

# 化學物質之毒性測試原理

## 前 言

現代的生活之中人工的化學藥品無所不在，食品及化粧品之添加物，治病之藥物，農用及環境用之殺蟲劑，殺菌劑以及殺草劑等，這些化學藥品長年累月的與人體接觸，進入人體是否會對人體造成爲害，是社會大眾極爲關切的問題，各國的管理單位紛紛制定法律加以管理，企業生產單位也紛紛對其產品加以研究，希望達到安全之目的，因此研究化學藥品安全性之科學應運而生。

研究化學品安全性之科學一般稱之爲毒理學，毒理學粗分爲兩大領域，一是研究生物對化學藥品之反應，主要在於測試化學藥品之毒性，另一是分析化學藥品在生物體及環境中之流佈，主要在測試毒性物質之量。本文主要在討論化學物質之毒性測試方法及其原理。

毒物的致毒作用與接觸的時間長短有密切的關係，故毒性的測試也因接觸時間的長短分爲急性毒性研究，短期毒性研究，長期毒性研究，以及特殊毒性研究等。

## 急性毒性研究

急性毒性的試驗大部分是用來測定化學藥品半數致死量 ( $LD_{50}$ )， $LD_{50}$  之定義為用統計方法推算的可以造成50%試驗動物死亡的單一劑量。同時急性毒性測試還可反映出化學藥物致毒作用的標的器官，致毒作用的特性，並為更長期的毒性測試提供試驗劑量之參考。

急性毒性測試若是經由呼吸投藥時，毒性之評價可用一定暴露期限內的半數致死濃度 ( $LC_{50}$ )，或在一定的化學藥物空氣濃度下的半數致死濃度 ( $LT_{50}$ ) 來表示。

### 一、實驗設計

(一)動物之選擇：一般選用小鼠或大鼠來測定  $LD_{50}$ 。優點為經濟，易得到，操作簡便。而且用這些動物所作的毒理學研究較多，有利於與其他化學物質進行毒性比較。

此外，也需作非啮齒動物的研究。特別是在大鼠和小鼠的  $LD_{50}$  有顯著的差異，或已知化學物在人體內的生物轉化的方式或速率，與在小鼠和大鼠體內有明顯不同時，更應

如此。

因為不同動物的易感性不同，測定  $LD_{50}$  時，應分別在雌、雄、幼年、成年動物中進行。

(二)投藥之途徑：最常用的投藥途徑是經口途徑。當利用經口途徑給予化學物質時，應利用胃管直接將藥物灌入胃中。將化學物質混入飼料中給予的缺點實是劑量不準確，而且一般都降低了化學物之毒性。

為便於投藥，通常將藥物利用水，生理鹽水，植物膠或纖維衍生物等溶解或製成懸浮液。即使毒物是液體，也需要溶劑。添加之輔劑本身毒性應很低或無，並且不和毒物發生反應。

毒物溶液或是懸浮液的體積可影響其毒性。所給予的液體體積過大可引起不良的作用；另一方面，體積減少，毒物濃度增加，能使毒性增高。因此，投藥時如毒物量很大，宜分次進行。

經皮膚和經呼吸的投藥方式也常用於急性毒性之測試研究，以探討藥物經不同途徑進入人體之急性毒性。另外，靜脈注射或腹腔注射能使藥物完全或接近完全的立即或很快的吸收。這些投藥的方式也可用來估計經皮膚或經口吸收的速率和程度。

(三)測試劑量和動物數： $LD_{50}$  測定的目的是確定致50%動物死亡的劑量，以及確定劑量—反應曲線的斜率。因此，至少需選擇3種劑量，一種能致一半動物死亡，另外一種劑量致死的動物超過半數（小於90%較適宜），第三種劑量致死的動物不足半數（以多於10%為好）。經常選用4種或更多的劑量，希望至少有3個劑量的動物死亡數落在上述範圍內。

一般說來，增加各劑量組動物數以及減小各相鄰組量比值（即組距縮小），可提高  $LD_{50}$  的精確性。很多研究者對每個  $LD_{50}$  試驗選用50個動物，組間比為1.2。用大動物如狗測定  $LD_{50}$ ，所用的動物數要少得多。

(四)環境因素：籠養的方式可影響化學物質之測定結果，例如每籠的隻數，籠子之結構（網籠或無孔籠等），以及墊料之種類，都可影響動物對毒物之反應。環境溫度可改變毒性作用。在低溫狀況下有些化學藥品毒性作用會增加而某些則又會減弱。相對濕度高常會使化學物質之急性毒性增強，使  $LD_{50}$  值降低。因為測定  $LD_{50}$  時受環境因子影響很大，所以需要確實記錄和報告實驗的環境條件。

## 二、觀察和檢查

動物被投藥後，不僅應記錄動物死亡的數量和時間，而且還應觀察其中樞神經系統、植物神經系統和行為方面的反應，包括反應的發生、強度、持續時間。每個劑量組的這些非致死性效應的發生率也應作記錄，以估計這些效應的半數效量。表1. 列舉了一系列毒性表現及受影響的系統和器官，作為參考。

表 1. 毒性表現與器官或系統的關係

系 統	毒 性 表 現
植物神經系統 動	瞬眼膜鬆弛、鼻腔分泌物、眼球突出、流涎、腹瀉、排尿、豎毛、不安、抬頭坐位、直瞪前方、垂頭、過度舔毛、咬足、氣喘、煩躁、敵意性攻擊、恐懼、混亂、活動異常。
感覺系統	痛敏感；翻正，角膜，迷路，放置和後肢反射；聲覺和觸覺敏感、眼球震顫、尖叫。
神經肌肉系統	活動增強和減弱、自發性收縮、震顫、共濟失調、衰竭、管狀尾、後肢虛弱、疼痛和後肢反射（缺失或降低）、肌緊張、死亡。
心血管系統	心率增快或降低、血管收縮、血管舒張、出血呼吸緩慢、呼吸困難、喘息、呼吸暫停。
呼吸系統	瞳孔放大、瞳孔縮小、流淚、眼球震顫、睫狀肌麻痺、瞳孔對光反射。
眼	流涎、乾嘔、腹瀉、便血、尿血、便秘、鼻滲漏、嘔吐、尿便失禁。
胃腸道、泌尿道	脫毛、豎毛、雞皮疙瘩、紅斑、水腫、壞死、腫脹。
皮膚	

觀察期應足夠長，使延遲性效應包括死亡不被遺漏。通常觀察7~14天，但也可更長。全部的死亡動物和部分存活動物，特別是在實驗結束時已患病的動物，要進行大體剖檢。剖檢可提供有關標的器官的有用的資料，尤其當投藥後不立刻出現死亡的情況下，尤為重要。選擇某些器官和組織進行組織病理學檢查。

### 三、測試結果資料之評估

(一)劑量—反應曲線：因為任何生物都有個體間敏感性的差異，不同動物不會死於同一種化合物的同一劑量。因而反應頻率如死亡率隨劑量增加而增加，以死亡率或其他效應的發生頻率對劑量的對數值來作圖時則得到一條S形之曲線，曲線中間部份（20%至80%）較直，可用來估計  $LD_{50}$  或  $ED_{50}$ 。若能將死亡率或發生頻率改為機率單位來作圖，則得到之直線範圍更為寬廣，對  $LD_{50}$  或  $ED_{50}$  之估算特別有用。機率單位乃由常態分佈之曲線導引而來，在此不再贅述。

(二)相對毒性：化學物質之潛在毒性差異很大，當比較兩種化學物質之  $LD_{50}$  時，應同時考量個別  $LD_{50}$  值之標準誤差，以及劑量—反應曲線之斜率。若兩者之  $LD_{50}$  標準誤差重疊，則  $LD_{50}$  較小的毒物，其毒性不一定比另一個強。若比較  $LD_{50}$  相同之兩種物質，斜率則非常重要，斜率較平坦者，在低劑量時其毒性大於斜率大者，高劑量時則相反。

### 四、 $LD_{50}$ 之應用

- (一)可用於化學物質之毒性分類，譬如以經口固體為例來分類，見表2。
- (二)估算有意外事故發生時過量接觸之危害程度。
- (三)制定亞急性或慢性動物毒性研究計畫。
- (四)可提供有關毒作用機制之線索。

(五)可提供試驗動物年齡，性別和宿主，以及環境因素對毒性之影響。

(六)可提供不同種屬和品系動物反應上之差異。

(七)提供某特定動物群反應性資料。

(八)提供設計人藥物試驗所需之一般資料。

(九)在檢測有影響生物學效力毒性物質之理化變化時，作為化合物質與量之控制之用。

表 2. 急性毒性分類

分 類	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
極 毒	<5
劇 毒	5~50
高 毒	50~500
中 等 毒	500~5,000
低 毒	5,000~15,000
無 毒	>15,000

## 短期毒性研究

人類接觸化學物時，通常接觸水平低於急性致死劑量，而接觸期限很長。為了獲得更接近實際情況下毒作用情況，要進行短期和長期毒性研究。

### 一、實驗設計

(一)動物種屬和數量：一般應用兩種或兩種以上的動物。較理想的是選擇對化學物質的生物轉化方式基本上相同的動物。但通常不易做到，故多選擇大鼠和狗。這類動物體積大小適當，易於得到，而且有大量的化學物對這些動物的毒理學資料。

實驗中雌雄各半。一般每個實驗劑量組和對照組動物數為10~30隻大鼠。這樣，可滿足統計學要求。狗的數量可較少（每組4~8隻），因為每隻動物可進行多次的檢查，同時也因為其體積大和價格貴。

(二)投藥途徑：化學物投藥途徑應與人類預期應用或接觸的途徑相同。大多數化合物，最常見的攝入途徑是經口。較好的方法是將化合物拌在飼料中給予，有時也可加入飲用水中，特別是當化學物可與飼料中某種物質反應時，應用後一種方法較好。化學物也可經灌胃或明膠膠囊給予，這種方法在用狗作實驗時用得較多。化學物的每日劑量也可拌在狗的罐裝飼料中。

經皮、吸入和非腸道途徑用於特殊的實驗目的，如工、農業產品和藥物。

(三)劑量和期限：因為這些研究的目的是確定毒性作用的性質和部位，以及“無作用水平”，因此選用三種劑量較好：即較高劑量組，使其能引起明顯的毒性表現，但不致引起很多動物死亡；較低劑量組，不引起毒作用；和介於兩者之間的中間劑量組。有時，另外再增加一或幾個劑量組，以保證達到上述目的。如前所述，還應包括對照組，對照組中動物不給予受試化合物，但必須接受實驗組所用的各種添加劑。

選擇劑量一般應在急性毒性研究資料基礎上進行，即根據 LD<sub>50</sub> 值和劑量—反應曲線的斜率。也應考慮其它有關化學物及其代謝的資料，特別應考慮是否有生物蓄積作用的資料。

曾建議採用劑量範圍的研究。方法為3~4個劑量組，每組雌雄各用5隻大鼠，餵養7天。毒性指標為死亡率、體重增長值、肝腎相對重量和飼料消耗。結果表明，7天試驗用以預示90天試驗劑量要比 LD<sub>50</sub> 值好。

在用大鼠進行研究時，劑量可用固定濃度（用 mg/kg 飼料即 ppm 表示），也可用固定劑量（用 mg/kg 大鼠體重表示）。動物生長時，體重增長，食物消耗也增加。若以固定劑量的方法給予，應定期按體重調整給藥量，以維持攝入化學物以 mg/kg 的量相對恒定。在生長迅速期應每週調整一次，以後可隔週調整一次。

此類研究大鼠的實驗期限通常為90天；而狗，常常延長到6個月甚至1~2年。

## 二、觀察和檢查

(一)體重和飼料消耗：這兩項指標應每週檢查。體重的下降是簡單而敏感的毒性指標。食物消耗也是有用的指標。此外，食物消耗量的顯著性降低可減輕或加重化學物的毒性表現。在這種情況下，應採用配對餵養或改用非腸道給藥方法。

(二)一般觀察：包括外形、行為或任何異常情況。死亡的和瀕死的老鼠應從籠中取出並做大體及可能的顯微鏡檢查。應經常觀察以避免動物間自相殘殺的情況。

(三)實驗室檢查：血液學檢查通常有紅細胞壓積、血紅蛋白、紅細胞計數、白細胞總數和分類計數。所有狗都應在給藥前、給藥後一周、一月和實驗結束時採樣。亦可採用其它時間間隔進行檢查。大鼠血量少，每次可檢查半數動物，其它的動物在結束時取樣。也可做一些特殊的檢查，如紅細胞計數、血小板計數、高鐵血紅蛋白和6—磷酸葡萄糖氫酶（G-6-PD）測定。

臨床實驗室檢查通常包括空腹血糖、谷—草轉氨酶(SGOT)、谷—丙轉氨酶(SGPT)、鹼性磷酸酶、總蛋白、白蛋白、球蛋白、血液尿素氮(BUN)和鈉、鉀、鈣、磷等。

尿液分析包括顏色、比重、pH、蛋白質、葡萄糖、酮體、有形成分（紅細胞等）、晶體物質和非晶體物質。

(四)屍檢：要儘可能對有死亡和瀕死動物進行大體病理學檢查，如組織保存完好，也應做組織學檢查。此外，應測定各種器官重量，以其絕對重量或與體重的相對比值來表示，這些都是有用的毒性指標。

通常要稱重的器官有肝、腎、腎上腺、心、腦、甲狀腺、睪丸或卵巢。需進行組織學檢查的有：全部肉眼可見的損傷、腦、脊髓、眼和視神經、大的唾液腺、胸腺、甲狀腺、心、主動脈、帶支氣管的肺、胃、小腸、大腸、腎上腺、胰腺、肝、膽囊（如存在的話）、脾、腎、膀胱、骨骼肌、骨和骨髓。

表3. 列舉了一般檢查、臨床實驗室試驗和死後檢查之間的相互關係。

## 三、結果評估

運用上述各種觀察和檢查指標，一種綜合性的短期毒性研究，通常能提供受試化學物的標的器官、毒物器官效應、劑量—效應和劑量—反應關係方面的毒性資料。所得資料常可為進一步特殊研究提供證據。有建議認為，短期研究和其他研究得到的定量資料可用來確定“無毒害藥量”（NEL）。

在某些化學物中，從短期試驗得到的 NEL，加上急性毒性資料、代謝資料，以及遺傳、生殖等方面的研究資料，可確定人類“可接受攝入量”。這種程序的進一步討論，見“長期毒性研究”。

表 3. 慢性毒性研究中的一般檢查、臨床實驗室檢查和病理學檢查

器官或系統	大體檢查	臨床實驗室血液學檢查	病理檢查
肝	粘膜變色（褪色）、水腫、腹水	谷—丙轉氨酶、谷—草轉氨酶、鹼性磷酸酶、膽固醇、總蛋白、白蛋白、球蛋白	肝臟
胃腸系統	腹瀉、嘔吐、糞便、食慾	總蛋白、白蛋白、球蛋白、鈉、鉀	胃、胃腸道膽囊（如存在）、唾液腺、胰腺
泌尿系統	尿量、成分、顏色	血尿素氮、總蛋白、白蛋白、球蛋白	腎、膀胱
造血／凝血系統	粘膜變色、嗜睡、虛弱	紅細胞壓積、血紅蛋白、紅細胞計數、白細胞總數及分類、血小板計數血抹片、凝血酶原時間活化因子、凝血激時間	脾、胸腺、腸系膜淋巴結、骨髓抹片和切片
神經系統	姿勢、運動、反應、行為		胸、脊髓、坐骨神經
眼	眼科檢查		眼和視神經
呼吸系統	呼吸頻率、咳嗽、鼻腔分泌物	總蛋白、白蛋白、球蛋白	一側肺和主要支氣管
內分泌系統	皮膚、毛髮、體重、尿和大便特徵	葡萄糖、鈉、鉀、鹼性磷酸酶（狗）、膽固醇	甲狀腺、腎上腺、胰腺
生殖系統	外生殖器的外形和觸診		睪丸、卵巢、子宮、前列腺、精囊
骨骼系統	生長、畸形、跛行	鈣、磷、鹼性磷酸酶	骨和抗斷裂強度
心血管系統	脈搏、頻率和特徵、節律性、水腫、腹水	谷—草轉氨酶	心臟、主動脈、其他組織的小動脈
皮膚	顏色、外表、氣味、毛髮	總蛋白、白蛋白、球蛋白	僅在經皮研究時進行
肌肉	體稱、無力、消瘦、活動減少	谷—草轉氨酶、磷酸肌酸激酶	在有觀察、臨床化學、大體損傷時進行

# 長期毒性研究

## 一、實驗設計

(一)動物的種屬和數量：一般使用一種或幾種動物，除非有其他原因，一般用大鼠。狗和靈長類為次選動物。小鼠雖常用於致癌研究，但因體積小，不適宜用於一般毒性的長期研究。

實驗採用雌雄動物各半。一般每個劑量組及對照組用40~100隻大鼠。狗和靈長類動物所用數量要少得多。

(二)給藥途徑、劑量以及期限：給藥途徑同短期研究。劑量選擇的標準也同短期研究。但因為長期研究中時間相當長，而且花費大，故在選擇劑量應格外仔細。

大鼠研究期限通常為2年。有些研究者建議更長些，這可能做到，但為避免衰老因素的影響，一般建議實驗期限不要超過30個月，狗和猴可維持6年或更長些。

## 二、觀察和檢查

與短期研究相似，包括體重、食物消耗、大體檢查、實驗室檢查、以及死後檢查。

## 三、結果評估

長期毒性研究的目的是確定化學物毒作用性質和確定“無毒害藥量”(NEL)。

如化學物毒性作用不嚴重，且已得到 NEL，可從動物資料外推到人的容許攝入量。在此過程中，一般都用安全系數。安全系數部份分別用以補償人與動物間易感性的差異、人群中易感性的差異、接觸的人群數量大和實驗動物數少之間的差異。

長期以來，WHO 推薦的安全系數為100，此值已被廣泛接受，但不是一成不變的。例如，在具有從人群中嚴密觀察到的毒性資料時，可用較小的安全系數。另一方面，當毒理資料的質和量存在某些不足時，則應採用較大的安全系數。化學物在較高劑量能引起較嚴重的毒作用時，也應採用較大的安全系數。

隨著我們對毒理學知識的擴展，越來越多的類型的觀察和檢查方法正引入到長期研究程序中來。儘管如此，仍在設計許多特異的試驗，用以闡明毒作用的性質和毒作用機制。只要有證據，就應作這些特殊性研究。這些證據可以是物質的某些化學性質，也可能是從短期和長期試驗中發現的。這些特殊性研究結果可影響制定每日容許攝入量 (ADI) 時所用安全系數的大小。甚至影響作出決定：某些物質是否允許制定 ADI。

# 長期致癌研究

長期致癌研究的目的是在於提供化學物質致癌作用的確定性資料。因為此類資料耗資費時，通常是在評估其他資料，如化學結構，致變性試驗以及長期毒理試驗的結果後，有需要時才進行致癌的研究。

## 一、實驗動物

最常使用大鼠和小鼠，因為體積小，壽命短，易得到而且有大量的對大、小鼠致癌的已知的化學物質資料。倉鼠也常被使用，特別用於研究膀胱、乳腺、胃腸道、呼吸道癌。

狗或靈長類也偶有使用，但因為體積大，壽命相當長，試驗需要7~10年時間，所以使用很有限。

一種良好的可用於致癌試驗之動物品系應具有下述之特徵：1. 對已知之相似化學結構的特質敏感；2. 自發性之腫瘤率低；3. 生物轉化速率和方式與人類相似；4. 高度近親繁殖之品系不宜使用。

致癌試驗之動物應包括兩性性別在內，為使便於統計分析，一般每個性別，每一劑量組，包括對照組需用50隻動物開始試驗。

## 二、實驗期限

為使接觸期限儘量拉長，通常實驗從動物斷乳後不久開始。一般不考慮使用新生動物，因為幼年和成年動物在代謝能力、解剖生理特徵、病毒易感性、激素水平、免疫能力等方面有差別。

研究期間一般大鼠為24個月、小鼠18個月。如動物健康狀況較佳，可分別延長到30和24個月。

## 三、投藥途徑

受試化學物應以與人類接觸相同的途徑給予動物。這一原則最適用於食品添加劑和污染物，以及大多數藥物。然而對工業與環境化學物，主要的進入途徑是吸入。因為缺乏合適的投藥設備，這類化學物通常經口給予。這樣做就必須比較經口和經呼吸道進入的動力學，以確保能將一種途徑所得結果合理地類推到另一種途徑。亦可選擇經氣管注入的投藥方式。

當受試物經口給予時，可與食料混合，或以恆定的濃度（每公斤飼料中化學物的毫克數，ppm），或以恆定的劑量（每公斤體重所給予的化學物毫克數，mg/kg 體重）。後者需根據在各個生長階段動物的食物消耗及體重調節化學物在飼料中的濃度。化學物也可摻入飲水中，或通過灌胃給予。

動物飼料應避免含有致癌物（如黃麴霉毒素）或酶誘導劑（如 DDT），能影響受試化學物的作用。

經皮給藥用於工業化學物和局部用藥的測試。這一途徑主要用於確定局部致癌作用。然而，在某些情況下也可吸收較大量而引起全身作用。

## 四、劑量

致癌研究中通常以2或3種劑量來試驗，還應設對照組作比較。劑量的選擇根據短期研究和代謝研究的資料。高劑量可出現某些較輕的毒性表現，但不明顯縮短動物的壽命，兩種較低的劑量通常是高劑量的一部份（如1/2和1/4），希望動物能在較好的健康狀況下存活到腫瘤發生。也有使用「最大耐受劑量」（MTD）作為致癌實驗的最高劑量，這一劑量可以90天試驗的結果估計得到。MTD 的定義是：在此劑量下，1. 與對照組相比，體重減輕不大於10%；2. 既不引起死亡，也不產生任何可縮短動物壽命的臨床毒性表現或病理損害。

一般情況下，在選擇劑量時，這些標準都可以達到。但是，在某些情況下這種劑量可

產生廣泛的器官損害或使正常的生物轉化機制飽和。在這種情況下，對結果要作嚴格的評價、或用較低劑量重複實驗。

另一方面，對明顯無毒的物質，高劑量也不應超過飼料中的5%，如受試物質是一種營養品，所占比例可較大一些。

## 五、對照組之設置

對照組應包括無處理組、添加物處理組，以及陽性處理組。陽性處理組乃給予足以產生癌症劑量之已知致癌物質，其目的在使受試化學物質的結果更具可靠性。對照組之動物數應與每個劑量組相同或多些。

## 六、觀察項目

(一)體重與食物消耗：應記錄體重和食物消耗。這些指標以每公斤體重攝入1毫克化學物為基礎來計算。再者，體重是動物健康狀況的一個靈敏的指標，在動物處於生長階段的最初3個月，應每周測定，以後每2周1次。

(二)大體觀察：應每天檢查動物的死亡與患病情況。死亡和患病動物應從籠中取出作大體檢查，在條件許可情況下作顯微鏡檢查。

為防止動物間相互殘殺，以及為了隔離，應將患病動物單獨籠養。如果需要，可用藥物治療，但任何治療必須作記錄。應避免使用長效藥物，以防止對受試物可能存在干擾。

應仔細檢查和記錄任何異常組織腫塊的起始、部位、大小及其生長情況。也應注意毒性體徵和藥理學作用。

(三)實驗室檢查：不像在短期和長期毒性研究中所有的毒性作用都要觀察研究，致癌研究的主要目的是確定化學物的致癌活性，因此，除了常規的血液學檢查，關於動物健康狀況的試驗很少。一般在研究結束時進行。如果在中期進行，實驗開始時應增加動物數量。

(四)屍檢：所有死亡或瀕死動物都應經大體剖檢。實驗終了時存活者也應處死剖檢。此外，應測量一些臟器的重量，如肝、腎、心、睪丸、腦等。

組織標本應保存留作組織學檢查，對所有腫瘤組織和大體檢查發現異常的組織作顯微鏡檢查。通常還應檢查下列組織：頷下淋巴結、唾液腺、乳腺、胸骨節（胸骨體）、股骨或脊椎骨（包括骨髓）、胸腺、甲狀腺、甲狀旁腺、氣管、肺和大支氣管、心、食管、胃、小腸、結腸、肝、膽囊、胰腺、脾、腎上腺、腎、膀胱、前列腺、睪丸、子宮、卵巢、腦、垂體、眼球（如果大體發現異常）、脊髓（若有神經體徵）。

(五)腫瘤報告：有些用於描述腫瘤的術語，如肝細胞瘤，有廣泛的含義，因而對損害部位的病理切片作詳細的描述很重要。

由於致癌作用可表現為不同的形式，所以必須記錄以下內容：

1. 不同類型（包括良性和惡性）腫瘤，以及任何罕見的腫瘤的數量；
2. 發生腫瘤的動物數；
3. 每一動物的腫瘤數；
4. 腫瘤發生時間。

## 七、結果之評估

(一)初步之評估：當評估一種化學物質是否有致癌之潛能時，初步可由其結構加以評估，因為許多致癌物質之結構都已有充分的研究，雖然與這些已知之致癌物質結構類似化合物未必一定是致癌物質，但至少可作為初步評估之參考。

當化合物是一種致變物質的時候，也可能具有致癌之潛能，由於其與 DNA 作用而產生遺傳性之基因改變與致癌物相似。致變性試驗也可提供一些線索，說明該化學物質是否必須一些生化轉換才能產生致變的作用。

在某些局部至癌實驗中已有陽性反應之化學物質常也被認定是致癌物，如小鼠皮膚腫瘤、小鼠肺癌、雌性大鼠乳房癌都屬此類。

(二)最終之評估：從設計良好的長期致癌性研究所得到的結果，已能判斷供試之化學物質是否為致癌物，但應事先作下述之考量：

1. 全面考慮：一般從長期致癌實驗得到的結果要比快速篩選測試所得到的結果更可靠。但是，最後的定論取決於許多因素。例如，當腫瘤發生時存活動物數太少可妨礙數據的統計分析，這一情況發生在每個劑量組的動物數不足和／或由於管理不當或給予極高劑量的競爭性毒作用所致死亡過多。

屍檢的徹底程度也起了重要的作用。常作大體和顯微鏡檢查。如只作粗略的剖檢，那麼可能遺漏組織和器官內的腫瘤。對某些器官，如膀胱需用特殊的技術來作適當的檢查，有無伴隨情況如膀胱結石和寄生蟲。適當的組織固定和染色有利於顯微鏡檢查。

2. 腫瘤發生率：患腫瘤的動物數明顯增加是最常見的形式。如果罕見腫瘤明顯增加，是一個重要現象，當發現一個或少數幾個時，應作進一步的檢查。潛伏期縮短常見於皮脂和皮下腫瘤。肉眼可見腫瘤的潛伏期實際上相當於患腫瘤動物的生存期，因為一般來說，常在剖檢時確證腫瘤。每個動物患腫瘤的數目增加，並不伴有患腫瘤動物數的增加，常提示僅為協同致癌物。

實驗動物腫瘤可表現各個階段，包括非典型增生、良性腫瘤、原位癌、鄰近組織浸潤、遠組織轉移。雖然同一類型但處於不同階段的腫瘤應分別列出，但應合併作統計分析。

3. 劑量—反應關係：通常可觀察到明顯的劑量—反應關係。但是，可能在高劑量出現腫瘤發生率低的現象，通常是由於實驗動物的存活數減少，或因化學物毒作用的競爭性死亡所致。

4. 結果的重現性：如果一個致癌研究的結果在另一品系的動物中重現，則可信性得以提高。如是能在另一種屬動物中重現，其意義更顯著。但是，如果在另一種屬動物中得到陰性結果，並不能否定已有的陽性結果，應作進一步研究。這種差別可能是由於化學物生物轉化機制的不同，或實驗所用化學物純度不同。

## 致變異性之研究

致變性是化學物質與生物體中遺傳物質相互作用之結果，而導致遺傳上之改變成變異。許多的疾病與 DNA 分子之改變和染色體畸變有關。近年來因為具有致癌作用之化學物質又具有致變異性，故致變異之測試又用於篩檢化學物質之致癌性。致變異性測試方法很

多，本章僅就基因突變、DNA 修補及重組、染色體效應三類分別舉例說明。

## 一、基因突變

基因突變是指 DNA 分子中碱基對的增加、缺失或取代。此外致變異物質也可進入到 DNA 分子中，形成錯誤之碱基對。最後可使合成之蛋白質造成很大的改變。測定基因突變之方法有下述數種：

(一)原核微生物：細菌屬於此類。測定點突變常用的細菌是鼠沙門氏菌和埃希氏大腸桿菌。大多數細菌測試系統是測定回復突變。例如，Ames 試驗即係檢測鼠傷寒沙門氏菌組氨酸缺陷型突變株回復到野生型。將突變株置於含微量組氨酸的培養基中培養，此時，細菌僅能繁殖數代，假如加入的毒物能誘發細菌回復突變，則所回復的野生型細菌即可在缺乏組氨酸的培養基上獲得良好生長。

許多致變異物質在生物活化以前沒有活性，因此可在體外試驗中加入生物活化系統。活化系統一般由大鼠或其化動物的肝臟微粒體成份組成（含混合功能氧化酶），為特殊的可採用人肝。苯巴比妥及多氯聯苯等誘導劑預處理動物可增加微粒體酶活性。

(二)真核微生物：酵母屬、裂酵母屬、鏈霉屬及曲霉屬的某些菌株主要用於檢測回復突變，個別可檢測正向突變。與細菌一樣，真核微生物測試系統也包括生物活化酶及輔助因子。如突變型的啤酒酵母菌需腺嘌呤才能生長，其菌落呈紅色，而野生型不需腺嘌呤，其菌落呈白色。因此可根據白色菌落在平皿上所佔的優勢程度用於檢測回復突變。

(三)體內微生物試驗法（宿主—介導試驗）：此類試驗是將微生物注入宿主動物（通常是小鼠）的腹腔，也可注入循環系統或睪丸。毒物一般先於微生物注入宿主，數小時後，處死宿主。然後收集微生物，觀察突變情況。其優點是考慮了毒物在宿主動物內的生物轉化，但缺點是微生物在宿主體內存活時間太短。從理論上該方法有許多優點，但發現其對某些致癌物不敏感，故不宜作為常規篩選試驗。

改良方法是用毒物處理宿主，然後收集宿主尿液，將含有高濃度毒物代謝產物的尿液再回注宿主。

## 二、對染色體之影響

毒物對染色體的作用可表現為結構異常與染色體數目改變。前者包括缺失、重選和轉位，後者包括染色體數增加或減少，其中有些作用是可遺傳的。

其作用機制可能是分子交聯引起 DNA 合成阻斷，而使染色體留下裂隙。亦可由於 DNA 損傷修復不完全引起。染色體不分離（有分裂期，成對的染色體分離障礙）可導致鑲嵌現象。配子形成期的不分離（減數分裂分離障礙）可導致二個子細胞染色體數異常，一個比正常多，另一個比正常少。前者為三體型，後者為單體型。

(一)體外試驗：細胞遺傳學試驗常用的細胞取自小鼠淋巴瘤、中國倉鼠卵巢，及人淋巴細胞。在合適的培養基中培養，然後在生物活化系統（常用大鼠肝均漿的微粒體組分）存在或不存在的狀況下，用不同濃度的待測化合物進行投藥。該試驗一般用兩個陽性對照誘變劑，一個是乙基磺酸甲酯，具有直接作用；另一是二甲基硝胺，需經代謝活化。培養一定時間後，加入秋水仙素阻止細胞分裂。然後製片、染色和計數。

染色體畸變包括染色單體裂隙、染色單體斷裂、染色體裂隙、染色體斷裂、染色單體缺失、染色體斷片、轉位、三相交換體、四相交換體、染色小體、粉碎染色體、環狀染色體、雙著絲粒染色體、10個以上的畸變、多倍體、超倍體等。

(二)體內試驗：用於對染色體影響研究的哺乳動物細胞有生殖細胞和體細胞。將待測化合物注入完整的啮齒類動物（小鼠、大鼠和倉鼠）和人體內。常用的體細胞是骨髓細胞和外周血淋巴細胞。用小鼠、大鼠或倉鼠骨髓進行試驗，計數方法與體外試驗相同。

微核試驗是一種比較簡單的體內測試法。可用小鼠的骨髓多染性紅細胞。用待測化合物處理小鼠，間隔24小時，第二次處理。6小時後處死動物，收集雙側股骨骨髓。如微核細胞多於對照組（大約0.5%）為陽性結果。微核實際上是紡錘體著絲點功能障礙形成的染色體和染色單體的斷片。

生殖細胞測試常用雄性動物。為了使精子發生的各階段皆能被測試物處理到，連續給藥5天，在停藥後的第1、3、5周處死動物。通過手術在副睪尾部收集精子，經過製片和染色，計算精子頭部異常率，然後與陰性和陽性對照組比較。

### 三、DNA 修復和重組

這些生物過程本身不是突變，但由於修復和重組是在 DNA 損傷後發生，故可表明有 DNA 損傷存在，此種損傷主要由致變異物質所引起。

(一)細菌：有些埃希氏大腸桿菌具有正常的能修復 DNA 損傷的 DNA 聚合酶 I，而有些則沒有。具致變異物質會使 DNA 損傷，可抑制修復酶缺陷型大腸桿菌生長，而修復酶正常的大腸桿菌則不受影響。因此具有 DNA 修復能力的菌株能排除細胞毒作用。

與此類似，有些枯草菌有重組能力，有些則沒有。前者通過重組可以修復 DNA 損傷，後者不能，因此致變異物質可以抑制後一種細菌的生長，而對前者無作用。

(二)酵母菌：各種真核細胞啤酒酵母菌，可通過誘導有絲分裂交叉、有絲分裂基因轉換及回復突變，檢測化學物的致變異性。

(三)姐妹染色單體互換：該試驗檢測二條姐妹染色單體片段在同源位點上的相互交換。可用小鼠淋巴細胞、中國倉鼠卵細胞及人淋巴細胞。一般過程是用5-Brdu 標記細胞，通過兩個複製週期，用螢光—吉姆薩染料染色。記錄每個細胞、每條染色體的交換率，並進行比較。由於 DNA 的半保留複製使每條染色單體中的一條多核苷酸鏈有 Brdu 的取代物，互換後，由於另一條染色單體二條多核苷酸鏈的有 Brdu 取代物，故可觀察到姐妹染色單體的互換。

### 四、致變異試驗研究注意事項

(一)選擇測試物質的標準：由於人類所接觸的天然和人工合成物質為數眾多，而致變測試方法也很多，要對所有的物質進行各種測試是不可能的。因此，有必要建立選擇待測物質和測試方法的標準。WHO 專家小組曾制定選擇藥物的標準。下面是選擇藥物及其它物質的標準：

1. 與已知致變劑或可疑致變劑在化學、藥理及生化上相關的物質。
2. 動物試驗提示有某些毒作用的物質，如具有抑制骨髓、使精子或卵子生成障礙、

抑制有絲分裂（如對小腸上皮細胞）、致畸、不育或半不育及免疫抑制作用的物質。

3. 人類長期接觸的物質。

4. 接觸面廣的物質。

(二)測試系統的選擇：由於致變劑對遺傳物質的作用方式各不相同，因此，在某個試驗呈陽性結果的物質，而在另一個試驗可呈陰性。為了排除假陽性結果，最好進行不同類型的幾種試驗。

1. 檢測基因突變，在以幾種方法中至少選擇3種：(1)細菌，(2)酵母菌，(3)昆蟲（如伴性隱性致死試驗），(4)哺乳動物體細胞培養，(5)小鼠專一性位點試驗。

2. 檢測染色體畸變，在以下幾種方法中至少選擇3種：(1)哺乳動物體內細胞遺傳學試驗，(2)具有染色體遺傳效應的昆蟲試驗，(3)啮齒類動物的顯性致死試驗，(4)大鼠可遺傳性轉位試驗。

3. 檢測原代 DNA 損傷，在以下方法中至少選擇2種：(1)細菌的修復試驗，(2)哺乳動物細胞非常規 DNA 修復合成試驗，(3)酵母菌有絲分裂重組或基因轉位試驗，(4)姐妹染色單體互換試驗。如有可能，上述試驗應做加或不加代謝活化系統2種以比較。

各種測試系統所需的費用和時間不同。加或不加活化系統的體外微生物試驗耗資少，費時短。而哺乳動物的體內專一性位點突變試驗費用多，時間長。

實際工作中常採用一組試驗。先做微生物試驗，然後是昆蟲、哺乳動物細胞培養、體內細胞遺傳學試驗、小鼠斑點試驗，最後做哺乳動物專一性位點試驗。

## 五、致變異性測試結果之意義

(一)致變異和致癌性的關係：許多調查表明致變劑與致癌物具有相關，以鼠傷寒沙門氏菌／微粒體試驗對300種物質進行致變性研究。並將測試結果與所報導的致癌性試驗結果比較，現二者之間關係非常密切：90%（156／175）的致癌物在試驗中有致變作用，而非致癌物幾乎沒有致變性。

在18個產生假陰性的致癌物中，發現某些物質需要其它代謝活化系統（如蘇鐵苷和二甲基胍對無菌動物不致癌，表明它需經腸內細菌群活化）。另一些物質如氨基三唑，可致甲狀腺腫大，但以非突變途徑引起甲狀腺腫瘤。

(二)可遺傳的影響作用：目前，可遺傳的突變試驗與人群實際情況沒有直接關係。儘管如此，假如一個物質各種試驗（包括整體動物的可遺傳的突變試驗）均為陽性結果，應認為物質是人的致變劑，除非有證據否定之。對於人群可以避免的化學物，如食品添加劑、農藥、化妝品及大部分藥品，不需大量陽性資料就可提出停止使用，目前還沒有可靠的方法可根據致變作用強度估計危險性。

如上所述，致變研究是一個新的領域。該領域迅速累積的知識對解釋致變試驗結果的意義，及選擇篩選毒物的測試系統將有很大的助益。

## 結 論

毒性測試之方法及種類極多，每種可能與人接觸之化學藥品都要完成這些測試，在人

力及財力上都不可能做到，故對任何一種化學物質之測試範圍都應有先期之規劃，這些規劃必需先基礎在對待測物質之理化特性、人類與其接觸方式之瞭解，這樣才能設計一套符合該化合物之測試方案。

毒性測試應分段實施，每一階段都必需評估，若有需要才進入下一階段，例如常用之測試程序為：(一)受試物質之確定，(二)接觸之評估，(三)急性毒性之測試，(四)遺傳毒理研究及新陳代謝和藥物動力學研究，(五)亞慢毒性和生殖作用，(六)慢性毒性。每一階段的測試結果都會決定需要或不需要進行下一步之試驗。

毒性測試之工作變化因素極大，為求結果之一致，試驗操作必需符合優良試驗規範 (GLP)。這些規範應包括：(一)人員，(二)動物，(三)設備，(四)儀器操作，(五)藥物管理，(六)實驗室管理，(七)記錄之儲存，數據之檢索，(八)報告內容等。這些內容都應有詳細之書面資料隨時提供另外單位之審閱。

(資料提供：李國欽)