

青枯病菌感染性 バクテリオファージ RKP181 生物農薬評価書

2023年11月28日

農業資材審議会農薬分科会
生物農薬評価部会

目次

	頁
1. 有効成分の概要.....	3
2. 製剤の概要.....	5
3. 物理的・化学的性状.....	6
4 安全性に係る試験の概要.....	7
4.1 毒性試験の結果概要.....	7
4.2. 農薬使用者暴露許容量（AOEL）・急性農薬使用者暴露許容量（AAOEL）	12
5. 家畜に対する影響.....	13
5.1 ミツバチに対する影響.....	13
5.1.1 ミツバチに対する影響試験.....	13
5.1.2 毒性及び感染性の有無から付される注意事項.....	13
5.1.3 評価結果.....	13
5.2 蚕に対する影響.....	15
6. その他の生物に対する影響.....	16
6.1 植物.....	16
6.2 標的外昆虫.....	17
6.3 土壌微生物.....	19
別添 1 用語及び略語.....	20
別添 2 評価資料一覧.....	21

<経緯>

令和4年（2022年）12月22日	農業資材審議会への諮問
令和5年（2023年）2月22日	農業資材審議会農薬分科会生物農薬評価部 会（第2回）
令和5年（2023年）10月4日	農業資材審議会農薬分科会生物農薬評価部 会（第5回）
令和5年（2023年）10月17日から11月15日まで	国民からの意見・情報の募集
令和5年（2023年）11月28日	農業資材審議会農薬分科会生物農薬評価部 会（第6回）

<生物農薬評価部会委員名簿>

（委員）

有江 力

小西 良子

（専門委員）

小坂 忠司

後藤 千枝

中村 純

（臨時委員）

山本 幸洋

1. 有効成分の概要

(資料 1-1)

1.1 申請者

パネフリ工業株式会社

1.2 有効成分

1.2.1 登録名

青枯病菌感染性バクテリオファージ

1.2.2 一般名

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181

英名 : *Ralstonia virus* RKP181

和名 : 青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181

1.2.3 学名及び分類学上の位置

(1) 学名

Ralstonia virus RKP181

(2) 分類学上の位置

門 : *Uroviricota* (ウロウイルス門)

綱 : *Caudoviricetes* (カドウイルス綱)

目 : *Caudovirales* (カドウイルス目)

科 : *Autographiviridae*

属 : (未分類)

種 : *Ralstonia virus* RKP181

株 : RKP181

1.2.4 生物学的性質

(1) 生育条件

青枯病菌に感染、増殖することから、青枯病菌の生育条件である約 20～37℃と一致する。

(2) 宿主域

Ralstonia virus RKP181 は青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を宿主とし、国内のトマト、ナス、ショウガ、ウコン、エゴマ等より分離された青枯病菌 100 株以上供試したところ全てに感染するとの報告がある。

(3) 生活史、作用機作

Ralstonia virus RKP181 は青枯病菌に感染し、増殖、溶菌することで青枯病菌に殺菌作用を示す。増殖した当該ファージは、さらに周囲に存在する青枯病菌に対し物理的接触により感染し、増殖、溶菌を繰り返す。一方、青枯病菌に接触できなかった当該ファージは失活する。

(4) 毒素の存在又は産生及びその性質（資料 1-2）

Ralstonia virus RKP181 のゲノム全塩基配列から、遺伝子及びその機能を推定した結果、既知の毒性産生に関わる遺伝子は特定されていない。また、これまでに当該ファージの青枯病菌以外への毒性について報告されていない。

(5) 自然界における存在及び地理的分布

Ralstonia virus RKP181 は新潟県の青枯病菌汚染土壌から分離、採取されたが、採取地近隣の青枯病菌非汚染土壌からは分離されなかった。また、別の年の同一汚染圃場からは当該ファージが分離されなかったことから、分布は限定的かつ非潜在的である。

2. 製剤の概要

2.1 種類及び名称

種類：青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 液剤

名称：青枯革命

2.2 用途

殺菌剤

2.3 組成

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 1.0×10^{10} PFU/mL
水 残量

2.4 適用病害虫の範囲及び使用方法

.

作物名	適用 病害名	希釈倍数	使用量	使用時期	本剤の 使用回数	使用 方法	青枯病菌感染性 バクテリオファージ RKP181 を含む 農薬の総使用回数
トマト	青枯病	100 倍	—	定植 2 日 前	—	5 分間 苗浸漬	—

2.5 諸外国における登録に関する情報

令和 3 年 1 月現在、諸外国での登録はない。

3. 物理的・化学的性状

3.1 製剤の物理的・化学的性状

本剤の代表的ロットを用いた試験結果を表 3-1 に示す。

表 3-1：青枯革命の物理的・化学的性状試験の結果概要（資料 3-1）

試験項目	試験方法	試験結果
外観	13 生産 3987 号通知 官能検査	淡褐色澄明液体
原液安定性	昭和 35 年 2 月 3 日 農林省告示第 71 号	0℃、72 時間放置後、分離は認められない。 ごく僅かな沈殿を認めた。
希釈液安定性	昭和 35 年 2 月 3 日 農林省告示第 71 号	沈殿・分離は認められない
密度	ピクノメーター法	1.00 g/cm ³ (23℃)

3.2 経時安定性

(資料 3-2)

本剤を用いて実施した経時安定性試験の結果、4℃で 3 か月保存において、有効成分含有濃度及び外観に問題はなかった。

この結果から、本剤の使用期限を 3 か月（4℃保存）とすることは妥当と判断した。

4 安全性に係る試験の概要

4.1 毒性試験の結果概要

原体及び製剤を用いた人に対する影響に関する試験の結果概要を表4に示す。

表 4-1：単回経口投与試験の概要（資料 4-1）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	原体
試験動物	Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD)、約 5 週齢、 体重；雄 119.9-128.2 g、雌 106.2-114.3 g 投与群；1 群雌雄各 14 匹（途中解剖群；1 群雌雄各 3 匹、最終解剖群；雌雄各 5 匹）、 溶媒対照群；雌雄各 2 匹
試験期間	21 日間
投与経路・投与量	経口、 1.0×10^8 PFU/動物
検査項目	一般状態観察及び死亡の有無 体重測定（投与前(0 日)・投与後 3・7・14・21 日） 体外への排出状況（投与後 1・3・7・14 日） 剖検（投与後 3・7・14・21 日） 体内における生残状況（投与後 3・7・14・21 日）腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、胃、小腸（十二指腸）、大腸（盲腸）、腸間膜リンパ節、血液
結果の概要	一般状態観察及び死亡：死亡例なし、毒性徴候なし。 体重：影響は認められなかった。 剖検：肉眼的病理検査の結果、異状は認められなかった。 体外への排出状況：糞中には、投与 1 日目に $1.2 \times 10^4 \sim 1.9 \times 10^5$ PFU/g（10/10 匹）が検出され、投与 3 日目に $1 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^3$ PFU/g（10/10 匹）、投与 7 日目に 1×10^2 PFU/g（1/10 匹）に減少し、14 日後にはプラークは検出されなかった。 体内における生残状況：投与 3 日目に肝臓（1/6 匹）、肺（1/6 匹）、小腸（2/6 匹）、大腸（3/6 匹）、投与 14 日目に胃（1/6 匹）、小腸（1/6 匹）、大腸（1/6 匹）に、3 プレート中 1 プレートに 1 プラークが検出されたが、いずれも投与 7 日目及び 21 日目にはプラークは検出されなかった。腎臓、脳、脾臓、腸間膜リンパ節及び血液では微生物は検出されなかった。 感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった。

表 4-2：単回経皮投与試験の概要（資料 4-2）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	製剤
試験動物	日本白色ウサギ（KbI:JW）、約 10 週齢、 体重；1.9-2.4 kg、1 群雌雄各 5 匹
試験期間	14 日間
投与経路・投与量	経皮、5mL/動物（ 1.0×10^{11} PFU/動物）
検査項目	一般状態観察及び死亡の有無 体重測定（投与前(0 日)・投与後 7・14 日） 剖検（投与後 14 日） 皮膚刺激性（投与前(0 日)・投与後 1・3 時間・1~14 日）

結果の概要	一般状態観察及び死亡：死亡例なし、毒性兆候なし。 体重：影響は認められなかった。 剖検：雌で肝臓に膿瘍が認められたが、雌雄あわせて 1/10 匹のみの発現であることから、投与に関連するものではないと考えられた。 皮膚刺激性：皮膚刺激性なし。 皮膚刺激性及び経皮毒性は認められなかった。
-------	---

表 4-3：単回経気道投与試験の概要（資料 4-3）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	原体
試験動物	Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD)、5 週齢、 体重；雄 145.6-161.8 g、雌 134.9-149.7 g 投与群；1 群雌雄各 17 匹（途中解剖群；1 群雌雄各 3 匹、最終解剖群；雌雄各 5 匹）、溶媒対照群；雌雄各 2 匹
試験期間	21 日間
投与経路・投与量	経気道、 1.0×10^8 PFU/動物
検査項目	一般状態観察及び死亡の有無 体重測定（投与前(0 日)・投与後 3・7・14・21 日） 剖検（投与直後、投与後 3・7・14・21 日） 体内における生残状況（投与直後・投与後 3・7・14・21 日）気管、鼻腔、腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、気管支リンパ節、血液
結果の概要	一般状態観察及び死亡：死亡例なし。呼吸音異常が、投与 1 時間目に溶媒対照群の雌雄全例（4/4 匹）、微生物投与群の雄（7/17 匹）及び雌（2/17 匹）、投与 1 日目に微生物投与群の雄（2/14 匹）、投与 2 及び 3 日目に微生物投与群の雄（1/14 匹）に認められたが、投与 4 日目以降、呼吸音異常なし。溶媒対照の雌雄全例で認められていることから、経気道投与に伴う非特異的な変化と考えられた。 体重：影響は認められなかった。 剖検：投与後 3 日目に雄 1 例で肺に限局性の出血痕が認められたが、全身状態の悪化を伴うものではなく、肺や気管などの気道では被験微生物は消失していることから、本変化は病原性や毒性を示唆するものではないと考えられた。 体内における生残状況： 肺において投与直後に 7.4×10^6 PFU/g（雄 1/3 匹）又は溶菌多数のためプラークをカウントできなかった（雄 2/3 匹、雌 3/3 匹）。投与 3 日目に $9.0 \times 10^2 \sim 5.3 \times 10^3$ PFU/g（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、7 日目に 1.0×10^2 PFU/g（雌 1/3 匹）又は 3 プレート中 1 プレートに 1 プラーク（雌 1/3 匹）検出されたが、投与 14 日目以降、プラークは検出されなかった。 投与直後に、気管支リンパ節（雄 1/3 匹、雌 2/3）、気管内拭い液（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、鼻腔内拭い液（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）に、最大 8.3×10^5 PFU/g が検出されたが、いずれも投与 3 日目以降、プラークは検出されなかった。 血液、腎臓、脳、肝臓及び脾臓ではプラークは検出されなかった。 感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった。

表 4-4：単回静脈内投与試験の概要（資料 4-4）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	原体

試験動物	Sprague-Dawley 系ラット(Crl:CD)、5 週齢、 体重；雄 135.7-150.0 g、雌 119.2-136.2 g 投与群；1 群雌雄各 17 匹（途中解剖群；1 群雌雄各 3 匹、最終解剖群；雌雄各 5 匹）、 溶媒対照群；雌雄各 2 匹
試験期間	21 日間
投与経路・投与量	静脈投与、 1.0×10^7 PFU/動物
検査項目	一般状態観察及び死亡の有無 体重測定（投与前(0 日)・投与後 3・7・14・21 日） 剖検（投与直後、投与後 3・7・14・21 日） 体内における生残状況（投与直後・投与後 3・7・14・21 日）腎臓、脳、肝臓、脾臓、小腸、大腸、鼠経リンパ節、血液
結果の概要	一般状態観察及び死亡：死亡例なし、毒性徴候なし 体重：影響は認められなかった。 剖検：肉眼的病理検査の結果、異状は認められなかった。 体内における生残状況： 脾臓において、投与直後 $1.8 \times 10^5 \sim 7.7 \times 10^5$ PFU/g（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、投与 3 日目に $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^2$ PFU/g（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、7 日目に 3 プレート中 1 プレートに 1 プラーク（雄 2/3 匹、雌 0/3 匹）が検出されたが、投与 14 日目以降、プラークは検出されなかった。 投与直後、腎臓（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、肝臓（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、小腸（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、大腸（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）、鼠経リンパ節（雄 3/3 匹、雌 2/3 匹）、血液（雄 3/3 匹、雌 3/3 匹）に、最大 4.5×10^4 PFU/g が検出されたが、いずれも投与 3 日目以降、プラークは検出されなかった。 脳ではプラークは検出されなかった。 感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった。

表 4-5：細胞培養試験（感染性試験）の概要（資料 4-5）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	原体
試験細胞	哺乳類動物細胞： ①WI-38（ヒト肺由来正常繊維芽細胞）、②CV-1（アフリカミドリザル腎由来線維芽細胞） ③NHEK（ヒト正常表皮角化細胞）、④SHOK（シリアンハムスター胎仔細胞） 細胞培養濃度： 1.0×10^5 cell/5mL 対照群：被験試料希釈液である PBS(-)接種群 不活化対照群：オートクレーブ処理したファージ液接種群
試験期間	21 日間
投与量	5.0×10^6 PFU/mL（5 PFU/cell）
検査項目	細胞変性の有無：顕微鏡観察（接種後 1・2・5・7・14・21 日） 感染の有無：培養上清中及び細胞中の被験微生物の力価を測定。青枯病菌を用いたプラークアッセイで分析（接種後 1・2・5・7・14・21 日）
結果の概要	細胞変性の有無：感染を示唆する異常は認められなかった。 感染の有無：全ての培養上清中に検出限界以上の被験微生物が検出され、培養細胞に十分な量の被験微生物が暴露されていた。 CV-1、WI-38 及び SHOK 細胞では、培養細胞抽出液から被験微生物は検出されなかった。NHEK 細胞では接種後 1 日に培養細胞抽出液中に 1×10 PFU/mL 検出されたが、培養上清中のものが細胞回収時に残留したものと推察され、細胞内への侵入を示唆するものではないと判断した。

	感染性は認められなかった。
--	---------------

表 4-6：細胞培養試験（細胞毒性試験）の概要（資料 4-6）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	原体
試験細胞	哺乳類動物細胞： ①WI-38（ヒト肺由来正常繊維芽細胞）、②CV-1（アフリカミドリザル腎由来繊維芽細胞） ③NHEK（ヒト正常表皮角化細胞）、④SHOK（シリアンハムスター胎仔細胞） 細胞培養濃度：200 cells/シャーレ、1 群当たり 10 シャーレ 非処理対照群：各細胞培地添加群 被験試料培養液対照群：被験試料原液構成培地添加群
試験期間	①WI-38、②CV-1：6 日間 ③NHEK、④SHOK：4 日間
投与量	1.0×10^5 PFU/シャーレ
検査項目	コロニー形成の有無：顕微鏡観察（1 回/日） コロニー数の測定：処理群、非処理対照群、被験試料培養液対照群のいずれかでコロニーが形成されるまで培養し、コロニー数を測定。各群の平均コロニー数を比較。
結果の概要	CV-1 細胞では、処理群のコロニー数は被験試料培養液対照群及び非処理対照群に比して有意に低値を示したが、背景データの正常値の範囲内であったことから、被験物質の影響ではないと判断した。 WI-38 細胞、NHEK 細胞及び SHOK 細胞では、処理群のコロニー数は被験試料培養液対照群及び非処理対照群との間には有意差は認められなかった。 細胞毒性は認められなかった。

表 4-7：眼刺激性試験の概要（資料 4-7）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	製剤
試験動物	日本白色ウサギ（KbI:JW）、約 10 週齢、 体重；1.9-2.2 kg、雄 非洗眼群 6 匹（投与後 24 時間に洗眼）、洗眼群 3 匹（投与後 30 秒後に洗眼）
試験期間	7 日間
投与量	2.0×10^9 PFU/動物
結果の概要	全ての動物において眼刺激性は認められなかった。

表 4-8：皮膚感作性試験の概要（資料 4-8）

報告年・テストガイドライン・GLP	2019 年、9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知、GLP
被験物質	製剤
試験動物	モルモット（Hartley）、約 5 週齢、 体重；340～394 g、1 群雄 10 匹
試験期間	34 日間
投与量	8.0×10^6 PFU/mL 初回感作及び惹起時：0.05 mL/動物、感作 2 回目～10 回目：0.1 mL/動物

結果の概要	全ての動物において体重の変動及び皮膚反応は認められなかった。 感作性は認められなかった。
-------	---

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 を用いた単回経口投与試験において、一般状態において異常は認められず、死亡も認められなかった。また、体重変化及び剖検についても異常は認められなかった。糞便からは $1.2 \times 10^4 \sim 1.9 \times 10^5$ PFU/g が検出されたが、投与 7 日目に 1×10^2 PFU/g、投与後 14 日後にはプラークは検出されなかった。青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 に生残性及び感染性はないと考えられた。

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 を用いた単回経気道投与試験において、呼吸音異常が雄 7 例及び雌 2 例で認められたが、対照群においても同様の症状が認められたことから、当該所見は、経気道投与に伴う非特異的变化と考えられた。体重については、試験期間中異常は認められなかった。青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 に毒性及び病原性はないと考えられた。

体内生残性検査では、投与後 14 日以降の検査では、いずれの検査対象器官・組織及び血液においてもプラークは検出されなかった。

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 を用いた細胞培養試験において、感染性及び細胞毒性は認められなかった。

各種毒性試験結果から感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった。

また、青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 について、過敏性反応等の事例は報告されていない。

表 4-9：各毒性試験の結果概要

試験	試験系	投与量 (PFU/動物)	結果概要
単回経口 (資料4-1)	原体 ラット	1.0×10^8	感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった
単回経皮 (資料4-2)	製剤 ウサギ	1.0×10^{11}	皮膚刺激及び毒性は認められなかった
単回経気道 (資料4-3)	原体 ラット	1.0×10^8	感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった
単回静脈内 (資料4-4)	原体 ラット	1.0×10^7	感染性、病原性、毒性及び生残性は認められなかった
細胞培養(感染性) (資料4-5)	原体	5 PFU/cell	感染性は認められなかった。
細胞培養(細胞毒性) (資料4-6)	原体	1.0×10^5 PFU/シャーレ	細胞毒性は認められなかった。
眼刺激性 (資料4-7)	製剤 ウサギ	2.0×10^9	眼刺激性なし。(区分外)
皮膚感作性 (資料4-8)	製剤 モルモット	8.0×10^6	陰性(区分外)

人畜に有毒な農薬については、その旨、使用に際して講ずべき被害防止方法及び解毒方法は以下のとおり。

(1) 人畜に有毒な農薬については、その旨及び解毒方法
該当なし

(2) 使用に際して講ずべき被害防止方法
該当なし

4.2. 農薬使用者暴露許容量 (AOEL) ・急性農薬使用者暴露許容量 (AAOEL)

文献調査の結果、動物又は人への病原性の発生についての言及はなかった。また、青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 は、第一段階試験の単回経口投与試験、単回経皮投与試験及び単回経気道投与試験において、感染性、病原性、毒性及び生残性は認められず（表 4-9）、人に対する安全性は問題ないと考えられるため、第二段階以降の試験は不要と判断し、農薬使用者暴露許容量 (AOEL) 及び急性農薬使用者暴露許容量 (AAOEL) の設定は不要とした。

5. 家畜に対する影響

5.1 ミツバチに対する影響

5.1.1 ミツバチに対する影響試験

ミツバチへの暴露の可能性がないため省略。

5.1.2 毒性及び感染性の有無から付される注意事項

ミツバチへの暴露の可能性がないため注意事項は要しない。

5.1.3 評価結果

本剤の適用方法は、トマト定植前のポット浸漬であり、ミツバチが本剤に暴露する経路としては、接触暴露及び経口暴露が該当する。

本剤の使用時期、使用方法及び本剤の地上部への移行性から、以下の理由より、接触暴露及び経口暴露ともに、ミツバチへの暴露の可能性はないと想定される。

- ・定植前のトマトは幼苗期であり、ポット浸漬処理中にミツバチが接触暴露することはないと考えられる
- ・ポット浸漬により根部に付着した本剤は、土壌の青枯病菌に防除効果を発することより、根域にとどまっていることが推察される
- ・青枯病菌非存在下において、ファージ剤をトマト苗の根元に使用濃度の 10 倍濃度で灌注処理し、定植後 30 日までの根、茎部位への移行性を検討したところ、表 5-1 のとおり、定植後 7 日の地上部（茎全体）で 9.0×10 PFU が検出されたが、定植後 1 日、14 日、30 日の地上部（茎全体）では検出限界未満であった
- ・ファージ剤をトマト苗の根元に使用濃度の 10 倍濃度で灌注処理後、定植時に青枯病菌を添加した試験区（青枯病菌添加区）及び添加しない区（青枯病菌非添加区）を設け、定植後 30 日までの根、茎部位への移行性を検討したところ、表 5-2 のとおり、青枯病菌添加区の定植後 1 日及び 7 日の地上部（茎全体）でそれぞれ 1.1×10^3 PFU 及び 1.0×10^3 PFU が検出されたが、定植後 14 日及び 30 日の地上部（茎全体）ではいずれも検出限界未満であった
- ・青枯病菌添加区における地上部（茎葉）への移行性に関し、地上部を地際から子葉付近までの部位と子葉付近から上部までの部位に分け、地上部におけるファージの局在性を検討したところ、表 5-3 のとおり、地上部の地際から子葉付近では処理後 14 日に限り 1.5×10^6 PFU が検出されたほかは、定植後 1 日、7 日、30 日いずれも検出限界未満であり、地上部の子葉付近から上部では期間を通じていずれも検出限界未満であった

したがって、申請の使用方法（定植 2 日前、苗灌注）においては、ミツバチの群の維持に支障を及ぼすおそれはないと考えられる。

表 5-1：農薬微生物のトマトの根、地上部への移行性について（資料 5-1）

トマト (部位)	製剤の力価* (PFU/部位全体)			
	定植後日数**			
	1日	7日	14日	30日
根部	3.0×10^4	1.9×10^3	1.8×10^3	ND
地上部（茎全体）	ND	9.0×10	ND	ND

トマト苗処理：製剤 10 倍希釈液、セル苗 1 株当たり 4mL を株元灌注
 (1.0×10^9 PFU/mL：実使用濃度の 10 倍濃度の使用液を株元灌注)

*：プラークアッセイによる（検出限界；1 PFU）

**：株元灌注処理後、3 日目に定植

表 5-2：農薬微生物のトマトの根、地上部への移行性について（資料 5-1）

トマト (部位)		製剤の力価* (PFU/部位全体)			
		定植後日数**			
		1日	7日	14日	30日
青枯病菌 非添加区	根部	1.3×10^5	7.6×10^3	4.3×10^3	ND
	地上部（茎全体）	ND	3.0×10^2	ND	ND
青枯病菌 添加区	根部	1.3×10^6	6.1×10^5	1.0×10^4	6.3×10^3
	地上部（茎全体）	1.1×10^3	1.0×10^3	ND	ND

トマト苗処理：製剤 10 倍希釈液、セル苗 1 株当たり 4mL を株元灌注
 (1.0×10^9 PFU/mL：実使用濃度の 10 倍濃度の使用液を株元灌注)

*：プラークアッセイによる（検出限界；1 PFU）

**：株元灌注処理後、3 日目に定植。定植時に青枯病菌($OD_{660}=0.1; 1 \times 10^8$ PFU/mL 相当)を 4mL を株元灌注

表 5-3：農薬微生物のトマトの根、地上部への移行性、分布について（資料 5-1）

トマト (部位)			製剤の力価* (PFU/部位全体)			
			定植後日数**			
			1日	7日	14日	30日
青枯病菌 非添加	根部		4.0×10^4	1.1×10^3	1.1×10^3	ND
	地上部（茎全体）		ND	9.8×10	ND	ND
青枯病菌 添加	根部		1.1×10^5	1.1×10^4	1.5×10^7	ND
	地上部 (茎全体)	地際 から 子葉付近	ND	ND	1.5×10^6	ND
		子葉付近 から 上部	ND	ND	ND	ND

トマト苗処理：製剤 10 倍希釈液、セル苗 1 株当たり 4mL を株元灌注
 (1.0×10^9 PFU/mL：実使用濃度の 10 倍濃度の使用液を株元灌注)

*：プラークアッセイによる（検出限界；1 PFU）

**：株元灌注処理後、3 日目に定植。定植時に青枯病菌($OD_{660}=0.1; 1 \times 10^8$ PFU/mL 相当)を 4mL を株元灌注

5.2 蚕に対する影響

蚕影響試験

原体を用いて実施した蚕影響試験の結果を表 5-4 に示す。

処理区での死亡率は対照区と同程度であった。死亡個体について、本微生物の感染は認められなかった。処理区の 4～5 齢経過日数、結繭蚕数、健蛹歩合等は対照区と同程度で、影響は確認されなかったことから、蚕に対して影響を及ぼすおそれはないと判断した。

表 5-4：原体を用いた蚕影響試験の結果概要（資料 5-2）

被検物質	原体(2.0×10^{11} PFU/mL)
供試生物	蚕 (<i>Bombyx mori</i> , 春嶺×鐘月)、1群100頭 (10頭×5反復、2連制)、4齢起蚕、試験機関でふ化、25℃
暴露方法	所定濃度に調製した被検物質懸濁液に、桑成葉を30秒間浸漬し、風乾後、4齢期間中の供試生物に摂食させた。 5齢期以降は無処理の人工飼料を摂食させた。
試験期間	23日間
試験区	処理区 1.0×10 ⁹ PFU/mL(微生物指針で規定されている最大使用濃度(1.0×10 ⁸ PFU/mL)の10倍濃度区 対照区 (無処理区)
調査項目	症状観察：処理後毎日、供試生物が死亡又は結繭するまで生死、苦悶、生存虫の齢期、発育の斉一度、行動や体色以上などの中毒症状を観察し、処理9日後、16日後、23日後の死亡率を求めた。また、4～5齢期間中の経過日数を算出するとともに、結繭後の繭重及び蛹重を調査し、結繭率、健蛹歩合、雌雄別繭重、繭層重、繭層歩合を求めた。 病理検査：試験期間中、処理区における死亡及び影響が見られた個体については、顕微鏡にて農薬微生物の感染の有無を調べた。
結果の概要	症状観察：処理区及び対照区の処理23日後の死亡率は、それぞれ5.0%及び2.0%であり、無処理区と比較して処理区において生存に及ぼす影響は確認されなかった。 蚕の発育については、処理区においては4～5齢期間中の経過日数、死亡率及び健蛹歩合のいずれも処理区と対照区との間に顕著な差は認められなかった。また、処理区においても発育の不斉一、中毒症状は見られなかった。 繭質については、結繭率、平均繭重、平均繭層重、繭層歩合、雌雄別の繭重、繭層重のいずれも処理区と対照区との間に顕著な差は認められなかった。 病理検査：死亡個体に農薬微生物の感染は見られなかった。

6. その他の生物に対する影響

6.1 植物

植物影響試験

被験物質 : 原体 (2.0×10^{11} PFU/mL)

供試植物 : 単子葉植物 : 稲、小麦、ねぎ、にら

双子葉植物 : なす、トマト、きゅうり、だいず、キャベツ、だいこん

試験区 : 試験物質処理区及び対照区各区 4 反復 4 連制 (1 区 16 株)

暴露方法 : 最高使用量 (1×10^8 PFU/mL) の 10 倍量 (1.0×10^9 PFU/mL) に調製した被験物質を使用し、展着剤グラミン S (ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル 15.0%、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル 5.0%、ポリナフチルメタンスルホン酸ナトリウム 4.0%) を 10,000 倍となるように添加した。対照区にも同様に脱イオン水を散布した。

各対象作物の生育期に、ドラフト内でスプレーヤーを用いて、150L/10a 相当量の薬液を茎葉散布した。

検査項目 : 各植物の生育状況について、処理前 (0 日)、処理後 7、14 及び 21 日に、草丈及び葉齢 (または葉期) を調査した。また、薬害症状の有無を肉眼で観察した。

結果 : 原体を用いて実施した植物影響試験の結果を表 6-1 に示す。4 科 6 作物の双子葉植物、2 科 4 作物の単子葉植物において、無処理区と比較して、草丈及び葉齢 (葉期) に差はなく、感染等異常は認められなかった。

本有効成分は、標的微生物に対して特異的に感染性を示すものであり、本微生物が植物に対して病原性を示し、生育不良を起こす等の影響を及ぼす可能性は低いと判断した。

表 6-1 : 原体を用いた植物影響試験の結果概要 (資料 6-1)

供試作物 種名	試験場所 実施年度	試験条件				結果
		希釈倍数 (倍)	処理濃度 (10^9 PFU/mL)	処理時期	使用方法	
トマト	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
なす	兵庫 R1	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
きゅうり	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
キャベツ	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。

だいこん	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
だいず	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
稲	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
小麦	兵庫 R1	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
ねぎ	兵庫 R1	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。
にら	兵庫 R2	200	1.0	生育期	散布	いずれの試験区も無処理区と比較して生育に差はなかった。感染等異常は認められなかった。

6.2 標的外昆虫等

標的外昆虫等影響試験

原体を用いて実施した標的外昆虫等影響試験の結果を表 6-2-1、6-2-2 及び 6-2-3 に示す。

チャバラアブラコバチ成虫に対する接触暴露試験では、処理区で行動異常及び死亡個体は認められなかった。ヒメカメノコテントウ成虫に対する接触暴露試験では、対照区と処理区の死亡率に差は認められず、行動異常及び感染は認められなかった。ミヤコカブリダニ成虫に対する接触暴露試験では、対照区と処理区の死亡率は同程度であり、行動異常及び感染は認められなかった。3 目 3 種の昆虫等に対し試験を行った結果、影響は確認されなかったことから、本微生物が標的外昆虫等への影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

表 6-2-1：原体を用いた標的外昆虫等影響試験の結果概要（資料 6-2-1）

被検物質	原体(2.0×10 ¹¹ PFU/mL)
供試生物	チャバラアブラコバチ <i>Aphelinus asychis</i> 、成虫、1 区 10 頭/容器、5 連
暴露方法	希釈液(1.0×10 ⁹ PFU/mL)を十分量試験容器に散布し、風乾後、供試生物を放飼した。
試験期間	7日間
試験区	処理区 1.0×10 ⁹ PFU/mL(微生物指針で規定されている最大使用濃度(1.0×10 ⁸ PFU/mL)の10倍濃度区 対照区（無処理区）
調査項目	症状観察：処理1時間後、1日後、4日後、7日後に生存虫数および異常行動虫数（ノックダウン、痙攣、動作緩慢等）を調査した。供試虫に対する死亡個体数（異常行動虫数含む）の割合を死虫率（%）として求めた。 病理検査：処理区における試験中の死亡個体については顕微鏡にて農薬微生物感染の有無等を調べた。
結果の概要	症状観察：処理区及び対照区において、異常行動は認められなかった。処理7日後の死虫率は処理区で0%、対照区で6.0%であり、被検物質は供試生物に対して影響はないと考えられた。

	病理検査：処理区に死亡個体が認められなかったため、感染の有無に関する調査は実施しなかった。
--	---

表 6-2-2：原体を用いた標的外昆虫等影響試験の結果概要（資料 6-2-2）

被検物質	原体(2.0×10^{11} PFU/mL)
供試生物	ヒメカメノコテントウ <i>Propylea japonica</i> 、成虫、1 区 10 頭/容器、5 連
暴露方法	希釈液(1.0×10^9 PFU/mL)に供試生物を30秒浸漬した後に試験容器内で飼育した。
試験期間	7日間
試験区	処理区 1.0×10^9 PFU/mL(微生物指針で規定されている最大使用濃度(1.0×10^8 PFU/mL)の10倍濃度区 対照区（無処理区）
調査項目	症状観察：処理1時間後、1日後、4日後、7日後に生存虫数及び異常行動虫数（ノックダウン、痙攣、動作緩慢等）を調査した。供試虫に対する死亡個体数（異常行動虫数含む）の割合を死虫率（%）として求めた。 病理検査：処理区における試験中の死亡個体については顕微鏡にて農薬微生物感染の有無等を調べた。
結果の概要	症状観察：処理区及び対照区において、異常行動は認められなかった。処理7日後の死虫率は処理区及び対照区で4.0%であり、被検物質は供試生物に対して影響はないと考えられた。 病理検査：死亡個体に対して、農薬微生物の感染は確認されなかった。

表 6-2-3：原体を用いた標的外昆虫等影響試験の結果概要（資料 6-2-3）

被検物質	原体(2.0×10^{11} PFU/mL)
供試生物	ミヤコカブリダニ <i>Neoseiulus californicus</i> 、成虫、1 区 10 頭/容器、5 連
暴露方法	試験容器に供試生物を放飼した後、希釈液(1.0×10^9 PFU/mL)を十分量蓄圧式噴霧器で散布した。
試験期間	7日間
試験区	処理区 1.0×10^9 PFU/mL(微生物指針で規定されている最大使用濃度(1.0×10^8 PFU/mL)の10倍濃度区 対照区（無処理区）
調査項目	症状観察：処理1時間後、1日後、4日後、7日後に生存虫数および異常行動虫数（ノックダウン、痙攣、動作緩慢等）を調査した。供試虫に対する死亡個体数（異常行動虫数含む）の割合を死虫率（%）として求めた。 病理検査：処理区における試験中の死亡個体については顕微鏡にて農薬微生物感染の有無等を調べた。
結果の概要	症状観察：処理区および対照区において、異常行動は認められなかった。処理7日後の死虫率は処理区で4.0%、対照区で2.0%であった。両区の死虫率の差は同程度であり、被検物質は供試生物に影響はないと考えられた。 病理検査：死亡個体に対して、農薬微生物の感染は確認されなかった。

6.3 土壤微生物

土壤微生物影響試験

原体を用いて実施した土壤微生物影響試験の結果を表 6-3 に示す。

処理区における細菌、放線菌数及び真菌はそれぞれの対照区の菌数と同程度であった。本微生物は、土壤微生物に対して影響を及ぼすおそれはないと判断した。

表 6-3：原体を用いた土壤微生物影響試験の結果概要（資料 6-3）

被験物質	原体（2.0×10 ¹¹ PFU/mL）						
供試土壌	火山灰土壌（淡色黒ボク土、壤土）						
暴露方法	散布濃度は、登録申請予定である製剤濃度 1.0×10 ¹⁰ PFU/mL の 100 倍希釈の 1.0×10 ⁸ PFU/mL とし、単位面積あたりの最大処理量 0.12 L/m ² の 10 倍量（1.2 L/m ² ）をジョウロを用いて均一に散布し、土壌に 20cm の深さで混和した。						
試験期間	90 日間						
試験区	処理区、対照区（溶媒：水道水）を設け、各 1.0 m ² (1.0 m x 1.0 m)の 3 反復とした。 緩衝帯は各区間で 1.0 m とした。						
検査項目	菌数測定：コロニー数計測後、生土重量/乾土重量を元に、乾土 1 g あたりの生菌数（CFU）を算出した。乾土重量は、適当量の検定用土壌試料をガラスシャーレに量り取り、生土重量を測定後、80℃の高温オープン中で 3 日間乾燥後、乾土重量を測定した。						
結果の概要	土壌細菌への影響：処理区及び対照区ともに菌数の季節変動は認められたが、試験物質処理による菌数推移への影響は認められなかった。土壌採取日毎にみても有意差は認められなかったことから、土壌細菌数に対する物質の影響はないと考えられた。 土壌放線菌への影響：処理区及び対照区ともに菌数の季節変動は認められたが、試験物質処理による菌数推移への影響は認められなかった。土壌採取日毎にみても有意差は認められなかったことから、土壌放線菌数に対する物質の影響はないと考えられた。 土壌真菌への影響：処理区及び対照区ともに菌数の季節変動は認められたが、試験物質処理による菌数推移への影響は認められなかった。土壌採取日毎にみても有意差は認められなかったことから、土壌真菌数に対する物質の影響はないと考えられた。						
	菌種	供試土壌	菌数（log CFU/g 乾土）				
			処理 13 日前	処理 1 日後	処理 10 日後	処理 30 日後	処理 90 日後
	細菌	処理区	7.06±0.06	7.07±0.03	7.15±0.15	7.10±0.07	7.32±0.06
		対照区		7.07±0.07	7.18±0.04	7.11±0.04	7.22±0.06
	放線菌	処理区	7.06±0.07	7.10±0.02	7.01±0.15	6.75±0.17	6.78±0.04
		対照区		7.10±0.10	7.05±0.04	6.71±0.24	6.66±0.03
	真菌	処理区	4.76±0.15	4.99±0.08	4.98±0.26	4.90±0.09	5.18±0.03
		対照区		4.91±0.10	5.08±0.07	4.79±0.08	5.11±0.03
	表中の数値は平均値±標準偏差						

別添 1 用語及び略語

AAOEL	acute acceptable operator exposure level	急性農薬使用者暴露許容量
AOEL	acceptable operator exposure level	農薬使用者暴露許容量
CFU	colony forming unit	コロニー形成単位
CPG培地	casamino acid-peptone-glucose 培地	青枯病菌の培養に用いられる培地
GLP	Good laboratory practice	優良試験所規範
MOI	multiplicity of infection	多重感染度
PFU	plaque forming unit	プラーク形成単位

別添 2 評価資料一覧

1. 基本情報

資料番号	報告年	表題、出典（試験施設以外の場合） 試験施設、報告書番号 GLP 適合状況（必要な場合）、公表の有無	提出者
1-1	2021	青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 の規格性状に関する資料 未公表	パネリ工業㈱
1-2	2017	Bacteriophage-Based Bacterial Wilt Biocontrol for an Environmentally Sustainable Agriculture 公表	パネリ工業㈱

3. 物理的・化学的性状

資料番号	報告年	表題、出典（試験施設以外の場合） 試験施設、報告書番号 GLP 適合状況（必要な場合）、公表の有無	提出者
3-1	2021	農薬の物理的・化学的性状に関する試験結果報告書 未公表	パネリ工業㈱
3-2	2021	農薬の経時安定性に関する検査結果報告書 未公表	パネリ工業㈱

4. 人に対する影響

資料番号	報告年	表題、出典（試験施設以外の場合） GLP 適合状況（必要な場合）、公表の有無	提出者
4-1	2019	RKP181 原体のラットを用いた単回経口投与試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-2	2019	RKP183 製剤のウサギを用いた単回経皮投与試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-3	2019	RKP181 原体のラットを用いた単回経気道投与試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-4	2019	RKP181 原体のラットを用いた単回静脈内投与試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-5	2019	RKP181 原体の細胞培養試験（感染性試験） GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-6	2019	RKP181 原体の細胞培養試験（細胞毒性試験） GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-7	2019	RKP183 製剤のウサギを用いた眼一時刺激性試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱
4-8	2019	RKP183 製剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験 GLP、未公表	パネリ工業㈱

5. 家畜への影響

資料番号	報告年	表題、出典（試験施設以外の場合） 試験施設、報告書番号 GLP 適合状況（必要な場合）、公表の有無	提出者
5-1	2023	青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 液剤（青枯革命）のトマト苗 処理後の薬剤移行性について 未公表	パネリ工業㈱
5-2	2019	RKP181 原体の蚕影響試験成績－急性毒性試験－ 住化テクノサービス株式会社、AC(E)19-12(1) 未公表	パネリ工業㈱

6. その他の生物への影響

資料番号	報告年	表題、出典（試験施設以外の場合） 試験施設、報告書番号 GLP 適合状況（必要な場合）、公表の有無	提出者
6-1	2020	微生物農薬 RKP181 原体の植物影響試験 住化テクノサービス株式会社、AC(E)19-13 未公表	パネリ工業㈱
6-2-1	2019	RKP181 原体の天敵昆虫等影響試験成績－チャバラアブラコバチに対する 急性毒性試験－ 住化テクノサービス株式会社、AC(E)19-11-(2) 未公表	パネリ工業㈱
6-2-2	2019	RKP181 原体の天敵昆虫等影響試験成績－ヒメカメノコテントウに対する 急性毒性試験－ 住化テクノサービス株式会社、AC(E)19-11-(6) 未公表	パネリ工業㈱
6-2-3	2019	RKP181 原体の天敵昆虫等影響試験成績－ミヤコカブリダニに対する急性 毒性試験－ 住化テクノサービス株式会社、AC(E)19-11-(4) 未公表	パネリ工業㈱
6-3	2020	RKP181 原体に関する試験成績 RKP181 原体の土壌微生物に対する影響試 験 一般社団法人日本植物防疫協会 未公表	パネリ工業㈱

「青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 生物農薬評価書（案）」に対する意見募集の結果について（案）

1. 意見募集の概要

（１）意見募集の対象農薬

青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181

（２）意見募集の周知方法

関係資料を電子政府の総合窓口（e-Gov）に掲載

（３）意見募集期間

令和5年10月17日（火）～ 11月15日（水）

（４）意見提出方法

- ・ 電子政府の総合窓口（e-Gov）
- ・ 郵送

（５）意見提出先

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

2. 意見募集の結果

（１）御意見提出者数

- ・ 電子政府の総合窓口（e-Gov） 11通
- ・ 郵送 0通

（２）御意見の延べ総数 11件

(別紙)

「青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 生物農薬評価書 (案)」に対する意見・情報の募集に寄せられた意見・情報の概要及びそれに対する考え方 (案)

	御意見	御意見に対する考え方
1	バクテリオファージと病原細菌の研究者として意見を述べさせていただきます。私は本企業の開発に一切関与しておりません。 【本製品の特徴】 ヒトや動物に対しては安全である バクテリオファージは宿主となる細菌でのみ増殖することができるウイルスです。そのため、青枯病菌に感染するファージはヒトに直接的に健康被害を及ぼすことはありません。すでに海外では、ファージをヒトに直接投与する例が多数あり、ヒトに対して大きな健康被害をもたらすようなものでないことが知られています。またパネフリ工業が実施した試験でも安全性は確認されています。動物モデルやヒトでの実験的臨床試験の結果から、ファージの殺菌効果も広く確認されているものです。米国では2006年時点で米国食品医薬品庁 (FDA) によりファージ製剤が承認されています。 環境への影響は、他の農薬に比べて極めて少ない ファージ自然に存在するもので、ヒトの体内にも少なくとも100兆個はいると見積もられます。宿主細菌 (青枯病菌) が存在する場所でのみ増える性質があり、宿主細菌がいない環境下では自然に消滅するため、環境への影響も他の農薬と比較し、極めて限定的と考えられます。ファージは病原細菌が存在する場所でのみ増殖するので、これまでの農薬の使用量に比べて圧倒的に少なく済みます。 【懸念点】 ファージ耐性の出現 バクテリオファージ RKP181 を継続的に使用すると、いつか RKP181 に対する耐性菌が出現するはずですが、本手法を継続的に利用するためには、いずれ別のファージの準備が必要です。効果を維持するためには、少なくとも数年毎にファージをアップデートする必要があるかと思います。ちなみに抗菌薬に対する薬剤耐性と異なり、ファージに対する耐性菌の発生は大きな問題とならないことが知られています。抗菌薬は耐性が出ると手の施しようがありませんが、ファージでは、別のファージを見つけたり、育種するだけで済みます。	ご意見ありがとうございます。 今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。

	効果のある青枯病菌に限られる可能性がある自然界にはファージに感染しにくい細菌がいますので、RKP181 は必ずしも全ての青枯病菌に効果があるとは言えないかもしれません。将来的に、ファージカクテルを作るもしくはファージをアップデートしていくことで、より効果的な農薬になると考えられます。 安全性、環境への影響に関して、大きな問題は見当たりません。効果に関しては、多少限定される可能性はありますが、今後の開発余地も十分にあります。総合的に判断して青枯病菌感染性バクテリオファージ RKP181 は本国の農薬として十分に使用可能であると考えます。	
2	近年、特に人も含めて動植物への抗菌剤による薬剤耐性に対して、その対策、規制が国内外において強力に進められています。今回開発されたバクテリオファージによる殺菌剤は、評価書を拝読すると、種特異的に感染するバクテリオファージ RKP181 により青枯病菌を死滅させる高い効果があり、また、他の生物への影響評価においても、危険性のないことが検証され、安全性において確認されています。水産養殖分野においても薬剤耐性については問題視されており、抗菌剤の適正な使用とワクチンの開発、利用が推進されていますが、その効果については限定的であり、水産庁が進めている養殖業成長産業化総合戦略においても疾病による被害がその妨げになっており、ファージ製剤の実用化が望まれています。 対象生物は異なりますが、本製剤については、有効性とさまざまな局面での安全性が動物実験などによって確認されており、認可するのが妥当と評価します。	ご意見ありがとうございます。 今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。

3	米国 FDA は、バクテリオファージを GRAS (Generally Recognized As Safe) であると認めており、食品添加物として認可しています。 https://www.federalregister.gov/d/E6-13621 RKP181 も天然ファージであることから、人体、動物ならびに環境に対する危害は極めて低いと考えられます。 一方、一般的に、細菌は、バクテリオファージに対する耐性を容易に獲得し耐性化します。この問題を克服する事が、RKP181 が青枯病菌 (<i>R. solanacearum</i>) に対する生物農薬として実用的に機能するかの重要な課題と考えられます。評価書 (案) においては、複数の <i>R. solanacearum</i> 株の RKP181 に対する感受性および耐性獲得能の評価が無く、農薬として実用的な有効性は評価書 (案) から推し量る事は出来ません。 従来生物農薬としての評価項目とは異なる評価が必要と思われます。	ご意見ありがとうございます。 農薬としての有効性については、農薬の登録申請時において適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効に関する試験成績及び適用農作物に対する薬害に関する試験成績が別途提出されており、トマトを加害する青枯病菌に対する有効性が確認されております。その結果については、農業資材審議会農薬分科会における資料に記載することとしております。 また、バクテリオファージに限らず、過度に農薬に依存した防除により、病害虫の薬剤耐性が発達し、防除に困難をきたすおそれがあるため、農林水産省では、農薬だけではなく様々な方法を組み合わせた総合防除の推進や、発生予察情報に基づく適時・適切な防除への転換などを通じ、防除に必要な量を的確なタイミングで使用するように取組を進めているところです。
4	資料で言及されている国だけではなくすべての外国の事例を集めて一番厳しい基準に合わせてください。	ご意見ありがとうございます。 微生物農薬を含む生物農薬については、評価法が化学農薬と異なることを踏まえ、生物分野に高い知見を有する専門家で構成する生物農薬評価部会において、農薬原体の成分の種類及び含有濃度及び分析方法の設定、農薬使用者暴露許容量その他農薬使用者への影響評価、蜜蜂の蜂群への影響等農薬の蜜蜂への影響評価、評価に基づく農薬の使用時に講ずべき被害防止方法に関する事項等を審議しています。 その際、海外評価機関の評価結果等の情報があれば、それらも参考に審議をしております。
5	「1.2 有効成分について」 国内でのファージを用いた農薬は初めてだと認識しており、非常に画期的である。 一方で、初めてだからこそ、様々な意見も予想され、より良い方向に進むとよいと感じる。 「(3) 生活史、作用機作について」 病原菌に対し、特異的に感染するため、評価結果のように他への影響も特にないようなので、安心できる。	ご意見ありがとうございます。

	「2.4 適用病虫害の範囲及び使用方法」 青枯病は非常に農家を悩ませる病害の一つと認識しており、効果的な対処法もあまりなく、あったとしても手間を要する、環境に影響がある、生産効率が下がるなどの課題があると認識している。そのため、定植前の5分間浸漬法は非常に現実的なやり方でよいと思われる。灌注法も適応されるとなると良いと感じる。 また、トマト以外でも被害もよく聞いため、今後、トマト以外でも使用できるようになれば良いと思われる。 「全体」 実際にどれくらいの効果があるのかも評価書で確認できればよいと感じた。	農薬としての有効性については、農薬の登録申請時において適用病虫害又は適用農作物等に対する薬効に関する試験成績及び適用農作物に対する薬害に関する試験成績が別途提出されており、トマトを加害する青枯病菌に対する有効性が確認されております。その結果については、農業資材審議会農薬分科会における資料に記載することとしております。
6	バクテリオファージは動植物には感染せず、特定の細菌だけに感染する。そのため、人体に対して無害であり、自然生態系に影響を与えることもないと言われている。当該ファージの安全性に係る試験結果はそのような通説を強く支持する結果である。さらに、化学農薬は標的の病原体以外にも作用を及ぼすが、当該ファージは青枯病菌だけを殺菌し、その他の細菌には影響を与えないため、理想的な生物農薬であると言える。すでに米国ではブドウ樹木のピアス病の原因菌を駆除するためのバクテリオファージが生物農薬として認められ、市販されている。バクテリオファージは、安全・安心な農産物作りに不可欠な生物農薬であり、日本でもその実用化の門戸を開くときが来ているように思う。	ご意見ありがとうございます。 今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。
7	バクテリオファージは旧来より細菌感染症に対する抗菌手段として東欧諸国（ロシア、ジョージアなど）でヒト医療に応用されている。また、その使用法は塗布、経口投与、静脈内投与等、多様である。近年では、2017年に米国FDAによる承認下で多剤耐性感染症症例に適用され、患者の救命に中心的な役割を果たした。このような実地的なヒトへの使用においても重大な副作用は報告されておらず、実験動物を用いたその他多くの学術的基礎研究でも重篤な副作用等は報告されていない。本件のRKP181の評価結果をこれら過去の事例と照らし合わせてもその安全性は十二分に担保できるものと考えら	ご意見ありがとうございます。

	れる。加えて、欧米諸国ではバクテリオファージを鍵とした生物製剤の開発・応用が活発化しており、アメリカ、ベルギー、スウェーデン、フランスでは既にファージを用いたファージセラピープログラムがヒト医療で始動している。これらは従来の抗生物質やその他の抗菌戦略を補完・補強するアプローチとして期待が高い。一方で本邦ではファージを用いた抗菌アプローチに対する認識は未だ低い、まずは本件に代表される様な農薬等の非医薬品分野での展開が今後の新規分野を開拓することが期待される。 一方で評価書（案）内では、当該ファージがビルレントファージ（ウイルスとしてのライフサイクル上、常に標的菌を殺菌する）であるかテンプレートファージ（ウイルスとしてのライフサイクル上、インテグレースなど関連分子の作用で標的菌のゲノムに潜伏し殺菌しないことがある）であるかの区別に関する記載が見当たらなかった。評価項目の結果から察するに、本 RKP181 はビルレントファージであることが強く想定されるが、いずれのファージであるか明記しておくことが良いと思われる。また、一般論としてテンプレートファージは遺伝子の水平伝播に寄与する可能性があることから、農薬であっても医薬品であってもファージを応用する際にはビルレントファージの使用が望ましい。 加えて、感染域の評価方法に関しては具体的な手法の記載がなかったが（これまでファージの評価方法に対する基準が制定されていないと思われるので致し方ないが）、高力価のファージ溶液を標的株に滴下し溶菌斑の形成有無で判断するのみである場合には感染域の over-estimation を招く可能性が指摘されている。したがって、高力価のファージ溶液の段階希釈を作成し、低力価のファージの plaque 形成の有無によって感染域を判断していることが望ましい。	ファージの種類については、別途提出されている規格性状に関する資料から、バクテリオファージ RKP181 は溶菌サイクルのみを持つ溶菌性ファージと考えられます。 宿主域については、申請者から提出された基本情報を引用したことがわかるよう評価書（案）を修正しました。
8	本製剤は、自然界から分離された青枯病菌に感染するバクテリオファージ RKP181 株を有効成分とする微生物農薬であり、抗菌性物質等の化学物質を主成分とする従来の農薬とは異なり有機農業の資材として有用であると考えられる。また、ファージは宿主特異性が高いことから、動植物あるいは環境中に存在する他の正常な微生物叢に対する影響が生じにくく、サステイナブルな農業に資する農薬と考えられる。抗生物質を使用しない本製剤は、昨今世界中で深刻化してきている抗生物質耐性菌問題に対して	ご意見ありがとうございます。

も、ワンヘルス・アプローチのツールとして歓迎されるであろう。 安全性については、評価書（案）に記載された試験成績から、ヒトを含めた哺乳類、昆虫、植物・土壌等の環境に対して極めて高い安全性を有すると考えられた。この試験成績は、ファージが哺乳類細胞には毒性を示さないことが知られていること、米国において米国食品医薬品局（FDA）から GRAS（Generally recognized as Safe）認定を受けて、既に食品中の微生物制御用製剤として 2006 年以降使用されていること、東欧・ロシアでは医療薬として数十年にわたって使用されていること、欧米においてもこの数年急速に進展している人体用医薬品の試験・開発において安全性が確認されていることとも合致している。なお、ファージ製剤では一般的に有効成分であるファージ株が溶菌性ファージであること、溶原化しないことの確認が重要であると考えられているため、今後は評価書にその旨明記されることが必要と考えた。ファージ製品は、生物農薬を含めた従来の農薬、消毒剤、あるいは医薬品と比較してその性質・作用機序が特有であるため、今後、ファージ製剤に特化した審議要件が明確化されることが望まれる。 有効性について、評価書には詳しい記載がないため具体的な薬効の詳細については不明であるが、一般的にバクテリオファージの宿主特異性は非常に高く、同一菌種でも異なる株には感染しないことも多いことが知られている中、本製剤の有効成分である PKP181 は異なる植物種に感染した青枯病菌 100 株以上全てに感染することが確認されており、その有用性は高いものと考えられた。 なお、評価書（案）の 2.4 使用方法中で使用量及び使用回数が「？」となっているが、具体的な内容が記載されるのが望ましいと考える。 日本では、医療用等も含めて公の審議を経て登録・認可されるファージ製剤としては本製剤が初めてと理解しているが、海外では、生物農薬、食品衛生分野での食品加工工程中の添加物、器具等の消毒用剤、家畜の飼料添加物等として広く使用されてきており、この数年、欧米	ファージ製剤に特化した審議要件の明確化につきましては、今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。 農薬としての有効性については、農薬の登録申請時において適用病害虫又は適用農作物等に対する薬効に関する試験成績及び適用農作物に対する薬害に関する試験成績が別途提出されており、トマトを加害する青枯病菌に対する有効性が確認されております。その結果については、農業資材審議会農薬分科会における資料に記載することとしております。 評価書（案）の 2.4 使用方法に関して、本剤の使用方法は 100 倍希釈液を調製し、その溶液へ苗浸漬するものですので、面積当たりの使用量は設定しておりません。また本剤は、感染性、病原性、毒性及び生残性は認められておらず、人に対する安全性は問題ないと考えられることから、使用回数につきましても設定しておりません。
---	---

	ではヒトの抗生物質耐性菌を含めた細菌感染症の治療薬としての開発も各国の強力な後押しを受けて進んでいる。安全性が高く、抗生物質耐性菌を引き起こすことがないファージ製剤が、本製剤を先駆けとしてまずは農業分野で、さらに他分野においても今後広く認知され使用可能となることを期待する。	
9	化学物質である農薬の使用においては、生態系への影響、農作物における残存性などの問題があります。一方、環境由来の微生物であるファージを農薬の代替えとして用いることは、安全で、環境に配慮した新たな取り組みとして期待できます。今回示されたデータは限られたものではありませんが、上記のファージの性質が示されており、納得できるものです。それを踏まえて、当該製剤について、まだ理解できていない点について以下に記載させていただきます。 ファージに対する感受性は株によって異なることが多いのですが、「青枯病菌 100 株以上全てに感染することが確認されている」というのは 100 株以上を用いて感染、溶菌することを検討し、その全ての株で同等の感受性がみられたことを示しているのでしょうか (page 3, (宿主域)の項)。 標的とする細菌にファージを感染させた場合、ファージに対する耐性菌が出現する可能性はあるのでしょうか。今回のような単回の使用では出現しないことも考えられますが、もし耐性菌が出現した場合、その菌が元の菌の病原性より高くなる可能性を検討する必要なないのでしょうか。 ファージの遺伝子は多様性に富んでおり、世代時間も短いため、自然発生的に変異が生じる可能性があります。ファージを継代して製品として使用する際、ファージゲノムの安定性をどの様に担保されるのでしょうか。 近年、地球温暖化の影響で気温の上昇は著しいですが、このような環境下でもファージの活性は保たれるのでしょうか。 以上、ご検討のほど宜しくお願い申し上げます。	ご意見ありがとうございます。 宿主域については申請者から提出された基本情報を引用したことがわかるよう評価書(案)を修正しました。 バクテリオファージに限らず、過度に農薬に依存した防除により、病虫害の薬剤耐性が発達し、防除に困難をきたすおそれがあるため、農林水産省では、農薬だけではなく様々な方法を組み合わせた総合防除の推進や、発生予察情報に基づく適時・適切な防除への転換などを通じ、防除に必要な量を的確なタイミングで使用するよう取組を進めているところです。 バクテリオファージ RKP181 は、製造者において、遺伝子レベルで同一性を確認することにより品質管理を行っております。 青枯病菌は比較的高温条件下で発生し夏季に多発する性質を有するため、青枯病菌を宿主とするバクテリオファージ RKP181 においても同様の環境下で生存するものと考えます。なお、本ファージ以外のバクテリオファージに関しましては評価を行っておりません。

10	細菌感染症の治療は、1945 年に臨床応用されて以降、長らく抗生物質に頼ってきた。一方、細菌はこの抗生物質に容易に耐性化し、それに対して人類は新たな抗生物質を開発するというやり方で対応してきたが、その‘いたちごっこ’の状態に勝利するゴールは見えず、このままでは 2050 年には薬剤耐性菌による世界中の死亡者数は、ガンによるものを超え、年間に 1000 万人以上となると試算され、薬剤耐性菌に対する対策は待ったなしの状況である。このような状況において、細菌に特異的に感染し溶菌するバクテリオファージ（ファージ）を用いたファージセラピーがその対策の切り札として注目されているが、製剤として世界基準に沿ったファージ製剤は、未だ承認されていない。 2016 年の「国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議」にて、薬剤耐性（AMR）アクションプランが策定された。本プランでは、ワンヘルスの概念に基づくヒト医療分野に限らない対策の必要性も明記されている。薬剤耐性菌に対する予防・治療手段の確保という観点で、本申請は本施策にあるようにワンヘルスの概念に十分合致した研究開発と考えられる。本申請に記載するように、ファージは抗生物質とは異なる作用機序を有し、細菌の生態系バランスへの影響を最小限に止める可能性があり、本研究を通じたアプローチは行政施策に貢献し得ると考えられる。 また、抗生物質関連市場は、農業用抗菌剤が 9,700 億円（世界）、動物用抗生物質が 1,670 億円（米）、飼料添加物が 330 億円（米）と推定されている。農業用抗菌剤は、その多量の使用量が問題であること、さらに動物用の抗生物質なども含まれており、このような使用によって環境中の薬剤耐性菌の出現は促進される可能性があるため、AMR アクションプランに明記されたように医療用以外の対策も必須とされている。 本申請のように、実際に、農業・畜水産業用途でのファージ製品も数点上市されているが、現状では、幅広く応用されているわけではない。しかし、ファージ製品の社会実装が農業用として定着し、薬剤耐性菌の課題を解決し得る選択肢としてファージの有用性が社会に浸透することによって、ファージ製剤の動物治療用製剤、人医療用製剤として、今後市場は間違いなく拡大すると考えられる。そういった意味で、日本において、今後のファージ製剤の実用化の	ご意見ありがとうございます。 今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。
----	---	---

	可能性を拓く意味においても、今回の製品申請にかかる期待はかなり大きいと考えている。 <本申請のファージ製剤について> ファージ製剤は、病原細菌内で増殖するため、低濃度でも効果を発揮することが期待され、一方で、特定の病原細菌のみを特異的に殺菌するため、生態系バランスへの影響も小さく、耐性菌の増加を最小限に食い止めることが期待されるため、消毒剤として環境中に散布するとしても安全性はかなり担保される。実際に申請書内のデータを見る限り安全性に問題は見当たらない。また、適用については、定植2日前に高濃度のファージに5分間浸漬するという方法を摂ることで、環境中に広く散布する手法ではない方法のため、より効果的に病原細菌の感染増殖を防ぐことになる。 ファージ製剤の開発においては、実際には細菌の多様性に対応する必要性や、ファージ耐性菌へ対応する必要性のため、複数のファージを混ぜたファージカクテルとして開発することが多い。一方で、複数のファージを混ぜることでそれぞれのファージの力価の担保や安全性の評価が難しくなる。そういう点において、本製品は効率よく感染する単一のファージ製剤として安全性をしっかりと担保し、まずは製品として確立するという道を拓くものとして価値が高い。 今後のファージ製剤の審査に求める事として、ファージの安全性については、本申請データとともにこれまでの知見も含め認知し、一定の精製度であれば基本的に病原性はなく、審査において求める基本レベルを必要最低限で良いという流れになっても良いと思う。今後、ファージのカクテル化剤など、少し複雑な申請が増えてくることも考えられるため、安全性の担保についての認識を本申請をベースに柔軟に考え、くれぐれもファージの製剤化の足枷とならないような対応も考えていただければと思う。薬剤耐性菌に対する脅威は目の前に迫っており、実用化に向けた柔軟な対応をお願いしたい。	
--	---	--

11	バクテリオファージ RKP181 の有効性と安全性について特に問題は認められず、認可するのが妥当と評価します。 薬剤耐性菌によるヒト医療の危機的状況により世界的に抗菌剤の使用が厳しく規制される中、これに代わるものとしてバクテリオファージ製剤は良い選択肢になると考えます。バクテリオファージには、特異性が極めて高いため環境細菌への影響が無いという利点もあり、本剤を嚙矢として農業や他分野でも広く活用されることを期待します。 一方、製剤の使用によるバクテリオファージ耐性株の発生/増加のリスクが懸念されますが、これは抗菌剤や動物用ワクチンにも存在する問題であり、本剤の承認を避けるべき理由とはなりません。 ただし、流行菌株に対する有効性のモニタリングは継続的に実施すべきであると考えます。	ご意見ありがとうございます。 今後の微生物農薬の審査において参考とさせていただきます。
----	--	---