

農用及環境用生物製劑審核之現況與展望

王順成 博士 1997.12.05

臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系

摘要

本文主要針對國內外微生物製劑登記之毒理資料安全性審核要件進行說明，包括國內微生物製劑登記之毒理資料要件中有關環境衛生用微生物製劑之毒理資料及農用微生物製劑之毒理資料及國外微生物製劑登記之毒理資料要件中，美國微生物製劑登記之毒理資料要件。並對國內外微生物製劑安全性研究現況，包括微生物製劑對哺乳類動物感染力、毒性及病原性加以探討，以期對整個微生物製劑安全性研究與評估做層次性分析。至於生化製劑之毒理資料安全性審核要件，因其性質與化學製劑之安全性審核要件相似，本文僅做蓋括性敘述，文後就生物藥劑對溫血動物安全性審核、研究及展望做綜合性探討並對生物藥劑對溫血動物研究展望做綜合性之建議。

前言

生物製劑的定義包括天然素材、微生物製劑、生化製劑及利用遺傳基因改造的微生物所產生的製劑或改造的生物所生成之製劑，微生物製劑為生物製劑之一部份，但卻為國內近年來農用及環境用生物製劑之主流。最近微生物製劑於國內外大量被應用於控制或減低田間作物病蟲害⁽¹⁸⁾或環境有害生物之發生及環境污染物之清除之例證相當多，其中農用微生物以蘇力菌製劑種類最多，目前各類微生物製劑種類申請上市已日益增加，由於微生物之變種或亞種菌株或品系不同，對標的害蟲及人體可能具有不同的致病性和毒性，因此微生物製劑上市前之審核，由於理化性質與化學藥劑相似，故上市前之審核與管理其實以安全性評估最為重要。因微生物製劑安全性評估與化學性

製劑測試不同，化學製劑可依劑量與生物效應進行結果評估，而微生物製劑之安全評估程序及評估項目則有其特殊性，主要乃因是微生物製劑之生物本質所造成。通常微生物製劑以極大的劑量處理供試動物時，可能引起測試動物窒息或胃腸道阻塞等物理傷害，且多數微生物製劑含有微生物活體，可能自行生長繁殖，並具感染性或潛在感染性，因此對動物及人體之安全性評估考慮層面自是不同。1988年美國環保署訂定頒布微生物製劑安全性評估管理辦法時，即針對不同的菌(病毒)株對標的物，具有不同程度的致病性和毒殺作用之特性，加以探討，管理辦法中最重要者乃提出微生物製劑應給予較高或最高的菌(病毒)量數及不同的毒理投予途徑以為安全評估依據，如氣管灌注，腹腔注射等投予方式，目的在增加瞭解微生物是否具感染性或致病性，甚至考慮增加顱內注射方式投予，以增加安全性評估，目的在避免人類及環境暴露於高數量微生物製劑時其可能受到危險之衝擊。國內目前對微生物製劑之管理分由衛生署、環保署及農委會等三個部門負責，各機關分別訂有管理微生物製劑之毒理資料審核要件，如行政院環保署於民國七十七年公告『環境衛生用微生物製劑運作審核要點』並於八十五年完成修正公告『環境衛生用微生物製劑運作審核要點修正案』，行政院農業委員會於民國八十年公告『農用微生物製劑之毒理資料要件』中均訂有明確需求之相關規定，上述之規定均源自美國環保署之資料並衡諸國內情況加以修正。自1948年第一個微生物製劑(*Bacillus poretiae*)在美國通過當時各項毒性測試，註冊上市後，各種微生物製劑使用隨即大量增加，並有部份毒性測試報告。綜合上述，本文將對國內外微生物製劑及生化製劑登記之毒理資料安全性審核要件及國內外農用及環境用微生物製劑及生化製劑安全性研究進行探討，以增進業界、生產者、消費者對微生物製劑及生化製劑資訊之利用與瞭解。

國內外微生物製劑登記之毒理資料安全性審核評估現況

一、國內微生物製劑登記之毒理資料審核評估

(一) 環境衛生用微生物製劑之毒理資料審核評估

病媒防治用及污染防治用之環境衛生用微生物製劑其毒理資料審核評估要件詳如表一，並可參考行政院環保署85年10月11日環署毒自第56474號函修正公告內容。其中病媒防治用之環境衛生微生物製劑所要求之毒理試驗資料中必備資料包括：（1）口服急毒性/致病性、（2）皮膚急毒性、（3）肺或呼吸急毒性/致病性、（4）眼刺激性/感染性、（5）皮膚過敏性、（6）靜脈注射急毒性/致病性、及（7）細胞培養試驗（8）其他等之生物毒性試驗；以及（1）水生生物急毒性、（2）鳥類急毒性、（3）非目標植物致病性、（4）非目標昆蟲致病性、（5）對蜜蜂急毒性/致病性等環境生態毒理資料評估報告，其中生物毒性試驗於新主成分1至4項為必備資料，環境生態毒理資料於新主成分僅第一項為必備資料，其餘資料需求視製劑種類而定。而污染防治用之環境衛生用微生物製劑之毒理資料要件生物毒性試驗包括（1）口服急毒性/致病性、（2）皮膚急毒性、（3）肺或呼吸急毒性/致病性、（4）眼刺激性/感染性、（5）皮膚過敏性，其環境生態毒理資料尚需包含（1）微生物製劑環境中殘留、（2）對元素循環之影響（3）水生生物急毒性（4）對蚯蚓急毒性（5）其他等資料，其中生物毒性試驗於新主成分僅第一項為必備資料，環境生態毒理資料於新主成分僅第三項為必備資料，其餘資料需求視製劑種類而定，且依處理後廢棄物承受體是水域或土壤的不同，其必備資料稍微不同，詳如表一。

（二）農用微生物製劑之毒理資料審核評估

1.農用微生物製劑之毒理資料審核評估要件詳如表二。該規定主要係參考美國環保署對於微生物製劑之管理規定，並考慮國情而訂。所要求之資料僅為美國所要求之第一階基本毒理試驗；包括：口服急毒性/致病性、皮膚急毒性、肺急毒性/致病性、靜脈注射急毒性/致病性、眼刺激性/感染性、過敏性反應及細胞培養試驗等對人體健康評估之急性試驗；以及鳥類、水生生物及非標的植物、蜜蜂之急毒性等環境評估報告等；在微生物中病毒較特殊，上述試驗中，細胞培養試驗僅病毒必需，而靜脈注射急毒性/致病性如為病毒則不需提供。

2. 國內產製之微生物製劑，若該微生物分離自國內自然環境，且未經人為誘變或遺傳基因改造者，僅需提供原體口服急毒性/致病性；或肺急毒性/致病性資料即可。
3. 若國外產製、其微生物種源也存在於國內自然環境，則經中央主管機關認可之試驗研究單位證明確為完全相同之菌系或品系，可比照國內產製之微生物製劑之毒理需求。
4. 申請與已登記微生物製劑之亞種(subspecies) 相同者，得免提供毒理試驗資料，然仍需進行委託田間試驗。以目前登記最普遍之蘇力菌種 (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) 為例，國內產製者，如經認可確為完全相同之菌系，並不需要提供毒理試驗資料。

二、美國微生物製劑登記之毒理資料審核評估：

美國環保署對於微生物製劑之管理規定，依據製劑可能對人體健康及環境安全性影響高低，而有不同階層的毒理資料要求；其所需資料之範圍，主要仍由微生物本身之特性，如本土性或自然產物，小面積、大面積或登記使用，及其是否具急毒性、致病性來判定鑑定、分析及第一階層基本毒理試驗報告包括：口服急毒性/致病性、皮膚急毒性、肺急毒性/致病性、靜脈注射急毒性/致病性、眼刺激性、過敏性反應及細胞培養試驗。在微生物中病毒較特殊，上述試驗中細胞培養試驗僅病毒必需，而靜脈注射急毒性/致病性則可免提供。如第一階層基本毒理試驗有急毒性、致病性或其它不良影響，則需進一步提供第二階層或第三階層之毒理試驗。包括亞慢性毒性/致病性、生殖毒性、致腫瘤性及靈長類感染性/致病性等慢性毒理試驗。

微生物製劑對非標的生物及環境安全性試驗之管理資料要求亦同，首先需提供第一階層試驗資料包括：鳥類口服毒性、淡水魚毒性、淡水無脊椎生物、蜜蜂急毒性、非標的植物集毒性及非標的昆蟲毒性等；如有對環境之不良影響，則需要第二階層或第三、四階層之試驗，包括海洋環境試驗，甚至包括對鳥類、哺乳類、水生生物、授粉昆蟲等之模擬實際田間試驗。

三、國內生化製劑登記之毒理資料審核評估：

生化製劑之毒理資料安全性審核要件，因其性質與化學製劑之安全性審核要件相似，即包括急毒性之口服、皮膚、呼吸、皮膚及眼刺激、皮膚過敏及遲發性神經毒性；90天亞慢毒性、致變異性試驗、致生殖毒性、致畸胎性、兩年慢毒性、致腫瘤性；環境生態毒理之水生生物毒性、禽類毒性非目標昆蟲、非目標植物、非目標動物等毒理資料安全性評估。

國內外農用及環境用微生物製劑安全性研究

一、微生物製劑對哺乳類動物的感染力(4,10,15,20,25,26,27,28,29,31,36)

大多數微生物製劑含有微生物活體，可能自行生長繁殖並具有其感染特性，這些原具有減少環境污染作用的微生物一旦施用於天然的環境中，與自然的菌種競爭生存，將可能直接或間接地影響生態系或人類的安全，因此在進行哺乳類動物的感染力評估時，需注意在動物組織內是否存有發育的營養期或在處理後一段時間內，活性生物的回收數目是否增加現象，是極為重要審核項目。有關農用微生物製劑對哺乳類動物安全性評估最早的正式報告為1968年Schaerffenberg 以大白鼠對黑殭菌進行口服、呼吸、靜脈及皮下接種試驗，證實此菌株對大白鼠無毒性及致病性，由該報告之過敏反應建議此製造工廠操作人員應有呼吸防護及穿著長袖和戴手套之保護措施。1975年後陸續發展之農用微生物製劑安全評估，包括對魚類及鳥類(鵪鶉)環境非目標生物的安全性評估，對大、小白鼠、天竺鼠、無胸腺老鼠、兔子、綿羊等溫血動物之毒理試驗(表三，表四)，此整個安全毒性測試對微生物應用安全上提供相當重要基本資料。1983年 Samples 和 Buettner曾提出蘇力菌 懸浮液所引起眼睛傷害個案，這些報告曾就微生物製劑引起眼睛潰瘍及對組織具有侵入性(表四)有所報導，而微生物於動物體內組織具留存性(persistence)，見表五及表六，Siegel及Haddey^(6,23,24)等以回收培養試驗中之不同投予途徑，如腹腔方式投予小白鼠或拌於飼料中餵食綿羊，均證明脾組織含大量微生物孢子，脾臟成為微生物(蘇力菌)孢子集中處，從目前研究對脾臟所含吞噬細胞所扮演重要的角色，是製劑安全評估研究上主要探討方向之一。

二、微生物製劑對哺乳類動物的毒性研究

由於一般微生物製劑與化學藥劑不同，一般在進行動物安全性評估時，通常需給予較高或最高的劑量及以較嚴苛的途徑投予，例如氣管內投予，靜脈、腹腔注射等方式，甚至以顱內注射方式以瞭解其致死劑量（表七），目的避免人類及環境受到高劑量下可能受到危險之衝擊。此外微生物製劑之不純物質如細菌雖在純培養時不具任何毒性，但培養基的成份及其副產物毒性亦不可忽視，故在審查評估毒理資料時應包括有效成份及商品化成品之測試，以確保評估安全可靠性，此為國內微生物製劑研究上較不重視之死角。今後國內外微生物製劑安全性研究之視野似應重新評估此項研究之重要性。

三、生化製劑對哺乳類動物的毒性研究

（一）生化製劑對溫血動物急毒性之研究^(1,2,3,5,16,32)

台灣有關生化製劑對溫血動物急毒性之研究，首先於1983年建立口服急毒性測驗方法之規範及評估標準，1984年正式完成標準測試之程序。1984年起正式接受國內藥界對於國內自行發展混合藥劑上市前口服急毒性之毒理資料製備，口服急毒性是國內最早進行之生化製劑對溫血動物毒性測試之項目，草創之初，限於當時國內動物飼育條件的限制及其他實驗環境之不週全，為配合當時藥劑管理之初步運作，僅規定口服急毒性之測試得以一種動物小白鼠，進行試驗。至1991年由於國內實驗動物之條件，漸趨成熟，在實驗動物之供應及對實驗動物準則之需求上，愈來愈嚴格。因此急毒性試驗（包括口服急毒性之試驗）偏向國際化。毒理資料及實驗之準則（Guideline）應運而生，口服急毒性之實驗亦改大白鼠為試驗動物，以配合管理法新規定之修改。國內由於1991年藥試所正式設立SPF（specific pathogen free）之動物房，使國內動物毒理研究進入一新紀元，不僅研究品質提昇，實驗規範要求已與美國環保署所公佈之急毒性測試方法相似，同時毒理研究報告，亦獲得國際認可。目前國內化學藥劑之急毒性之測試大多以成品藥劑為對象。

除口服急毒性試驗外，台灣地區農藥及生化製劑安全審核上，皮膚急毒性、皮膚刺激性及眼刺激性等毒性測試項目為化學製劑之毒性測試之必

要項目，上述研究項目台灣於1986年至1987年均已陸續完成實驗規範準則及程序，且對上述之實驗加以標準化。皮膚急毒性主要以大白鼠為試驗對象，皮膚刺激性及眼刺激性之試驗則以紐西蘭白兔為試驗動物。皮膚急毒性試驗劑量最高限界為2,000mg/kg意即在2,000mg/kg之使用劑量以上，即不必進行該項試驗。而皮膚急毒性之試驗主要是經由皮膚表面投與藥劑，此與口服急毒性試驗由胃管法投與方式不同，除投與藥劑方式不同及劑量限界不同外，其他觀察及結果之估算則大抵與口服急毒性者相似。至於皮膚刺激性、眼刺激性之試驗主要均針對成品藥劑。其試驗目的乃依據所得之試驗之數據做為商品上市時標籤上警告標語之用，並為往後使用者施用藥劑時採取安全防護措施之參考。至於此兩項試驗，若供試之藥劑之酸鹼值大於11.5或小於2時，均應禁止其上市，因這些藥劑屬於強鹼或強酸，顯然會對動物皮膚或眼睛造成強烈之傷害，故不必進行此項試驗。目前國內完成之眼刺激性及皮膚刺激性之試驗安全審核方式中，眼刺激之評估等級主要是依角膜(Cornea)、虹膜(Iris)及結膜(conjunctivae)等受傷害程度等綜合評估以決定其眼受刺激程度。而皮膚刺激性程度則是根據：皮膚產生紅斑及痂皮之程度及皮膚產生浮腫形成程度之綜合判斷。

呼吸毒性之測試為國內最困難發展之急毒性測試項目，主要由於此項試驗牽涉到複雜之儀器設備，其設定儀器之條件相當多，且影響試驗中條件如試驗中藥劑濃度，粒子分佈、氧氣供應、溫濕度之控制，皆可影響試驗之成敗，而空氣之流量及整個呼吸暴露箱之廢氣排除亦是試驗中相當重要的。歐、美、日等國，對呼吸毒性之要求品質相當高，試驗方法卻十分不一致。屬於全身暴露之呼吸毒測試儀器，其人力、物力及設備往往在百萬美元上，目前國內呼吸毒性所使用頭鼻式之呼吸儀(Head & nose only inhalation chamber)為呼吸毒性較簡單型式，儀器雖小，但已可涵蓋大部分試驗項目。目前此項儀器之相關配備如粒子分佈偵測儀及造粉機國內均於1995年完成配備，目前配合這些儀器的發展，短期內對生化製劑呼吸毒性之測試或空氣污染及勞工工作環境之工廠污染等安全性評估均可加以應用，此項試驗為目前國內最富潛力，最具應用價值之測試項目。

皮膚過敏性之測試主要目的在測試動物對藥劑經由免疫系統造成之敏感程度。測試藥劑以成品為主。測試動物則以對藥劑過敏性反應較敏感之天竺鼠為對象，目前國際間發展出之測試過敏性方法非常多，其中七種為常用者：1 .Draize 法 2 .Freund's Complete Adjuvant 法 3. Mauer Optimisation法 4. Buehler法 5. Open Epicutaneous法 6. Maximisation法 7. Split Adjuvant方法。由於測試過敏性方法過於分歧，為適應國內現階段環境，以往實驗曾經利用 Freund's Complete Adjuvant (FCA) 及 Maximization方法比較相互間優劣，並評估國內藥劑利用此二方法後之評估結果分析結果，顯然在精確度上及動物使用量較少之原則下，FCA方法較佳，而Maximization方法在操作及處理手續較簡化，衡之國內目前藥劑之過敏性試驗，由於天竺鼠之供應困難，利用FCA較符合目前之狀況，但就長期發展而言，在天竺鼠之供應穩定情形下，建議利用Maximization方法較佳。

遲發性神經毒性試驗 (Delayed neurotoxicity study) 此項試驗主要是針對某些有機磷劑及胺基甲酸鹽藥劑，由於此類藥劑可抑制神經酯酶 (Neuropathy target esterase) 導致遠端神經軸突病變，故需進行此項試驗，尤其是有機磷劑中的含thioate 或 thionate之藥劑，尤需進行此類試驗。試驗以蛋雞 (hen) 為測試動物，觀察行為或檢查均需維持至21天或更久，目前國內此項實驗之程序大抵完成，完成此項試驗動物對急毒性試驗之完整性則十分重要^(32,34,35)。

四、生化製劑之慢毒性研究：

慢毒性毒理之研究是毒理研究中最受重視也是困難的工作，需投資之人力及物力之大，通常需配合國家產業發展程序，才能決定慢毒性毒理研究成功與否，由於慢毒性毒理研究結果與消費者最息息相關，因此亦最受社會大眾所關注，唯慢性毒理研究因耗時甚鉅，以目前研究之環境，包括政府及研究主管機構很少願意主動是供長期支援，加上此慢毒性毒理研究需有良好實驗動物環境如前所提之SPF動物房之設施，否則無法進行，本國在1991年SPF動物房設施相繼完成，生化製劑對慢毒性毒理之研究才陸續開展，其中最重要一項為快速致肝癌法之開發，依傳統方法研究生化製劑對

動物致癌性，通常需耗時至少兩年以上，由於此法需耗龐大的財力及人力、且時間長，所需設備亦十分昂貴，目前國內雖有良好之SPF動物房進行類似之慢毒性（Chronic test）測試，但實際執行上還存在相當大困難，因此國內於1991年引入1989年^(7,8,9,17,19,21,22,30)日本所發展之快速致肝癌法以進行國內藥劑致癌性相關性研究，1993年^(11,12,33)成研究開發。此法優點為試驗時間短又具備活體試驗之優點，可補足目前國內慢毒性測試之缺失，又可縮短篩選時間，成效良好，已為國內動物致癌性之研究開創一新領域。表七為國內利用2-AAF所建立快速誘導致肝癌法所得部分結果，由以上之試驗結果可知快速誘發肝癌之方法在病理組織病變上已顯現出相當明顯之結果，充分呈現此方法之應用價值，目前所得之結果已推廣於醫學上之應用及其他化學物質致癌性之預測上，並結合基因毒理的研究，希望發展更快速致癌性偵測法。

生化製劑致畸胎（Teratogenicity）及生殖毒性之研究，國內遲至1993年開始建立相關試驗方法，由於國內對生化製劑致癌法開發成功，相對上述二種慢毒性研究進展頗有助益，1995年^(13,14)述二種方法之研究體系即因此快速完成。

台灣地區農用及環境用生物製劑管理、研究未來展望

農用及環境用生物製劑，由於應用層面甚廣，索涉的資源與環境較深，尤其台灣目前狀況與1980年國內早期發展情形已有很大之不同。尤其溫血動物毒理研究不僅可應用於化學農藥及農用微生物藥劑之安全性評估及管理，同時對於醫學之研究，環保污染物之安全評估及化學工業產品之安全性之評估具有相同之應用價值，筆者認為台灣地區毒理研究似應朝以下之方向加以規劃以適應農用及環境用生物製劑管理、發展。

- 一、毒理技術，應儘速建立全面化國家優良實驗操作規範（GLP）體系，以利國際交流認證及認同。
- 二、毒理實驗領域，應做合理之規劃避免人力資源重覆浪費。
- 三、加速國內毒理人材之培育及動物毒理基礎工作之發展。

四、擴大毒理研究，以製作套裝（Packge）毒理資料為目標，支援生物製劑產業升級，配合生物製劑產業拓展國際競爭力

參考文獻

1. Brown, V. K. 1980. Acute toxicity in theory and practice with special reference to the toxicity.
2. Brown, E. M., Dellmann, H. D., and Nicander, L. 1987. Lymphatic organs. pp.164-184. In Dellmann, H. D. and Brown, E. M. [eds.]. Textbook of Veterinary Histology. Lea & Febiger, U. S. A.
3. Doll, J. 1980. Factors influencing toxicity. In : Casarett and Doull's Toxicity : The Basic Science of Poison : Edited by J. Doull, C. D. Klassen, and M. O. Amdur, pp. 70-83 MacMillan, New York.
4. El-Kadi, M. K., L. S. Xara, P. F. De Matos., J. V. N. Da Rocha, and D. P. De Oliveria 1983. Effect of the entomopathogen Metarhizium anisopliae on guinea pig and mice. Environ. Entomol. 12:37-42.
5. Hayes, A. W. 1994. Principles and methods of toxicology. Raven Press, New York.
6. Hadley, W. M., J. P. Thilsted, C. M. Hibbs, J. A. Days. Whorton, M. B. Friedman, and R. E. Stoll, 1987. Five-Month oral (diet) toxicity infectivity study of Bacillus thuringiensis insecticides in sheep. Fundam. Appl. Toxicol. 8:236-242.
7. Ito, N., T. Inoue, Y. Tagawa, T. Akoe, and M. Kagawa. 1986. Development of new rapid bioassay for carcinogen to predict the results of long-term carcinogenicity test. Carcinogenesis 9 (6) : 601-611.
8. Ito, N., H. Tsudea, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoke, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima, and M. Asamoto . 1988. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats. Carcinogenesis 9:387-394.
9. Ito, N., K. Imaida, R. Hasegawa, and H. Tsuda . 1989. Rapid methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. CRC Critical Review in Toxicology 19:385-390.
10. 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
11. Liao, J. W., S. C. Wang, and C. I. Liu. 1993. Effect of concentration on response in rapid bioassay for hepatocarcinogenesis in rats. J. Chin. Soc. Vet. Sci. 62:-47-56.
12. Liao, J.W., S. C. Wang, and C.I. Liu. 1993. Carcinogenesis for four pesticides evaluated by carcinogenesis bioassay model on rats. Taiwan Ani. & Vet. Sci. 62: 47-56.
13. Lu, S. Y., H. W. Lin, and S. C. Wang. 1994. Teratogenic studies with Benomyl in rats. J. Chin. Soc. Vet. 20 (4) :348-356.
14. Lu, S., H. W. Lin, and S. C. Wang. 1995. Evaluation on teratogenicity of Carbendazim in rats. Plant Port. Bull. 37:331-338.

15. McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105, 1995
16. OECD test guidelines. 1980. OECD expert group on good laboratory practices, March 7, 1980, Paris.
17. Ogiso, T., M. Tatematsu, S. Tamano, R. Hasegawa, and N. Ito. 1990. Correlation between medium-term liver bioassay system data and results of long-term testing in rats. *Carcinogenesis* 11:561-566.
18. Ohba, M. and Aizawa, K. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. *J. Invert. Pathol.* 47:12-20.
19. Plaa, L. G., and W. R. Hewitt. 1982. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. *Principles and Methods of Toxicology* (A. Wallace Hayes ed.) . Raven Press. New York. pp. 407-445.
20. Shadduck, J. A., D. W. Roberts, and S. Lause. 1982. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: Preliminary results: *Environ. Entomol.* 11:189-192.
21. Shirai, T., K. Imaida, M. Ohshima, S. Fuchushima, Mei-Sie Lee, M. C. King, N. Ito. 1985 : Different response to phenobarbital promotion in the development of γ -glutamyltranspeptidase-positive foci in the liver of rats initiated with diethylnitrosamine, N-acetylaminofluorene and aflatoxin B₁. *Jpn. Cancer Res. (Grann)* , 76:16-19
22. Shirai, T., K. Hosoda, M. Hirose and N. Ito. 1985; Promoting effects of phenobarbital and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on the appearance of γ -glutamyl-transpeptidase positive foci in rat liver pretreated with varying dose of diethylnitrosamine. *Cancer Lett.* 28:127-133.
23. Siegel, J. P., Shadduck, J. A. and Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* for mammals. *J. Entomol.* 80: 717-723.
24. Siegel, J.P., and J. A. Shadduck. 1990. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. *J. Econ. Entomol.* 83:347-355.
25. Snarski, V.M. 1990. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2618-2622.
26. Tsai, S.F., J.W. Liao, W.K. Hung, and S.C. Wang . 1994 .Acute pulmonary toxicity, infectivity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* on rats *Plant Prot Bull* :36; 65-73
27. Tsai, S. F. , J. W. Liao, W. K. Hung, and S. C. Wang. 1994. Acute Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* on rats. *Plant Prot. Bull.* 36: (2) 161-166
28. Tsai, S. F., J. W. Liao, and S. C. Wang. 1995. Clearance and distribution of *Bacillus thuringiensis* sub. *Kurstaki* from rat by oral administration. *Plant Prot. Bull.* 37: 265-270.

29. Tsai, S. F., J. W. Liao, and S. C. Wang. 1996 Safety evaluation of *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* for Japanese quail by oral administration. *J. Chin. Vet.* 22(1):344-347

30. Tusda, H., R. Hasegawa, K. Imaida, T. Masu, M. A. Moore, and N. Ito. 1984. Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of - glutamyltranspeptidase positive foci in diethylnitrosamine initiated rat liver. *Gann*. 75:876-883.
31. U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Assessment Guidelines. FIFRA Subdivision M: Microbial and Biochemical Pest Control Agents, Subsection 154A-16. Environment Protection Agency, Office of Pesticide Program. Washington, D. C. 192 pp., 1988
32. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances Washington D. C. Toxic Substances. Health Effects Test Guidelines. EPA 56016-82-001, 1982
33. Wang, S. C., and J. W. Liao. 1991. The rapid bioassay method for liver carcinogenesis on rat. *J. Chinese Vet. Med.* 17 (4) :133-140
34. Wang, S.C., and C.Y. Hsin. 1991. Toxicological study of pesticides on mammals in Taiwan. *Weed Science Bull.* 12: 93-102.
35. Wang, S.C. 1996 . Current status of toxicity study of chemical pesticide and biopesticide on mammals in Taiwan-Japan Seminar on "Laboratory animal academic research activity
36. Wasti SS, Hartmann GC, Rousseau AJ. Gypsy moth mycoses by two species of entomogenous fungi and an assessment of their avian toxicity. *Parasitol.* 80:419-424, 1980

Management and safety evaluation of Agro- and Environmental biopest control agents

Wang Shun-Cheng , Ph.D.

Head, Applied Toxicology Department

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Abstract

Unlike Agro- and Environmental chemical pesticides, microbial pest control agent may survive and reproduce in the environment, and may infect or cause disease in living organism. Thus the basic test procedure and management are designed specifically to evaluate for these characteristics. This paper emphasizes the different exposures in various tests, including the oral toxicity/pathogenicity, pulmonary toxicity/pathogenicity, intravenous toxicity/pathogenicity in rats and avian oral toxicity/ pathogenicity. The current research status of microbial pest control agent on mammals by special technique is well elucidated, too. These studies are also set a battery data to evaluate the potential toxicity, infectivity and pathogenicity of microbial pest control agent. In the mean time, it is considered as a basis reference for the management and safety evaluation of microbial pest control agent using in Taiwan. The approach issues of mammalian toxicology on bio-chemical pesticide include acute toxicity test, subchronic toxicity test, rapid carcinogenicity, reproductive toxicity, teratogenicity, and avian toxicity test are discussed. Some further prospects to expect a clear picture are mentioned for toxicology research in biochemical pesticide and biopesticide in the future in Taiwan.

表一、環境衛生用微生物製劑*之毒理資料要件

	備註
<p>一、病媒防治用之環境衛生用微生物製劑所需之毒理資料：</p> <p style="text-align: center;">資料項目</p> <p>(一) 生物毒性試驗 口服急毒性/致病性試驗 (N)、皮膚急毒性試驗 (N)、肺或呼吸急毒性/致病性試驗 (N)、眼刺激性/感染性 (N)、皮膚過敏性 (C)、靜脈注射急毒性/致病性 (C)、細胞培養試驗 (C)、其他</p> <p>(二) 環境生態毒理資料 水生物急毒性 (N)、鳥類急毒性 (C)、非目標植物致病性 (C) 非目標昆蟲致病性 (C)、對蜜蜂致病性 (C)</p> <p><i>N: 新成分及變更有效成份及新劑型必備, C: 視情況而定</i></p> <p>二、污染防治用之環境衛生用微生物製劑所需之毒理資料：</p> <p style="text-align: center;">資料項目</p> <p>(一)、生物毒性試驗 口服急毒性/致病性試驗 (W,S,N)、皮膚急毒性試驗 (C)、肺或呼吸急毒性/致病性試驗 (C)、眼刺激性/感染性 (C), 皮膚過敏性 (C)</p> <p>(二)、生態毒理資料 製劑微生物環境殘留 (C) 元素循環之影響 (C)、水生生物急毒性 (WN)、蚯蚓急毒性 (SN)</p> <p><i>W: 水域必備, S: 土壤必備 C: 視情況而定</i></p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>1</p> <p>3</p>
<p>備註：1. 伺機性病原微生物，應檢附相關病理之注射(靜脈注射，腦內注射，或腹腔注射等)致病性試驗。 2. 病毒類環境衛生用微生物製劑需附本項資料。 3. 污染防治用及環境衛生用微生物製，其組成微生物無文獻報導可使人體或其他有益生物致病者，若使用於具物理性或生物隔離性處理設備，或經該製劑處理後廢棄物中所含該製劑之微生物含量(每一百公撮之總微生物量)，低於廢棄物承受體水或土壤)相同微生物含量者，可檢附製劑微生物於環境殘留試驗資料，免檢附大項目所列其他各項資料。</p>	

*除非另有規定，毒理測試項目其試驗物質為成品。

表二、國內農用微生物製劑登記之毒理資料要件

資 料 項 目	供	樣	備 註
	試 原體	品 成品	
一、急毒性試驗(Acute toxicity testing)			
口服急毒性/致病性(Oral toxicity/pathogenicity)	V		
肺急毒性/致病性(Pulmonary toxicity/pathogenicity)	V		
靜脈注射急毒性/致病性(Intravenous toxicity/pathogenicity)	V	V	1 2
皮膚急毒性(Dermal toxicity)	V	V	
眼刺激性/感染性(Eye irritation/infectivity)	V	V	3
過敏性反應報告(Report of hypersensitivity incidents)	V		4
細胞培養試驗(Cell culture test)			5
二、環境安全試驗(Environmental fate studies)	V		
水生物急毒性測試(Aquatic toxicity)	V		6
鳥類急毒性/致病性(Avian toxicity/pathogenicity)	V		7
非目標植物致病性(Nontarget plant pathogenicity)	V		8
非目標昆蟲毒性/致病性(Nontarget insect toxicity/pathogenicity)	V		
對蜜蜂急毒/致病性(Honey bee toxicity/pathogenicity)			
<p>備註：1. 產品為病毒者可免。 2. 蘇力菌製劑可免。 3. 如有任何過敏性反應時需提出報告。 4. 病毒類製劑必備。 5. 其他成份若具高毒性或增效性時必需另附成品水生物急毒性測試。 6. 微生物殺草劑必備，所用植物種類視個案而定。 7. 微生物殺蟲劑使用於天敵釋放區，必須附上對該天敵之毒性/致病性試驗。 8. 使用於蜜源植物必備。</p>			

表三、農用微生物製劑(黑殭菌)之安全評估正式報告

作者/試驗動物	投予方式	結果
Schaerftten 大鼠 (1968)	皮下注射、呼吸毒、餵飼	無致病性及過敏性反應
Latch 小鼠、天竺鼠 (1976)	餵飼	與對照組無明顯差異
Robberts 魚(<i>Epiplatys bifasciatus</i>) (1975)	孢子混合於水中	死亡率與對照組無明顯差異
Wasti <i>et. al.</i> 鵪鶉(Japanese quail) (1980)	飲水中	無致病性及毒性
Shadduck 小鼠、大鼠、兔子 (1982)	腹腔及皮下注射、 眼睛投予	無致病性及毒性 無眼刺激性
El-kaid等 小鼠、天竺鼠 (1983)	皮下注射、呼吸毒 、餵飼	無致病性及毒性
王順成、蔡三福等 大鼠 (1994)	氣管灌注	無致病性及感染性(異物性肺炎)
蔡三福、王順成等 大鼠(1997)	氣管灌注	不具增殖性，肺臟形成大量 泡沫狀吞噬細胞

表四、農用微生物製劑(蘇力菌)之安全評估正式報告

作者/試驗動物	投予方式	結果
Hadley 等 綿羊 (1987)	餵飼(5個月)	具有侵入性 (分佈於血液)
Siegel 等 小鼠、大鼠 兔子、無胸腺小鼠 (1987)	胃管、呼吸毒 腹腔皮下注射 眼睛投予	無毒性及致病性
Siegel 等 小鼠、兔子(1990)	腹腔皮下注射 眼睛投予	無感染性
Snarski 魚類(1990)	混合於水中	於水生生物具散佈性
蔡三福、王順成等 大鼠(1995)	胃管	具有侵入性
蔡三福、王順成等 鵝鶉(1996)	胃管	無毒性及致病性
蔡三福、王順成等 大鼠(1997)	氣管灌注	不具增殖性，肺臟形成肉芽腫 組織病變

表五、小鼠腹腔注射蘇力菌後經由脾臟回收之孢子數

注射天數	樣本數	脾臟 (cfu/g)
11	4	1.3x10 ⁶
15	4	4.9x10 ⁶
25	4	3.0x10 ⁶
31	4	2.5x10 ⁶
45	4	2.3x10 ⁶
53	4	1.1x10 ⁶
58	3	3.3x10 ⁶
67	3	2.1x10 ⁶
80	3	1.6x10 ⁶

*腹腔注射 2.72x10⁷ cfu/隻

表六、蟲生細菌、真菌和原生動物在哺乳類體內的存留時間

微生物病原	處理路徑	存留(天)	種 類
<i>B. t. kurstaki</i>	腹腔注射	35	小白鼠
<i>B. t. israelensis</i>	腹腔注射	70	"
<i>B. t. sphaericus</i>	腹腔注射	67	"
黑殭菌	腹腔注射	18	大白鼠
<i>Lagenidium giganteum</i> ^a	腹腔注射	28	小白鼠
<i>Nosema algerae</i> ^b	皮下注射	27	"
<i>N. locustae</i> ^c	腹腔注射	42	兔

- 觀察卵孢子；未測定其活性。
- 前孢子期一有少許複製的現象。
- 觀察孢子，未測定活性一無意中在肝堆積。

表七、離乳大白鼠顱腔內接種三種不同品系蘇力菌菌株的毒性測試

蘇力菌菌株	菌種倍數	死 亡 數			
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
試驗組					
R. Bellon	3.5	5/6	1/6	0/6	0/6
R. Bellon*	3.5	0/6			
Abbott 125	20.0	5/6	0/6	0/6	0/6
Abbott 125*	20.0	1/6			
Abbot 125b	1.2	4/6	0/6	0/6	0/6
Abbot 125b*	1.2	0/6			
R153-78	1.5	5/6	0/6	0/6	0/6
R153-78*	1.5	0/6			
對照組					
Abbot 125(濾液)		0/24			
HBSS		1/30			

*蘇力菌菌株經高壓滅菌