

快得寧水分散性粒劑對天竺鼠皮膚過敏反應之評估

吳偉嘉 楊俊宏 黃振聲 蔡三福*

台中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所 應用毒理組

(接受日期：2007 年 6 月 28 日)

摘 要

吳偉嘉、楊俊宏、黃振聲、蔡三福* 2007 快得寧水分散性粒劑對天竺鼠皮膚過敏反應之評估 植保會刊 49：153 – 165

對於各種新配製或新合成藥劑進行皮膚過敏性安全評估，是保障藥劑操作者或使用安全之重要參考資料。因此本試驗以國際公認之 Buehler Test 皮膚貼覆測試方法，評估由國內自行配製之 80%快得寧(oxine-copper)水分散性粒劑(W.G., water dispersible granule)對天竺鼠之皮膚過敏反應，實驗分為實驗 1 與實驗 2。實驗 1 目的為篩選及確認藥劑的刺激濃度後進行實驗 2。實驗 2 以未稀釋之 80%快得寧水分散性粒劑分別於第 1、2 及 3 週進行致敏試驗、第 4 週為停藥期、第 5 及第 6 週進行激發試驗。試驗並以 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitro-1-chlorobenzene, DNCB)為陽性藥劑。試驗分析項目包括皮膚紅腫程度、血液學、血清生化分析及病理組織判讀。試驗顯示由國內自行配製之快得寧水分散性粒劑於各週藥劑處理後第 24 及 48 小時之結果，對天竺鼠左腰窩部皮膚並無明顯紅腫反應。而 DNCB 陽性藥劑處理後皮膚出現中至強度之紅斑及浮腫並於 48 小時後形成痂皮等皮膚病變。血液學檢查於處理快得寧水分散性粒劑後對天竺鼠之紅血球總數、血球容積比及血色素等與對照組相較無明顯差異($P>0.05$)。且白血球分類計數(WBC differential count)亦顯示，快得寧水分散性粒劑對天竺鼠之淋巴球、嗜中性球及嗜伊紅性球等比例上與對照相較亦無明顯差異($P>0.05$)。但 DNCB 藥劑處理組則對天竺鼠之淋巴球比例上與對照相較有明顯上升趨勢。血清生化檢測顯示，快得寧水分散性粒劑及 DNCB 處理組對天竺鼠之鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)、天門冬安酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)、總膽紅素(total bilirubin)、血中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、膽固醇(cholesterol)、總蛋白(total protein)及鈣離子(calcium)等與對照相較均無顯著性差異。組織病理觀察結果，顯示快得寧水分散性粒劑除於皮膚組織有嗜伊紅性球浸潤(infiltration)外，並無明顯皮膚病變。但 DNCB 處理組則可導致

* 通訊作者。E-mail: sftsai@tactri.gov.tw

明顯接觸性過敏性皮膚炎，皮膚病變區呈現過度角化(hyperkeratosis)及棘皮層增厚(acanthosis)，真皮層局部出血並伴有淋巴球、嗜伊紅性球(eosinophils)及少數肥大細胞(mast cells)浸潤於病兆區，同時病變區出現慢性炎症修補反應，可見纖維芽細胞(fibroblasts)及結締組織增生等變化。綜合以上結果，顯示由國內自行配製之 80%快得寧水分散性粒劑對天竺鼠不具皮膚過敏反應。

(關鍵詞：快得寧水分散性粒劑、皮膚過敏性、天竺鼠)

緒 言

化學藥劑造成之皮膚紅斑(erythema)現象，可能為單純皮膚刺激性及過敏性反應所造成，而過敏反應為一種體內免疫疾病⁽¹²⁾。體內免疫系統對於進入身體中之外來物質都可以藉由產生適當的免疫反應，以免受到有害物質或病原體的傷害，此本是一種正常而有益的反應，但若是對於較無害且於日常生活中常會接觸到的物質產生過度免疫反應，將導致不必要的炎症反應，往往造成身體組織之傷害，此種負面的反應即稱為過敏反應(hypersensitivity)。由於皮膚性化學過敏物質種類眾多，如福馬林(formaline)、苦味酸(picric acid)、苯胺染料(aniline dyes)或 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)及蓋普丹(captan)等藥劑，若與皮膚重覆接觸後，均可促使體內形成蛋白化學複合物(protein-chemical complexes)，經由活化 Th₁ 淋巴細胞(T helper 1 lymphocytes)免疫反應造成接觸性過敏性皮膚炎(allergic contact dermatitis, ACD)，使皮膚產生紅腫、丘疹等現象⁽¹⁶⁾。最初皮膚角化細胞(keratinocytes)受外來皮膚過敏性抗原刺激後，所分泌之腫瘤壞死因子 TNF- α (tumor necrosis factor α) 與細胞激素 IL-6 (interleukin-6)等，具刺激與活化蘭格罕氏細胞(Langerhans cells)之作用，促進蘭格罕氏細胞將所接觸到之皮膚過敏性抗原(antigen)有效地呈獻給 Th₁ 淋巴球系統^{(7, 10,}

21)，而後引發進一步之皮膚過敏免疫反應。DNCB 為用於治療皮膚脫毛常用藥劑之一，具有強皮膚過敏性及致變異性，故往往作為各種動物皮膚過敏試驗之陽性對照藥劑^(12, 21)。

臺灣地處亞熱帶區，天氣炎熱，各種植物病蟲害普遍，故農藥使用頻率相當高，農民於噴灑農藥時常忽略皮膚安全防護措施，極易造成皮膚暴露藥劑導致中毒或過敏反應，由於皮膚過敏反應屬於遲發性，無立即症狀反應，農民施藥後不易警覺，故易被忽視。農民噴灑除草劑如巴爾班(barban)時常導致臉部、眼瞼或手臂紅腫、起水泡及皮膚潰爛，造成慢性皮膚炎等症狀⁽¹⁶⁾，為防止此一潛在危險性發生，針對各種新配製或新合成藥劑及部分化學結構具過敏潛在性之藥劑⁽¹²⁾，進行皮膚過敏性安全評估測試，是保護農民安全重要措施之一。

已往利用天竺鼠做為皮膚過敏性試驗動物已證實與已知人體過敏原之間有良好相關性^(4, 12)，鼯鼠及大鼠雖可利用為篩檢未知過敏原物質之試驗動物，其敏感性各有差異，其中以 1-3 月齡(約 300-450 g)之 Hartley 品系天竺鼠敏感度最佳^(5, 6, 21)，唯天竺鼠本身無法合成 Vitamin C 常引發壞血症而導致皮下出血，且低溫、潮濕的環境亦會增加其反應敏感性，影響試驗結果甚鉅，故實驗進行時必需十分注意外在因素之控制^(8, 12)。化學藥劑對皮膚過敏試驗安全評估方法甚多，經國際公認而推薦之方法有：Draize Test (DT)、Mouse Ear

Swelling Test (MEST)、Murine Local Lymph Node Assay (MLLNA)、Büehler Test、Open Epicutaneous Test (OET) 及 Guinea Pig Maximization Test (GPMT) 等多種方法^(3, 5, 18, 19)。若依其試驗目的及試驗期程之差異進行分類，上述試驗方法大致可再分為四類：(一)皮內注射方式包括 DT 法，以連續多次皮內注射，誘使體內產生較高之抗體。(二)小鼠耳朵皮內注射方式包括 MEST 及 MLLNA 法，以連續多次耳朵皮內注射，測量並計算耳朵腫脹程度及刺激指數^(11, 13)。(三)皮膚塗抹方式包括 Büehler 及 OET 法，為重覆多次皮膚覆蓋測試藥劑，與實際藥物使用狀況較為符合⁽¹⁾。其中 DT 及 MEST 法因試驗期間注射次數過多且給藥途徑，與臨床接觸與使用上較不符合，但 MEST 及 MLLNA 法之優點為可快速篩選中至強度過敏性試驗物質，以作為進行 Büehler 及 GPMT 法之前試驗，且較具測量客觀性及使用動物數少等優點^(18, 21)；而 Büehler 法分二階段試驗為致敏試驗期 (sensitization phase) 及激發試驗期 (challenge phase)，較符合使用上接觸藥劑之實際情況，是目前較常採用之方法⁽²¹⁾。

本試驗中所評估之快得寧藥劑為目前台灣地區已使用多年之殺菌劑，廣泛用於防治多種果樹病害，如梨黑星病、葡萄露菌病及荔枝露菌病等。並常與其他殺菌劑如硫酸銅(copper sulphate)、鹼性氫氧化銅(cupric hydroxid)、依普同(iprodione)及滅達樂(metalaxyl)等藥劑混合，以防治各種蔬果病害。雖然其對哺乳動物之口服及皮膚急性毒性低，亦不具致變異性，而被認為是一種較低毒性的農藥，但有鑑於其為一新配製的農藥，國內外至今仍缺乏完整皮膚過敏性毒理資料。因此本試驗之研究目的為利用 Büehler 皮膚局部塗抹貼覆的測試方法，測試由國內自行配製之 80%快得寧水分散性粒劑(W.G., water dispersible)對天竺鼠之皮膚過敏反應，以瞭解該新劑型農藥

之安全性，以製備及提供此藥劑皮膚過敏反應之安全評估資料。

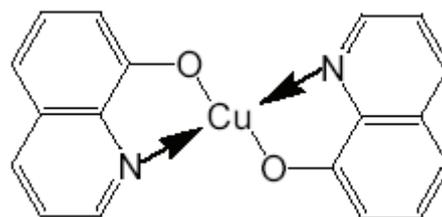
材料與方法

試驗動物

5 週齡雌性 Hartley 品系天竺鼠，體重約 300 ± 50 g，購自台灣大學動物中心，在本所動物飼育室觀察一週後，依逢機方式分為實驗 1、空白對照組、陽性對照組及試驗組，天竺鼠數目各組分別為 16、10、10 及 10 隻，以不銹鋼飼育籠(60 x 55 x 20 cm)飼育天竺鼠，天竺鼠分別以耳號作為標識。動物飼育室的溫度及相對濕度分別維持在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 及 $60 \pm 10\%$ ，而光照週期為明 12 小時/暗 12 小時，給予充足天竺鼠飼料(Purina Guinea Pig Chow, No.5002, PM2 Feed Inc., MO., USA)，添加維生素 C (Merck, Germany) 2 g/10 L 於飲水中任飲(ab libitum)。

試驗藥劑

80%快得寧水分散性粒劑〔主成分 bis(quinolin-8-olato-*O, N*)copper，化學分子式： $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{CuN}_2\text{O}_2$ ，分子量：351.9，化學結構式如圖一〕，由本所農藥化學組提供，為一橄欖綠色粒劑。陽性對照藥劑：98.5% 2,4-dinitro-1-chlorobenzene〔DNCB，化學分子式： $(\text{NO}_2)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}$ ，和光純藥工業株式會社、大阪、日本〕，為黃白色結晶粉末，可溶於絕對酒精。95% sodium dodecyl sulfate (SDS，和光純藥工業株式會社、大



圖一、快得寧之化學結構。

Fig. 1. Chemical structure of Oxine copper.

阪、日本)，為白色粉末，以蒸餾水稀釋成 10% 溶液使用。

實驗設計

以 Büehler 試驗方法⁽¹⁾，將試驗分為實驗 1 與實驗 2。實驗 1 主要目的為篩選並確認藥劑的刺激濃度，選取具微刺激性之藥劑濃度作為實驗 2 第 1、2 及 3 週致敏試驗期濃度；而選取無刺激性之藥劑最高濃度作為第 5 及第 6 週激發試驗期濃度。實驗 2 之第 1、2 及 3 週為致敏試驗、第 4 週為停藥期、第 5 及第 6 週進行激發試驗。

實驗一

試驗前將天竺鼠右腰窩部毛剔除，分別取 0.5 g 未稀釋、稀釋 2 倍、4 倍及 8 倍之 80% 快得寧水分散性粒劑，未稀釋者以少量蒸餾水濕潤，每個濃度 2 隻天竺鼠分別直接塗佈在四層紗布(1 inch²)，貼於天竺鼠之右腰窩部，並以透氣膠布(MicroporeTM, 3M, St. Paul, MN, USA)及黏著彈性繃帶(ELATEX, Alcare, Tokyo, Japan)包紮 6 小時，取下貼布後連續觀察並記錄貼覆部位第 24、48 及 72 小時之紅斑及浮腫刺激程度後，以評估選取藥劑微刺激濃度(%)。以同樣方式評估篩選無刺激濃度(%)，唯其包紮時間為 24 小時。

實驗二

第 1、2 及 3 週致敏期，試驗前將天竺鼠右腰窩部毛剃除乾淨(4×6 cm)，取空白對照組(蒸餾水)(0.5 ml)、陽性藥劑組(1% DNCB)(0.5 ml)及未稀釋 80% 快得寧水分散性粒劑處理組(0.5 g，以蒸餾水濕潤)塗佈在四層紗布上，貼於天竺鼠之右腰窩部，並以前述之透氣膠布及黏著彈性繃帶包紮 6 小時後，取下貼布以蒸餾水沖淨藥劑貼覆部位，觀察及記錄第 24 及 48 小時之紅腫情形。第 4 週僅稱重記錄，不做其它處理。第 5 及第 6 週激發期，在試驗前一天將天

竺鼠左腰窩部毛剃除乾淨，取 0.5 ml 之 10% (w/v) SDS 局部塗抹左腰窩 6 小時後，並以蒸餾水沖淨藥劑部位。隔日分別取 0.5 ml 空白對照組(蒸餾水)、陽性藥劑組(0.1% DNCB)及稀釋 8 倍不具皮膚刺激性之 80% 快得寧水分散性粒劑塗佈在四層紗布上，貼於天竺鼠左腰部，以透氣膠布及黏著彈性繃帶包紮 24 小時，取下紗布後觀察及記錄第 24 及 48 小時之紅腫情形。

試驗檢查及分析項目

體重及臟器重測量

每週進行天竺鼠體重之秤重並記錄。試驗第六週結束後，解剖取心臟、肺臟、肝臟、腎臟、脾臟、胸腺、耳朵及測試部位皮膚，秤重後泡置於 10% 福馬林中。

血液學分析

以含 EDTA 抗凝血管收集天竺鼠腹動脈血液後，以自動血液分析儀(Sysmex K-4500, TOA Medical Electronics Co., Ltd., KOBE, JAPAN)檢測其白血球(WBC)、紅血球(RBC)、血色素(HGB)、血球容積比(HCT)、平均血球容積(MCV)、平均紅血球血紅素(MCH)、平均紅血球血紅素濃度(MCHC)及血小板(PLT)之數值。

白血球分類計數

取微量血液製作血液抹片，利用 Diff Quick (International Reagents, Tokyo, Japan) 染色後，在光學顯微鏡下計算 200 個細胞中的白血球比例(單核球、淋巴球、嗜中性球、嗜伊紅性球及嗜鹼性球)，再由細胞總數依比例換算各類細胞之數目。

血清生化分析

以血清管收集天竺鼠腹動脈血液後，經離心(KUBOTA 2010, 3000rpm, 30 分鐘)後，取血清(serum)以自動生化儀(Chiron Express Plus, Chiron Diagnostics, MA, USA)

檢測其鹼性磷酸酶(ALP)、丙胺酸轉胺酶(ALT)、天門冬氨酸轉胺酶(AST)、總膽紅素(total bilirubin)、血中尿素氮(BUN)、膽固醇(cholesterol)、肌酸酐(creatinine)、麩氨酸轉移酶(γ -Glutamyltransferase, γ -GT)、葡萄糖(glucose)、磷(phosphorus)、總蛋白(total protein)及鈣離子(calcium)之數值。

皮膚過敏率及肉眼病變評估

依據 Draize (1944)之皮膚刺激評估法，肉眼評估皮膚紅斑及浮腫等病症。過敏率的計算以呈陽性反應的天竺鼠百分率(陽性反應隻數/處理隻數 \times 100%)，再以 Kligman 等(1966)分級方法依過敏百分率程度，分為弱、輕微、中度、強度及極強等五級反應。

組織病理

將大體解剖取下之臟器及皮膚組織置於 10% (V/V)中性福馬林溶液中固定 48 小時以上，經石臘包埋等過程製成切片(2 μ m)，經蘇木紫及伊紅(H&E)、甲苯胺藍(Toluidine blue)及 Luna 氏法染色後，在光學顯微鏡下觀察組織病理變化，並使用影像分析儀(Q-500, Lieca, Germany)計算天竺鼠皮膚組織每單位面積中嗜伊紅性球之數值。

結果分析

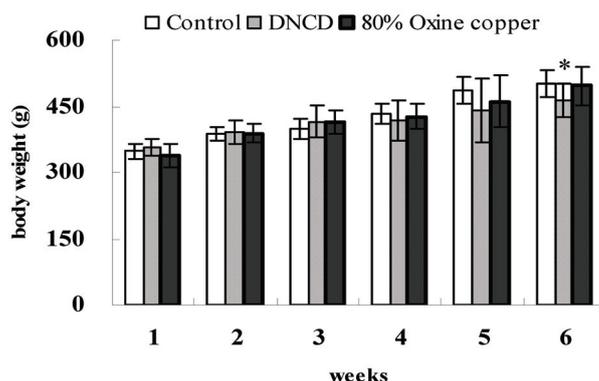
各試驗組所得數值以 Microsoft Excel 之 AVERAGE 法求取平均值及 STDEV 法求取標準偏差值，並以 Student's *t*-test 分析法比較各處理組與對照組值之組間差異，倘數值 $P < 0.05$ 則具顯著性差異。

結果與討論

本試驗利用 Buehler 皮膚局部塗抹貼覆的測試方法，評估由國內自行配製之 80%快得寧水分散性粒劑之皮膚過敏性反

應。乃由於各種新配製或新合成農藥使用或操作時常忽略皮膚安全防護措施，極易造成皮膚重複暴露藥劑的特性，導致過敏反應。評估接觸性皮膚過敏反應，最早由 Landsteiner 及 Jacobs⁽¹⁵⁾以皮內注射之方式，將 nitro-chlorosubstituted benzene 藥劑打到天竺鼠體內，數天後再進行皮下激發試驗，可誘發出接觸過敏性皮膚炎。其後 Landsteiner 及 Chase⁽¹⁴⁾使用低分子量的化學物質致敏化天竺鼠，並建立藉由半抗原與蛋白質的作用後成為完全抗原的理論基礎。雖然過敏性疾病產生的免疫機制不盡相同，但過敏反應的產生皆需經過兩個共通的階段⁽²¹⁾，首先為誘發階段(induction phase)，敏感個體首先需經足夠過敏原的刺激，並引發起始之免疫反應，又稱為致敏化過程(sensitization period)，其後經敏感化的個體，再次接觸到相同之過敏原，則會引發更快速且較為強烈的第二次免疫反應，並出現臨床症狀及炎症反應，該階段稱為激發期(challenge phase)。而化學藥劑致過敏性評估之 Buehler 試驗方法，乃依據二階段藥劑重覆刺激誘發接觸部位產生過敏性皮膚炎，此方法所偵測之藥劑陽性過敏百分率與人類結果相接近，為目前常被採用的試驗方式之一^(16, 21)。

試驗期間第 1-5 週，雖然各組之間對天竺鼠體重無顯著性影響，但是 DNCB 陽性處理組之平均體重在第 4 週開始低於對照組，至第 6 週則可見天竺鼠體重明顯減輕(圖二)。在臟器重量分析方面，快得寧水分散性粒劑及 DNCB 處理組對天竺鼠脾臟重具顯著之影響(表一)，其原因應與脾臟免疫反應有關，其中 DNCB 陽性組於白血球分類結果中具促使淋巴球百分比數量上升趨勢；而快得寧處理組則未造成淋巴球數量百分比之明顯改變(表四)。經由實驗 1 篩選與確認藥劑的刺激濃度之主要目的，為以微皮膚刺激性反應增加藥物潛在的皮膚過敏反應表現，而以無刺激濃度來避免皮膚



圖二、DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之體重變化，附加*者表示與對照組相較具顯著性差異($P<0.05$)。DNCB 處理組體重之數值與對照組相較具顯著性差異。

Fig. 2. Body weight (g) change of guinea pig treated with DNCB and 80% oxine copper WG. *significant difference compared with control group at $P<0.05$. The value of body weight (g) of guinea pig treated with DNCB was significantly higher than that of control.

表一、DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之臟器重變化¹⁾

Table 1. Organ weight (g) change¹⁾ of guinea pig treated with DNCB and 80% oxine copper WG

Organs/Group	Control	DNCB	80% Oxine copper
Thymus	0.08±0.03	0.11±0.04	0.09±0.02
Spleen	0.66±0.03	0.82±0.11*	0.49±0.07 ²⁾
Liver	21.49±5.22	18.32±3.21	18.60±4.03
Kidney	3.51±0.21	3.71±0.49	3.09±0.22
Lung	3.06±0.16	2.95±0.14	3.09±0.44
Heart	1.72±0.09	1.78±0.24	1.59±0.13

¹⁾ Values are expressed as mean ± S.D.

²⁾ Significant difference compared with control group at $P<0.05$.

表二、在第六週貼覆物處理後第 24 及 48 小時，評估 DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之皮膚反應

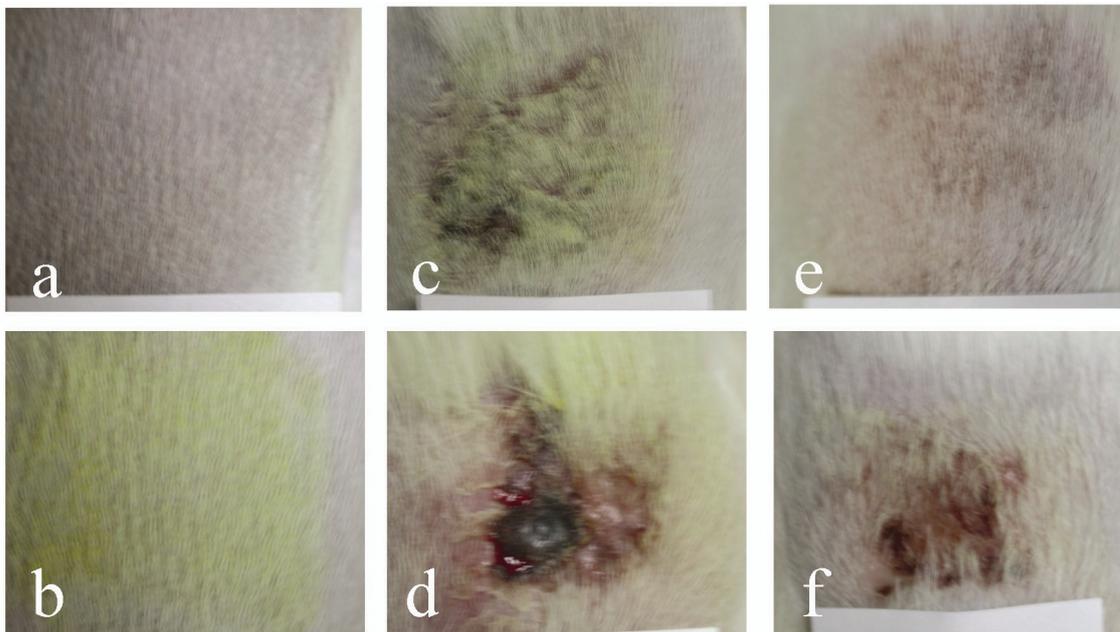
Table 2. Scoring of dermal reaction treated with DNCB and 80% oxine copper WG after patch removal 24 and 48 hours at 6th week in guinea pig

Group	Time (hr)	Animal No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	24	0/0 ¹⁾	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	48	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
DNCB	24	1/1	2/1	2/1	3/2	1/1	2/1	1/1	2/1	2/1	1/1
	48	1/1	1/1	1/1	4/2	1/1	2/1	1/1	1/1	2/1	1/1
80% Oxine copper	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	48	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

¹⁾ Data in parentheses indicate erythema score/edema score.

病兆影響觀察之判讀，其中皮膚包紮 6 小時顯示稀釋與未稀釋濃度均不具有微皮膚刺激性，而皮膚包紮 24 小時需稀釋至 8 倍才不具刺激性。第 1-3 週以未稀釋 80% 快得寧水分散性粒劑覆蓋右腰窩部皮膚 6 小時後；第 5-6 週分別以稀釋 8 倍不具刺激性之藥劑濃度覆蓋左腰窩部皮膚 24 小時後，分別觀察快得寧水分散性粒劑於各週處理後，第 24 及 48 小時對天竺鼠左腰與右腰窩部皮膚顯示均無明顯紅腫反應。而 DNCB 陽性對照組則於第 6 週處理後 24 小時出現中至強度紅斑及浮腫，至第 48 小時

則形成痂皮(圖三、表二)。在血液學分析方面，快得寧水分散性粒劑及 DNCB 處理組對天竺鼠之紅血球總數、血球容積比、血色素、平均血球容積及白血球總數與對照比較均無明顯差異(表三)。由於嗜伊紅性球可作為過敏反應評估的重要指標，因此進行白血球分類計數，結果顯示，快得寧水分散性粒劑對天竺鼠之淋巴球、單核球、嗜鹼性球、嗜中性球及嗜伊紅性球等比例與對照組比較均無明顯差異，但 DNCB 處理組則對天竺鼠之淋巴球百分比有明顯增加之情形(表四)。



圖三、Buehler 測試法。空白對照組(a)及 DNCB 陽性藥劑組各試驗週(b-f)經除去貼布後第 48 小時天竺鼠之皮膚過敏性變化。第 1 週致敏期皮膚呈輕微紅腫反應(b)，第 2(c)及第 3(d)週致敏期皮膚呈中度至強度反應，第 5(e)及第 6(f)週激發期皮膚則呈輕微至中度反應。

Fig. 3. Buehler test. Dermal sensitization change of guinea pig treated with blank control (a) and DNCB (b-f) positive control 48 hours after patch removal. The skin of guinea pig showed slight dermal reaction at 1st week of induction phase (b). The skin showed moderate to severe dermal reaction at 2nd week(c) and 3rd week (d) of induction phase. The skin showed slight to moderate dermal reaction at 5th week (e) and 6th week (f) of challenge phase.

表三、DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之血液學變化¹⁾Table 3. Hematological change¹⁾ of guinea pig treated with DNCB and 80% oxine copper WG

Parameters/Group	Control	DNCB	80% Oxine copper
RBC ²⁾ (10 ⁶ /dL)	5.1±0.2	5.4±0.2	5.2±0.2
Hct ³⁾ (%)	41.2±1.6	44.6±1.9	42.2±2.0
Hb ⁴⁾ (g/dL)	14.6±0.3	15.5±0.8	14.9±0.6
MCV ⁵⁾ (fL)	81.5±1.3	82.8±1.8	80.9±0.5
WBC ⁶⁾ (10 ³ /dL)	7.5±1.3	6.5±2.5	8.7±2.7

¹⁾ Values are expressed as mean ± S.D.

²⁾ RBC: red blood cell.

³⁾ Hct: hematocrit.

⁴⁾ MCV: mean corpuscular volume.

⁵⁾ WBC: white blood cell.

⁶⁾ Hb: hemoglobin.

表四、DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之白血球分類計數變¹⁾Table 4. WBC differential count change¹⁾ of guinea pig treated with DNCB and 80% oxine copper WG

Parameters/Group	Control	DNCB	80% Oxine copper
Monocyte (%)	3.8±2.7	2.1±2.0	3.5±1.5
Lymphocyte (%)	36.5±8.5	55.1±18.3	28.9±11.3
Neutrophil (%)	54.4±8.2	35.6±11.8	61.5±8.4
Eosinophil (%)	5.4±2.0	7.1±8.2	6.1±4.7
Basophil (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

¹⁾ Values are expressed as mean ± S.D.

在血清生化分析方面，雖然快得寧水分散性粒劑及 DNCB 處理組對血清生化分析項目與對照相較均無顯著性差異(表五)，惟此數據可提供較詳細天竺鼠血清生化數值供其他研究者參考；在皮膚組織病理變化方面，快得寧水分散性粒劑處理組除於真皮層組織中有嗜伊紅性球浸潤較多外，並無明顯皮膚病變(組織圖片未呈現)，而嗜伊紅性球則呈現顯著性增加現象，其可能影響與非特异性皮膚刺激反應有關，唯此反應尚未引發顯著的皮膚病兆，有待進一步評估。而 DNCB 處理組則導致明顯接觸性過敏性皮膚炎，表現出皮膚過度角化及棘皮層增厚，伴隨真皮層局部出血且有淋巴球、嗜伊紅性球(圖四)及少數肥胖細

胞(圖五)浸潤於病兆區內，同時病變區出現慢性炎症修補反應，可見纖維芽細胞及結締組織增生等變化(圖六)。綜合以上結果顯示，經由 Buehler 測試方法評估 DNCB 及 80%快得寧水分散性粒劑之皮膚過敏反應，顯示由國內配製之 80%快得寧水分散性粒劑對天竺鼠不具明顯皮膚過敏反應，而 DNCB 處理組則可誘發明顯接觸性過敏性皮膚炎。快得寧藥劑殺菌作用機制為銅離子阻礙脫氫醇素，其不具明顯皮膚過敏反應，與其物化性質為一對光、紫外線及熱安定，經由皮膚吸收程度差等特性有關。根據 Coombs 和 Gell 分類法定義之過敏反應⁽²⁾，依其免疫作用不同可區分為四種類型，分別為第一型立即型過敏反應

表五、DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組對天竺鼠之血清生化數值變化¹⁾
 Table 5. Biochemical parameters change¹⁾ of guinea pig treated with DNCB and 80% oxine copper WG

Parameters/Group	Control	DNCB	80% Oxine copper
ALP ²⁾ (U/L)	167.5±17.7	140.0±41.2	171.0±23.8
ALT ³⁾ (U/L)	40.2±7.1	40.7±5.3	48.1±16.1
AST ⁴⁾ (U/L)	61.9±23.5	70.5±48.4	143.8±120.3
Total bilirubin (mg/dL)	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0
BUN ⁵⁾ (mg/dL)	19.8±3.1	22.6±1.5	18.4±1.8
Cholesterol (mg/dL)	52.5±10.4	45.8±8.2	42.8±9.0
Creatinine (mg/dL)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1
γ-GT ⁶⁾ (U/L)	21.8±4.1	23.0±9.0	19.8±6.2
Glucose (mg/dL)	220.5±27.0	198.8±45.1	226.0±20.2
Phosphorus (mg/dL)	7.4±0.5	7.2±0.6	6.9±0.9
Total protein (g/dL)	4.9±0.2	5.0±0.4	4.7±0.3
Calcium (mg/dL)	10.1±0.7	10.0±0.7	9.8±0.3

¹⁾ Values are expressed as mean ± S.D.

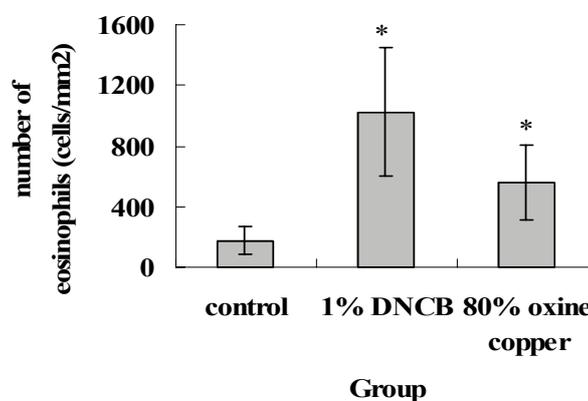
²⁾ ALP: alkaline phosphatase.

³⁾ ALT: alanine aminotransferase.

⁴⁾ AST: aspartate aminotransferase.

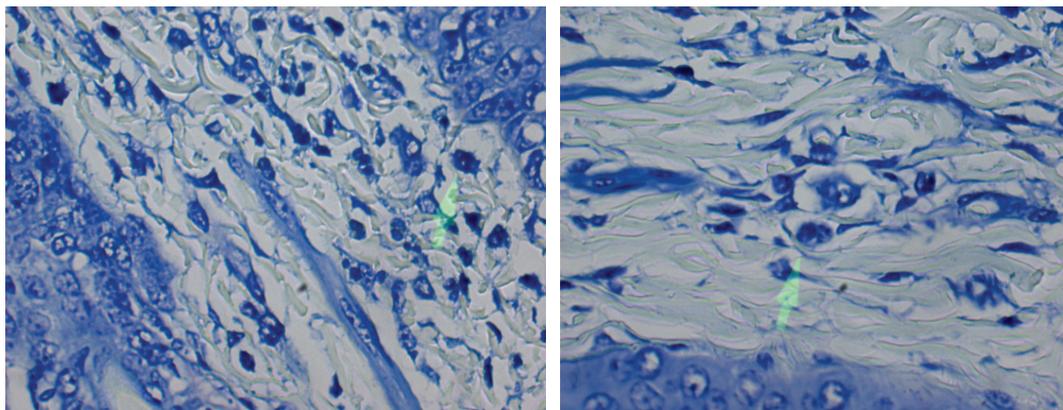
⁵⁾ BUN: blood urea nitrogen.

⁶⁾ γ-GT: γ-Gluatamyltransferase.



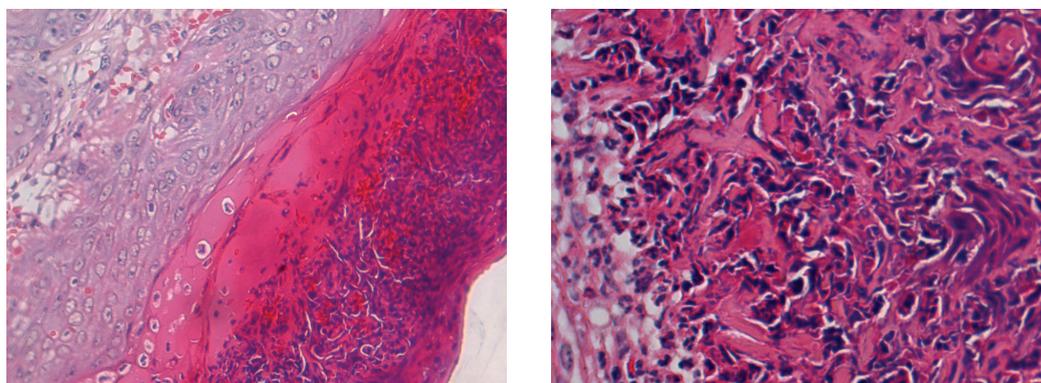
圖四、天竺鼠皮膚組織每單位面積中嗜伊紅性球之數值，附加*者表示與對照組相較具顯著性差異($P<0.05$)。DNCB 與 80%快得寧水分散性粒劑處理組嗜伊紅性球之數值與對照組相較具顯著性差異。

Fig. 4. Values are expressed as mean (total field of eosinophils of guinea pig skin) ± S.D., *significant difference compared with control group at $P<0.05$. The value of eosinophils of guinea pig treated with either DNCB or 80% Oxine copper was significantly higher than that of control.



圖五、DNCB 處理組對天竺鼠皮膚組織病理變化(甲苯胺藍染色, 400X)。箭頭顯示在皮膚真皮層中可見少數肥胖細胞浸潤於病兆區。

Fig. 5. Histopathological change of guinea pig treated with DNCB (Toluidine blue stain, 400X). Arrow showed few mast cells infiltration in lesion area of dermis layer.



圖六、DNCB 處理組對天竺鼠皮膚組織病理之變化(H&E 染色, 100 或 400X)。在表皮層中可見皮膚過度角化與淋巴球及嗜中性球浸潤等皮膚炎症反應, 並可見纖維母細胞及結締組織增生現象。

Fig. 6. Histopathological change of guinea pig treated with DNCB (H&E stain, 100 or 400X). The epidermis showed hyperkeratosis with some lymphocytes and neutrophils infiltration, and fibroblasts and connective tissue proliferation.

(Type I immediately allergic reaction)、第二型抗體媒介細胞毒性過敏反應(Type II antibody-dependent cytotoxicity allergic reaction)、第三型免疫複合體媒介型過敏反應 (Type III immune-complex mediated allergic reaction)及第四型遲發型過敏反應 (Type IV delayed allergic reaction)。本研究試驗中 DNCB 所誘發的過敏反應即為第四型過敏反應, 其潛伏期約 2 至 14 天, 主要

由 Th_1 淋巴細胞媒介造成接觸性皮膚炎 (ACD), 其機制為當 Th_1 細胞上的抗原接受器及相關附屬結合體(CD28 ligand)與抗原呈獻細胞將過敏原呈獻作用相結合後, 便開始製造相關細胞激素(IFN- γ 等), 以影響其它有關之免疫細胞, 而引發延遲型皮膚過敏反應^(8, 22)。

化學藥劑致過敏性評估除了本研究使用的 Buehler 試驗方法外, 近年來尚有較簡

易且快速之其它活體內(in vivo)方法,其優點是節省時間、人力及試驗成本,此活體內評估法常以對淋巴球功能具指標作用之局部淋巴結分析試驗(MLLNA)法^(11, 18),檢測體內淋巴球增殖及分化速率或利用巨噬細胞趨化(chemotactic factor)及抑制作用(macrophage inhibitory factor)或細胞毒性(cytotoxicity)等作為各種化學物質、外用藥劑及化妝品過敏性指標,以進行快速篩檢。MLLNA 等方法雖然簡單,但與動物或人體皮膚過敏反應試驗之符合性僅有70%^(4, 20),究其原因為接觸性過敏性皮膚炎的產生涉及全身免疫系統反應及體內賀爾蒙的影響,例如類固醇之多寡會抑制免疫系統,產生不同結果之差異性。雖然利用MLLNA 等作為過敏性評估指標時,仍需與動物皮膚過敏反應等試驗作一整合性配合,才能較正確評估一物質之潛在過敏性^(12, 17)。但兩種小鼠測試系統包括小鼠耳朵腫脹試驗(MEST)及 MLLNA 試驗,最近幾年仍常作為皮膚致敏原之初步篩選^(11, 18, 21),尤其針對農藥配方之中除了主成分之外,其餘大部分為佐劑(或稱惰性成分 inert/other ingredients)成分。這些農藥產品中的佐劑成分往往不只一種,其含量甚至常較主成分高,但人們常忽略這些農藥佐劑使用之安全性。因此,對於上百種農藥佐劑的皮膚過敏安全性評估,先利用篩選式小鼠 MEST 及 MLLNA 致敏原測試系統,將是未來重要的研究課題之一。

謝 辭

本研究承蒙農委會農業藥物毒性試驗所科技計畫 95 農科-13.2.3-藥-P1(6)之經費補助,本組張淑滿小姐、湯秀枝小姐及劉清標先生等協助實驗之進行,謹此誌謝。

引用文獻

1. Büehler, E. V. 1964. A new method for detecting potential sensitizers using the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6: 341.
2. Coombs, R. R. A., and Gell, P. G. H. 1968. Classification of allergic reactions responsible for drug hypersensitivity reactions, pp. 575-596. *In: R. R. A. Coombs & P. G. H. Gells [eds.], Clinical Aspects of Immunology*, second ed. Davis, Philadelphia, PA.
3. Draize, J. H., Woodward, G., and Carvery, H. O. 1944. Methods for the study of irritation and toxicology of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 83: 377-390.
4. Edwards, D. A., Soranno, T. M., Amoroso, M. A., House, R. V., Tummey, A. C., Trommer, G. W., Thomas, P. T., and Ribeiro, P. L. 1994. Screening petrochemicals for contact hypersensitivity potential: A comparison of the murine local lymph node assay with guinea pig and human test data. *Fund. Appl. Toxicol.* 23: 179-187.
5. Environmental Protection Agency Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington D.C. 1998 (August). Skin Sensitization (OPPTS 870.2600). OPPTS Harmonized Test Guidelines. USA.
6. Esther, P., and Howard, M. 1994. Dermatotoxicology, pp. 773-785. *In: A. W. Hayes [ed.], Principles and Methods of Toxicology*. 4th ed. Raven Press, New York, USA.
7. Flint, M. S., Dearman, R. J., Kimber, I., and Hotchkiss, S. A. M. 1998. Production and in situ localization of

- cutaneous tumour necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* 10: 213-219.
8. Gad, S. C., and Searle, G. D. 1988. A scheme for the prediction and ranking of relative potencies of dermal sensitizers base on data from several systems. *J. Appl. Toxicol.* 8: 361-368.
 9. Gerberick, G. F., and Sikorski, E. E. 1998. *In vitro* and *in vivo* testing techniques for allergic contact dermatitis. *Am. J. Cont. Dermat.* 9: 111-118.
 10. Holliday, M. R., Dearman, R. J., Basketter, D. A., and Kimber, I. 1996. Stimulation by oxazolone of increased IL-6, but not IL-10, in the skin of mice. *Toxicology* 106: 237-242.
 11. Ikarashi, Y., Kaniwa, M., and Tsuchiya, T. 2002. Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs. *Biomaterials* 23: 4907-4914.
 12. Klecak, G. 1991. Identification of contact allergens: predictive tests in animals, pp. 363-413. *In: F. N. Marzulli & H. I. Maibach [eds.], Dermatotoxicology.* 4th ed. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA.
 13. Lalko, J., and Api, A. M. 2006. Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. *Fd. Chem. Toxicol.* 44: 739-746.
 14. Landsteiner, K., and Chase, M. W. 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple chemical compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 288-390.
 15. Landsteiner, K., and Jacobs, J. 1935. Studies on sensitization of animal with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61: 643-656.
 16. Liao, J. W., Tsai, S. F., and Wang, S. C. 1996. Dermal sensitization of technical chlorpyrifos in guinea pigs. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb.* 66: 297-305.
 17. Marzulli, F., and Maguire, H. C. 1982. Usefulness and limitations of various guinea pig test methods in detecting human skin sensitizers validation of guinea pig tests for skin hypersensitivity. *Ind. Chem. Toxicol.* 20: 67-74.
 18. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 1992 (July). Skin Sensitization Section 4: Health Effects: 406. Guidelines for Testing of Chemicals. Paris.
 19. Partrick, E., and Maibach, H. 1994. *Dermatotoxicology*, pp. 767-796. *In: A. W. Hayes [ed.], Principles and Methods of Toxicology.* 4th ed. Raven Press, New York.
 20. Robinson, M. K., and Cruze, C. A. 1996. Preclinical skin sensitization testing of antihistamines: Guinea pig and local lymph node assay responses. *Fd. Chem. Toxicol.* 34: 495-506.
 21. Maurer, T. 2007. Guinea pigs in hypersensitivity testing. *Methods* 41: 48-53.
 22. Wang, L. F., Wu, J. T., and Sun, C. C. 2002. Local but not systemic administration of IFN- γ during the sensitization phase of protein antigen immunization suppress Th2 development in a murine model of atopic dermatitis. *Cytokine* 19: 147-152.

ABSTRACT

Wu, W. J., Yang, C. H., Hwang, J. S., and Tsai, S. F.* 2007. Evaluation of dermal sensitization of Oxine copper in guinea pigs. Plant Prot. Bull. 49: 153-165 (Applied Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC))

This study is aimed to evaluate the dermal sensitization of various new formulated or synthesized compound and provide the important information for people who handle these chemicals or other users. Experiments were carried out according to the internationally approved Böhler test, using skin patch method in guinea pigs to evaluate the dermal sensitization of domestically formulated 80% Oxine copper. Studies were performed by experiment I and experiment II. Experiment I were applied to select and confirm irritant concentrations for the Experiment II. Experiment II, undiluted 80% Oxine copper was used at the 1st, 2nd and 3rd week of the induction phase. There was no chemical applied at the 4th week and the challenge phase was performed at the 5th and 6th week. The dermal sensitizing chemical, 2,4-dinitro-1-chlorobenzene (DNCB), was used as the positive control. The test items included in this study were skin erythema and edema reaction, hematology analysis, serum biochemical analysis and histopathologic observations. The domestically formulated Oxine copper applied to the left waist skin of guinea pig did not show obvious erythema or edema reaction at 24th and 48th hour at every test weeks, whereas the DNCB positive control exhibited pathological changes of moderate to severe erythema, edema and eschar at 48th hour. The hematological data did not indicate any significant change in total red blood count, hematocrit or hemoglobin in Oxine copper treated group compared with the blank control group ($P>0.05$). The leukocyte differential count also did not show significant difference in lymphocytes, neutrophils or eosinophils in Oxine copper treated group compared with the blank control group ($P>0.05$). However, there was a significant increase in lymphocytes in DNCB group compared with blank control group. The serum biochemical assay showed no significant changes in alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, total protein and calcium in both Oxine copper treated and DNCB groups. Histopathological observations revealed no obvious skin pathological changes except for an increase in eosinophils in Oxine copper treated group. However, DNCB caused obvious contact hypersensitivity dermatitis, with hyperkeratosis and acanthosis. There was also hemorrhage in the dermis accompanied by infiltration of lymphocytes, eosinophils and few mast cells in lesion areas. Chronic repair inflammation reaction such as fibroblasts and connective tissue proliferation also occurred in these areas. The comprehensive tests carried out in this study showed no significant dermal sensitization reaction of domestically formulated 80% Oxine copper in guinea pigs.

(Key words: Oxine copper, dermal sensitization, guinea pig)

*Corresponding author. E-mail: sftsai@tactri.gov.tw

