

# 斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) (Lepidoptera: Noctuidae) 核多角體病毒對大鼠毒性與致病性之安全評估

游明惠<sup>1</sup> 張敬宜<sup>1</sup> 李松泰<sup>2</sup> 蔡躉任<sup>1\*</sup>

1. 台中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所應用毒理組  
2. 台南縣永康市 南台科技大學生物科技系

(接受日期：2009年6月30日)

## 摘 要

游明惠、張敬宜、李松泰、蔡躉任\* 2009 斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 核多角體病毒對大鼠毒性與致病性之安全評估 植保會刊 51(1, 2): 33-52

本試驗主要為支援病毒類微生物製劑產品開發過程中原體之安全評估，以提供生物性農藥產品商品化所需的毒理資料。以  $1 \times 10^8$  PIB/ml 之 *Spodoptera litura* 核多角體病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV) (SpltNPV) 包涵體，進行大鼠口服 (10 ml/kg 體重) 與氣管灌注 (1 ml/kg 體重) 毒性與致病性之安全評估。口服與肺急毒性試驗以 Spraque-Dawley (SD) 品系大鼠分為 A、B、C、D、E 共 5 組，其中 A-C 為處理組，D 與 E 組為高壓滅菌與空白組，分別在第 1、3 及 21 天評估致死率、臨床症狀、體重增重、臟器重量、血液學、血清生化、血清蛋白電泳、聚合酶鏈鎖反應偵測病毒及組織病理判讀。結果顯示經 SpltNPV 口服後無任何大鼠死亡，亦無明顯的臨床症狀，體重增重、肉眼病變等與空白組比較亦無明顯差異，臟器重量方面第 21 天處理組大鼠肝臟顯著低於滅菌組。大鼠氣管灌注後肺臟可見明顯的發炎反應，體重除第 1 及第 3 天顯著低於空白組 ( $p < 0.05$ ) 外，第 21 天體重則無明顯差異；血清生化分析顯示尿酸 (Uric acid) 顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ )；處理組與滅菌組肝臟重量組織顯著低於空白組，肺臟重量則顯著大於空白組。血清蛋白方面，口服與氣管灌注試驗第 1、3 與 21 天處理組及對照組大鼠皆具相似之 SDS-PAGE 血清蛋白圖譜與濃度。經由 (35/36) 引子監測臟器內純化的 DNA，並未在大

\* 通訊作者。E-mail: sftsai@tactri.gov.tw

鼠肺臟與其他組織臟器增幅出 680 bp 的病毒基因片段。綜合上述結果顯示，SpltnNPV 對大鼠無明顯之口服與肺急毒性或致病性。此試驗研究除了建立較完整之病毒類微生物製劑對溫血動物之安全評估系統外，並可支援 SpltnNPV 微生物製劑產品之商品化及對此類產品管理政策訂定之參考。

(關鍵詞：核多角體病毒、包涵體、聚合酶鏈鎖反應)

## 緒 言

近年由於化學性農藥的廣泛使用，導致部份環境、土壤與食物中藥物殘留超過標準，欲減少此問題，乃逐漸開發出生物性製劑作為控制作物害蟲之替代方法<sup>(4)</sup>。以巴西為例，使用病毒類微生物製劑已成功防治境內超過 200 萬公頃之黃豆作物免於蟲害的爆發<sup>(18, 19)</sup>。桿狀病毒為少數使用於田間之病毒類微生物農用製劑之一，桿狀病毒除了可作為生物性農藥之外，更可運用於基因療法、外來蛋白表現系統與生物試劑之生產。桿狀病毒科 (Baculoviridae) 可分為核多角體病毒 (Nucleopolyhedrovirus, NPV) 和顆粒體病毒 (Granulovirus, GV)<sup>(15)</sup>，其中經研究報導之桿狀病毒已超過 800 種，國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV) 共紀錄 504 種 NPVs 與 135 種 GV<sup>s</sup> <sup>(20)</sup>。桿狀病毒大小約為 40-50×200-400 nm<sup>(12)</sup>，具有環狀雙股 DNA (80-200 kb) 及核心蛋白，結合成一個核酸蛋白核心 (nucleic acid-protein core)<sup>(23, 26)</sup>，此核心被一桿狀之核蛋白外鞘 (capsid) 包裹，並在單一或多個核酸外鞘外，再覆以封套 (envelope) 形成病毒顆粒。病毒感染產生的後代具胞外病毒 (extracellular virus, ECV) 與包涵體病毒 (occluded virus, OV) 兩種型式，稱雙相式複

製週期 (biphasic replication cycle)。前者由受感染的細胞以出芽 (budding) 方式所產生，主要作為細胞與細胞間的感染；後者包埋於包涵體 (inclusion body) 中，於感染最晚期時經細胞裂解後才釋出，主要作為昆蟲個體之間的感染。昆蟲在感染晚期血淋巴內的病毒會形成大量的結晶狀包涵體，以保護病毒於不適宜環境下生存<sup>(27)</sup>。桿狀病毒對植物害蟲具高度特異性，昆蟲對於病毒產生的抗性也較小，若與其他生物防治法或化學農藥並用時，甚至可產生協同作用，增加殺蟲效果<sup>(5)</sup>，但其缺點為作用所需時間較化學性藥物長。為改善此一缺點，科學家藉由生物科技嵌插相關基因於桿狀病毒基因體中，如昆蟲特異性之毒性基因 AaIT，可提高 40% 病毒消滅害蟲之能力及降低 60% 的病毒投予量<sup>(2, 14)</sup>。

利用昆蟲桿狀病毒作為防治農業害蟲斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 為當前新興的方法之一，昆蟲桿狀病毒除了對少數同科種類昆蟲具專一性外，目前在農業的應用上亦已發展出多種商品化的 NPV 殺蟲劑。雖然大部分研究指出桿狀病毒對脊椎動物和植物不具明顯毒性，但面對日益增多的病毒類製劑，仍須於上市前評估其安全性。另一方面，為了解經基因改造之病毒類微生物製劑實際應用的可行性與潛在之危險性，亦應審慎評估以防止環境與生態

平衡及安全性的問題。目前已有多種偵測宿主體內病毒的方法，如免疫化學法<sup>(24)</sup>、原位雜交反應<sup>(29)</sup>、電子顯微鏡觀察<sup>(16,9)</sup>、azan 染色<sup>(11, 30, 22)</sup>與聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)<sup>(28)</sup>等方法。其中，PCR 檢測已於流行病學及醫療生技領域上行之多年，可有效且快速偵測出特異性病原。已知核多角體病毒基因組中含有 P10 及多角體蛋白 (polyhedrin) 二強勢啟動子，因此，桿狀病毒表現載體系統常利用 P10 及 polyhedrin 啟動子來啟動外源基因的表現。Chou 等人<sup>(6)</sup>曾以引子 (35/36) 增幅出約 680 bp 的多角體基因片段，許多研究報告也多次運用此組引子作為核多角體病毒的鑑定技術之一。因此，本研究以引子 (35/36) 作為鑑定大鼠組織中斜紋夜蛾核多角體病毒基因片段之引子，利用 PCR 方法偵測大鼠經胃管灌食與氣管投予核多角體病毒微生物製劑後病毒的分佈與清除，並評估對大鼠毒性與致病性之強弱，以支援本土性核多角體病毒產品開發過程中所需的毒理資料及其安全性。

## 材料與方法

### 試驗動物

試驗分為口服與肺急毒性兩部分，試驗動物為 5 週齡之 Spraque-Dawley (SD) 品系大鼠，購自樂斯科生物科技股份有限公司 (台灣，台北)。在本所動物飼育室觀察 2 週後，取體重約  $300 \pm 50$  g 相近之健康成鼠進行試驗。每一試驗依逢機方式分為 A、B、C、D、E 共 5 組，其中 A-C 為試驗組 (IB)，D 與 E 組為高壓滅菌 (A-IB) 與空白組 (DW)，大鼠數目各組分別為 3、3、

6、12 及 12 隻。試驗動物每籠關 1-2 隻除了處理前 3 小時及處理後 4 小時禁食外，給予充足之飼料 (Lab Diet<sup>®</sup> 5001 Rodent diet, PMI, IN, USA) 及飲水。動物飼育室控制狀況為溫度 19-25 °C 及 12 小時光 / 12 小時暗之光照週期。

### 試驗病毒包涵體之純化

參考 Chou<sup>(6)</sup>之方法純化斜紋夜蛾蟲體內之包涵體。口服投予之病毒包涵體由本所生物藥劑組提供感染核多角體病毒之斜紋夜蛾蟲體，經研磨之組織液以紗布過濾，經 2000 rpm，4°C 離心 10 分鐘後取上清液，內即含有 *Spodoptera litura* NPV (SpltNPV) 包涵體。氣管投予之病毒包涵體純化液同樣以感染 SpltNPV 之斜紋夜蛾蟲體以去離子水磨碎後，先以紗布過濾再以棉布進行第二次過濾。於 4°C 下 5,000 rpm 離心 30 分鐘。以正己烷洗去脂肪體後經糖梯離心收集約 55% 左右的環帶處，經去離子水離心洗淨，沉澱之包涵體以 TE buffer (Tris-EDTA buffer) 回溶，口服與氣管投予的病毒純化液以血球計數盤計算之包涵體數目皆大於  $10^8$  PIBs/ml。

### 試驗設計

試驗動物劑量選擇依據美國環境保護署頒布之微生物製劑對溫血性動物急毒性、致病性及感染性毒性評估測試指引進行。口服急毒性方面，以塑膠注射針筒 (Terumo, Tokyo, Japan)，套上長 90 mm 不鏽鋼胃管 (Fine Science Tools, USA)，將  $1 \times 10^8$  PIBs/ml SpltNPV 強迫餵食大鼠，每隻灌注之液體量為 10 ml/kg 體重。肺急毒性方面以哈樂仙 (Halothane, Halocarbon, USA) 進行

全身性呼吸麻醉，將大鼠門齒掛於壓克力網架上，取 1 ml 塑膠注射針筒套上長 110 mm 不鏽鋼接種針 (Hamilton 91072, USA)，透過耳鏡 (Hene, Germany) 經喉頭進入氣管，每隻灌注液體量為 1 ml/kg 體重，其 SpltNPV 濃度調整為  $1 \times 10^8$  PIBs/ml。於處理後第 1、3 與 21 天解剖。對照組則僅給予去離子水或滅菌之包涵體。

### 試驗檢查及分析項目

項目包括致死率、臨床症狀、體增重、臟器重量、血液學、血液生化、血清蛋白電泳及聚合酶鏈鎖反應。動物大體解剖時採大鼠肝臟、脾臟、胸腺、腦、腎臟、肺臟並秤重，臟器將作為組織病理或 PCR 監測病毒。取 1 ml 全血與 1 ml 血清作為血液相、血清生化及血清蛋白電泳分析之樣品。口服毒性方面另取 1 g 盲腸內容物作為 PCR 監測病毒之樣品。

### 組織病理

將大體解剖取下之臟器置於 10% (V/V) 中性福馬林溶液中固定 48 小時以上，經石臘包埋等過程製成切片 (3  $\mu$ m)，經蘇木紫及伊紅 (H&E) 染色後，在光學顯微鏡下觀察組織病理變化。

### 血清蛋白電泳分析

參考 Ashour<sup>(2)</sup>之方法進行血清蛋白電泳分析。4 ml 下膠中包含 1.93 ml 二次蒸餾水、1 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、1 ml 40% acrylamide-bis、40  $\mu$ l 10% SDS、20  $\mu$ l 10% APS 與 2  $\mu$ l 之 TEMED。2 ml 上膠成分則為 1.27 ml 二次蒸餾水、0.5 ml 之 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.2 ml 40% acrylamide-bis、

20  $\mu$ l 10% SDS、10  $\mu$ l 10% APS 與 2  $\mu$ l TEMED。將 20  $\mu$ l 血清與 40  $\mu$ l sample buffer (1 g SDS, 1.5 ml 2-mercaptoethanol, 5 ml glycerol, 與 0.02 g bromophenol blue 皆溶於 50 ml Tris, pH 6.8 中) 混合並以 90°C 加熱 10 分鐘，於作用後將 25  $\mu$ l 之樣品添加於上膠孔洞中。電泳過程為 35 mA/plate，5 小時。膠片以 0.2 % 之 Coomassie brilliant blue R-250 染色，並以 2 : 12 : 28 比例之 96% acetic acid, ethanol 與二次蒸餾水退染去除膠片背景色。

### PCR 監測病毒及敏感度測試

以 QIAamp 之商業化套組 DNA mini kit (NO. C01-51306) 純化臟器中 DNA。純化 DNA 之前，大鼠樣品需剪碎至泥樣狀並以 3 $\times$ DAS (0.3M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.51 M NaCl, 30 nM EDTA, pH 10.9) 劇烈震盪處理。聚合酶鏈鎖反應於無菌微量離心管中依次加入 19.25  $\mu$ l 無菌水、1  $\mu$ l 10 mM dNTP、10  $\times$  Blend Taq buffer、0.5  $\mu$ l 之 10  $\mu$ M 引子 35 (5'-AC<sup>T</sup>/<sub>c</sub> TA<sup>T</sup>/<sub>c</sub> GTG TAC GAC AAC AA<sup>A</sup>/<sub>g</sub> TA<sup>T</sup>/<sub>c</sub> TAC AAA-3') 與 36 (5'-GG<sup>T</sup>/<sub>c</sub> GCG TC<sup>T</sup>/<sub>g</sub> GGT/CGCA AA<sup>T</sup>/<sub>c</sub> TC<sup>T</sup>/<sub>c</sub> TT<sup>A</sup>/<sub>t</sub> AC<sup>T</sup>/<sub>c</sub> TT<sup>A</sup>/<sub>g</sub> AA-3') 或可合成 500 bp 之大鼠  $\beta$ -actin FP (5'-GAT GTA CGT AGC CAT CCA-3') 與 RP (5'-GTG CCA ACC AGA CAG CA-3')、0.25  $\mu$ l Blend Taq polymerase 與 1  $\mu$ l 純化之 DNA。PCR 步驟為 95°C 5 分鐘，55.2°C 1 分鐘，72°C 1 分鐘之後 95°C、55.2°C、72°C 皆 1 分鐘連續 30 個重複，最後 72°C 5 分鐘結束。PCR 反應完成後取反應液 10  $\mu$ l，在 1 % agarose 電泳分析確定產物 DNA 之有無與大小。為確認 PCR 偵測不同包涵體濃度的敏感度與組織臟器對 PCR 偵測干擾程度，

純化之 SpltNPV 包涵體由  $10^8$  PIBs/ml 十倍重複稀釋至  $10^3$  PIBs/ml。另以肺臟組織及盲腸內容物與  $10^8$  PIBs/ml 包涵體混合，以先前步驟取得包涵體 DNA 後再進行 PCR 以計算其偵測敏感度。

### 統計分析

各試驗組所得數值以統計分析系統 (Statistical Analysis System 9.1 版；SAS) 套裝軟體進行統計分析，並使用一般線性模式程序 (general linear model procedure; GLM) 進行變方分析。再以鄧肯氏新多變域法 (Duncan's new multiple range test) 比較各處理組平均值間差異之顯著性，倘數值  $p < 0.05$  則具顯著性差異。

## 結果與討論

由於生物性製劑在自然情況下最易經由口及呼吸系統進入人體，因此試驗上進行口服及肺急毒性對大鼠之影響，以模擬生物性製劑進入人體後所可能產生之毒性作用，並增加 PCR 監測核多角體病毒之分布情形，以建立較完整之病毒類生物製劑

對溫血動物之安全評估模式。

在口服急毒性試驗方面，經胃管灌注 SpltNPV ( $1 \times 10^8$  PIBs/ml, 10 ml/kg) 後，未發現任何供試鼠隻死亡，供試鼠隻亦未發現任何明顯的臨床症狀。以 SpltNPV 處理後大鼠體重輕微下降，至第 21 天時體重輕微上升，各組間體重無顯著差異 (表一)。此結果與大鼠口服  $1 \times 10^8$  PIBs 之 AcMNPV (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) 相似<sup>(2)</sup>。表二顯示至第 21 天時，SpltNPV 處理組大鼠肝臟重量分別低於空白組與滅菌組 24.3% 及 32.8%，其中 SpltNPV 處理組與滅菌組間具顯著差異。由於組織病理切片上未見肝臟細胞有明顯的病理病變，加上肝臟重量較輕常不見臨床上意義，推論應為動物個體差異所造成的。另一方面，經氣管灌注 SpltNPV 後，除部份鼠隻暫時有呼吸音 (水泡音) 之外，均未發現任何供試鼠隻死亡。於體重方面，以 SpltNPV 處理後大鼠第 1 及第 3 天體重顯著低於空白組，至 21 天時則無顯著差異 (表三)，顯示經由氣管灌注 SpltNPV 所導致的肺炎影響大鼠的正常體重增加。由於試驗設計的重點在試驗病毒是否對大鼠造成感染性或致

表一、大鼠口服斜紋夜蛾病毒包涵體後對體重變化之影響<sup>1)</sup>

Table 1. Body weight change in the rats oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body

Administration (day)	DW <sup>2)</sup>	A-IB	IB
1	235.2±22.23	231.8±26.37	230.1±31.04
3	228.4±14.93	225.0±20.30	213.4±20.09
7	242.5±12.44	233.0±35.49	216.7±19.58
14	275.2±18.43	272.8±35.46	240.5±28.86
21	298.3±24.01	299.2±53.95	256.5±49.68

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean (g) ± SD. (n=6 - 12)

<sup>2)</sup> D.W.: deionized water group ; A-IB: autoclaving inclusion body group ; IB: inclusion body group.

表二、大鼠口服斜紋夜蛾病毒包涵體後對臟器重變化之影響<sup>1)</sup>Table 2. Effects on organ weights of the rats oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body

Organ weight (g)		DW	A-IB	IB
D1	Brain	1.98±0.03	1.88±0.06	1.87±0.11
	Thymus	0.38±0.09	0.46±0.06	0.51±0.11
	Lungs	0.95±0.12	0.93±0.10	0.95±0.09
	Liver	10.47±1.44	10.61±0.94	11.71±1.96
	Spleen	0.49±0.03	0.52±0.07	0.54±0.06
	Kidneys	1.90±0.13	1.95±0.31	1.91±0.19
D3	Brain	1.88±0.03	1.92±0.05	1.83±0.06
	Thymus	0.52±0.05	0.52±0.14	0.45±0.11
	Lungs	1.00±0.09	1.06±0.15	0.93±0.09
	Liver	8.85±0.89	8.88±0.28	8.41±0.42
	Spleen	0.52±0.11	0.55±0.10	0.42±0.04
	Kidneys	1.71±0.15	1.83±0.15	1.56±0.11
D21	Brain	1.94±0.08	1.86±0.04	1.89±0.10
	Thymus	0.42±0.11	0.46±0.12	0.37±0.07
	Lungs	1.03±0.11	1.06±0.13	1.03±0.16
	Liver	10.33±1.02ab <sup>2)</sup>	11.64±2.18a	7.82±1.68b
	Spleen	0.58±0.13	0.58±0.08	0.46±0.12
	Kidneys	1.98±0.22	2.15±0.61	1.81±0.28

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean (g) ± SD. (n=3 - 6)

<sup>2)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表三、大鼠氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體後對體重變化之影響<sup>1)</sup>Table 3. Body weight change in the rats after intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body

Administration (day)	DW	A-IB	IB
1	214.8±22.37a <sup>2)</sup>	190.3±21.98b	194.7±20.79b
3	217.1±21.28a	202.2±19.40ab	190.4±21.10b
7	245.2±28.14	232.5±30.60	213.0±29.96
14	267.7±30.65	240.2±39.57	233.0±33.79
21	298.8±51.57	269.2±50.37	253.2±40.48

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean (g) ± SD. (n=6 - 12)

<sup>2)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表四、大鼠氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體後對臟器重變化之影響<sup>1)</sup>Table 4. Effects on organ weights of the rats after intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body

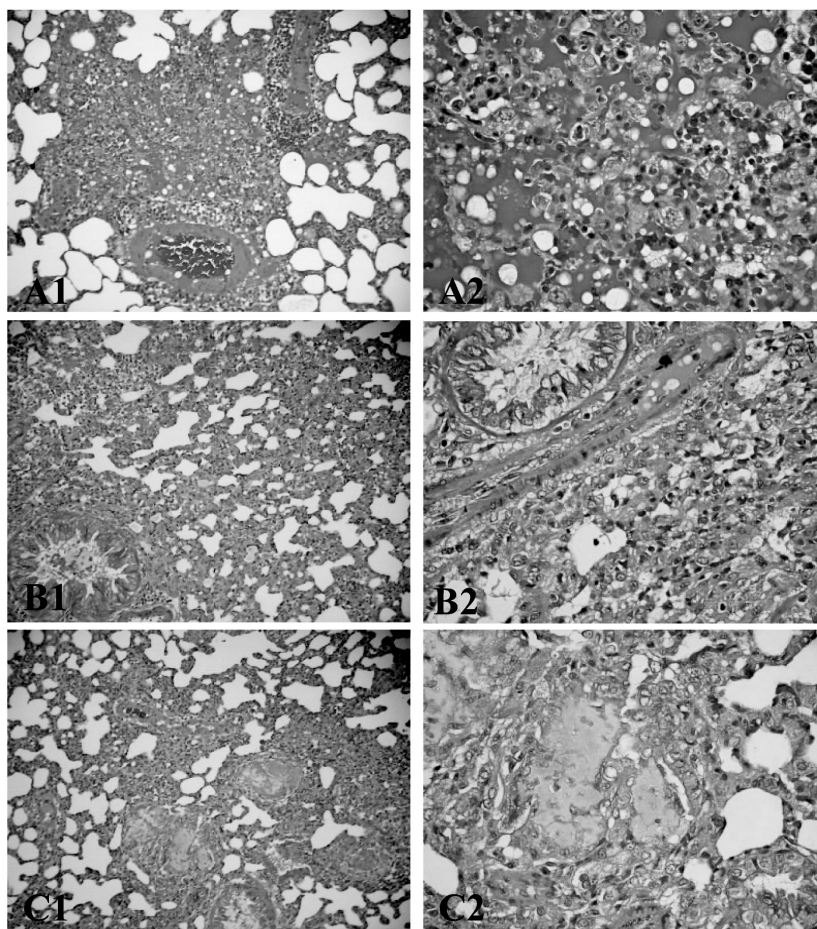
Organ weight (g)		DW	A-IB	IB
D1	Brain	1.85±0.04	1.82±0.08	1.79±0.10
	Thymus	0.48±0.03	0.39±0.02	0.42±0.07
	Lungs	0.99±0.04b <sup>2)</sup>	1.66±0.23a	1.66±0.41a
	Liver	9.29±0.59	9.21±1.04	8.65±1.22
	Spleen	0.63±0.09	0.52±0.08	0.62±0.10
	Kidneys	1.83±0.03a	1.55±0.19b	1.58±0.06b
D3	Brain	1.76±0.02	1.70±0.09	1.71±0.01
	Thymus	0.53±0.06	0.36±0.03	0.54±0.19
	Lungs	1.03±0.02b	1.77±0.23a	1.26±0.07b
	Liver	8.15±0.47	8.41±0.23	8.51±0.80
	Spleen	0.90±0.53	0.50±0.06	0.46±0.10
	Kidneys	1.67±0.26	1.41±0.07	1.51±0.27
D21	Brain	1.88±0.13	1.88±0.07	1.92±0.05
	Thymus	0.53±0.06	0.43±0.13	0.41±0.09
	Lungs	1.16±0.11b	1.53±0.22a	1.33±0.11b
	Liver	12.08±2.48a	9.52±2.33b	7.97±1.17b
	Spleen	0.66±0.08	0.62±0.19	0.53±0.05
	Kidneys	2.09±0.23	1.90±0.29	1.85±0.30

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean (g) ± SD. (n=3 - 6)

<sup>2)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

病性，因而同一組動物中包含雌鼠與雄鼠(相等的數目)，導致表一及表三部分體重數值偏差較大。表四顯示氣管灌注 SpltNPV 後可顯著影響大鼠肺臟、腎臟與肝臟之重量，其中第 1 天處理組與滅菌組肺臟重量高於空白組 ( $p < 0.05$ )，可見外來微生物進入肺臟後引發肺臟的發炎反應，造成肺水腫及充血，使得急性期的肺臟重明顯增加，這亦可由組織病理變化得到證實。腎臟及肝臟重在第 1 或第 21 天時處理組與滅

菌組大鼠均低於空白組，臨床上亦不具明顯的毒性意義。解剖時可見肺臟表面呈現紅色的斑點或區塊，肺臟呈現腫大，於氣管灌注的第 3 天最為嚴重，之後肺臟表面呈現灰色的斑點或區塊，可見炎症反應轉為慢性的反應。將肉眼病變觀察呈現潮紅腫脹的肺臟，進行組織切片觀察，可見處理組大鼠的肺臟有許多炎症細胞的浸潤，且隨著時間增長越為明顯(圖一 A、B、C)，至第 3 天時可見肺泡壁細胞有少許的



圖一、大鼠氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體後的肺臟組織病理變化(100 or 400 X)；(A) 投予後第 1 天肺臟組織可見肺泡腔大量滲出液；(B) 投予後第 3 天肺臟組織可見肺泡壁有少許增生；(C) 投予後第 21 天可見肺泡壁明顯增生。

Fig 1. Histopathological changes of lung from rat intratracheally administered with *Spodoptera litura* inclusion body (100 or 400 X). (A) Day 1, showed a severe exudates in the alveolar space of rat lung. (B) Day 3 showed a recovery and slightly hyperplasia in the alveolar septal walls. (D) Day 21, showed a recovery and severe hyperplasia in the alveolar septal walls.

增生(圖一 B)。21 天時可見明顯增生情形(圖一 C)，高倍率顯微鏡觀察下，病變區出現的細胞主要為淋巴球、伴發少量的漿細胞、嗜中性球及多核巨噬細胞，形成一多發性肉芽腫病變，此病灶屬於正常的異物性肺炎反應病變。

進一步分析血清酵素活性與血液組成

之變化可提供部分大鼠器官或身體系統變化之訊息，以了解體內生理值是否呈現異常的現象。口服 SpltNPV 後之血液變化如表五與表六，其中 alkaline phosphatase (ALP)，aspartate aminotransferase (AST)，alanine aminotransferase (ALT) 與 bilirubin 為肝功能之生物性指標<sup>(2)</sup>。口服後第 1 天處

表五、大鼠口服斜紋夜蛾病毒包涵體後對血清生化數值變化之影響<sup>1)</sup>Table 5. Effect on serum chemical parameters change of the rats oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body

Blood chemical composition		DW		A-IB		IB	
D1	ALP(U/l) <sup>2)</sup>	573.7±	88.82a <sup>3)</sup>	456.7±	81.87ab	342.3 ±	23.54b
	ALT(U/l)	34.6±	11.39	34.0±	4.73	37.2 ±	5.20
	AST(U/l)	105.0±	6.12	100.0±	28.05	75.2 ±	5.02
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.03±	0.06
	CRE(mg/dl)	0.4±	0.00	0.4±	0.00	0.4 ±	0.00
	Glu (mg/dl)	153.0±	5.57	164.0±	10.54	158.3 ±	7.77
	TP(g/l)	4.7±	0.17	4.9±	0.06	4.6 ±	0.23
	Che(U/l)	774.3±	72.34	945.3±	135.88	838.3 ±	134.9
	Uric(mg/dL)	2.0±	0.12	2.9±	1.07	2.0 ±	0.44
D3	ALP(U/l)	413.7±	209.36	269.0±	85.56	333.3 ±	90.65
	ALT(U/l)	32.8±	6.04	32.3±	4.26	42.4 ±	6.63
	AST(U/l)	117.0±	21.95	112.3±	6.18	89.2 ±	5.28
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.1 ±	0.00
	CRE(mg/dl)	0.4±	0.00	0.4±	0.00	0.4 ±	0.00
	Glu (mg/dl)	170.3±	17.39	149.0±	7.55	163.3 ±	18.15
	TP(g/l)	5.2±	0.36	5.0±	0.17	4.8 ±	0.15
	Che(U/l)	2045.7±	44.74	2646.0±	659.63	2345.0 ±	322.43
	Uric(mg/dL)	2.1±	0.12	2.0±	0.21	1.9 ±	0.20
D21	ALP(U/l)	250.5±	74.31ab	313.2±	137.09a	134.3 ±	75.52b
	ALT(U/l)	37.2±	3.96a	41.3±	11.4a	21.5 ±	9.78b
	AST(U/l)	107.4±	15.50a	81.4±	20.36b	94.5 ±	7.34ab
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.1 ±	0.04
	CRE(mg/dl)	0.5±	0.05	0.4±	0.04	0.5 ±	0.10
	Glu (mg/dl)	162.7±	6.74a	155.2±	11.11a	131.0 ±	15.01b
	TP(g/l)	5.1±	0.52	5.1±	0.46	5.0 ±	0.55
	Che(U/l)	1999.2±	1304.72	2168.7±	1501.70	2190.3 ±	1573.5
	Uric(mg/dL)	2.2±	0.42	2.0±	0.22	2.1 ±	0.37

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean ± SD. (n=3 - 6)<sup>2)</sup> ALP : alkline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; TP: total protein; T-Bil: total bilirubin; CRE: creatinine; Glu: glucose; Che: acetylcholinesterase; Uric: uric acid .<sup>3)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different (p < 0.05).

表六、口服斜紋夜蛾病毒包涵體對大鼠之血液學變化<sup>1)</sup>Table 6. Hematological parameters change of the rats oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body

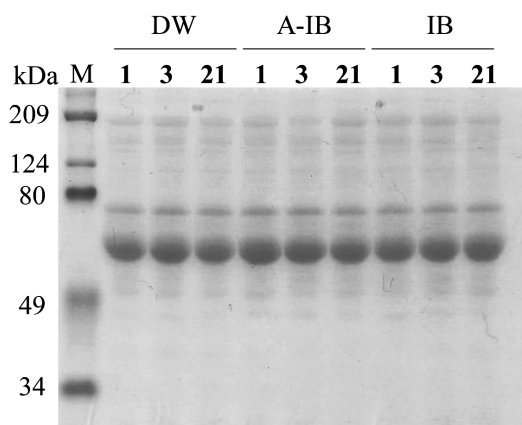
Hematological composition		DW	A-IB	IB
D1	WBC( $10^3$ ) <sup>2)</sup>	10.7± 4.60	5.6± 1.78	7.0 ± 2.0
	RBC( $10^6$ )	7.0± 0.14a <sup>3)</sup>	6.9± 0.67ab	6.1 ± 0.15b
	HGB(g/dl)	15 ± 0.17a	14.5± 1.02a	13.2 ± 0.35b
	HCT(%)	43.5± 0.70a	42.8± 3.99a	37.8 ± 0.67b
	MCV(fl)	62.5± 0.59	62.5± 0.78	62.5 ± 0.55
	MCH(pg)	21.6± 0.23	21.3± 0.58	21.8 ± 0.26
	MCHC(g/dl)	34.5± 0.26	34.0± 0.80	34.9 ± 0.40
	PLT( $10^3$ )	931 ± 88.54	965.3±85.71	956.7 ± 85.68
D3	WBC( $10^3$ )	10.7± 0.55	9.4± 0.65	10.5 ± 5.22
	RBC( $10^6$ )	6.5± 0.33a	6.1± 0.14b	6.4 ± 0.08ab
	HGB(g/dl)	14.8± 0.50a	13.8± 0.23b	14.6 ± 0.23a
	HCT(%)	40.7± 1.70a	37.8± 0.17b	40.9 ± 0.80a
	MCV(fl)	62.3± 1.71	62.2± 1.19	64.3 ± 0.70
	MCH(pg)	22.7± 0.46	22.8± 0.53	23.0 ± 0.36
	MCHC(g/dl)	36.4± 0.56	36.6± 0.57	35.8 ± 0.91
	PLT( $10^3$ )	1086.0± 50.57	1069.3± 9.07	1046.3 ± 85.82
D21	WBC( $10^3$ )	8.5± 2.06	8.1± 2.39	7.2 ± 3.46
	RBC( $10^6$ )	6.9± 0.44b	7.0± 0.16b	7.63± 0.52a
	HGB(g/dl)	14.8± 0.62b	15.0± 0.35b	15.9 ± 1.01a
	HCT(%)	42.1± 3.29b	43.0± 1.48b	46.2 ± 2.28a
	MCV(fl)	61.0± 1.52	61.3± 2.29	60.6 ± 1.25
	MCH(pg)	21.5± 0.69	21.4± 0.47	20.9 ± 0.59
	MCHC(g/dl)	35.3± 1.64	34.9± 1.03	34.4 ± 0.87
	PLT( $10^3$ )	867.7±112.9	944.7±87.61	959.3 ±121.78

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean ± SD. (n=3 - 6)

<sup>2)</sup> WBC: white blood cell; RBC: red blood cell; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; PLT: platelet.

<sup>3)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

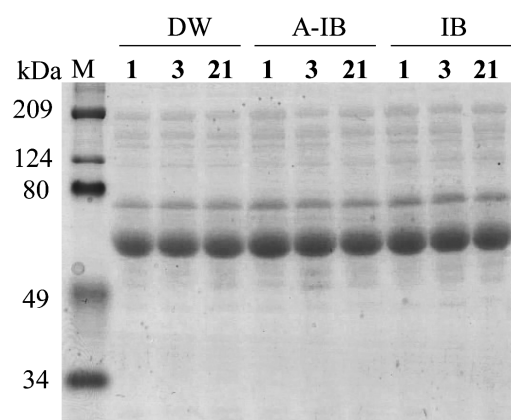
理組之 ALP 有降低之現象，ALT、AST 與 total bilirubin 皆無改變，顯示口服 SpltNPV 對肝功能無明顯影響，其餘 creatinine、glucose、total protein、acetylcholinesterase 與 uric acid 則無顯著改變；第 21 天時處理組大鼠 ALT 與 glucose 皆顯著低於滅菌組與空白組 ( $p < 0.05$ )。血清總蛋白濃度於三組大鼠間皆無顯著不同，上述結果亦可與圖二之血清蛋白 SDS-PAGE 結果相互呼應，更加確認口服 SpltNPV 後血液內無明顯的特異蛋白產生。大鼠口服 SpltNPV 後血液內組成之變化，在第 1 天時，處理組紅血球、血色素及血球容積比皆顯著低於空白組，至第 3 天時滅菌組此三項指數皆顯著低於空白組，當 21 天時處理組則顯著高於空白組與滅菌組。於第 1、3 與 21 天解剖時收集之血液，其紅血球、血色素及血球容積比皆有改變，但其數值均於正常生理值參考範圍內，不具明顯毒性反應<sup>(12)</sup>。



圖二、口服接種斜紋夜蛾病毒包涵體後大鼠之血清蛋白 SDS-PAGE 圖。

Fig 2. SDS-PAGE of serum proteins from rats post oral treatment of *Spodoptera litura* inclusion body.

在肺急毒性方面，經氣管灌注 SpltNPV 24 小時內滅菌組與處理組大鼠血清內 ALP 降低，其餘肝功能指標無升高之現象。血清測試生化值中之尿酸為腎臟功能指標之一，雖然尿酸值在處理組顯著高於空白組與滅菌組 ( $p < 0.05$ )，但仍於正常生理值參考範圍內；氣管灌注 SpltNPV 至第 21 天時導致 ALT 之濃度降低(表七)，但其數值均於正常生理值參考範圍內，顯示氣管投予 SpltNPV 亦不會損害大鼠的肝臟功能。圖三空白組、滅菌組與處理組之血清蛋白 SDS-PAGE 圖譜結果與口服試驗均相似。第 1 天處理組血液雖然白血球顯著低於對照組，但仍屬正常範圍內，而紅血球、血色素、血球容積比、平均血球容積、平均血球血紅素、平均血球血紅素濃度與血小板與空白組相比皆無顯著變化(表八)。比較口服與氣管灌注兩種方式產生之影響，經氣管灌注 SpltNPV 之大鼠尿酸增加較顯著；口服處理對大鼠紅血球、血色素及血球容積比改變較顯著(表六、表七)。



圖三、氣管接種斜紋夜蛾病毒包涵體後大鼠之血清蛋白 SDS-PAGE 圖。

Fig 3. SDS-PAGE of serum proteins from rats post intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body.

表七、大鼠氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體後對血清生化數值變化之影響<sup>1)</sup>Table 7. Effect on serum chemical parameters change of the rats after intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body

Blood chemical composition		DW		A-IB		IB	
D1	ALP(U/l) <sup>2)</sup>	456.3±	18.58a <sup>3)</sup>	286.0±	47.51b	366.0±	56.71b
	ALT(U/l)	41.53±	3.52a	29.9±	2.90b	33.2±	7.18ab
	AST(U/l)	99.3±	12.80	80.5±	5.33	80.7±	10.30
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.1±	0.00
	CRE(mg/dl)	0.4±	0.06	0.4±	0.00	0.3±	0.06
	Glu (mg/dl)	152.3±	6.03	169.3±	18.82	167.7±	26.54
	TP(g/l)	4.9±	0.32	5.2±	0.06	4.9±	0.10
	Che(U/l)	868.3±	69.29a	621.0±	173.47b	910.3±	95.52a
	Uric(mg/dL)	1.4±	0.15b	1.7±	0.10b	2.9±	0.62a
D3	ALP(U/l)	252.7±	66.08	341.0±	103.1	304.0±	57.04
	ALT(U/l)	35.1±	3.88	40.5±	3.64	33.7±	3.70
	AST(U/l)	119.1±	25.47	104.3±	16.39	84.6±	18.03
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.1±	0.00
	CRE(mg/dl)	0.4±	0.00	0.4±	0.00	0.4±	0.00
	Glu (mg/dl)	160.0±	10.58	155.7±	4.16	172.3±	20.60
	TP(g/l)	5.0±	0.15ab	5.2±	0.15a	4.8±	0.06b
	Che(U/l)	2011.0±	355.95	1995.3±	1072.74	2033.7±	427.70
	Uric(mg/dL)	1.5±	0.21	1.3±	0.1	2.4±	0.70
D21	ALP(U/l)	288.7±	141.17	256.2±	108.50	165.8±	40.16
	ALT(U/l)	47.2±	6.59a	40.3±	10.90a	25.5±	3.75b
	AST(U/l)	96.3±	9.14	98.3±	13.07	92.0±	13.23
	T.Bil(mg/dL)	0.1±	0.00	0.1±	0.00	0.1±	0.00
	CRE(mg/dl)	0.5±	0.05	0.4±	0.05	0.5±	0.05
	Glu (mg/dl)	157.8±	13.79	149.8±	14.86	150.0±	17.12
	TP(g/l)	5.3±	0.26	5.1±	0.40	5.0±	0.45
	Che(U/l)	2059.2±	1387.61	2306.8±	1929.56	1917.3±	1166.06
	Uric(mg/dL)	2.4±	0.73ab	1.7±	0.38b	2.5±	0.63a

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean ± SD. (n=3 - 6)<sup>2)</sup> ALP : alkline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; TP: total protein; T-Bil: total bilirubin; CRE: creatinine; Glu: glucose; Che: acetylcholinesterase; Uric: uric acid.<sup>3)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表八、氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體對大鼠之血液學變化<sup>1)</sup>Table 8. Hematological parameters change of the rats after intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body

Hematological composition		DW	A-IB	IB
D1	WBC( $10^3$ ) <sup>2)</sup>	10.1± 0.25a <sup>3)</sup>	7.6± 0.61b	8.0± 1.61b
	RBC( $10^6$ )	6.7± 0.27	6.7± 0.38	7.0± 0.43
	HGB(g/dl)	15.0± 0.58	15.9± 1.01	16.1± 1.42
	HCT(%)	45.2± 1.55	46.6± 2.48	47.1± 3.40
	MCV(fl)	67.1± 1.15b	70.0± 2.00a	67.0± 0.78b
	MCH(pg)	22.3± 0.81	23.9± 1.01	22.8± 0.68
	MCHC(g/dl)	33.2± 0.61	34.2± 0.62	34.1± 0.75
	PLT( $10^3$ )	1025.0±55.97	1097.3±153.03	1165.3± 35.00
D3	WBC( $10^3$ )	9.6± 2.17	9.1± 3.04	10.0± 1.72
	RBC( $10^6$ )	6.1± 0.21	6.4± 0.16	6.1± 0.42
	HGB(g/dl)	14.2± 0.67	14.7± 0.4	13.9± 0.79
	HCT(%)	39.2± 1.77	41.1± 1.18	38.6± 1.35
	MCV(fl)	64.1± 1.32	63.8± 0.35	63.6± 3.27
	MCH(pg)	23.2± 0.36	22.8± 0.06	22.9± 1.53
	MCHC(g/dl)	36.2± 0.40	35.8± 0.23	36.0± 0.95
	PLT( $10^3$ )	1044.7±78.65	1072.0±162.82	1092.0± 41.39
D21	WBC( $10^3$ )	18.1± 6.91	19.6± 14.85	28.3± 11.68
	RBC( $10^6$ )	7.3± 0.28ab	7.0± 0.40b	7.8± 0.62a
	HGB(g/dl)	14.5± 0.72	14.5± 0.65	15.4± 1.52
	HCT(%)	43.7± 1.45ab	41.7± 1.91b	45.4± 3.13a
	MCV(fl)	59.7± 1.03	59.4± 1.12	58.5± 1.18
	MCH(pg)	19.9± 0.60	20.6± 0.85	19.8± 0.62
	MCHC(g/dl)	33.3± 0.92	34.7± 1.32	33.9± 1.56
	PLT( $10^3$ )	806.7±92.30	872.0± 77.81	861.2±152.28

<sup>1)</sup> Each value is presented as the mean ± SD. (n=3 - 6)

<sup>2)</sup> WBC: white blood cell; RBC: red blood cell; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; PLT: platelet.

<sup>3)</sup> Means within same rows in the same day without same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Bensimon<sup>(3)</sup>等人於 1987 年曾指出，以 PCR 方法可測得 *Locusta migratoria* 幼蟲體內之微量 S/NPV DNA，Ouriel Faktor 與 Dalit Raviv<sup>(21)</sup>亦表示 PCR 可偵測未發病之感染幼蟲體中 NPV DNA。表九為以高敏感度與操作快速的 PCR，利用核多角體病毒特殊引子偵測口服包涵體後大鼠組織中 SpltNPV 包涵體之結果。試驗偵測臟器以

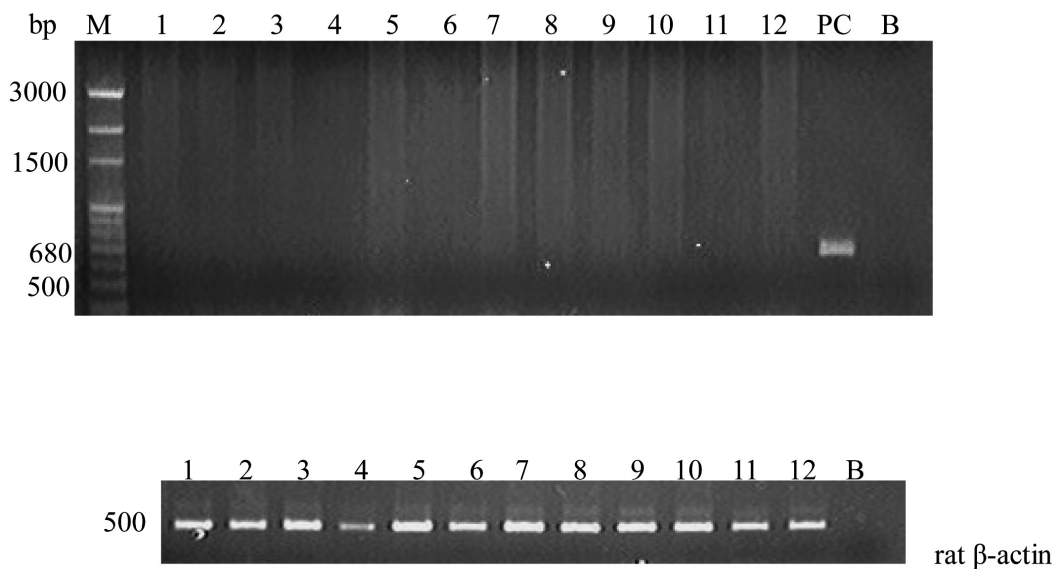
肝臟、脾臟與盲腸內容物為主，資料顯示口服 SpltNPV 後，剪碎之大鼠肝臟、脾臟與盲腸內容物經 PCR 反應皆可增幅出 500 bp 之大鼠 house keeping gene  $\beta$ -actin 基因產物，並且無 680 bp 之多角體蛋白基因片段產生，直至第 21 天時臟器亦無增幅出該基因片段 (圖四)。由於在肝、脾及腸內容物等為 SpltNPV 較易分佈的組織，但未監測

表九、PCR 偵測大鼠口服斜紋夜蛾病毒包涵體之結果

Table 9. PCR detection of the rats oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body

Days	Liver			Spleen			Cecum content		
	DW	A-IB	IB	DW	A-IB	IB	DW	A-IB	IB
D1	0/3 <sup>1)</sup>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
D3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
D21	0/3	0/3	0/6	0/3	0/3	0/6	0/3	0/3	0/6

<sup>1)</sup> denominator : determinate number ; numerator : present positive number. (n=3 - 6)

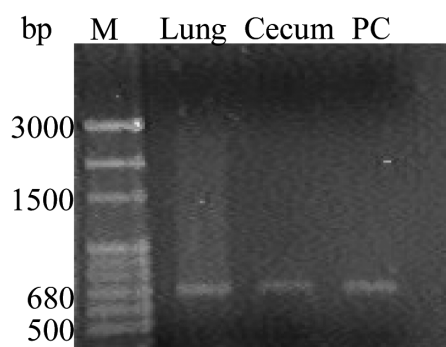


圖四、PCR 偵測口服斜紋夜蛾病毒包涵體 21 天之大鼠脾臟。

Fig 4. PCR detection of spleen after oral treated with *Spodoptera litura* inclusion body on 21<sup>st</sup> day. M: 100 bp DNA marker; lane 1-6: inclusion body group; lane 7-9: autoclaving inclusion body group; lane 10-12: deionized water group; PC: positive control; B: blank.

出 SpltNPV 基因，此結果與本引子經 PCR 反應後可偵測包涵體之敏感度為  $10^3$  PIBs/ml (資料未顯示) 有關，加上臟器組織 (如肺臟) 與腸內容物並不會干擾 PCR 的偵測，皆可增幅出混合於其中的 SpltNPV 基因 (圖五)。由此結果可推測口服 SpltNPV 後每克臟器所含之包涵體濃度低於  $10^3$ - $10^4$  PIBs/ml，加上許多研究顯示微生物進入哺乳動物消化道後，易被胃液及腸液降解消化而失去活性成分或分解<sup>(1)</sup>，使得進入或到達至臟器的數量明顯降低。表示 SpltNPV 進入大鼠體內後，在體內重要組織器官的含量均非常低，可能不具增殖現象，此與先前研究報告指出之桿狀病毒不會於脊椎動物中發現結果相同<sup>(25)</sup>。而病理組織亦無明顯的變化，更能推論進入體內之病毒包涵體無增殖的現象。許多研究亦針對鬮屬、大鼠、天竺鼠、兔及鳥類進行 NPV 病毒感染之評估，其中 Doller 等人<sup>(8)</sup>也曾以仔豬 (約 18 kg) 為試驗動物，以每公克體重餵食  $5 \times 10^7$  PIBs *Mamestra brassicae* NPV 之劑量處理下，處理組仔豬與對照組間無顯著差異亦無任何感染現象。在大鼠施予口服 ( $1 \times 10^8$  PIBs) 或腹腔注射 ( $1 \times 10^7$  PIBs) 基因重組之昆蟲致病性 *Autographa californica* 核

多角體病毒，結果亦顯示基因重組之桿狀病毒對大鼠無明顯危險性<sup>(2)</sup>。至於肺急毒性之研究，經氣管灌注 SpltNPV 後以核多角體病毒特殊引子偵測組織中 SpltNPV 包涵體殘留之結果如表十。以 PCR 反應偵測肝臟、脾臟與肺臟純化之 DNA，資料顯示第 1 至第 21 天之大鼠臟器皆無增幅出多角體蛋白基因片段。由表九與表十結果可推測口服與氣管灌注 SpltNPV 後每克臟器所含之包涵體濃度低於  $10^3$  - $10^4$  PIBs/ml，且進入體內之病毒包涵體無增殖之現象。



圖五、PCR 偵測不同組織在體外混和病毒包涵體之敏感度。

Fig 5. The sensitivities of PCR detection in tissue and cecum content mixed with *Spodoptera litura* inclusion body. PC: positive control.

表十、PCR 偵測大鼠氣管灌注斜紋夜蛾病毒包涵體之結果

Table 10. PCR detection of the rats after intratracheal administration with *Spodoptera litura* inclusion body

Days	Liver			Spleen			Lung		
	DW	A-IB	IB	DW	A-IB	IB	DW	A-IB	IB
D1	0/3 <sup>1)</sup>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
D3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
D21	0/3	0/3	0/6	0/3	0/3	0/6	0/3	0/3	0/6

<sup>1)</sup> denominator : determinate number ; numerator : present positive number. (n=3 - 6)

SpltNPV 不會於大鼠腸道、氣管亦或臟器中感染增殖之原因可歸納為下列二點：第一、包涵體需於昆蟲腸鹼性環境 (pH 9.0-11.5) 及酵素作用下才能被溶解而釋出病毒粒子<sup>(13)</sup>，昆蟲與大鼠之腸道環境不相同 (大鼠腸道中段 pH 值約 6.5、迴腸 pH 值約 7.3)<sup>(7,17)</sup>，因此大鼠體內有利於病毒包涵體釋出之條件有限；第二、病毒宿主範圍狹窄且專一性高，主要於少數昆蟲 (主要為鱗翅目) 體內生長繁殖。基於 NPV 不會危害非宿主的特性，為較具安全性之微生物製劑，但無論如何本試驗研究利用 PCR 確認核多角體病毒未在大鼠體內增殖，提供了非常重要的直接證據。

由以上試驗結果可知除血清化學指標具輕微改變與異物性肺炎病變之外，SpltNPV 對於哺乳動物無任何嚴重毒性與安全性之威脅，此結果與先前研究報告一致<sup>(2, 8)</sup>。Tinsley<sup>(25)</sup>亦指出桿狀病毒至目前只發現於無脊椎動物中，不會感染蔬果或高等植物。比較二種投予途徑所造成之影響，可知口服投予方式對大鼠較不具影響，可能與外來物進入體內時會受消化道系統的降解而減低其危險性。綜上所述，此試驗研究除了可建立較完整的病毒類微生物製劑對溫血動物之安全評估系統外，並可用以支援 SpltNPV 微生物製劑產品之商品化及對此類產品管理政策訂定之參考。

## 謝 辭

本研究承蒙農委會農業藥物毒性試驗所科技 97 農科-14.2.2-藥-P4 之經費補助，本組張淑滿小姐、湯秀枝小姐及洪慶和先生等協助實驗之進行，及本所生物藥劑組

高穗生組長、蔡勇勝博士提供生物材料，謹此誌謝。

## 引用文獻

1. 張敬宜、黃振聲、蔡三福。2006。本土綠僵菌對大鼠急毒性與致病性之安全評估。植保會刊 48: 331-340。
2. Ashour, M. B., Ragheb, D. A., El-Sheikh, E. A., Gomaa, E. A., Kamita, S. G., and Hammock, B. D. 2007. Biosafety of recombinant and wild type nucleopolyhedroviruses as bioinsecticides. Int. J. Environ. Res. Public Health. 4: 111-125.
3. Bensimon, A., Zinger, S., Gerassi, E., Hauschner, A., Harpaz, I., and Sela, I. 1987. 'Dark cheeks', a lethal disease of locusts provoked by a lepidopterous baculovirus. J. Invertebr. Pathol. 50: 254-260.
4. Boguslaw, S., Liliana, H. C., Maria, P., Iwona, S., and Marlinda, L. S. 2006. Baculoviruses-re-emerging biopesticides. Biotechnol. Adv. 24: 143-160.
5. Bonning, B. C., and Hammock, B. D. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. Annu. Rev. Entomol. 41: 191-210.
6. Chou, C. M., Huang, C. H., Lo, C. F., Kou, G. H., and Wang, C. H. 1996. Characterization of *Perina nuda* Nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) polyhedrin gene. J. Invertebr. Pathol. 67: 259-266.
7. Daniel, H., Fett, C., and Kratz, A. 1989. Demonstration and modification of intervillous pH profiles in rat small intestine

- in vitro*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 257: 489-495.
8. Doller, G., Groner, A., and Straub, O. C. 1983. Safety evaluation of nuclear polyhedrosis virus replication in pigs. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1229-1233.
  9. Falcon, L. A., and Hess, R. T. 1985. Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth *Cydia pomonella*. J. Inverteb. Pathol. 45: 356-359.
  10. GadSc. 2006. Animal models in toxicology. Taylor and Francis, group USA.
  11. Hamm, J. J. 1966. A modified azan staining technique for inclusion body viruses. J. Inverteb. Patnol. 8: 125-126.
  12. Harrap, K. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. Virology. 50: 114-123.
  13. Harrap, K. A., and Longworth, J. F. 1974. An evaluation of purification methods for baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 24: 55-62.
  14. Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., Hinton, A. C., Huang, Q., Severson, T. F., and Kang, K. D. 2001. Recombinant baculoviruses for insect control. Pest. Manag. Sci. 57: 981-987.
  15. Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., and Vlak, J. M. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Arch. Virol. 151: 1257-66.
  16. Liu, H. S., and Hou, R. F. 1983. Electron microscopic observation on infection of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*, Proc. Natl. Sci. Counc., ROC 7: 51-56.
  17. Lucas, M. 1983. Determination of acid surface pH *in vivo* in rat proximal jejunum. Gut. 24: 734-739.
  18. Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44: 257-289.
  19. Moscardi, F., and Santos, B. 2005. Producao commercial de nucleopoliedrosis de *Anticarsia gemmatalis* HUBNER (Lep: Noctuidae) em laboratorio. Proceedings of the IX Simposio de Control Biologico. Brazil: Recife. 42.
  20. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna & New York: Springer-Verlag.
  21. Ouriel, F., and Dalit, R. 1996. A polymerase chain reaction for the detection of nucleopolyhedroviruses in infected insects: the fate of the *Spodoptera littoralis* virus in *Locusta migratoria*. J. Virol. Methods. 61: 95-101.
  22. Pfannenstiel, R. S., Szymanski, M., Lacey, L. A., Brunner, J. F., and Spence, K. 2004. Discovery of a granulovirus of *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae), a leafroller pest of apples in Washington. J. Inverteb. Pathol. 86: 124-127.

23. Summers, M., and Anderson, D. 1972. Granulosis virus deoxyribo-nucleic acid: a closed double-stranded molecule. *J. Virol.* 9: 710-713.
24. Thorne, C. M., Otvos, I. S., Conder, N., and Levin, D. B. 2007. Development of a dipstick immunoassay to detect nucleopolyhedroviruses in Douglas-fir tussock moth larvae. *J. Virol. Methods.* 146: 188-195.
25. Tinsley, T. W., and Kelly, D. C. 1985. Taxonomy, and nomenclature of insect pathogenic viruses. In *Viral Insecticides for Biological Control*, (ed. K. E. Maramorosch) Academic Press, New York, 3.
26. Tweeten, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis viral nucleocapsids. *J. Virol.* 33: 866-876.
27. Vlak, J. M., and Rohrmann, G. F. 1985. The nature of polyhedrin. In: Maramorosch, L. and K. E. Sherman (Eds.), *Viral Insecticides of Biological Control*. Academic Press, New York, pp. 489-542.
28. Wang, C. H., Yang, H. N., Liu, H. C., Kou, G. H., and Lo, C. F. 2000. Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. *J. Virol. Methods.* 84: 65-75.
29. Zhang, S., Troyer, D. L., Kapil, S., Zheng, L., Kennedy, G., Weiss, M., Xue, W., Woods, C., and Minocha, H. C. 1997. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization. *Virol.* 236: 249-257.
30. Zhang, P., Yang, K., Dai, X., Pang, Y., and Su, D. 2002. Infection of wild-type *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus induces in vivo apoptosis of *Spodoptera litura* larvae. *J. Gen. Virol.* 83: 3003-3011.

## ABSTRACT

**Yu, M. H<sup>1</sup>, Chang, J. Y<sup>1</sup>, Lee, S. T<sup>2</sup>, and Tsai, W. R.<sup>1\*</sup> 2009. Safety assessment of acute toxicity and pathogenicity for *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in rats.** Plant Prot. Bull. 51 (1, 2): 33-52 (<sup>1</sup> Applied Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC); <sup>2</sup> Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Technology, Yungkang City, Tainan 710, Taiwan (ROC))

The purpose of this study is to evaluate the acute toxicity and pathogenicity of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltnNPV) in rats for supporting registration required data of commercial bioinsecticides. A dose of  $1 \times 10^8$  PIB/ml of SpltnNPV inclusion body was used for acute oral (10 ml/kg body weight) and pulmonary (1 ml/kg body weight) toxicity assessment. Sprague-Dawley rats were divided into A, B, C, D and E groups, which A-C were treatment groups and D and E were autoclaved and control groups, respectively. The assessment was itemized as mortality, clinical symptoms, pathological changes, body weight gain, organ weights, hematological parameters, serum chemical parameters, SDS-PAGE of serum proteins and polymerase chain reaction detection. Animals with oral administration showed no significant toxic signs or death, and no significant differences in body weight gains and gross or microscopic pathology in comparison with control rats; but the liver weight was significantly lower than the control group on 21<sup>st</sup> day. In the acute pulmonary toxicity study, the lungs of the treated rats showed a marked inflammation. The body weight gains decreased significantly in the treated rats on 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> day ( $p < 0.05$ ). In the serum biochemical analyses, the levels of uric acid of the treated rats were significantly higher than the control rats ( $p < 0.05$ ). The liver and lung weights in treatment and autoclaved groups were decreased and increased significantly, respectively, than the control group. The SDS-PAGE analyses of serum proteins showed that the profile and concentration of serum proteins were similar in all treated and control groups. A primer set (35/36) for amplifying a 680 bp of polyhedrin gene fragment was used, and no SpltnNPV genes were amplified in lungs or other organs of the treated rats. Our results demonstrated that SpltnNPV inclusion body has no significant effects of acute oral and pulmonary toxicity/pathogenicity in rats. This study not only establishes more complete evaluation system of viral biopesticides on animal but also provides management information for commercial SpltnNPV biopesticides.

(Key words: Inclusion body, nucleopolyhedrovirus, polymerase chain reaction)

\*Corresponding author. E-mail: sftsai@tactri.gov.tw

