分析及血清生化值分析。臨床症狀之觀察，包括症狀發生、復原及死亡時間，在處理後 1/2、1、2、4 小時記錄；自處理後第二天起，每日觀察一次，至處理後第 21 天為止。每週大鼠置於電子動物稱重器 (Mettler-PB3001, Switzerland)，以評估其增重情形。以電子體溫器 (Digital thermometer-TD300, Japan) 測量大鼠試驗前及試驗後 2、4、24 小時之肛溫。實驗結束後，大鼠以 95% 乙醚 (聯工，臺灣) 麻醉，在後大動脈以含抗凝血劑 (K3 EDTA, Vacutainer, NJ, USA) 裝 2mL 全血，置入血球計數儀 (Sysmex K-4500, Japan) 檢測血液相包括紅血球 (RBC)、血容比 (Hct)、平均紅血球容積 (MCV)、白血球 (WBC)、血紅素 (Hb) 等項目；另以血球血清分離管 (Vacutainer, Franklin Lakes, USA) 裝 5mL 血液，置於離心機 (Kubota 2010, Japan) 以 $775 \times g$ ，離心 15 分鐘，取血清 0.5 mL 以自動血清生化儀 (Chiron Express Plus, USA) 檢測血液生化值包括 alkaline phosphatase (ALP)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、blood urea nitrogen (BUN)、total protein (TP)、albumin、creatine phosphate kinase (CPK)、glucose、lactate dehydrogenase (LDH) 及 creatinine，並剖檢觀察肉眼病理變化。另取臟器組織置於 10% (V/V) 中性福馬林溶液中固定 48 小時以上，而後經石蠟包埋等過程製成切片，

以蘇木紫及伊紅 (H & E)、Masson's trichrome、Toluidine blue 及 Luna's 等染色, 分別於光學顯微鏡下觀察組織病理變化。

結果分析 各試驗組所得動物死亡數值以 probit analysis (Maximum Likelihood Program) 分析求得半致死劑量 (median lethal dose, LD_{50})。各試驗組所得數值以 Microsoft Excel 之 AVERAGE 法求取平均值及 STDEV 法求取標準偏差值, 以 Student's *t*-test 分析法比較各處理組與對照組值之組間差異, 倘數值 $p < 0.05$ 則具顯著性差異。

結 果

口服急毒性試驗 以 5.87% 蘇力菌素進行大鼠口服急毒性第一項試驗, 顯示在劑量 50 mg/kg 死亡 5 隻 (3 雌, 2 雄)、在 70 mg/kg 死亡 8 隻 (4 雌, 4 雄)、在 90 mg/kg 死亡 9 隻 (5 雌, 4 雄), 死亡鼠隻均於兩天內出現, 其口服半致死劑量 (LD_{50}) 為 53.9 mg/kg, 於 95% 可信賴區間值為 42.8-63.8 mg/kg。中毒鼠隻呈遲鈍、皮毛粗剛、抽搐及死亡, 並有鼻分泌物等症狀。此蘇力菌素對雄鼠口服後第 7 天, 30 mg/kg 處理組未死亡鼠隻之平均體重增長百分率較對照組減少, 第 21 天血液相及血清生化值, 其紅、白血球總數減少, 部分血清生化值 ALP、AST 及 LDH 均下降 (表 1、表 2), 唯在正常值範圍內 [25]。死亡鼠隻經組織病理切片觀察, 其肝臟呈現出血、鬱血及局部凝固樣壞死之病變 (圖 1), 部分肺臟呈現瀰漫性出血病變, 腎臟亦呈現鬱血的明顯病變。第二項試驗以胃管口服投予最大溶解度 1,090 mg/kg 之 7.20% 蘇力菌素後, 對大鼠無任何毒性症狀產生或明顯的病理變化。第三項試驗處理組鼠隻均呈遲鈍、皮毛粗剛及抽搐, 並有鼻分泌物等中毒症狀, 結果顯示以 CPC 經口服處理大鼠其 LD_{50} 值大於 250 mg/kg。

肺急毒性試驗 肺急毒性試驗以細接種針經氣管投予 7.20% 蘇力菌素後, 所有大鼠均呈呼吸音 (水泡音), 部分處理組大鼠產生明顯的低體溫 (表 3)、俯臥、皮毛粗剛、體重增重減少之臨床症狀並造成部分大鼠死亡。死亡鼠隻均於八天內出現, 在劑量 50 mg/kg 死亡 3 隻 (1 雌, 2 雄)、在 100 mg/kg 死亡 7 隻 (3 雌, 4 雄)。分析其肺急毒性

LD_{50} 為 71.8 mg/kg, 於 95% 可信賴區間值為 51.8-99.3 mg/kg。大體解剖肉眼觀察可見處理組初期死亡 (第 3 天) 鼠隻肺臟表面潮紅呈明顯的充出血病變 (圖 2a), 未死亡 (第 21 天) 鼠隻可見肺臟表面呈局部點狀紅色病變區及大區域紫灰色病變區 (圖 2b)。組織切片可見初期死亡 (第 3 天) 鼠隻肺臟具明顯的瀰漫性出血、肺氣腫、小支氣管炎、肺泡細胞大量的嗜中性球浸潤病灶區及部分肺泡細胞壞死 (圖 3a)。後期死亡 (第 8 天) 可見因大區域出血致使血液逆流終末氣管、小支氣管上皮細胞呈立方樣增生及纖毛脫落、肺泡壁破裂及結締組織增殖之慢性纖維化 (圖 3b) 病變, 未死亡鼠隻肺臟可見更明顯的結締組織增殖之慢性纖維化病變, 以 Masson's trichrome 染色法, 可見膠原物質呈藍色反應 (圖 4a), 以 Luna's 染色法, 可見增殖的肺泡細胞質內有豐富嗜伊紅性顆粒之肥胖細胞出現 (圖 4b)。

討 論

蘇力菌發酵液以 CPC 進行純化萃取後, 所得之 5.87% 蘇力菌素其口服 LD_{50} 為 53.9 mg/kg, 於 95% 可信賴區間值為 42.8-63.8 mg/kg, 在農委會所公告農藥毒性分類上 [1], 屬口服劇毒性 (固體) 物質, 即 LD_{50} 值介於 5 至 50 mg/kg。死亡鼠隻經組織病理切片觀察, 部分肝臟組織呈現出血、鬱血及局部壞死, 部分肺臟組織呈針狀出血、立方上皮細胞增生病變, 且劑量越高病變越明顯; 未死亡之大鼠於處理後第 21 天解剖, 可見其肝臟及肺臟組織病變均已進行修復, 部分原先所造成的組織病變已不明顯或出現慢性局部肉芽腫性病變, 依此推論 5.87% 蘇力菌素對大鼠造成的組織傷害是一種可逆反應, 此可說明第 21 天血清生化值測值 (表 2) 為何不具任何臨床病理上的意義。而根據 Nelson 等報告 [17] 指出, CPC 主要用途是做為防腐劑、消毒及治療敗血症之藥劑, 其對大鼠的口服半致死劑量 LD_{50} 值為 200 mg/kg 屬於口服中等毒性之物質。使用澱粉作為純化萃取物質之 7.20% 蘇力菌素口服急毒性試驗, 當單一劑量投予最大溶解度之蘇力菌素 1,090 mg/kg 時, 並不造成大鼠口服致死毒性, 與 Sebesta 等 [21] 在小鼠連續餵食蘇力菌素 200 mg/kg 八天後引起部分鼠隻的死亡不同, 由於 Sebesta 等之試驗在連續餵食

Table 1. Hematological changes were gavaged with 5.87 % thuringiensin product (CPC-extracted) for 21 days in rats.

Item	Treatment (mg/kg)					
	male			female		
	0	10	30	0	10	30
RBC (10 ⁶)	7.28 (0.39)	6.82 (0.12)	6.28 (0.14)	6.74 (0.38)	6.38 (0.50)	8.14 (0.39)
Hct (%)	6.85 (0.12)	7.21 (0.17)	7.73 (0.05)	7.26 (0.35)	7.23 (0.21)	7.33 (0.24)
MCV (fL)	15.98 (0.14)	15.54 (0.17)	16.24 (0.17)	15.56 (0.15)	15.43 (0.12)	15.6 (0.19)
WBC (10 ³)	42.84 (0.66)	40.88 (0.55)	42.96 (0.80)	42.56 (1.66)	39.4 (0.85)	39.52 (1.09)
Hb (g/dL)	62.4 (0.22)	56.8 (0.87)	55.6 (0.78)	59.0 (1.2)	54.8 (0.58)	54.0 (0.4)

the values are showed as mean, also give one standard deviation in (); RBC: red blood cell; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; WBC: white blood cell; Hb: hemoglobin

Table 2. Biochemical changes were gavaged with 5.87 % thuringiensin product (CPC-extracted) for 21 days in rats.

Item	Treatment (mg/kg)					
	male			female		
	0	10	30	0	10	30
ALP (μ /L)	216 (22.80)	210.2 (17.62)	185.8 (9.43)	199.6 (11.68)	224.75 (22.67)	152.4 a (8.85)
AST (μ /L)	152.6 (6.62)	143.6 (3.64)	126.2 a (3.83)	141.2 (6.64)	144.75 (5.32)	122 (7.45)
ALT (μ /L)	66.6 (2.41)	74.4 (2.31)	67.4 (3.94)	68.8 (2.78)	72.5 (2.01)	58.8 (6.91)
BUN (mg/dL)	20.2 (1.04)	20.8 (1.58)	22.2 (1.8)	24.4 (1.34)	24.8 (1.43)	20.4 (0.67)
T. protein (g/dL)	6.76 (0.22)	7.12 (0.14)	7.4 (0.24)	6.82 (0.08)	7.33 (0.27)	6.96 (0.28)
Glucose (mg/dL)	143 (10.55)	133 (6.29)	129.2 (7.33)	159 (8.55)	173.5 (9.88)	154.8 (6.26)
LDH (μ /L)	1956.4 (128.25)	1618 (175.18)	1246.8 a (128.35)	1746.6 (128.25)	1488.3 (99.92)	1051 a (64.59)
Creatinine (mg/L)	2.84 (0.21)	2.46 (0.11)	2.40 (0.08)	2.78 (0.07)	3.30 (0.25)	2.42 (0.12)

the values are showed as mean, also give one standard deviation in (); a : significant difference compare with control group at $p < 0.05$; ALP: alkaline phosphatase ; AST: aspartate aminotransferase; ALT : alkaline aminotransferase ; BUN : blood urea nitrogen; T. protein : total protein ; LDH : lactate dehydrogenase.

Table 3. Body temperature changes were intratracheally instilled with 7.20 % thuringiensin product (starch-extracted) during 24 hours in rats.

Sex	Treatment (mg/kg)	Body temperature °C at			
		Day prior to dosing	2hr after dosing	4hr after dosing	24hr after dosing
♂	0	37.7±0.1	37.5±0.1	37.2±0.3	37.4±0.1
	5	37.5±0.3	37.1±0.2	36.7±0.1	35.5±0.2 a
	20	38.1±0.2	36.5±0.3 a	36.5±0.4	35.1±0.3 a
	50	38.0±0.2	36.5±0.4 a	36.7±0.3	34.0±0.1 a
	100	37.6±0.2	35.7±0.2 a	36.7±0.3	33.9±0.3 a
♀	0	38.7±0.1	38.3±0.3	37.8±0.2	38.3±0.3
	5	38.6±0.3	38.0±0.2	37.4±0.1	37.2±0.2
	20	38.8±0.1	37.5±0.4	37.2±0.4	36.1±0.2 a
	50	38.7±0.3	36.2±0.6 a	36.5±0.8 a	35.3±0.2 a
	100	38.8±0.3	35.3±0.7 a	36.6±0.4 a	35.9±0.6 a

a : significant difference compare with control group at $p < 0.05$.

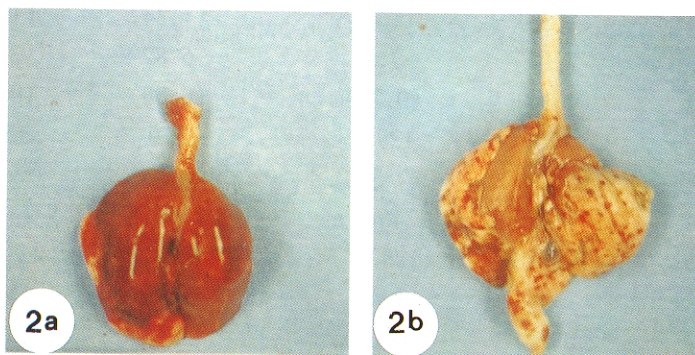
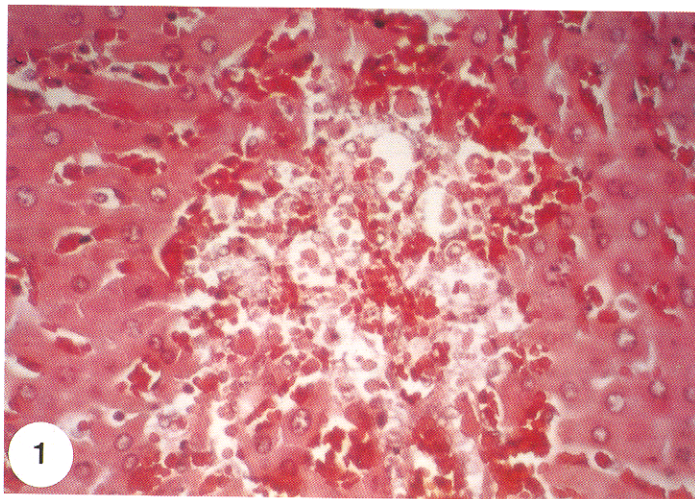


Fig. 1 Rat was gavaged with 70 mg/kg 5.87 % thuringiensin product (CPC-extracted) which caused dead and multiple focal hemorrhagic, and coagulative necrotic foci of liver after 2 days treatment (H&E stain, $\times 400$).

Fig. 2 Rat was intratracheally instilled with 100 mg/kg 7.20 % thuringiensin product (starch-extracted), and (a) showed remarkable hemorrhage and edema of lung in a dead rat after 3 days application, and (b) the survival rats

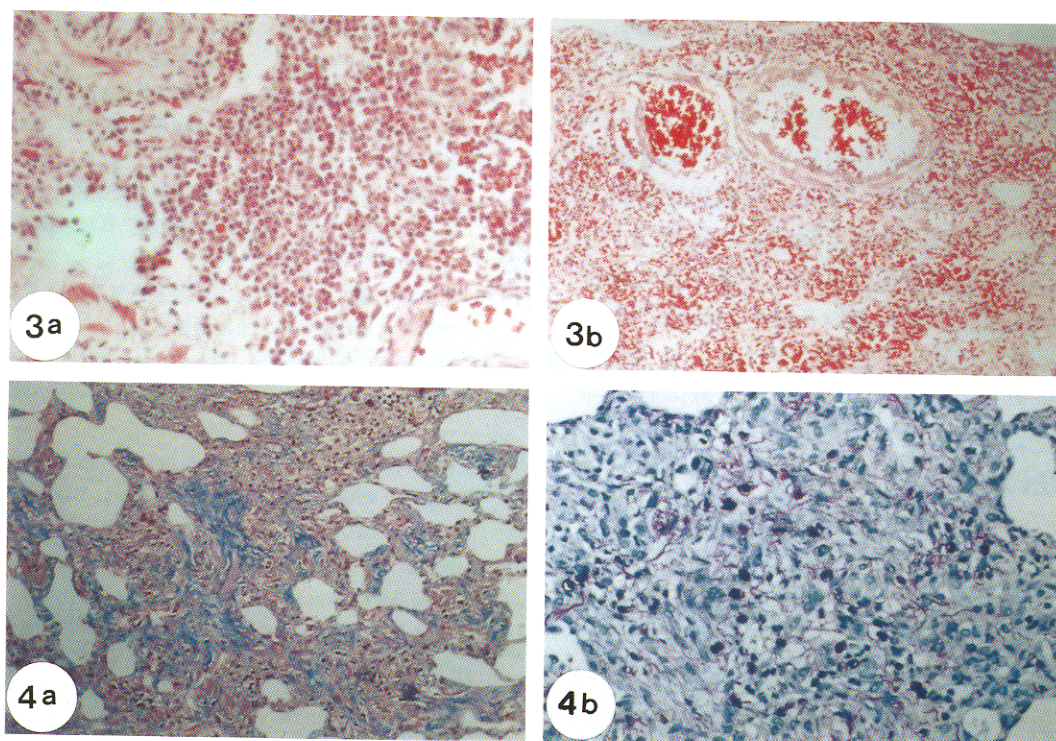


Fig. 3 Rat was intratracheally instilled with 100 mg/kg 7.20 % thuringiensin product (starch-extracted), and (a) showed focal necrotic cellular debris and remarkable neutrophil infiltration of lung in a dead rat at 3-day (H&E stain, $\times 400$), and (b) focal fibrotic proliferation, and fibrosis of lung in dead rats at 8-day treatment (H&E stain, $\times 100$).

Fig. 4 The survival rats were intratracheally instilled with 100 mg/kg 7.20 % thuringiensin product (starch-extracted), that, (a) bluish color of collagen could be strongly stained by Masson's Trichrome staining method ($\times 100$), and (b) abundance eosinophilic granules in the cytoplasm of mast cells (Luna's stain, $\times 400$) in the focal fibrotic tissues of lungs after 21 days treatment.

八天後的蘇力菌素總量為 1,600 mg/kg，加上使用不同實驗動物種類，可能是造成此口服急毒性之差異所在，唯蘇力菌素本身不屬於口服劇毒性物質是可確定的。而口服投予大鼠 CPC 原體 250 mg/kg 劑量後，鼠隻均呈遲鈍、皮毛粗剛及抽搐，並有鼻分泌物等中毒症狀，唯不造成任何大鼠的死亡，顯示本試驗 CPC 對大鼠口服 LD_{50} 值應大於 250 mg/kg。由 5.87% 蘇力菌素之 LD_{50} 值為 53.9 mg/kg、CPC 原體對大鼠口服急毒性及 Nelson 等報告 [17] 之 CPC 口服 LD_{50} 值，推估 5.87% 蘇力菌素所含的 CPC 量應很高，才造成如此口服劇毒物質。綜合口服急毒性試驗結果顯示，5.87% 蘇力菌素的急性致死毒性與中毒症狀應由 CPC 所造成，此可由 7.20% 蘇力菌素對大鼠的口服 LD_{50} 大於 1,090 mg/kg 可知，而此口服毒性資料可間接提供人體安全的急毒性毒理劑量參考值。因此在進行蘇力菌素量產的純化萃取沉澱時，應先進行類似毒理試驗，以

篩選低毒性的萃取物質或取少量毒性物質配合其他無毒性物質，如此一方面可達到萃取目的，另一方面符合蘇力菌素本身對人體的安全考量。

至於肺急毒性之研究，以氣管灌注法為實驗動物模式直接將蘇力菌素灌注於肺臟中探討其安全性，此技術具有劑量投予精確、操作快速及不需昂貴儀器設備之優點，對於開發新的本土性微生物或生化農藥，欲短時間內瞭解其呼吸毒性或預備上市所需之毒理資料為可行的試驗方法 [23]。在大鼠氣管灌注蘇力菌素後，造成大鼠體溫在 24 小時內明顯降低，此低體溫之臨床症狀產生，可能類似蘇力菌內毒素造成心跳徐緩 [16] 之情形，而間接影響體溫的下降有關。由早期死亡鼠隻之肺臟組織中白血球大量的浸潤，顯見蘇力菌素存在肺臟組織會引起供試鼠隻激烈的炎症反應，終造成大鼠體重之增重明顯的降低及部分高劑量處理組的大鼠死亡，由大鼠肺急毒性 LD_{50} 值為 71.8 mg/kg，於 95% 可

信賴區間值為 51.8-99.3 mg/kg, 顯見以含無毒的澱粉作為純化蘇力菌素之萃取物時, 蘇力菌素本身對大鼠仍具肺急毒性。至於病理學變化上, 在大體解剖肉眼觀察時, 處理組死亡鼠隻產生明顯肺臟充血, 組織切片可見初期死亡鼠隻之肺臟組織受蘇力菌素刺激, 產生明顯的炎症反應吸引大量的嗜中性球的浸潤, 使肺臟組織通透性增加, 導致細胞瀰漫性出血、肺氣腫、小支氣管炎及肺泡細胞急性壞死之病變, 後期可見因大區域出血致使血液逆流終末氣管及動物體內肺臟組織之修復加上淋巴球之出現, 使小支氣管上皮細胞增生及纖毛脫落、肺泡壁的破裂及結締組織增殖之慢性纖維化病變。此蘇力菌素所造成的病變與蘇力菌孢子使組織產生炎症反應, 進而吸引吞噬細胞, 以進行吞噬及清除的工作, 形成慢性的多發性肉芽腫病變 [6] 不同, 這可能歸因於蘇力菌素易溶於水之特性 [2], 可快速的在肺臟組織中分佈及吸收, 導致肺泡細胞急性壞死之急性病變。另外在病變區中以 Luna 氏染色可見細胞質內有豐富嗜伊紅性顆粒之肥胖細胞, 這是否和蘇力菌素之分子量較大 (分子量 701) 又含有腺嘌呤, 核糖, 葡萄糖及磷酸等分子 [14] 為一良好的過敏原有關, 唯本次試驗為單次的曝露蘇力菌素於氣管中, 肺臟出現大量的肥胖細胞, 則有待進一步的探討。

綜合試驗結果顯示, 以含不具毒性的澱粉萃取物, 所純化之蘇力菌素不具明顯的口服急毒性, 唯具肺急毒性。因此商品化之蘇力菌素應避免利用粉劑型式, 考量使用粒劑或水溶性粒劑之劑型, 以避免對人類健康造成潛在的呼吸毒性。

誌 謝

本文承蒙國科會 NSC86-2622-E-259-001 (4) 計畫經費, 洪慶和先生、張淑滿及湯秀枝小姐等協助動物房管理、動物解剖及組織切片製作, 謹此誌謝。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。農藥毒理資料範圍公告。八十農糧字第 002671A 號。臺北, 1991。
2. 曾耀銘、鄭宏盈。微胞強化超過濾技術回收蘇力菌素的測試與探討。技術學刊 10: 261-268, 1995。
3. 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物及相

- 開設之微生物監測系統: I. 細菌監測系統。藥試所專題報導 36: 5-17, 1995。
4. 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物房微生物監測系統: II. 黴菌及病毒監測系統。藥試所專題報導 43: 9-17, 1996。
5. 蔡三福、廖俊旺、王順成。藥試所毒理研究之 SPF 動物房微生物監測系統: III. 寄生蟲監測系統。藥試所專題報導 46: 1-8, 1997。
6. 蔡三福、廖俊旺、王順成。比較大鼠氣管灌注蘇力菌及黑殭菌孢子之清除及影響。中華獸醫誌 23: 515-522, 1997。
7. Barjac HD, Burgerjon A, Bonnefoi A. The production of heat-stable toxin by nine serotypes of *Bacillus thuringiensis*. J Inverte Pathol 4: 537-538, 1966.
8. Faust RM. Bacteria and their toxins to insecticides. In: Microbial and virus pesticides. Kustak E ed. Dekker, New York, 75-110, 1982.
9. Hayes AW. Principles and methods of toxicology. Third Edition. Raven Press, New York, 1994.
10. Heimpel AM. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". J Inverte Pathol 9: 346-375, 1967.
11. Jong JZ, Hsiun DY, Wu WT, Tzeng YM. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production in a tower type bioreactor. Biotech Bioeng 48: 207-213, 1995.
12. Kallapur VL, Mayes ME, Edens FW, Held GA, Dauterman WC, Kawanishi CY, Roe RM. Toxicity of the crystalline polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Japanese quail. Pestic Biochem Physiol 44: 208-216, 1992.
13. Latch GCM. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. Entomophaga 21: 31-38, 1976.
14. Levinson BL, Kasyan KJ, Chiu SS. Identification of exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by HPLC. J Bacteriol 6: 3172-3179, 1990.
15. Mareec F, Matha V, Weiser J. Analysis of the genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin by means of drosophila wing spot test. J Inverte Pathol 53: 347-353, 1989.
16. McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic Sci 45: 95-105, 1995.
17. Mayes ME, Held GA, Lau C, Seely JC, Roe RM, Dauterman WC and Kawanishi CY. Characterization of the mammalian toxicity of the crystal polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Fundam Appl Toxicol 13: 310-322, 1989.
18. Nelson SC, Lyster SC. Acute toxicity of cetylpyridinium chloride for mammals. J Am Pharm Assoc 35: 89, 1946.
19. Rodriguze-Padilla C. *Bacillus thuringiensis neoleonensis* serotype H-24, a new subsp. Which produces a triangular crystal. J Inverte Pathol 56: 280-282, 1990.
20. Rowe GE, Margaritis A. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit Rev Biotech 6: 87-127, 1987.
21. Sebesta K, Farkas J, Horská K. Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges HD ed. Microbial control

- of pests and plants diseases 1970-1980. Dekker, New York, 249-281, 1981.
22. Siegel JP, Shaddock JA, Szabo J. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. J Entomol 80: 717-723, 1987.
23. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Program. Pesticide Assessment Guidelines. FIFRA Subdivision M: Microbial and Biochemical Pest Control Agents, Subsection 154A-16. Washington, D.C. 192 pp, 1988.
24. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides & Toxic Substances. Health Effects Test Guidelines. EPA 56016-82-001, Washington D.C., 1982.
25. Vondruska JF, Greco RA. Certain hematologic and blood chemical values in Charles River CD albino rats. Bull Am Soc Vet Clin Pathol 2: 3-7, 1973.

Acute Oral and Pulmonary Toxicity of Thuringiensin in Rats

San-Fu TSAI, Jiunn-Wang LIAO and Shun-Cheng WANG

Department of Applied Toxicology, Taiwan

Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC

(Received: June 26, 1998. Accepted: August 12, 1998.)

ABSTRACT Mammalian acute oral and pulmonary toxicities of rats to thuringiensin products from different protocols such as extracts from cetylpyridinium chloride, and starch-extracted were investigated in this study. Rats were gavaged individually with dosage as follows: 0, 10, 30, 50, 70 and 90 mg/kg of 5.87% thuringiensin (CPC-extracted) per body weight, or 0, 500 and 1,090 mg/kg of 7.20% thuringiensin (starch-extracted), 0 and 250 mg/kg of CPC as extracted-material control group. The observation period was set for 21 days. Results revealed that 5.87% thuringiensin- and CPC-treated animals showed signs of dullness, rough hair, convulsion or eventually died. Unlike 5.87 % thuringiensin- and CPC-treated animals, the 7.20% thuringiensin treated showed no significant toxic sign after treatment. The calculated oral LD₅₀ of 5.87% thuringiensin product was 53.9 mg/kg based on our results. According to the oral toxicity, the LD₅₀ of 7.20% thuringiensin was greater than 1,090mg/kg, and then evaluate the pulmonary toxicity. Intratracheal instillation was applied with 0, 5, 20, 50 and 100 mg/kg per body weight of 7.20% thuringiensin product for 21 days. Respiratory-rales, hypothermia, prone, rough hair, decrease body weight gain and death were observed after dosing. The pulmonary LD₅₀S calculated was 71.8 mg/kg. At necropsy, effected lungs were exhibited remarkable hyperemia and hemorrhage on the surface of thuringiensin treated rats. Pathological findings revealed symptoms such as diffused hemorrhage, edema, emphysema, bronchiolitis, and alveolar necrosis in the dead animals, and focal fibrotic lesions in the survival rats at the end of experiment. In conclusion, both of 5.87 % thuringiensin product and CPC were harmful to rats by oral uptake in this study. The 7.20% thuringiensin did not cause acute oral lethality until the dosage reached 1,090 mg/kg or above, but induced obviously pulmonary toxicity in tested rats. The best strategy to minimize the risk of pulmonary toxicity on mammals would be to formulate it in a granule form or soluble form. [*Tsai SF, Liao JW and Wang SC. Acute oral and pulmonary toxicity of thuringiensin in rats. J Chin Soc Vet Sci 24(3):203-211, 1998. *Corresponding author TEL:04-330 2101, FAX: 04-332 3073]

Keywords: *Thuringiensin, Oral toxicity, Pulmonary toxicity, Rat*