

白殭菌 A1 在基因與非基因途徑 之致癌潛力剖析

李彥芸 王雲鶴 詹玲琴 蔡寶隆 游碧堉*

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 應用毒理組

(接受日期：2007 年 2 月 16 日)

摘 要

李彥芸、王雲鶴、詹玲琴、蔡寶隆、游碧堉* 2007 白殭菌 A1 在基因與非基因途徑之致癌潛力剖析 植保會刊 49 : 57 – 74

本研究以基因與非基因途徑的短期試驗，篩檢白殭菌 (*Beauveria bassiana*) A1 的致變異/致癌潛力，以評估其對人體健康的安全性。動物活體以定量孢子懸浮液經胃管灌注處理；離體試驗則以一定蛋白含量之孢液 (spore lysate) 處理，並經換算為孢子相對劑量，以比較不同試驗體系之間的劑量與毒性反應關係。白殭菌 A1 在 $0.5 \sim 10 \times 10^6$ 孢子相對量範圍，對沙門菌組胺酸基因無鹽基置換、框構位移及赭石突變反應；對枯草菌的 DNA 無傷害影響；對倉鼠卵巢細胞的 DNA 與染色體亦無顯著之傷害。小鼠口服 $2.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ spores/kg bw 白殭菌 A1，對紅血球母細胞的染色體斷裂及紡錘體結構亦無傷害影響。白殭菌 A1 經以上四種基因毒性篩檢結果皆無致變異性反應。在非基因途徑方面：白殭菌 A1 對人體血癌細胞株 HL60 並無促進細胞增殖的影響，但對細胞凋亡與分化有顯著的促進作用，後兩項標竿意味著白殭菌 A1 對於啓始癌化的細胞有輕微的抑制優點。白殭菌 A1 經以上七種短期試驗篩檢及劑量反應關係的剖析結果：此本土蟲生真菌對人體細胞應無致癌之毒性風險，其安全性值得開發為商品化的微生物農藥。

(關鍵詞：白殭菌 A1、基因毒性、非基因毒性、致癌潛力剖析)

緒 言

鑑於大量濫用化學合成農藥造成的環境衝擊，改用天然有效成份類型的農藥已

漸獲共識。近幾年來在美國登記的百餘種天然有效成份農藥類中，除少數無機化合物以外，生物性天然產物佔八成以上，如植物萃取物、基因轉殖植物、昆蟲性費洛蒙、微生物（泛指真菌、藻類、細菌或病

* 通訊作者。E-mail: yby@tactri.gov.tw

毒) 等, 已被廣泛應用於調節作物生長、忌避與誘引害蟲、抑制病原菌與雜草生長、或提高作物免疫力等⁽³⁶⁾。尤其微生物農藥中的蟲生真菌, 由於對目標害物的專一性與對哺乳動物的低急毒性, 已漸為各國積極開發的主力, 台灣本土的黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae*)、綠殭菌 (*Nomuraea rileyi*)、白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 等^(3, 14), 對鞘翅目、鱗翅目、同翅目、半翅目、膜翅目、雙翅目、直翅目及蟎類等重要害蟲皆具防治效果⁽¹⁾。其中, 白殭菌對於甜菜夜蛾、蚜蟲、紋白蝶、甘藷蟻象、玉米螟、大豆食心蟲、細緣椿象、馬鈴薯葉甲蟲、金龜子幼蟲、蟎、蘋果蛀心蟲、松毛蟲和蟻害等皆具防治效果^(1, 3, 14)。

國際間對於微生物農藥使用的安全性考量, 以其在環境中的消退、對非目標生物的危害、以及對人體健康的影響為主, 依照申請登記的使用條件而要求審核不同程度的毒性評估資料。以美國環保署 (USEPA) 的三階段審核流程為例: 第一階段即要求動物的口服與皮膚急毒性、免疫毒性與基因毒性, 而新登記的微生物農藥在未被證實安全之前, 大多不開放使用在食用作物, 也嚴格限定在特定地域使用, 並且要求使用者需戴防護衣物。雖然在某些微生物農藥的核准特例直接以齧齒類動物之無致病性試驗結果而未訂容許量, 但仍為"有條件"核准登記使用。舉如黑殭菌 ESC1 與 F52 品系^(33, 35), 對大鼠、兔子的口服、皮膚、呼吸皆無急性致死與致病性, 對非目標昆蟲亦無毒殺性, 但仍限用於旱地且未推薦在食用作物上; 綠殭菌則尚未註冊登記; 在美國取得有條件登記的三種白殭菌品系 ATCC 74040·GHA 與 447^(28, 32, 34), 僅 GHA 被核准用於食用作物上, 其它微生物農藥在推廣到食用作物之前, 將視情況要求增審毒理試驗項目。

有關我國本土的白殭菌 A1 之安全性

評估資料, 僅知其對大鼠無急性致死及致病影響⁽²⁾, 如欲推廣到國際市場, 則其對人體健康的致癌潛力評估資料實待補強。本研究以經濟合作發展組織 (OECD) 與 USEPA 都推薦的沙門菌基因回復突變 (*Salmonella*/microsomal reverse mutation, 即 Ames test)^(21, 29)、枯草菌重組檢定 (Rec assay)^(13, 17)、倉鼠卵巢細胞株 (CHO) 之姊妹染色體交換 (sister chromatid exchanges, SCE)^(22, 30)、以及小鼠微核測試 (mouse micronucleus test)^(23, 31) 等四種基因毒性 (genetic toxicity) 試驗來篩檢白殭菌 A1 的致變異潛力, 並以人體血癌細胞株 (HL60) 為材料, 檢測白殭菌 A1 對細胞的凋亡 (apoptosis)、增殖 (proliferation) 與分化 (differentiation) 等非基因途徑 (epigenetic) 的促癌或抑癌影響, 以綜合剖析白殭菌 A1 的致癌潛力。

材料與方法

化學藥品及試劑:

9-Aminoacridine (9AA)、2-aminoanthracene (2AAT)、2-aminofluorene (2AF)、biotin、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、chloramphenical (CRP)、cyclophosphamide (CP)、ethylmethane sulfonate (EMS)、mitomycin C (MMC)、4-nitroquinoline-*N*-oxide (4NQO) 及 sodium azide (SA) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。Nutrient broth (NB) 及 Bacto agar 購自 Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)。Tryptophan pyrolysate 1 (Trp-P-1, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido (4,3-b) indole acetate) 購自 Wako (Osaka, Japan)。Colcimid·McCoy's 5A 與 Iscove's Modified Dulbecco (IMD) 培養基、以及胎牛血清購自 Gibco BRL (Gaithersburg, MD or Grand Island, NY)。V8 培養基購自 Campbell (Camde, NJ, USA)。生理食鹽水購自信東生

技 (桃園、臺灣)。單株抗體 CD14-PE、CD66b-FITC 與 CD71-FITC 皆購自 Beckman Coulter Immunotech (Marseille Cedex, France)。BrdU Flow Kit 與 Mouse MicroFlow^{PLUS} Kit 皆購自 BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)，前者主要內含 FITC-BrdU-Ab，後者內含甲醇、抗凝血劑、碳酸氫鈉緩衝液、RNase (1 mg/ml)、FITC-ATR-Ab、2.5 µg/ml propidium iodide (PI)、及流式細胞儀校正用血液樣品。其餘試劑或試藥購自 E. Merck (Darmstadt, Germany)。

白殭菌 A1 之培養與孢子 (spore) 和孢液 (spore lysate) 之收集：

白殭菌 (*B. bassiana*) A1 (本所生藥組提供) 以 20% V8 agar 斜面培養基於 26~28 °C 培養 7~10 天，經淋洗與離心沈降收集孢子，以血球計數器計數後以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 懸浮孢子，定量到 10^8 spores/ml。比照一般微生物在液體培養基之生長常於 10^8 cfu 達到生長遲滯點 (lag phase of growth)，故以 10^8 spores/ml 白殭菌 A1 之孢子懸浮液做為活體 (*in vivo*) 試驗之最高投藥用量的上限。而在離體試驗 (*in vitro*) 時，由於未知細菌或細胞等試驗材料對白殭菌孢子的內噬作用 (endocytosis)，故以定量孢子萃取孢液並測定其蛋白含量後再處理試驗材料。每批收集之白殭菌孢子懸浮液定量至 10^8 spores/ml 後，置冰浴以超音波 (Vibra CellTM, Sonicis & Materials Inc.) 震碎，離心 (10,000 ×g) 收集上層孢液並測其蛋白含量，此收集之孢液蛋白含量約在 0.8~1.2 mg/ml，每批收集之孢液最後以加無菌水稀釋或冷凍乾燥濃縮至蛋白含量為 1 mg/ml，試驗時以孢液容積不超過菌種或細胞培養基之 10% 為上限。白殭菌 A1 處理劑量之孢液與孢子相對量換算基準為 1×10^{-5} µg protein/spore。

白殭菌 A1 孢液對沙門菌基因回復突變影響試驗：

依 OECD⁽²¹⁾ 與 USEPA⁽²⁹⁾ 試驗規範：以沙門菌 (*S. typhimurium*) TA98、TA100、TA1535、TA1537 及 TA102 菌株 (購自 ATCC, USA) 檢測試驗物質對菌種組胺酸基因 (*his*⁻) 之致變影響。各菌種皆以 1.2、3.7、11.1、33.3 及 100 µg/plate 白殭菌 A1 孢液處理 5 重複培養盤，經選汰培養 (1.5% bacto-agar, 2% glucose 於 Volgel-Bonner 溶液) 2 天後，計數回復突變 (*his*⁺) 菌落數。試驗結果依 Maron 與 Ames 方法⁽¹⁹⁾，以最小顯著差異法 (least significant difference, LSD) 分析白殭菌孢液對菌種基因變異影響的差異顯著性，並以線性迴歸分析劑量反應關係，若有 2 個以上之劑量處理顯著增多任一菌種的平均回復突變數 2 倍以上，且劑量反應關係顯著者，視為具有致變異性反應。同時，試驗也以 Aroclor® 1254 誘增大鼠 (SD Narl 品系，購自樂斯科、宜蘭) 肝臟微粒體代謝酵素表現並製備成 S9 混合液⁽¹⁹⁾，於沙門菌基因回復突變試驗時，白殭菌 A1 孢液另加 0.25 ml/plate S9 混合培養，以模擬其經哺乳動物肝臟酵素代謝後的可能轉化。試驗過程不加 S9 處理時，五種供試菌株皆以 0.1 ml/plate 無菌去離子水之空白 (blank) 處理，做為陰性對照 (negative controls)；陽性對照 (positive controls) 則以 0.5 µg/plate 4NQO 處理 TA98 與 TA100 菌種，0.5 µg/plate SA 處理 TA1535 菌種，250 µg/plate 9AA 處理 TA1537 菌種，以 0.5 µg/plate MMC 處理 TA102 菌種。而試驗過程加 0.25 ml/plate S9 處理時，五種供試菌株以另加 0.1 ml/plate 無菌水為陰性對照；陽性對照則以另加 5 µg/plate 2AF 分別處理 TA98、TA100、與 TA1535 菌種，以另加 10 µg/plate 2AAT 分別處理 TA1537 與 TA102 菌種。

白殭菌 A1 孢液對枯草菌之 DNA 傷害影響試驗：

參考 USEPA 基因毒理綱領⁽²²⁾，以枯草菌 (*B. subtilis*) M45 (*rec 45 arg try*) 與 H17 (*rec⁺ arg try*) 為材料 (購自 Institute for Fermentation, Japan)，菌種以 NB 培養基培養後，依斑點擴散測試法⁽¹³⁾：以 20 μ l 白殭菌 A1 孢液 (代謝轉化處理組另加 10 μ l S9) 分別滴在 H17 與 M45 菌地 (直徑 9 cm) 中央之無菌濾紙上，各處理重複 5 培養盤，於 37°C 培養 2 天後，量測藥劑經濾紙 (直徑 6 mm) 擴散對菌種殺傷所造成的生長抑制圈直徑。試驗結果依 Kada 等之方法⁽¹³⁾，比較相同劑量處理對兩菌種之生長抑制差異，若 M45-H17 顯著大於 5 mm 者視為正反應；小於 2 mm 者視為負反應；介於兩者之間者視為"疑正反應"。不論試驗加 S9 處理與否，皆以 20 μ l/disc 無菌去離子水為空白對照處理；以 6 μ g/disc CRP 為陰性對照處理。加 10 μ l/disc S9 處理與否的陽性對照則分別為 100 μ g/disc Trp-1 與 8 μ g/disc MMC。

白殭菌 A1 對細胞的姊妹染色體交換影響試驗：

CHO 細胞株 (獲贈自中央研究院詹崑源博士) 以含 10% 胎牛血清之 McCoy's 5A 培養基培養於 37°C 含 5% CO₂ 培養箱。白殭菌 A1 孢液以 1.2、3.7、11.1、33.3 及 100 μ g/ml 等劑量，依 Latt 等⁽¹⁶⁾ 之方法加 30 μ M BrdU 處理 CHO (加 S9 處理時參考 Stetka & Wolff⁽²⁶⁾ 之方法) 培養 22 小時後，加 0.2 μ g/ml colcemid 繼續培養 2 及 4 小時各收一次分裂中期細胞。收集之細胞依 Jan 等⁽¹²⁾ 之螢光加吉氏染色方法 (fluorescent plus Giemsa stain) 處理後，於顯微鏡 (1,000 \times) 下觀測每次收集之細胞各 30 組染色體之姊妹染色體交換數，結果以 LSD 及線性迴歸分析姊妹染色體交換之差異顯著性與劑量反應關係，依 OECD⁽²²⁾

及 USEPA⁽³⁰⁾ 規範：不論試驗物質經 S9 代謝轉化與否，若有 2 個以上之劑量處理顯著增多姊妹染色體交換平均數 2 倍以上且劑量反應關係顯著者，視為具有致變異性反應。試驗不加 S9 處理時，以每毫升培養基含 0.1 ml 無菌去離子水及 0.3 μ l EMS (即 3.14 mM) 分別為陰、陽性對照。每毫升培養基加 50 μ l/ml S9 處理之試驗則以另加 0.1 ml 無菌去離子水及含 0.01 mM CP 之處理為陰、陽性對照。

白殭菌 A1 在小鼠之微核試驗：

六週齡 ICR Narl 品系小鼠雌雄各 25 隻 (購自樂斯科、宜蘭)，各分 5 組標記後，粒狀飼料 (Lab Diet® 5001) 及逆滲水任鼠取用，馴養一週 (動物房溫控 22~28°C，相對濕度 50~70%，光暗循環各 12 小時)。參考 OECD⁽²³⁾ 及 USEPA⁽³¹⁾ 試驗規範，依動物體重胃管灌注 10 ml/kg bw 試驗物質溶液或懸浮液。五組動物之投藥處理分別為：10 ml/kg bw 生理食鹽水 (負反應對照)、2 mg/kg bw MMC (正反應對照)、白殭菌 A1 孢子 2.5 \times 10⁸ spore/kg bw (低劑量)、5 \times 10⁸ spore/kg bw (中劑量) 及 1 \times 10⁹ spore/kg bw (高劑量)。

每隻動物於投藥前 (0 小時) 與投藥後 48、72 小時 (MMC 處理組不收集 72 小時數據)，分別秤體重並由尾巴採靜脈血 120 μ l，依 Mouse MicroFlow^{PLUS} Kit 說明⁽¹⁸⁾：將血液樣品固定、清洗、及抗 FITC-ATR 抗體和 PI 染色後，以流式細胞儀 (FACS Calibur™, BD。含 CELLQUEST 軟體) 分析網狀紅血球 (reticulocyte, RET) 與正紅血球 (normochromatic erythrocytes, NCE) 數量，以及兩者含微核之血球數。各血液樣品進樣分析之血球數以 RET 達 20,000 個為止，重複進樣 3 次取平均讀值分析每隻動物之 RET 佔總紅血球含量百分率 (RET%) 供評估藥劑的血液毒性；以帶微核之 NCE 含量百分率 (Mn⁺NCE%) 做為

週邊血中含微核背景值；以帶微核之 RET 含量百分率 ($Mn^+RET\%$) 做為新生紅血球產生微核的指標。試驗結束時，動物以 CO_2 昏迷安樂犧牲後焚化處理。

各組動物之平均體重在相同採血時間點，雌雄之間的比較係以 T-test 統計分析其差異顯著性；相同性別在不同採血時間點之間的體重變化則以 paired-T 分析比較動物經投藥處理前後的體重差異顯著性。而由於紅血球之微核發生係屬稀有事件 (rare event)，新生網狀紅血球佔總紅血球比例亦低 (約 5%)，這些觀測參數之數據皆不呈常態分佈 (normal distribution)，故採無母數方法 (nonparametric methods) 予以統計分析：各組動物在相同採血時間點以 Mann-Whitney U (簡稱 U test) 檢定不同性別之間的差異顯著性；同組動物相同性別則以 Wald-Wolfowitz Runs (簡稱 Runs test) 檢定投藥前後之差異顯著性，顯著水準皆採 5%。

白殭菌 A1 對 HL60 之細胞凋亡影響測試：

HL60 細胞 (獲贈自中興大學楊秋英博士) 以含 10% 胎牛血清之 IMD 培養基培養於 CO_2 培養箱。分植 5×10^5 cells 於直徑 6 公分培養盤，以白殭菌 A1 孢液 5、10、20、50 及 100 $\mu g/ml$ 處理 2 天 (正對照處理 0.4 mM H_2O_2)，收集細胞以冰冷之 70% ethanol/PBS 固定 1 小時以上，經 PBS 水洗及離心收集後，於室溫以 0.5 ml RNase A (1 mg/ml) 及 1 ml PI (100 $\mu g/ml$) 避光處理 15 分鐘即置冰浴，最後以流式細胞儀分析各處理 10,000 個細胞中含 DNA 碎片之凋亡細胞含量百分率，每件細胞樣品重複進樣 3 次取其平均讀值。數據分析時，以空白對照組之平均相對螢光強度為基數，換算各處理組之凋亡細胞群倍增數。細胞經 3 重複試驗結果，以 LSD 分析各劑量處理與空白對照之間的差異性，以線性迴歸分析劑量反應關係。

白殭菌 A1 對 HL60 之細胞增殖影響測試：

培養 2×10^5 HL60 於直徑 6 公分培養盤，各以 3 重複之 5、10、20、50、100 $\mu g/ml$ 白殭菌 A1 孢液加 10 μM BrdU 培養 40 小時後，收集細胞以 PBS 洗兩次，依 BrdU Flow Kit 試劑組方法⁽⁴⁾ 經 FITC-BrdU-Ab 染色後，以流式細胞儀檢測 10,000 個細胞中含 BrdU 之增殖細胞群相對螢光強度，每件細胞樣品重複進樣 3 次取平均讀值，以空白對照組之平均螢光強度為基準換算各處理結果之細胞倍增率，再以 LSD 分析各處理與空白對照之間的差異性。

白殭菌 A1 對 HL60 之細胞分化影響測試：

參考 Verlinden 等方法⁽³⁷⁾：以 3 重複之白殭菌 A1 孢液 20、40、60、80 及 100 $\mu g/ml$ 處理 HL60 ($10^5/ml$) 細胞培養盤，6 天後收集細胞以 PBS 洗兩次分兩組測細胞表面抗原。一組以 CD14-PE 及 CD66b-FITC 抗體同時處理，於 4°C 避光反應 30 分鐘；另組以 CD71-FITC 抗體處理，經 1% paraformaldehyde 固定後，分別以流式細胞儀檢測 10,000 個細胞中，表現 CD71 (未分化細胞)、CD14 (分化為單核球或巨噬細胞)、及 CD66b (分化為顆粒球) 之細胞比率，每件細胞樣品重複進樣 3 次取平均讀值。以 χ^2 分析各處理結果與空白對照之間的分化細胞分佈差異，以線性迴歸分析各分化細胞群與處理劑量間的關係。

白殭菌 A1 之致癌潛力剖析：

為便於比較白殭菌 A1 之孢子或孢液處理在不同試驗之間，可有一致性的 "劑量" 處理基準，以孢液處理之試驗，依孢液蛋白含量經 1×10^{-5} μg protein/spore 換算為相對孢子處理量。動物試驗處理劑量使用之 kg 體重單位 (spores/kg bw) 則改用 g 為單位 (10^{-3} spores/g bw)。評估測試物對生物細胞之致癌潛力時，採二階段致癌作用 (two-step carcinogenesis) 模式：基因毒性屬於啟動變

異 (initiation) 階段；非基因毒性則屬促癌影響 (promotion) 階段。測試物的基因毒性與細胞增殖對致癌作用有促進的影響，致癌潛力剖析時，選其最低正反應劑量 (lowest positive-response dose, LPD) 或最高負反應劑量 (highest negative-response dose, HND)，由 0 劑量之基準線分別向上或下方繪製實心柱狀圖表示其致癌潛力。測試物對細胞有促進分化或引發凋亡者，對致癌作用有抑制的影響，則採與基因毒性相反之剖析策略。試驗結果對致癌作用既不促進也不抑制者，兼選 LPD 與 HND 橫跨基準線以空心柱狀圖表示。

結 果

白殭菌 A1 對沙門菌之基因變異影響：

白殭菌 A1 孢液的五個劑量處理 (1.2、3.7、11.1、33.3 與 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$) 造成沙門菌五株 TA 菌種的平均回復突變菌落數如表一：不論試驗加 S9 處理與否，已知的致變劑都極顯著增加沙門菌的回復突變菌落數 (T-檢定, $P < 0.01$)，而白殭菌 A1 的所有劑量處理既未顯著增多任何菌種 2 倍以上的回復突變菌落數，亦無顯著之劑量反應關係。依 OECD⁽²¹⁾ 與 USEPA⁽²⁹⁾ 之標準：白殭菌 A1 對沙門菌無基因變異影響。

表一、白殭菌 A1 孢液對沙門菌基因回復突變的影響¹⁾

Table 1. Effect of *Beauveria bassiana* A1 spore lysate on reverse gene mutation in *Salmonella typhimurium* TA strains¹⁾

Treatments	S9	TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102
Blank	N	23 \pm 3	152 \pm 6	10 \pm 4	6 \pm 1	171 \pm 16
PC ²⁾	N	625 \pm 25 ^{**}	> 2000 ³⁾	286 \pm 22 ^{**}	> 2000 ³⁾	1136 \pm 159 ^{**}
1.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$	N	29 \pm 5	114 \pm 14	7 \pm 2	8 \pm 2	161 \pm 8
3.7 $\mu\text{g}/\text{plate}$	N	25 \pm 5	115 \pm 15	10 \pm 1	10 \pm 7 ^{##}	190 \pm 10 [#]
11.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$	N	27 \pm 7	133 \pm 18	12 \pm 3	6 \pm 1	180 \pm 13
33.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$	N	26 \pm 4	119 \pm 16	10 \pm 2	7 \pm 2	195 \pm 7 ^{##}
100 $\mu\text{g}/\text{plate}$	N	23 \pm 5	131 \pm 22	11 \pm 2	7 \pm 2	204 \pm 9 ^{##}
Blank	Y	30 \pm 4	107 \pm 9	10 \pm 3	7 \pm 2	216 \pm 20
PC ²⁾	Y	611 \pm 34 ^{**}	586 \pm 39 ^{**}	198 \pm 39 ^{**}	288 \pm 14 ^{**}	537 \pm 79 ^{**}
1.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Y	27 \pm 4	120 \pm 21	9 \pm 3	7 \pm 2	225 \pm 30
3.7 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Y	33 \pm 4	116 \pm 10	9 \pm 2	8 \pm 3	245 \pm 14 [#]
11.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Y	32 \pm 3	130 \pm 7 [#]	11 \pm 2	9 \pm 3	239 \pm 20
33.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Y	32 \pm 3	129 \pm 12 [#]	8 \pm 3	7 \pm 1	221 \pm 20
100 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Y	30 \pm 6	134 \pm 12 ^{##}	10 \pm 3	10 \pm 3	214 \pm 14

¹⁾ Data of means \pm S.D. are calculated from 5 replicates. Within each column, the "***" notation represents significant difference ($P < 0.01$) between treated and blank control by t-test; "##" and "#" represent $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels of difference between spore lysate treatment and blank control by LSD analysis, respectively.

²⁾ Positive controls (PC) in assays without (N) S9 are 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 4NQO for TA98 and TA100, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ SA for TA1535, 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 9AA for TA1537, and 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ MMC for TA102. In assays with (Y) S9, positive controls are 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2AF for TA98, TA100 and TA1535, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2AAT for TA1537 and TA102.

³⁾ For revertant counts greater than 2000, the entry is given by ">2000" and no statistical analysis is deemed necessary.

白殭菌 A1 對枯草菌之 DNA 傷害影響：

枯草菌 H17 與 M45 培養盤，同時經 20 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 白殭菌 A1 孢液處理 2 天後的生長抑制圈表現結果如表二：不論試驗加 S9 與否，致變劑 MMC 與 Trp-1 都造成 M45 與 H17 的生長抑制差異大於 5 mm，如期得到正反應結果；而白殭菌孢液與無菌水之對照處理都對菌種沒有殺傷力，依 Kada 等⁽¹³⁾ 之標準：白殭菌 A1 孢液對枯草菌的 DNA 沒有傷害影響。

白殭菌 A1 對 CHO 細胞的姊妹染色體交換影響：

CHO 細胞經白殭菌 A1 孢液 1.2~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 處理兩世代後之姊妹染色體交換結果如表三：細胞在加與不加 S9 處理之染色體自然交換數 (SCEs/cell) 分別為 8.0 ± 1.0 及 8.1 ± 1.3 ，誘變劑 EMS 及代謝轉化的 CP 之處理則使 SCE 顯著增多為 $29.1 \pm$

5.9 及 17.3 ± 2.1 ($P < 0.01$)，在此正反應對照如期增多 2 倍以上 SCE 的相同試驗條件下，白殭菌 A1 孢液的五個劑量處理不論加 S9 與否，對細胞的 SCE 皆無影響 (LSD 分析差異不顯著)。

白殭菌 A1 孢子對小鼠紅血球之微核發生影響：

七週齡 ICR 小鼠經白殭菌 A1 孢子懸浮液胃管灌注前 (0 小時)、後 (48 或 72 小時) 的體重變化如表四。五組動物在各時間點的體重有性別上的差異顯著性 (T-檢定, $P < 0.05$)，故後續之參數分析皆採雌雄分開統計。雖然部分組別之動物在處理前後的體重變化有統計上的顯著增減 ($P < 0.05$)，但變化都小於 5%，在一般動物試驗仍被認為無不良影響的範圍 (10%) 內^(23, 31)，而試驗期間觀察動物的外觀活動與生理狀況 (如流涎、糞尿外觀、活動性、毛

表二、白殭菌 A1 孢液對對枯草菌 H17 與 M45 菌種之生長抑制影響

Table 2. Effect of *Beauveria bassiana* A1 spore lysate on growth inhibition of H17 and M45 strains in *Bacillus subtilis* on rec assay

Treatments ¹⁾	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	S9	Growth Inhibition Zone ²⁾		Difference (M45-H17)	Response ³⁾
			H17 (<i>rec</i> ⁺)	M45 (<i>rec</i> ⁻)		
Blank	20	N	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	0	-
CRP (NC)	6	N	15.0 ± 0.0	15.0 ± 0.0	0	-
MMC (PC)	8	N	31.0 ± 1.9	44.6 ± 0.9	13.6	+
<i>B. bassiana</i> A1	20	N	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	0	-
Blank	20	Y	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	0	-
CRP (NC)	6	Y	15.0 ± 0.0	15.0 ± 0.0	0	-
Trp-1 (PC)	100	Y	8.0 ± 0.0	13.8 ± 0.8	5.8	+
<i>B. bassiana</i> A1	20	Y	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	0	-

¹⁾ In both assays with (Y) and without (N) 10 $\mu\text{l}/\text{disc}$ liver S9, deionized water was used as blank control, chloramphenicol (CRP) as negative control, while tryptophan pyrolysate 1 (Trp-1) and mitomycin C (MMC) were used as positive controls.

²⁾ After 2 days treatment with *B. bassiana* A1 spore lysate, growth inhibition zones of bacterial lawn were measured (mm in diameter) on spot test. Default zone of the assay disc is 6-mm in diameter. Data of mean \pm S.D. were calculated from 5 replicates in each treatment.

³⁾ Based on Kada's criteria⁽¹³⁾, growth inhibition zone of less than 2 mm or larger than 5 mm is specified as negative or positive response, respectively.

表三、白殭菌 A1 孢液對 CHO 細胞之姊妹染色體交換影響¹⁾Table 3. Effect of *Beauveria bassiana* A1 spore lysate on sister chromatid exchanges (SCE) in CHO cells¹⁾

Treatments	Without liver S9		With liver S9	
	Mean \pm S.D.		Mean \pm S.D.	
Blank	8.1 \pm 1.3		8.0 \pm 1.6	
Positive control ²⁾	29.1 \pm 5.9 **		17.3 \pm 2.1 **	
<i>B. bassiana</i> A1				
1.2 μ g/ml	7.9 \pm 1.5		8.1 \pm 1.6	
3.7 μ g/ml	7.8 \pm 1.7		7.8 \pm 1.6	
11.1 μ g/ml	7.7 \pm 1.6		7.8 \pm 1.6	
33.3 μ g/ml	7.4 \pm 1.5		7.9 \pm 1.5	
100 μ g/ml	8.4 \pm 1.6		7.9 \pm 1.7	
LSD _($\alpha=0.05$)	0.56		0.57	
LSD _($\alpha=0.01$)	0.73		0.75	
R ³⁾	0.225		-0.521	

¹⁾ Means of SCEs/cell were calculated from 60 cells in each treatment. "***" denotes difference from blank control at $P < 0.01$ by T-test.

²⁾ Positive controls in assays with and without S9 are 0.01 mM cyclophosphamide and 3.14 mM ethyl methanesulfonate, respectively.

³⁾ Correlation coefficient of dose-response regression, $R_{(3, 0.05)} = 0.878$; $R_{(3, 0.01)} = 0.959$.

表四、胃管灌注白殭菌 A1 孢子對 ICR 小鼠的體重影響¹⁾Table 4. Effect of *Beauveria bassiana* A1 spores on ICR mouse body weight after oral administration¹⁾

Treatments (dose)	Time (h)	Male bw (g)		Female bw (g)		Difference between Gender ²⁾
		Mean \pm S.D.	S.D.	Mean \pm S.D.	S.D.	
Saline (10 ml/kg bw)	0	28.9 \pm 1.5		26.2 \pm 1.3		*
	48	28.2 \pm 1.8 [#]		25.7 \pm 1.1		*
	72	28.6 \pm 2.0		25.7 \pm 0.8		*
Mitomycin C (2 mg/kg bw)	0	29.4 \pm 0.8		27.5 \pm 2.4		
	48	28.6 \pm 1.0 [#]		26.6 \pm 1.3		*
	72	28.3 \pm 1.6		24.9 \pm 0.7 [#]		**
<i>B. bassiana</i> A1 (2.5 $\times 10^8$ spores/kg bw)	0	28.6 \pm 1.1		24.3 \pm 0.8		**
	48	27.8 \pm 2.0		24.9 \pm 0.9 [#]		*
	72	28.3 \pm 1.6		24.9 \pm 0.7 [#]		**
<i>B. bassiana</i> A1 (5 $\times 10^8$ spores/kg bw)	0	31.2 \pm 2.1		23.9 \pm 1.4		**
	48	31.1 \pm 1.5		23.8 \pm 1.6		**
	72	31.3 \pm 1.5		23.8 \pm 1.6		**
<i>B. bassiana</i> A1 (1 $\times 10^9$ spores/kg bw)	0	26.1 \pm 0.7		23.5 \pm 1.5		**
	48	27.2 \pm 0.6 ^{##}		23.8 \pm 1.9		**
	72	27.3 \pm 0.7 [#]		23.8 \pm 1.8		**

¹⁾ Data were calculated from five animals. Means of body weight followed by "[#]" and "^{##}" represent differences between pre- and post-treatments within same gender at significance level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, by paired-T test.

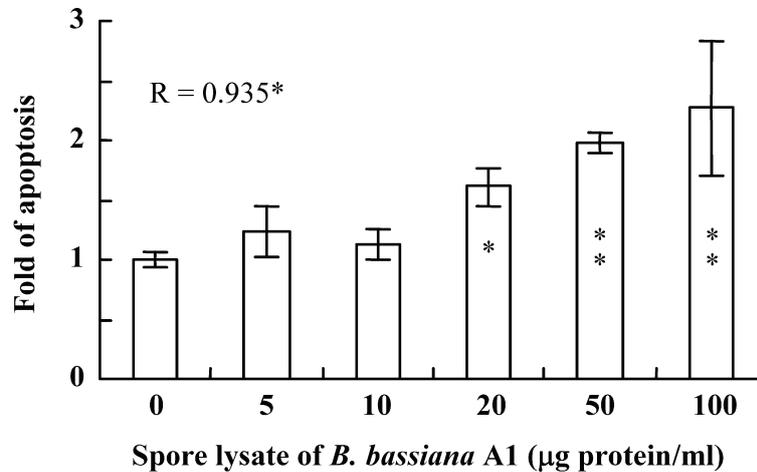
²⁾ The difference level between gender by T-test, "*" and "**" indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively, in each treatment at the same time interval.

髮等) 亦無特別的癥狀反應。表五顯示：幾乎所有的小鼠不論性別，其總紅血球中的網狀紅血球含量 (RET%)，在處理後的 48 及 72 小時都比處理前略增 (MMC 處理組雄鼠除外)，白殭菌 A1 孢子高劑量處理之雄鼠的 RET% 在 48 及 72 小時都比 0 小時顯著增多 (Runs 分析, $P < 0.05$)，但此現象亦見於生理食鹽水處理之雄鼠。而所有小鼠之成熟紅血球中的含微核率 ($Mn^+NCE\%$) 皆不受任何處理而改變。致變劑 (MMC) 之處理確使動物在 48 小時後新生的網狀紅血球之微核發生率 ($Mn^+RET\%$) 顯著增多 (Runs 分析, $P <$

0.05)，而生理食鹽水與白殭菌 A1 孢子之處理都不影響 $Mn^+RET\%$ 的變化。

白殭菌 A1 對 HL60 之細胞凋亡影響：

HL60 以白殭菌 A1 孢液 5~100 $\mu\text{g/ml}$ 劑量處理 2 天後之凋亡細胞群倍增情形如圖一，LSD 分析結果顯示白殭菌 A1 孢液在三個較高劑量 (20、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$) 之處理皆顯著增多細胞的凋亡率 (顯著水準分別為 5%、1% 與 1%)。線性迴歸分析結果顯示：細胞之凋亡與其處理劑量間有顯著之正相關 ($R = 0.935^*$)，白殭菌 A1 孢液對 HL60 細胞有輕微的細胞凋亡作用。



圖一、白殭菌 A1 孢液對人體血癌細胞株 HL60 之凋亡影響。培養之細胞經白殭菌 A1 孢液處理 2 天，經離心收集、固定、水洗與 PI 染色後，各處理組以流式細胞儀分析 10,000 個細胞中含凋亡細胞數後，以空白處理組為基數換算各劑量處理組凋亡細胞倍增數。柱狀圖頂端之上下標示乃各處理組三次重複試驗結果之平均值 \pm 標準差。柱內之 "*" 與 "**" 號表示最小差異顯著性分析結果，與空白對照組之間的差異顯著性分別為 5% 與 1%。劑量反應關係之線性迴歸相關係數參考值為 $R_{(3, 0.05)} = 0.878$ ； $R_{(3, 0.01)} = 0.959$ 。

Fig. 1. Apoptotic effect of *Beauveria bassiana* A1 on HL60. After two days treatment of *B. bassiana* A1 spore lysate, the cells were collected centrifugally, fixed, rinsed, stained with PI, and then analyzed by flow cytometry. Data of bar-chart (means) with S.D. are calculated from three replicates by counting 10,000 cells. The notation "*" and "**" means significantly different with blank control by LSD at $P = 0.05$ and 0.01 , respectively. Correlation coefficient of linear regression for dose-response relationship gave $R_{(3, 0.05)} = 0.878$; $R_{(3, 0.01)} = 0.959$.

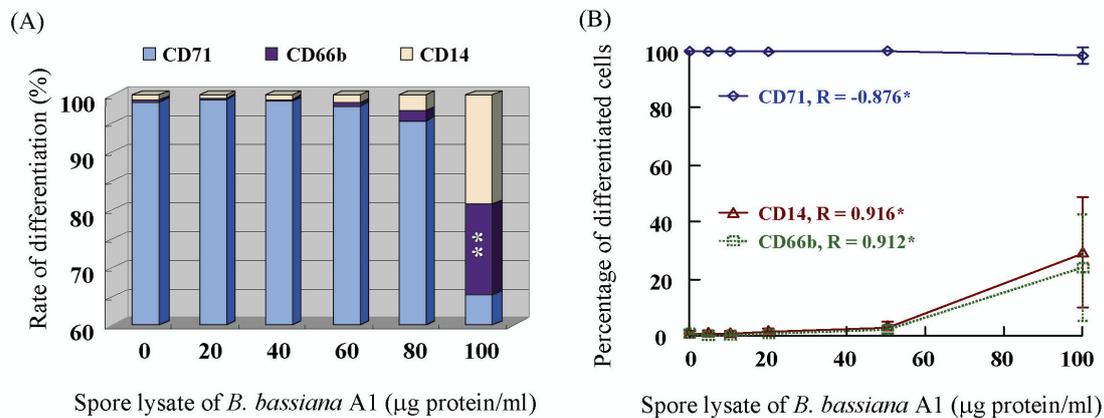
白殭菌 A1 對 HL60 細胞之增殖影響：

HL60 細胞經白殭菌 A1 孢液加 BrdU 培養處理 40 小時後，經螢光抗體 FITC-BrdU 染色及流式細胞儀分析結果：細胞的平均增殖率經白殭菌孢液 5、10、20、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 劑量處理後之變化依次為 0.86 ± 0.18 、 0.75 ± 0.17 、 0.90 ± 0.28 、 0.75 ± 0.2 及 0.80 ± 0.28 倍。LSD 分析結果顯示各劑量處理與空白對照組之間，並無差異顯著性，白殭菌 A1 對 HL60 之增殖沒有影響。

白殭菌 A1 對 HL60 之細胞分化影響：

HL60 細胞經白殭菌 A1 孢液 20~100

$\mu\text{g/ml}$ 處理 6 天後，含 CD71 (未分化)、CD14 (單核球或巨噬細胞) 與 CD66b (顆粒球) 表面抗原之細胞含量百分率分佈如圖二 A：與空白對照處理相比，最高劑量處理組 (100 $\mu\text{g/ml}$) 之細胞表面抗原 CD14、CD66b 與 CD71 的表現組合分佈，有顯著的改變 (χ^2 分析, $P < 0.01$)。線性迴歸分析結果 (圖二 B) 則顯示：表現 CD71 的細胞比率隨著白殭菌孢液處理劑量之增加而顯著下降 ($R = -0.867^*$)；而表現 CD14 與 CD66b 之細胞比率反而隨劑量處理增加而顯著增加 (R 值分別為 0.916^* 與 0.912^*)，可見白殭菌之處理有促使 HL60 分化為顆粒球、單核球或巨噬細胞的影響。而這些細胞在顯微



圖二、白殭菌 A1 孢液對 HL60 細胞之分化影響。培養之細胞經白殭菌 A1 孢液處理 6 天後分別以含有抗 CD71 (未分化)、CD14 (單核球或巨噬細胞) 及 CD66b (顆粒球) 表面抗原之螢光染劑染後，以式細胞儀分析各 10,000 個細胞中之分化細胞佔有百分率。各數據分別由 3 次重複處理平均而得。(A) 為各劑量處理結果之分化細胞佔有的分化比率，經卡方檢定結果，細胞分化率顯著性 $P < 0.01$ 者以 "***" 表示。(B) 為各分化細胞群之劑量反應關係，線性迴歸分析結果，劑量反應關係顯著者，以 "*" 號表示 $P < 0.05$ 。

Fig. 2. Effect of *Beauveria bassiana* A1 on cell differentiation in HL60. The cells were treated with spore lysate of *Beauveria bassiana* A1 with protein contents as indicated for six days and harvested to examine cell surface antigens of CD71 (undifferentiated)、CD14 (monocyte or macrophage) and CD66b (granulocyte) by flow cytometry. Data are calculated from three replicates of 10,000 cells. (A) Distribution of differentiated cell patterns. "***" means $P < 0.01$ compared to the blank control by χ^2 analysis. (B) "*" means $P < 0.05$ by linear regression analysis for dose-response relationships.

鏡下鏡檢時，並未觀察到偽足形態的巨噬細胞 (數據未列)，白殭菌孢液可能只會影響 HL60 細胞分化為顆粒球與單核球。

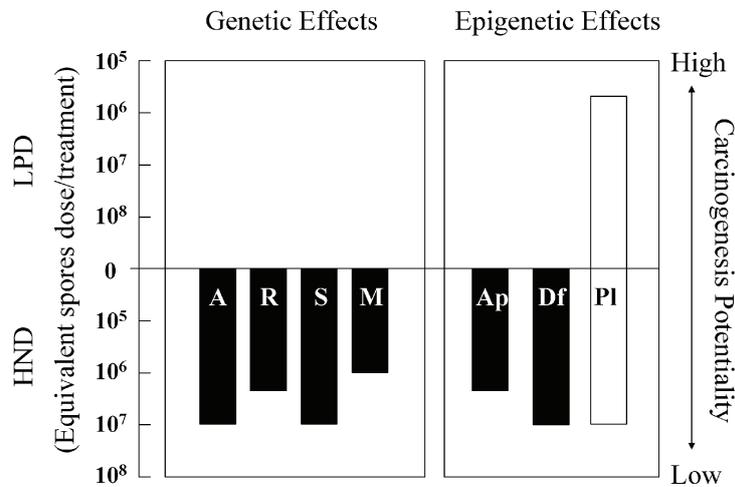
潛力剖析結果如圖三：白殭菌 A1 經四種基因毒性試驗結果皆無啟動細胞變異之危險；對於細胞的癌化過程亦無促進影響。

白殭菌 A1 對生物細胞之致變異/致癌潛力剖析：

白殭菌 A1 在四種基因毒性與三種非基因毒性試驗之孢液與孢子處理之間，經相對孢子劑量轉換結果如表六。各選其促進細胞癌化之最低正反應相對量 (LPD) 或最高負反應相對量 (HND) 所繪的致癌

討 論

由於沙門菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及 TA102 等菌株的組胺酸基因操縱子 (*his operon*) 之變異設計分別為 D3052 (GCGCGCGC) 之框構位移 (frame-shift)、G46 (GGG) 之鹽基置換



圖三、白殭菌 A1 之致變異/致癌潛力剖析。白殭菌 A1 經沙門菌基因回復突變 (A)、枯草菌 DNA 傷害 (R)、細胞姊妹染色體交換 (S) 與小鼠微核 (M) 等基因毒性 (genetic effects) 測試，以及細胞之凋亡 (Ap)、分化 (Df) 與增殖 (Pl) 等非基因途徑 (epigenetic effects) 之致癌影響等試驗結果，以 0 為基準線，試驗觀測標竿有致癌或促癌潛力者，取其最低有反應劑量 (LPD) 向上拉實心柱狀圖標示；無致變或抑癌潛力者，取其試驗的最高處理劑量 (HND) 向下拉實心柱狀圖。對癌化無影響者兼取 LPD 與 HND 向上與下拉出空心柱狀圖。實心柱愈往上者致癌潛力愈高；愈往下者致癌潛力愈低。各試驗之相對劑量的換算基準參考表六。

Fig. 3. Mutagenicity/carcinogenicity profiles of *Beauveria bassiana* A1. According to battery results of Ames test (A), Rec assay (R), SCE assay (S), micronucleus test (M), apoptosis detection (Ap), differentiation examination (Df), and proliferation measurement (Pl), enhancing effects on carcinogenesis are indicated by the lowest positive equivalent dose (LPD). Attenuating effects on carcinogenesis are indicated by the highest negative equivalent dose (HND). Non-effect results are indicated by dose range of LPD to HND, and presented by hollow columns. The labeled equivalent doses may refer to table 6.

(base-pair substitution)、G46 (GGG) 鹽基置換、C3076 (GGGG) 之框構位移，以及 G428 (TAA) 之赭石突變 (ochre mutation)⁽¹⁹⁾，因此，從白殭菌 A1 不論經 S9 代謝轉化與否對五菌株皆無致基因變異的結果 (表一) 可以推測：白殭菌 A1 對菌種基因的鹽基置換、框構位移、及赭石突變等致變機制皆無影響。

枯草菌 H17 與 M45 為一組同系異基因型菌種，兩者基因型唯一差別在於對受害 DNA 的修復能力 (*rec⁺*)。表二的重組檢定結果顯示：白殭菌 A1 對 H17 與 M45 菌種皆無抑制生長的作用，依 Kada⁽¹³⁾ 與 USEPA⁽¹⁶⁾ 的致變異性判定標準驟下"無致變異反應"的結論，或可能會被質疑：試驗物質是否確能由培養盤中央的濾紙擴散到菌地的周圍？由負反應對照藥劑 CRP 的五重複處理皆使 H17 與 M45 得到相同的生長抑制圈 (直徑 15 ± 0 mm) 結果可見：濾紙中央的測試物質應有能力在菌地培養盤擴散。

不論是對特定的基因序列 (如沙門菌 TA 菌種) 或是無特定序列的 DNA (如枯草菌)，白殭菌 A1 對微生物都無基因途徑的傷害。即使對 CHO 細胞的 DNA，白殭菌 A1 亦無傷害的影響。雖然姊妹染色體交換試驗的觀測胞器為染色體，但由於姊妹染色體發生交換的機制係因兩個世代前的 DNA 斷裂再經修補所產生雙股間的交換所造成^(12, 16)。因此，從白殭菌 A1 對 CHO 的姊妹染色體交換試驗的負反應結果 (表三) 除了從染色體外觀的鏡檢可以確定受試物質對染色體結構沒有傷害影響之外，也間接證明了白殭菌 A1 對受試細胞的 DNA 沒有傷害能力。此外，由於姊妹染色體交換的可觀測條件，必須確定細胞的複製生長時間為第二世代的分裂中期，任何延緩或加速細胞生長週期的影響，都會導致收集之細胞在以螢光加吉氏染色後區染姊妹染色體分體的失敗⁽¹²⁾，此亦可看出白殭

菌 A1 對 CHO 細胞的生長週期沒有影響。

小鼠經胃管灌注白殭菌 A1 孢子 ($2.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ spores/kg bw) 後 48 與 72 小時，其血液中網狀紅血球的微核發生率 (Mn^+ RET%) 並未顯著增多 (表五)，這表示小鼠從投藥起，其紅血球母細胞在分裂過程中的染色體或紡錘體皆未受到攝入之白殭菌 A1 的顯著性破壞。雖然高劑量 (1×10^9 spores/kg bw) 處理組在第 2 與第 3 天，使雄鼠的網狀紅血球含量 (RET%) 從 1.94% 顯著增多到 3.24% 及 5.37% (Runs 分析, $P < 0.05$)，此可能因該組動物本身的 RET% 背景值即偏低之故，但無論如何，此現象亦見於生理食鹽水之處理結果 (其 RET% 值在 0、48、72 小時分別為 3.73%、5.47% 及 6.82%)，而且這些增高的 RET% 值仍在一般小鼠的背景值範圍內^(8, 27)。此外，同在 72 小時採血的雄鼠，白殭菌孢子處理組與生理食鹽水處理組之間的 RET% 經 U-檢定結果並無差異顯著性 ($P = 0.117$)，這些增多的 RET% 應非由於白殭菌 A1 之孢子處理所致。從處理的 50 隻動物除了 MMC 處理組雄鼠以外，其餘各組的 RET% 值都在 48 及 72 小時有對應上升的趨勢，這種現象可能是動物被重複採血後，生理的代償機制使得造血活絡所致。無論如何，從各組動物血液之 RET% 在處理後皆未顯著下降的情形看來，動物的各組處理應無血液毒性作用。此外，本研究在檢測小鼠紅血球微核時採用的組織為週邊血而非傳統的骨髓^(10, 25)，動物的犧牲量可比傳統試驗省 2/3，雖然新生紅球在週邊血液中的 RET 含量遠比在骨髓中少很多，必需增大細胞的觀測量^(9, 10)，此可藉流式細胞儀與免疫螢光染色技術的進步而得解^(6, 9, 27)，而且，兩種方法已被評估具有一致性的結果^(20, 27)。

人體 HL60 細胞株具有骨髓母細胞 (myeloblast) 的特性，可被某些特定化合物刺激而分化^(5, 15)。其若分化為巨噬細胞可

表五、胃管灌注白殭菌 A1 孢子對 ICR 小鼠之紅血球生成及微核化影響¹⁾Table 5. Effect of gavaged *Beauveria bassiana* A1 spores on erythropoiesis and micronucleus in ICR mouse¹⁾

Animal treatment (dose)	Gender	Time (h)	RET %		Mn ⁺ NCE %		Mn ⁺ RET %	
			Mean±	S.D.	Mean±	S.D.	Mean±	S.D.
Saline (10 ml/kg bw)	Male	0	3.73±	0.70	0.17±	0.04	0.23±	0.06
		48	5.47±	1.35	0.17±	0.03	0.25±	0.05
		72	6.82±	2.29 *	0.19±	0.03	0.27±	0.05
	Female	0	1.43±	0.62	0.16±	0.04	0.26±	0.07
		48	1.88±	0.90	0.17±	0.05	0.22±	0.07
		72	2.94±	0.66	0.16±	0.05	0.24±	0.09
Mitomycin C (2 mg/kg bw)	Male	0	3.39±	0.71	0.17±	0.02	0.28±	0.04
		48	2.98±	0.82	0.18±	0.02	0.68±	0.16 *
	Female	0	1.73±	0.68	0.15±	0.04	0.28±	0.07
		48	2.31±	0.53	0.15±	0.04	0.57±	0.09 *
<i>B. bassiana</i> A1 2.5×10 ⁸ (spores/kg bw)	Male	0	3.60±	1.26	0.16±	0.03	0.24±	0.03
		48	4.33±	1.76	0.17±	0.04	0.27±	0.08
		72	6.47±	2.59	0.16±	0.03	0.24±	0.07
	Female	0	1.80±	0.58	0.14±	0.02	0.18±	0.03
		48	2.90±	1.06	0.16±	0.04	0.22±	0.04
		72	3.70±	1.08	0.13±	0.03	0.17±	0.04
<i>B. bassiana</i> A1 5×10 ⁸ (spores/kg bw)	Male	0	2.70±	0.98	0.22±	0.03	0.29±	0.06
		48	3.15±	0.69	0.19±	0.02	0.32±	0.07
		72	3.48±	0.92	0.22±	0.04	0.35±	0.09
	Female	0	2.26±	0.54	0.15±	0.02	0.26±	0.07
		48	2.28±	0.88	0.15±	0.01	0.27±	0.04
		72	2.33±	0.73	0.15±	0.01	0.32±	0.05
<i>B. bassiana</i> A1 1×10 ⁹ (spores/kg bw)	Male	0	1.94±	0.32	0.16±	0.02	0.22±	0.03
		48	3.24±	0.41 *	0.16±	0.02	0.30±	0.06
		72	5.37±	0.62 *	0.15±	0.02	0.29±	0.04
	Female	0	2.35±	0.38	0.15±	0.01	0.24±	0.03
		48	2.84±	0.69	0.15±	0.02	0.27±	0.12
		72	3.49±	1.08	0.15±	0.02	0.18±	0.03

¹⁾ Means marked with "*" represent significant differences between pre- and post-treatment at 48 or 72 h at P < 0.05 by Runs test. RET%: percentage of reticulocytes in total erythrocytes. Mn⁺NCE%: percentage of micronucleated mature erythrocytes. Mn⁺RET%: percentage of micronucleated reticulocytes.

表六、白殭菌 A1 在七種短期試驗之處理孢液與孢子相對量的換算¹⁾Table 6. Conversion of spore lysate treatments to equivalent doses of *Beauveria bassiana* A1 among seven short-term tests¹⁾

Short-term tests	Spore lysate treatment	Spore suspension treatment	Equivalent spore dose treatment
Reverse mutation	1.2~100 µg/plate		1.2~10 × 10 ⁶ spores/plate
Rec	20 µg/disc		2 × 10 ⁶ spores/disc
SCE	1.2~100 µg/ml		1.2~10 × 10 ⁶ spores/ml
Micronucleus		2.5×10 ⁸ ~1×10 ⁹ spores/kg	0.25~1 × 10 ⁶ spores/g
Proliferation	5~100 µg/ml		0.5~10 × 10 ⁶ spores/ml
Apoptosis	5~100 µg/ml		0.5~10 × 10 ⁶ spores/ml
Differentiation	20 ~ 100 µg/ml		2 ~ 10 × 10 ⁶ spores/ml

¹⁾ Spore lysate with 1 mg/ml protein contents is quantitatively extracted from spore suspension at concentration of 1×10⁸ spores/ml PBS.

在顯微鏡下看到偽足化的形態改變⁽⁷⁾；其它球形細胞若分化為顆粒球或單核球則可由分析細胞表面抗原的改變而獲知^(11, 24, 37)，是近年來用於探討已啟動變異之細胞在後續的癌化演變的最佳模式。由於白殭菌 A1 對 HL60 細胞的增殖不但沒有影響，還可引起細胞的凋亡（圖一）與分化（圖二），這表示白殭菌 A1 不但不具基因毒性，還對癌化的細胞有弱化的作用。而由本研究各試驗體系之投藥的孢子相對量達 10⁵⁻⁷（表六），應可涵括其在田間的施用濃度（假設成品已濃縮孢子到 10⁹ 稀釋 100 倍噴洒）。這株由我國本土開發的廣效殺蟲性微生物農藥，其對人體健康的致癌風險經本研究的安全性評估結果（圖三），極具商品化的潛力與價值。

謝 辭

本研究由行政院農業委員會 94-AS-13.2.3-PI-P1 及 95-AS-13.2.3-PI-P1 經費援助，謹此致謝。

引用文獻

1. 高穗生、蔡勇勝。1995。蟲生真菌在蟲

害防治上之利用。農業藥物毒物試驗所專題報導第 38-39 期，24 頁。

2. 蔡三福、廖俊旺、洪文凱、王順成。1994。黑殭菌對白鼠肺急毒性、感染性及致病性之探討。植保會刊 36: 65-73。
3. 蔡勇勝、高穗生、高清文、侯豐男。1992。數種殺蟲劑對黑殭菌感染甜菜夜蛾之影響。植保會刊 34: 216-226。
4. BD Bioscience 2006. BrdU flow kits instruction manual. BD Pharmingen. 38 pp.
5. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2458-62.
6. Dertinger, S. D., Torous, D. K., and Tometsko, K. R. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. Mutat. Res. 371: 283-292.
7. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. 1979. Characterization of

- the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713-33.
8. Gollapudi, B. B., and McFadden, L. G. 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 347: 97-99.
 9. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I.-D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., and Sutou, S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environm. Mol. Mutagen.* 35: 234-52.
 10. Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., and Salamone, M. F. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 123: 61-118.
 11. Hong, J., Ishihara, K., Yamaki, K., Hiraizumi, K., Ohno, T., Ahn, J. W., Zee, O., and Ohuchi, K. 2003. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces differentiation of HL-60 cells. *Cancer Lett.* 189: 197-206.
 12. Jan, K. Y., Sheng, W. W., and Wen, W. N. 1982. A simplified fluorescence plus Giemsa method for consistent differential staining of sister chromatid. *Stain Tech.* 57: 45-46.
 13. Kada, T., Hirano, K., and Shirasu, Y. 1980. Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*, pp.149-173. In: F. J. de Serres and A. Hollaender [eds.], *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*, Vol. 6, Plenum Press, New York and London.
 14. Kao, S. S., Tsai, Y. S., Yang, P. S., Hung, T. H., and Kao, J. L. 2002. Use of random amplified polymorphic DNA to characterize entomopathogenic fungi, *Nomuraea* spp., *Beauveria* spp., and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, from Taiwan and China. *Formosan Entomol.* 22: 125-134.
 15. Koeffler, H. P., and Golde, D. W. 1980. Human myeloid leukemia cell lines: A review. *Blood*, 56: 344-50.
 16. Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B., and Wolff, S. 1981. Sister-chromatid exchanges: A report of the U. S. EPA gene-tox program. *Mutat. Res.* 87: 17-62.
 17. Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., Stafford, R., and Rosenkranz, H. S. 1981. An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of U. S. EPA's gene-tox program. *Mutat. Res.* 87: 211-297.
 18. Litron Laboratories 2006. Microflow^{PLUS} mouse micronucleus analysis kit. Litron Laboratories Instruction manual. 32 pp.
 19. Maron, D. M., and Ames, B. N. 1983. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
 20. Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., and Heddle, J. A.

1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. EPA Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239: 29-80.
21. OECD 1996. Bacterial reverse mutation test. *In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals.* #471. 11 pp.
22. OECD 1996. Genetic toxicology: In vitro sister chromatid exchange assay in mammalian cells. *In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals.* #479. 6 pp.
23. OECD 1996. Mammalian erythrocyte micronucleus test. *In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals.* #474. 10 pp.
24. Saydam, G., Aydin, H. H., Sahin, F., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., and Omay, S. B. 2003. Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxy chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. *Leuk Res.* 27: 57-64.
25. Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
26. Stetka, D. G., and Wolff, S. 1976. Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41: 343-350.
27. Torous, D. K., Hall, N. E., Dertinger, S. D., Diehl, M. S., Illi-Love, A. H., Cederbrant, K., Sandelin, K., Bolcsfoldi, G., Ferguson, L. R., Pearson, A., Majeska, J. B., Tarca, J. P., Hewish, D. R., Doughty, L., Fenech, M., Weaver, J. L., Broud, D. D., Gatehouse, D. G., Hynes, G. M., Kwanyuen, P., McLean, J., McNamee, J. P., Parenteau, M., Van Hoof, V., Vanparys, P., Lenarczyk, M., Siennicka, J., Litwinska, B., Slowikowska, M. G., Harbach, P. R., Johnson, C. W., Zhao, S., Aaron, C. S., Lynch, A. M., Marshall, I. C., Rodgers, B., and Tometsko, C. R. 2001. Flow cytometric enumeration of micronucleated reticulocytes: High transferability among 14 laboratories. *Environ. Mutagen.* 38: 59-68.
28. USEPA 1995. *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040 Technical Document. OPP# 128818. USEPA. 11 pp. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
29. USEPA 1998. Bacterial reverse mutation test. *In: Health Effects Test Guidelines.* OPPTS 870.5100. 11 pp.
30. USEPA 1998. In vitro sister chromatid exchange assay. *In: Health Effects Test Guidelines.* OPPTS 870.5900. 5 pp.
31. USEPA 1998. Mammalian erythrocyte micronucleus test. *In: Health Effects Test Guidelines.* OPPTS 870.5395. 12 pp.
32. USEPA 1999. *Beauveria bassiana* strain GHA Technical Document. OPP#128924. USEPA. 13 pp. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
33. USEPA 2001. *Metarhizium anisopliae* strain ESC1 Fact Sheet. OPP# 129056. USEPA. 2 pp. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
34. USEPA 2002. *Beauveria bassiana* strain 447 Fact Sheet. OPP# 128815. USEPA. 3 pp. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
35. USEPA 2002. Biopesticides Registration Action Document - *Metarhizium anisopliae* strain F52. OPP# 029056. USEPA. 36 pp. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
36. USEPA 2005. Regulating Biopesticides.

- <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
37. Verlinden, L., Verstuyf, A., Mathieu, C., Tan, B. K., and Bouillon, R. 1997. Differentiation induction of HL60 cells by 1,25(OH)₂D₃, all trans retinoic acid, TGF-β₂ and their combinations. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 60: 87-97.

ABSTRACT

Lee, Y. Y., Wang, Y. H., Jan, L. C., Tasi, B. L., and You, B. Y.* 2006. Carcinogenicity profile of *Beauveria bassiana* A1 via genetic and epigenetic toxicities. Plant Prot. Bull. 49: 57-74. (Applied Toxicology Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufong, Taichung 41358, Taiwan (ROC))

Mutagenicity/carcinogenicity profile of *Beauveria bassiana* A1 is assessed by both genetic and epigenetic short-term tests. To facilitate dose treatments comparison among different assays, protein contents ($\mu\text{g}/\text{treatment}$) of spore lysate treatments applied in *in vitro* assays were converted into equivalent spore dose (spores/treatment) based on extraction of 10^{-5} μg protein content per spore. In the equivalent dose range of $0.5\sim 10 \times 10^6$ spores/treatment, *B. bassiana* A1 didn't induce gene mutation in *Salmonella typhimurium* by mechanisms of base-pair substitution, frame shift, or ochre mutation. Non-mutagenic responses were resulted from rec assay, sister chromatid exchange assay or mouse micronucleus test. These results suggested that *B. bassiana* A1 could not possibly initiate the transformation of normal cells via genetic pathway. On the other hand, the results from epigenetic toxicity tests showed that *B. bassiana* A1 notably promoted the apoptosis and differentiation rather than stimulated the proliferation of human leukemia cells. These end-points implied that *B. bassiana* A1 has an slightly advantage over the inhibition of initiated cells. In conclusion, above results from seven short-term screening tests and carcinogenicity profile suggested that *B. bassiana* A1 could have no mutagenicity/carcinogenicity effects on human health and is a valuable biopesticide candidate for commercialization.

(Key words: *Beauveria bassiana* A1, Genetic toxicity, Epigenetic toxicity, Carcinogenicity profile)

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