

白僵菌分生孢子急性毒性 药动学数据及致突变作用的实验研究

赫梅生 詹丽芬 张玉芝 郭景阳 王凤友

(中国医科大学药理教研组)

白僵菌制剂用于防治农业害虫和杀灭医学昆虫,国内外已有报导〔1~4〕。关于白僵菌对人类和脊椎动物的安全性问题,据有关文献介绍〔5~9〕,认为白僵菌制剂在特定条件下对人和脊椎动物有一定毒性,而且它是一个过敏原;但它是否就是致病原尚未做出肯定判断。对人的毒性主要表现是:头痛、倦怠无力、四肢与关节疼痛、发冷或发烧等〔9〕。白僵菌的分生孢子毒性作用较强,菌丝体作用较弱〔9〕,其毒性成分可能是一种缩羧肽〔10〕,也可能是有毒的蛋白酶〔11〕或脂肪酶〔12〕,或是其他成分〔13,14〕。上述研究没有提出定量性的毒理学数据。从国内一些未公开发表的研究资料中:据吉林省白僵菌毒性研究协作组观察:在每立方米空气含100毫克左右孢子的条件下,工人常发生过敏性呼吸道疾病;太原市卫生防疫站对生产人员进行调查并用大白鼠作了毒性实验,证明从气管进入能引起肺部的炎症改变,孢子超过10mg/kg以上时便有致死者,100mg/kg约半数致死;湖北省卫生防疫站等证明,动物中毒主要因为吸入或气管内注入而致,注入100亿/公斤孢子以上出现症状,超过500亿个别动物致死,6天吸入比1天吸入毒性增加。本工作对白僵菌制剂进行了急性毒性和蓄积毒性的定量研究,并用细菌学方法观察了纯孢子粉的致突变作用。

实验材料和方法

材料:1981年夏季由吉林省农业科学院提供。菌种为白僵菌属球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill)。有两种样品:一种是纯的分生孢子粉末;一种是以麦麸作培养基的粗制品。除标明的急性LD₅₀实验用过粗制品外,其余实验均用纯孢子粉末(703亿/克)。

菌液制备法:纯孢子粉末加蒸馏水在乳钵中轻轻研磨制成悬浮液,用时充分振荡;粗制品过40目筛加蒸馏水在乳钵中研磨,然后用四层纱布过滤,菌液为棕色半透明状液体。一般临时现配,若连续实验,可一次配成,放冰箱内可保存数日。

方法:用容量为25立升的玻璃柜,内设一个由电动机带动的小风扇,将小白鼠放入笼中柜内。开动风扇后,由风扇顶部通过小孔向柜内加入定量的孢子粉末,使其均匀悬浮在空气中,供小白鼠吸入,每次2小时,每半小时投放一次孢子粉末。

药物代谢动力学数据测定方法：用我们设计的动物急性死亡率方法测定〔16〕。

致突变实验方法：1、Ames回变检定法〔16、17〕；2、枯草杆菌修复检定法〔18〕，在使用该法时稍有改进。

实验用动物：小白鼠和制备肝药酶P450所用的雄性大白鼠由中国医科大学动物饲养室提供。

实验结果

一、急性毒性实验

1、急性腹腔注射LD₅₀及其95%可信限测定 每次正式实验用60只小白鼠，用Kürber氏法计算结果：纯孢子粉末为128±12mg/kg (P=0.95)；粗制品为766±72mg/kg (P=0.95)。

2、致死时间及致死情况

纯孢子粉末腹腔注射死亡高峰期注射后3天左右，最快1天，最慢5~7天。用粗制品制剂死亡较快，死亡高峰期在24~36小时之内。动物死前的表现：多为侧卧、不能行动、稍有抽搐，呼吸受到明显抑制。

3、急性灌胃毒性测定

经过多批次的预备实验，发现灌胃给药动物没有死亡。正式实验结果如下：10%纯孢子粉末悬浮液0.5ml/个灌胃，20只小白鼠均无死亡。10%粗制品滤液0.5ml/个灌胃，20只小白鼠也无死亡，二者说明LD₅₀>2,500mg/kg。

4、结论

纯孢子粉末腹腔注射时，属于中等毒类，粗制品毒效为纯孢子粉末的1/6，属低毒类制剂。白僵菌制剂无口服毒性问题，因为不致死剂量已超过2,500mg/kg。推测口服无毒的原因有二：1、不吸收；2、被消化液分解。

二、吸入毒性实验

1、吸入空气中不同浓度孢子粉毒性结果

结果见表1。如每次向瓶内加纯孢子粉0.5克，即500mg/25立升=20mg/立升，2小时加药4次，共2克。但考虑到半小时内孢子粉的消耗（吸入、附着或沉积于器壁及动物体表），空气中浓度只按一次加入量计算。

表1 不同浓度、不同吸入次数，孢子粉所致小白鼠死亡情况

组别	第一吸入周期			停用 day	第二吸入周期			动物数	死亡情况	
	浓度 mg/立升	时间 hr	天数 day		浓度 mg/立升	时间 hr	天数 day		数	%
1	10	2	3	—	—	—	—	10	0	0
2	20	2	3	—	—	—	—	10	1	10
3	10	2	3	4	40	2	3	10	10	100
4	20	2	3	4	40	2	1	10	10	100

注：空气中孢子粉浓度是近似值

小白鼠死亡时间多在停用后1~4天内。用纸灰过细筛粉末作对照,10只小白鼠都未死亡。

2、吸入毒性数据的估计

由上述结果估计空气中孢子粉最大不致死浓度约为15mg/立升(15g/m³) (在第1、2组吸入剂量之间); LD₅₀约为30mg/立升浓度每天吸入2小时,连用3天(在第2、3组吸入剂量之间)。

3、吸入毒性与腹腔注射急性毒性比较

根据生理知识,动物每公斤体重每小时约吸入10立升空气,如空气中孢子粉浓度为30mg/立升,2小时共吸入孢子粉600mg/kg,此量连续吸入3天约可使一半动物死亡。而一次腹腔注射LD₅₀为128mg/kg,故吸入的LD₅₀比腹腔注射约大5倍。如以腹腔注射时吸收入血比率为100%,则呼吸吸入的孢子粉约有20%可吸收入血或在肺组织内发挥毒效。

4、由吸入毒性看检品的蓄积性

表1中第3组和第4组动物死亡率相同,其中第二吸入周期第4组用药1天,第3组用药3天,是由于第4组第一吸入周期的浓度为第3组的两倍。在第一和第二吸入周期之间停止吸入4天,可见孢子粉在动物体内有一定的蓄积性,此点将在下述进一步研究证明。

5、结论

空气中孢子粉浓度超过一定限度时,可以通过呼吸道吸入中毒。空气中最大不致死浓度约为15g/m³。吸入毒效约比腹腔注射低5倍。

三、药物代谢动力学数据测定

1、小白鼠死亡率方法的结果

小白鼠在保证组间一致前提下分为6组,每组20只,平均体重19克。两次腹腔注射用药剂量均为LD₃₀,用药间隔时间各组不同。结果见表2和图1。

表2 小白鼠死亡率方法测药动力学数据实验结果

用药间隔 (hr)	动物数	死亡情况			剂量(mg/19g)			体存	
		n	p	机率单位				%	log
3	20	17	0.85	6.04	3.23	2.22	1.01	45.5	1.66
6	21	20	0.95	6.65	3.67	2.22	1.45	65.3	1.81
12	20	16	0.80	5.84	3.10	2.22	0.88	39.6	1.60
24	20	14	0.70	5.52	2.91	2.22	0.69	31.1	1.49
48	20	11	0.55	5.13	2.52	2.22	0.30	13.5	1.13
72	20	8	0.40	4.75	2.34	2.22	0.12	5.4	0.73

体存%计算(以3小时为例) $1.01/2.22 \times 100 = 45.5$ 。就用药间隔时间和体存%作图为曲线,log体存%作图为直线,如图1。

2、药动力学数据计算

消除速率常数 $K = \frac{\ln x_1 - \ln x_2}{t_2 - t_1}$, 在图1直线上取任意两点: 24和48小时, 则:

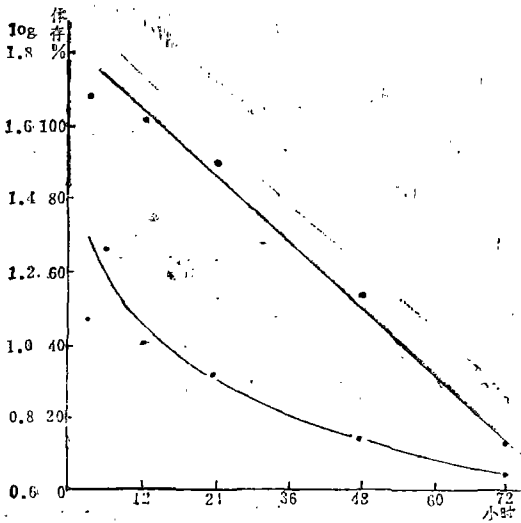


图1 用药后不同时间与体存%以及log体存的线性关系

$$K = \frac{\ln(\log^{-1}1.44) - \ln(\log^{-1}1.195)}{48 - 24}$$

$$= \frac{3.316 - 2.752}{24} = 0.0235$$

据此可算出生物体半衰期:

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{K} = \frac{0.693}{0.0235} = 29.5,$$

亦即孢子粉在动物体内的生物半衰期约30小时。图1时间和log体存%为直线关系,故知孢子粉在体内的消除方式为一级动力学型式。一级动力学型式消除的物质连续恒量用药时,5个半衰期后体内药量即接近坪值,所以连续多次恒量摄入孢子粉,150小时(6天半左右)后体内含量可接近坪值。

坪值是“入药”与“出药”的波动状动态平衡,有最高值与最低值之分。坪值最高值两种计算方法如下:

$$(1) (Xn)_{\max} = X_0 \frac{1}{1 - e^{-k\tau}}$$

$$(2) \text{按坪值定义 } (Xn)_{\max} = X_0 \frac{1}{\text{消除率}}, \text{ 式中消除率} = 1 - \text{体存率}。 \text{任意用}$$

药间隔的体存率的运算:

$$\text{体存率} = 0.5^{\tau / T_{\frac{1}{2}}}$$

如果每天(24小时)一次恒量(X_0)吸入孢子粉,则可按以上两法计算坪值最高值:

$$(1) (Xn)_{\max} = X_0 \frac{1}{1 - e^{-0.0235 \times 24}} = X_0 \frac{1}{1 - 0.569}$$

$$= \frac{1}{0.431} = 2.32X_0$$

亦即为原剂量的2.32倍。

$$(2) \text{体存率} = 0.5^{24/29.5} = 0.5^{0.814} = 0.569$$

$$\text{则消除率} = 1 - 0.569 = 0.431$$

$$\text{所以 } (Xn)_{\max} = X_0 \frac{1}{0.431} = 2.32X_0$$

可知两种计算方法的结果和计算过程的后半部完全相同,这是因为 e^{-kt} = 体存率的原故。

四、致突变作用实验结果

1、Ames回变检定结果

用TA100、TA98、TA1538、TA1537和TA1535、五株依赖组氨酸变异型鼠伤寒杆菌，包括用肝药酶P450激活或不激活，渗入法，每皿加入孢子粉量高达4,000微克，多批重复实验，证明纯孢子粉无致突变作用。而用标准阳性物如亚硝基胍或乙酰氨基基则观察到明显的致突变作用。

2、枯草杆菌修复检定结果

用H17修复型及M45修复缺陷型菌株，以0.4%孢子粉悬浮液划线未观察到致突变作用。而微量标准致突变物丝裂霉素则为阳性。

讨 论

1、吸入毒性为何较腹腔注射毒性低？实验结果中已经说明，吸入毒性约比腹腔注射低5倍，这是因为吸入肺内的物质不可能全被吸收，还有相当部分被呼出。文献记载吸入的微粒状物质在肺中沉积率为25%〔19〕，而沉积的部分也不一定全吸收，这与我们的结果相符合。

2、关于白僵菌空气中允许浓度问题：Muller—Kogler用白化品系老鼠实验，在空气中有5 mg/立升浓度分生孢子时，每周吸入一次（1小时）动物情况良好，吸入两次可死亡，认为100 mg/m³是安全的〔9〕。国外有人实验，认为分生孢子浓度为4 mg/m³时两个月对小白鼠无影响〔5〕。太原市卫生防疫站给大白鼠气管内注入分生孢子0.1 mg/kg时，动物无不良反应，按1%安全系数计算，认为卫生标准应取0.001 mg/kg。

我们的实验结果是空气中分生孢子浓度为10 mg/立升时，吸入2小时动物不致死（见表1）；而按毒理学规律，不致死量（最大）的1%可视为无作用量，10 mg/立升 $\times \frac{1}{100} = 0.1 \text{ mg/立升}$ （即100 mg/m³），与Muller—Kogler看法相符。再把卫生标准上常用的1%安全系数考虑在内，则我们认为空气中白僵菌分生孢子的允许浓度应定为1 mg/m³。前边提到过分生孢子4 mg/m³处理小鼠两个月无影响〔5〕的材料也是一个例证。

如果空气中分生孢子浓度为1 mg/m³，每天呼吸2小时，吸收率按0.2计算，则机体实际摄入量 = 1×0.02 （每公斤体重2小时吸入20立升，即0.02 m³） $\times 0.2 = 0.004 \text{ mg/kg}$ 。与太原市卫生防疫站的结果相接近。如果每天呼吸1 mg/m³空气2小时，而且无限期继续下去，按我们药动学数据测定结果，则动物机体最大积存量（坪值高值） = $2.32 \times 0.004 = 0.0093 \text{ mg/kg}$ 。此值为腹腔注射LD₅₀（128 mg）的1/13,763，不可能有什么问题。

小 结

本文报导了白僵菌纯分生孢子急性毒性、药动学数据及致突变作用的研究结果。小白鼠急性腹腔注射LD₅₀及95%可信限为128 ± 12 mg/kg（P = 0.95）。消化道给药基本无

毒。呼吸道吸入的毒性较腹腔注射毒性低5倍。分生孢子的生物半衰期为29.5小时；连续每天摄入一次，体内坪值高值为2.32倍剂量。Ames及枯草杆菌法致突变作用阴性。建议空气中分生孢子允许浓度为 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 。

参 考 文 献

- (1) 徐庆丰等：应用白僵菌防治大豆食心虫的初步研究，昆虫学报，9(3)：203, 1959.
- (2) 徐庆丰等：应用白僵菌防治玉米螟的田间试验，昆虫学报，16(2)：203, 1973.
- (3) 马应名：白僵菌对医学昆虫杀灭作用的观察，中华流行病学杂志，2(3)：203, 1981.
- (4) 湖南省微生物研究所情报资料组：白僵菌国外研究应用简况，内部资料，1979.
- (5) 湖南省微生物研究所情报资料组：关于白僵菌对人畜的安全性问题，内部资料，1979.
- (6) 赵子辰等：白僵菌致病作用的探讨，中华预防医学杂志，15(5)：272, 1981.
- (7) Ferron, P.: Ann.Rev.Entomol., 23: 409, 1978.
- (8) Ignoffo, C.M.: Ann. N.Y.Acad.Sci., 217: 141, 1973.
- (9) Muller-Kogler, E.: Entomophaga, 12(5)：429, 1967.
- (10) Hamill, P.L.et al.: Tetrahedron Lett., No.49: 4255, 1969.
- (11) Samsinakova, A.et al.: See M.A.C.V56127, 1975.
- (12) Paris, S.et Segratain, G.: Entomophaga, 20: 135, 1975.
- (13) West, E.J.and Briggs, J.D.: J.Econ.Ent., 61: 684, 1968.
- (14) Wojcienchowska, W.: See M.A.C.4 C6900, 1973.
- (15) 赫梅生等：用动物急性死亡率方法测定药物代谢动力学数据，全国农药毒性及残留研究资料汇编，1981.
- (16) Ames, B.N.: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 72: 2423, 1975.
- (17) Ames, B.N.et al: Mutation Res., 31: 347, 1975.
- (18) Hiroshi Tanooka: Mutation Res., 42: 19, 1977.
- (19) Anon: Recommendation of the International commission on radiological protection. Report of Committee 2 on permissible dose for internal radiation. ICRP publication 2, Pergamon press, London, 1959.