

アグロバクテリウム・ラジオバクターの毒性試験の概要

トモノ農業株式会社 研究部

(Agrobacterium radiobacter)

薬剤の概要

オーストラリアの Kerr 博士によって、根頭がんしゅ病に罹病した桃の根圏土壤中から分離された本菌（アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84）の懸濁液に、桃やトマトの苗を浸漬処理すると、本菌が根頭がんしゅ病菌（アグロバクテリウム テュメファシエンス）に拮抗的に作用し、植物の発病を抑えることが見い出され、1972年に報告された。その後、世界各国で研究が行われ、多くの植物の根頭がんしゅ病に卓効のあることが明らかになった。

本菌は、アグロシン84と呼ばれる抗菌性物質を産生し、大部分の根頭がんしゅ病菌の生育を阻害する（但し、生理型IIIの病原菌に対しては、効果が認められない）。本物質は、アデニンヌクレオチド類似体でエタノール可溶、酸性、分子量1000mol wt 以下でpH 4以下または9以上で活性が低下する。本物質は病原菌のDNA合成を阻害し、また、病原菌の細胞壁の合成を阻害し、植物体への吸着を阻止する。本菌による防除効果は、アグロシン84の殺菌効果と、植物付傷部への吸着における本菌と病原菌との競合作用との両方に依ると考えられている。

我国では、1987年より、本菌のビートモス培養製剤（商品名 バクテローズ®）のバラ根頭がんしゅ病に対する圃場レベルでの試験を開始し、実用的な防除効果のある事が確認された。

本菌の名称、分類学上の位置及び生理学的性状は以下に示す通りである。

一般名：アグロバクテリウム・ラジオバクター

学名：アグロバクテリウム・ラジオバクター ストレイン84 (*Agrobacterium radiobacter* Strain84)

分類学上の位置および系統：

網：分裂菌綱 (Schizomycetes)

目：真正細菌目 (Bacterium)

科：根生菌科 (Rhizobiaceae)

属・種：アグロバクテリウム属ラジオバクター種

系統：ストレイン84 (Strain84)

色：白色

産生物：アグロシン84と呼ばれるバクテリオシン

病理性：なし (Tiプラスミドを持たない)

生理型：生理型I～IIIのIIに属する

アグロバクテリウムの属細菌の生理型の識別性状を次表に示す

表1：アグロバクテリウム属細菌の生理型の識別性状

試 験	生 理 型		
	I	II	III
3-ケトラクトースの生成	+	-	-
クエン酸鉄アンモニウムの利用	+	-	
NaCl 耐性 (%)	3~4%	1%	3%
クエン酸の利用	-	+	
オキシダーゼ反応	+	-	
テロシンの利用	-	+	-
エリスリトールからの酸の産生	-	+	-
エタノールからの酸の産生	+	-	-
L-酒石酸からのアルカリ産生	-	+	+
35°C 生育 (最高生育温度)	+	-	-
選択培地の生育			
Schroth et al	+	-	-
New & Kerr	-	+	-

安定性：

温度：最適生育温度は25~28°C

生育温度範囲は5~30°C

最適保存温度は3~5°C

pH：最適生育 pH は6~7.5程度の中性。

酸性およびアルカリ性では生育しない

光：直射日光は避ける

急性毒性試験

1. ラットにおける急性経口毒性試験

(残留農業研究所、1988年)

本菌の湿重量で1g/10ml (18×10^9 cells/ml) の蒸留水懸濁液を調整した。これを1群雌雄各10匹のSD系

SPF ラットに10ml/kg (18×10^{10} cells/kg) あるいは20 ml/kg (36×10^{10} cells/kg) 投与し、対照群にはオートクレーブ滅菌処理した死菌懸濁液を投与した。その結果14日間の観察期間中、臨床症状の異常や死亡例は認められなかった。

表2：ラットにおける経口半数致死量 (LD50)

投与量 (湿重量mg/kg)	0, 1000, 2000
LD ₅₀ (湿重量mg/kg)	♂♀共 >2000*

*生菌数で 36×10^{10} cells/kg

刺激性および皮膚感作性試験

1. ウサギにおける眼一次刺激性試験

(残留農薬研究所、1988年)

本菌の湿重量で1 g/10ml (12×10^9 cells/ml) の蒸留水懸濁液を調整し、6例のニュージーランドホホワイト種のSPF雄ウサギの左眼に各0.1mlづつ投与した。右眼を対照として、投与後1, 3時間及び1, 2, 3, 4, 7日目に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、農林水産省の指針および Draize 法に従い評価した。その結果、刺激性変化は全く認められず、アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の生菌は、ウサギの眼粘膜に対して刺激性を有さないと判断された。

2. ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

(残留農薬研究所、1988年)

本菌の湿重量で1 g/10ml (13×10^9 cells/ml) の蒸留水懸濁液を調整し、6例のニュージーランドホホワイト種のSPF雄ウサギの剪毛した背部皮膚(約6 cm²)に各0.5ml塗布し、もう1カ所(約6 cm²)には蒸留水のみ塗布した。塗布時間は4時間とし、塗布終了後1, 24, 48および72時間目に、紅斑、浮腫形成の刺激性変化を観察し、農林水産省の指針および Draize 法に従い評価した。その結果、刺激性変化は全く認められず、アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の生菌は、ウサギの皮膚に対して、刺激性を有さないと判断された。

3. モルモットにおける皮膚感作性試験

(残留農薬研究所、1988年)

ハートレイ系雌モルモットを用いて、Maximization 法により、本菌の皮膚感作性を検討した。本菌の湿重量で1 g/10ml ($13 \sim 20 \times 10^9$ cells/ml) の滅菌生理食塩

水懸濁液を調整し、被験物質投与液とした。投与群は、感作・惹起とも被験物質を投与する被験物質投与群(25匹)、感作投与では被験物質を用いず惹起でのみ投与する被験物質に対する陰性対照群(25匹)、感作・惹起とも DNCB を投与する陽性対照物質投与群(10匹)および惹起でのみ DNCB を投与する陽性対照物質に対する陰性対照群(10匹)の4群を設置した。

その結果、両陰性対照群の惹起による皮膚反応は全く認められなかった。被験物質投与群では25匹全例に肉眼的反応が認められず皮膚感作率は0%であった。一方、陽性対照物質投与群では、強度の紅斑および浮腫が10匹全例に認められ、皮膚感作率は100%であった。従って、モルモットを用いた Maximization 法において、アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の生菌は、皮膚感作性を有しないものと判断された。

変異原性試験

1. 復帰変異性試験

(オレゴン州立大学及びモンタナ州立大学、1979年)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 TA 系3株(TA-98,100,1537)を用い、ラットの肝臓から調整した薬物代謝酵素系(S-9)の存在下及び非存在下で、Ames 等の方法で、本菌及びその産生する抗菌性物質アグロシン84の変異原性を検定した。

本菌(生菌)は3日間培養して用い、半精製のアグロシン84は、大量培養後の培養液よりカラム、HPLC等で分離し、十分な大きさの阻止円形成の認められる程度の量を用いた。生菌では、菌の産出したアグロシン84の影響のみを見るスポット法と、本菌とサルモネラ菌が直接接触するシリゲータ法の2方法を用いた。

その結果、アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の生菌(スポット法とシリゲータ法)及び半精製アグロシン84は、いづれの菌株においても、代謝活性化を含め、復帰変異コロニー数の増加は認められず、復帰変異誘発性はないと判断された。

哺乳動物に対する病原性試験

1. ラットに対する病原性試験

(残留農薬研究所、1988年)

1群雌雄各10匹のSD系SPFラットに1000あるいは2000湿重量mg/kg(18あるいは 36×10^{10} cells/kg)のアグ

ロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84生菌を経口投与後14日間観察した。その結果、臨床症状、体重変化、体温変化及び解剖所見に全く異常が認められず、ラットに対して病原性はないと判断された。

同時に、本菌投与後のラットの糞尿中、臓器中(肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胃、小腸、盲腸、大腸)及び血液中の生菌の有無を検討した。投与後1～3日で1部のラットの排出物中に生菌が検出され(糞中7/40例、尿中2/40例)、生菌が生体内で完全に死滅せず、糞ないし尿から排出される事が示された。又、投与14日後に臓器中及び血液中の生菌の存在を調べたところ、1部の雄ラット(2/20例)の盲腸からアグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の生菌が検出された。

考 察

本菌の投与可能な最高濃度は、湿重量で1g/10mlであり、生菌数は $12\sim 20\times 10^6$ Cells/mlであった(シャーレ培養)。圃場での実使用時の懸濁液の生菌数は 10^8 cells/ml程度以下なので、試験に用いた投与液は、実使用時の濃度を十分に上回る濃度であった。さらに、投与液中のアグロシン84(抗菌性物質)濃度は、実使用時の菌液中(ピートモス培地使用)のアグロシン84濃度を十分に上回る濃度であることも確認されている。これらの濃度において急性経口毒性、眼一次刺激性、皮膚一次刺激性、皮膚感作性は、いづれも全く認められなかった。又、本菌の産生するアグロシン84の半精製試料に関しても変異原性は認められなかった。

アグロバクテリウム属の細菌は、土壌細菌で特に植物根圏に多いが、まれに人間の体内から分離される事がある。Lautrop, H; Acta Pathol Microbiol (Scand) 187 (Suppl.) 63-64 (1969)によると、臨床検体から10年間に10種類のアグロバクテリウム属細菌が分離され、そのうち1種類だけが植物病原性を有した。いづれの菌も臨床的重要性(病原性)はないと推定され、偶然、患者の体内に棲息していたか、あるいは検体の操作中の混入物として分離されたものであった。さらにRiley, P.S. & Weaver, R.E; Journal of Clinical Microbiology 5 (2)172-177 (1977)によると、12年間に36種類のアグロバクテリウム属に性格の類似した細菌が、臨床検体から分離され、米国アトランタの医療センターのSpecial Bacteriology Sectionに送られて

きた。形態学的及び生化学的研究の結果、いづれもアグロバクテリウム属に属すると考えられたが、既往症等から考えて、人間の病原性には関係なかった。アグロバクテリウム ラジオバクター ストレイン84の場合も、ラットを用いた病原性試験で、少数のラットの盲腸より生菌が分離され、消化管内で長時間生存可能である事が示されたが、病原性は全く認められなかった。又、その検出率も低く、動物体内での増殖力は弱いと考えられた。

要 約

本菌は、実使用濃度よりも十分に高濃度で、急性経口毒性、眼一次刺激性、皮膚一次刺激性、皮膚感作性は全く認められず、哺乳動物に対する感染性も認められなかった。さらに本菌の産生物質アグロシン84に変異原性は認められなかった。

本菌は、1976年頃より、特にオーストラリア、ニュージーランド、アメリカ等で広く使用されているにもかかわらず、動植物への悪影響は全く報告されていない。国内では、1989年12月にバラの根頭がんしゅ病に登録取得し、1990年より上市されて以来、定められた使用規準を遵守すれば、安全性の高い農薬であり、有用な農業資材の一つとして好評を得ている。

問合せ

トモノ農薬株式会社

〒420-91 静岡県春日2丁目12番25号