



殺菌劑快得寧之致變異性與致癌可能性評估

游碧堉^{1,2} 王雲鶴² 郭明良¹

1. 臺北市 國立臺灣大學醫學院毒理學研究所
2. 臺中縣霧峰鄉 臺灣省農業藥物毒物試驗所

(接受日期：88年2月25日)

摘 要

游碧堉、王雲鶴、郭明良 1999 殺菌劑快得寧之致變異性與致癌可能性評估 植保會刊 41:119 - 132

殺菌劑快得寧 (copper 8-hydroxyquinolate) 的原料化合物 8-hydroxyquinoline 為致變異性物質並有致癌疑慮，為了確保快得寧農藥對人畜仍具有安全性，本文以沙門菌回復突變 (Ames test)、枯草菌重組檢定 (rec assay) 以及倉鼠卵巢細胞 (CHO) 姊妹染色體交換 (sister chromatid exchanges, SCE, assay) 等基因毒性簡速偵測法 (short-term tests) 來綜合評估快得寧的致變異性，同時也以 Wistar 大鼠之二階段肝腫瘤促進試驗 (two-step hepatocarcinogenesis assay) 及鼠肺細胞株 (V79) 之細胞間隙連繫 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 影響等非基因毒性 (epigenetic toxicity) 試驗來評估快得寧在促進腫瘤及轉化細胞方面的可能致癌影響。試驗結果顯示快得寧本身對供試之生物並無直接之基因毒性，但經肝臟酵素活化後轉而具有致變異性，其顯著引起沙門菌之鹽基置換突變，增加對枯草菌的 DNA 危害，同時也使 CHO 細胞之 SCE 呈劑量反應關係。而在非基因毒性方面：快得寧農藥不會抑制 V79 細胞的 GJIC，對於經誘變劑 N-nitrosodiethylamine (DEN) 啟動變異的大鼠肝臟組織，也不會促成肝腫瘤的形成。因此快得寧農藥可歸屬為“具有致變異性的非致癌劑 (mutagenic-noncarcinogen)”。此外，快得寧可使大鼠肝細胞之 γ -羧胺醯轉化酶 (γ -glutamyltranspeptidase, GGT) 的活性增加並使肝細胞萎縮，其可能對肝臟有其它潛在的慢性傷害，因此，有關快得寧農藥之毒性安全評估似有重新檢討的必要。

(關鍵詞：快得寧、沙門菌回復突變測試、枯草菌重組檢定、姊妹染色體交換測試、細胞間隙傳遞、二階段肝腫瘤促進試驗)

緒 言

快得寧 (copper 8-hydroxyquinolate, oxine copper) 殺菌劑廣泛用於防治胡瓜、豌豆、葡萄、蓮霧、荔枝、梨、柑桔、木瓜等作物之黑斑病、黑星病及瘡痂病等病害⁽¹⁾，該農藥原體自民國 72 年核可以來，由於急性毒相當低 (口服半數致死劑量 LD₅₀ 在大鼠約 1060 mg/kg，在兔子 > 9000 mg/kg)，而一向被認為是相當“安全”的農藥。然而其原料化合物 8-hydroxyquinoline (OHQ) 為具有致變異性化合物，經大鼠肝臟酵素 (S9) 代謝後會引起沙門菌的基因變異^(28, 30, 34, 35)，增加倉鼠卵巢細胞的染色體變異⁽³⁾，口服處理大鼠會促使肝細胞分裂⁽⁴⁾，但腹腔注射處理小鼠並未使骨髓細胞染色體變異及姊妹染色體交換 (SCE) 率增加⁽²²⁾；其在動物的致癌性試驗結果並無一致性的結論⁽³³⁾，目前被國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 列為 C 群 (即動物試驗疑具致癌性) 化合物。雖然快得寧農藥原體與 OHQ 的殺菌機制不同⁽¹⁰⁾，兩者對細胞內的金屬離子螯合能力與被含硫基化合物拮抗的反應雖然不同，但由二分子 OHQ 螯合銅金屬而得的快得寧是否因而具有致變異或是致癌可能仍值得懷疑。本文因而就化學物質在基因毒性 (genetic) 與非基因毒性 (epigenetic) 方面的致癌可能影響加以篩檢，以綜合評估快得寧農藥原體可能的致變異性或致癌潛力。

在基因毒性測試方面，本文以沙門菌回復突變 (*Salmonella* microsomal reversion assay, Ames test)^(2, 15)、枯草菌重組檢定 (*Bacillus rec* assay)⁽¹³⁾ 以及倉鼠卵巢細胞之姊妹染色體交換測試 (SCE assay)⁽¹⁸⁾ 等方法，分別針對農藥在引起基因變異、DNA 的破壞與修復、以及染色體傷害等遺傳毒性標竿，來綜合篩檢快得寧農藥的致變異性潛力。而在非基因毒性方面，則以螢光

染劑在倉鼠肺細胞株 (V79) 的細胞間隙傳遞 (GJIC) 試驗^(6, 14, 17)，以及 Wistar 大鼠的二階段肝腫瘤促進試驗⁽³¹⁾，分別篩檢農藥在引起細胞轉化 (cell transformation) 以及促進腫瘤作用 (tumor promotion effect) 方面的可能致癌影響。

材料與方法

供試藥劑

快得寧原體 (copper 8-hydroxyquinolate, oxine copper, Quinolate, CAS #10380-28-6)，純度 98% (Aldrich# 43644-5)，以 dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶解成 100 mg/ml 儲存液備用，試驗前以培養基稀釋至待測濃度，唯試驗時培養基中的 DMSO 含量以不超過 1% 為限，以藥劑之最高可溶解濃度或具有細胞殺傷力之濃度為試驗之最高測試濃度。細胞培養基 (McCoy's 5A 及 DMEM) 與細胞培養用抗生素 (streptomycin 及 penicillin) 購自 Gibco；細菌用培養基 (Nutrient broth、PYM medium 及 Bacto agar) 購自 Difco，其餘化學試藥購自 Sigma 或 Merck。

沙門菌回復突變測試 (*Salmonella* microsomal reversion assay, Ames test)

依 Ames 及 Maron 氏等之平板預養試驗方法 (plate preincubation method)⁽²¹⁾，以 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 菌種 (購自 Institute for Fermentation, IFO# 14193 & 14194) 為材料，分別篩檢組胺酸基因的框構位移和鹽基置換突變反應。以 Aroclor 1254 (500 mg/kg b.w.) 一次腹腔注射處理六週齡雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (體重 200 ± 20 g，購自國科會 SPF 動物中心)，五日後解剖取肝，依 Ames 及 Maron 氏等之方法⁽²¹⁾ 製備肝臟微粒體酵素抽出液 (S9)。

快得寧農藥於 4.1~1000 μg/plate 劑量範圍分別以加或不加 S9 進行回復突變試驗。

試驗中以 1% DMSO 為溶劑負反應對照，以 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 2-aminofluorene (2AF) 及 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 4-nitroquinoline-N-oxide (NQO) 分別為加 S9 處理與否之正反應對照，試驗時各處理重複 5 個培養盤，結果以 t-test 分析正、負反應對照與無藥劑對照間的差異顯著性，以最小顯著差異法 (least significant difference, LSD) 分析快得寧之各處理濃度與無藥劑對照間的差異，以線性迴歸 (linear regression) 分析劑量反應關係，採 1% 顯著水準。

枯草菌重組檢定 (rec assay)

以 *B. subtilis* H17 (*rec⁺ arg try*) 與 M45 (*rec45 arg try*) 菌種 (IFO#14191 & 14192) 為材料，前者對於被破壞的 DNA 具有重組修復能力而後者則否。依 Kada 等之斑點擴散測試法 (spot test)⁽¹³⁾：取 20 μl 藥劑溶液 (加 S9 活化處理組則先取 0.1 ml 藥劑溶液與 0.1 ml S9 混合液於 37°C 先反應 30 分鐘) 滴在培養菌種之菌地 (lawn) 中央的無菌濾紙 (直徑 6 mm) 上，於 37°C 培養 1~2 天後，測量菌種之生長抑制圈 (growth inhibition zone) 直徑，以 mm 為單位，無生長抑制者以濾紙之直徑估之。試驗中以 20 $\mu\text{l}/\text{disc}$ DMSO 為溶劑對照，0.4 mg/disc 2AF 及 8 $\mu\text{g}/\text{disc}$ mitomycin C (MMC) 分別為加 S9 處理與否之正反應對照，試驗時各處理重複 5 個培養盤。結果以 t-test 分析藥對劑 H17 與 M45 菌種間的生長差異顯著性，同時參照 Kada 氏之判定標準⁽¹³⁾：當 M45-H17 之抑制圈直徑差異值 ≤ 2 mm 者視為“負反應”，介於 2-5 mm 者視為“疑正反應”， ≥ 5 mm 者視為“正反應”結果。

姊妹染色體交換試驗 (SCE assay)

CHO 細胞 (中央研究院動物所詹崑源博士慨贈) 以 McCoy's 5A 培養基 (加 10% bovine serum, 0.22% NaHCO_3 , 0.03% L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及

streptomycin) 培養於含 5% CO_2 、95% RH 之 37°C 培育箱。不加 S9 處理時依 Perry 與 Wolff 氏之方法⁽²⁷⁾，加 S9 活化處理組則依 Stetka 與 Wolff 氏之方法⁽³²⁾，快得寧於 1.6~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 劑量範圍內，分別以加或不加 S9 進行 SCE 試驗：5 $\times 10^5$ CHO 隔夜培養後加入測試農藥及 30 μM BrdU 培養 22 小時，再加 0.1 ml 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid 繼續培養 2 小時，然後離心收集分裂中期之細胞，經 0.5% KCl 低張處理及 Carnoy's 固定液處理後，將細胞滴在玻片上陰乾，經 FPG 染色⁽¹²⁾，於 1000 \times 光學顯微鏡下觀察核型為 N=21 之細胞的 SCEs，各處理計數 30 個細胞，並重複兩次收集細胞。試驗中以 0.01 mM cyclophosphamide 及 3.14 mM ethyl methanesulfonate 分別為加 S9 活化處理與否之正反應對照，以 1% DMSO 為溶劑對照。結果之統計分析方法同沙門菌回復突變試驗。

螢光染劑在細胞間隙之傳遞試驗 (dye transfer in GJIC)

V79 細胞 (ATCC#CCL-93) 以 DMEM 培養基 (加 10% fetal calf serum, 0.22% NaHCO_3 , 0.03% L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及 streptomycin) 培養於含 5% CO_2 、95% RH 之 37°C 培育箱。10⁶/dish V79 細胞隔夜培養後以 0.1 ~ 10 μM 快得寧處理 3 小時後，參考 El-Fouly⁽⁸⁾ 及 Kang⁽¹⁴⁾ 等之螢光染劑傳遞試驗方法略修改為：倒出培養基取 200 μl 與 200 μl 融溶之 1% agarose 混合立即倒回細胞盤使成薄膜，加入 1 ml 0.5% calcein (溶於 PBS) 螢光染劑，以解剖刀劃 4 道傷痕，於室溫反應 3 分鐘後以 4% formalin (溶於 PBS) 固定並輕輕洗去瓊脂薄膜，於倒立螢光顯微鏡 (488 nm 激光, Leica I3 濾鏡) 觀察綠色螢光染劑在細胞層之間的傳遞距離 (以 μm 為量測單位)，各處理重複 3 盤細胞，各觀察 4 條刀痕之平均傳遞距離。並以 10 μM dieldrin 為抑制傳遞反

應之對照，結果以 t-test 分析藥劑處理與否的差異顯著性。

二階段肝腫瘤促進試驗 (tumor promotion examination in two-step hepatocarcinogenesis)

五週齡雄性 Wistar 大鼠 (購自國科會 SPF 動物中心)，體重約 150 ± 10 公克，單隻飼養於聚碳酸材質鼠籠及不銹鋼網架，動物房環境溫控 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度 50-70%，光暗循環各 12 小時，以符合 Richardmond standard™ 標準之粉狀 Lab Diet (PMI#5001) 飼料及逆滲水飼養。飼料與飲水之供應任鼠取用 (*ad libitum*)，動物經馴養 1 週後再進行試驗。

試驗動物 15 隻先以 DEN (100 mg/kg b.w.) 一次腹腔注射，隔週後逢機分 3 組，分別以一般粉狀飼料、含 0.02% 2-acetylaminofluorene (2AAF) 飼料 (正對照)，及含 0.15% 快得寧飼料 (參考急性口服 LD_{50} 之 1/10) 繼續餵食至 12 週試驗結束。試驗第 3 週時將大鼠肝臟切除 2/3，試驗期間每週記錄動物體重及飼料消耗量。

試驗結束時，動物以乙醚昏迷後解剖，由腹主動脈 (abdominal aorta) 採血收集血清分析天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 及總蛋白含量，作為肝細胞壞死之指標；而解剖之肝臟秤重後，切取部分經中性福馬林固定作石蠟切片 (厚度約 $3 \mu\text{m}$)，以蘇木素及伊紅素 (Hematoxylin & Eosin, H&E) 染色進行一般病理切片觀察；另以小鼠之抗增殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的單株抗體 (19A2)，進行組織免疫染色⁽²⁰⁾，檢定肝細胞之 DNA 複製期 (S phase) 的細胞核數目，以作為肝細胞增殖指標；部分肝臟則於 -20°C 冷凍，經冷凍切片 (厚度約 $5-10 \mu\text{m}$) 後，進行 γ -麩胺醯轉化酶 (GGT) 活性染色⁽²⁹⁾，作為肝臟組織癌化之參考。結果以 t-test 分析藥

劑處理與否的差異顯著性，採 1% 顯著水準。

結 果

快得寧經肝臟酵素代謝後，引起沙門菌之鹽基置換突變反應

快得寧經沙門菌回復突變試驗結果如表一：試驗中之正負反應對照皆如預期結果，試驗中快得寧之最高劑量處理 ($1000 \mu\text{g}/\text{plate}$) 所引起的回復突變菌數皆比較低劑量處理者少，此乃藥劑的細胞殺傷力之故。

在不加 S9 處理時，快得寧對 TA98 及 TA100 菌種皆無直接之致變反應。在 S9 的存在下，快得寧處理中雖有 2 個劑量使 TA98 菌種之回復突變數顯著增多，但未超過對照處理的 2 倍，而且亦無劑量反應關係；而在 TA100 菌種，處理中較高的三個劑量使菌種之回復突變菌落數顯著增多 ($P < 0.01$)，其中甚至有增多 2 倍以上者，線性迴歸分析 (具有殺傷力的最高劑量處理組不採計) 結果則見劑量反應關係顯著 ($r = 0.994^{**}$)。可見，快得寧經 S9 作用後轉而具有基因毒性而引起沙門菌的鹽基置換突變反應。

快得寧經肝臟酵素代謝後，對枯草菌的 DNA 破壞影響增加

快得寧經枯草菌重組檢定結果如表二：2 mg/disc 快得寧之直接處理菌種，對 H17 (*rec*⁺) 及 M45 (*rec*⁻) 菌種生長皆無影響。然而經 S9 活化處理的快得寧，對不具修復能力的 M45 (*rec*⁻) 之生長抑制 (抑制圈直徑 $10.6 \pm 0.5 \text{ mm}$) 較具有修復能力之 H17 (*rec*⁺) 的生長抑制 (抑制圈直徑 $6.0 \pm 0.0 \text{ mm}$) 明顯差異 4.6 mm，依 Kada 氏之界定標準⁽¹³⁾ 屬於“疑正反應結果”。與不經 S9 活化處理組相比，快得寧農藥經肝臟酵素代謝後對菌種 DNA 的傷害能力的確增強。

表一、快得寧對沙門菌 TA98 及 TA100 菌種之回復突變影響

Table 1. Effects of oxine copper on gene mutations in *Salmonella* microsomal reversion assay

Oxine copper ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants/plate ¹⁾			
	Without S9 activation		With S9 activation	
	TA98 strain	TA100 strain	TA98 strain	TA100 strain
4.1	30.2 \pm 17.5	155.8 \pm 35.8	82.8 \pm 5.5 **	147.4 \pm 5.9
12.3	28.6 \pm 13.9	121.2 \pm 22.3	80.6 \pm 3.0	162.0 \pm 15.0
37	33.0 \pm 12.5	138.0 \pm 16.8	67.8 \pm 22.9	162.8 \pm 23.6
111	48.4 \pm 5.4	160.2 \pm 9.3	74.6 \pm 27.8	255.4 \pm 44.7 **
333	36.4 \pm 12.5	142.0 \pm 15.0	83.0 \pm 9.0 *	412.8 \pm 60.0 **
1000	18.2 \pm 9.8	134.4 \pm 43.5	53.8 \pm 6.9	359.8 \pm 18.7 **
Check control	43.2 \pm 10.7	148.6 \pm 37.6	61.6 \pm 8.0	152.0 \pm 14.1
DMSO	40.2 \pm 7.5	148.6 \pm 25.5	61.4 \pm 4.0	155.8 \pm 20.6
Positive control ²⁾	187.8 \pm 22.5 **	777.0 \pm 100 **	986.6 \pm 160 **	684.2 \pm 106 **

¹⁾ The data were obtained from 5 replicates. Within a column followed by "*" or "**" represent significant difference between treatments and check control at the level of 5% or 1%, respectively.

²⁾ Positive controls: 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ of 4-nitroquinoline-N-oxide in assay without S9 activation, and 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ of 2-aminofluorene in assay with S9 activation.

表二、快得寧對枯草桿菌之 DNA 破壞影響

Table 2. Damaging of oxine copper on DNA in *B. subtilis*

Treatment ¹⁾	Liver S9	Growth inhibition zone ²⁾		Response ³⁾
		H17 (<i>rec</i> ⁺)	M45 (<i>rec</i> ⁻)	
Check control		6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0	-
DMSO 20 $\mu\text{l}/\text{disc}$	±	6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0	-
Mitomycin C 8 $\mu\text{g}/\text{disc}$	-	36.4 \pm 2.2	56.4 \pm 2.2	+
Oxine copper 2 mg/disc	-	6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0	-
2-Aminofluorene 0.4 mg/disc	+	6.0 \pm 0.0	11.0 \pm 2.0	+
Oxine copper 2 mg/disc	+	6.0 \pm 0.0	10.6 \pm 0.5	±

¹⁾ An aliquot of 20- μl DMSO was directly added onto the paper disc in diameter of 6 mm which was placed on the center of bacterial lawn. Other treatments were supplemented with 20 μl of compound solutions and then expressed in dose/disc. Concentrations used in positive controls were referred to Kada (1980) ⁽¹³⁾. Stock solution of oxine copper at the concentration of 100 mg/ml was employed in assay.

²⁾ The inhibition zones were measured in diameter of mm from 5 replicates in each treatment.

³⁾ According to Kada (1980) ⁽¹³⁾, when the growth inhibition zone from same treatment in M45 (*rec*⁻) than that of H17 (*rec*⁺) is less than 2 mm or larger than 5 mm was specified as negative or positive response, respectively. Otherwise was classified as questionable positive responses.

快得寧對 CHO 細胞之 SCE 影響雖不顯著，但經肝臟酵素代謝後基因毒性略有增加

快得寧經 SCE 試驗結果如表三：試驗中之正負反應對照亦如預期結果，快得寧直接處理細胞時，有兩個劑量處理（8 及 200 $\mu\text{g/ml}$ ）顯著增加細胞的 SCE（顯著水準分別為 5% 及 1%），但因劑量反應關係不顯著（ $r=0.920$ ），可見其對 CHO 細胞的 DNA 或染色體並無直接的傷害。然而快得寧農藥若與 S9 同時處理細胞時，亦有兩個較高劑量處理（40 及 200 $\mu\text{g/ml}$ ）顯著增多 SCE（顯著水準分別為 5% 及 1%），且劑量反應關係顯著（ $r=0.980^*$ ），快得寧對細胞 SCE 的影響亦因 S9 的代謝而增強，但因增多的 SCE 未超過 2 倍以上，若採美國環境保護署的認定標準⁽¹⁸⁾，仍可歸結為負反應。

快得寧對 V79 細胞之 GJIC 沒有抑制作用

快得寧對 V79 的 GJIC 影響試驗結果如表四：螢光染劑（calcein）在無藥劑處理之

細胞的 GJIC 間平均傳遞速率為 $185.2 \pm 41.7 \mu\text{m/min}$ ，在 S9 之存在下的平均傳遞距離為 $180.7 \pm 22.0 \mu\text{m/min}$ ，S9 之存在與否對細胞的 GJIC 並無影響。抑制性對照藥劑（10 μM dieldrin）使 calcein 在細胞之 GJIC 間的傳遞速率降為 $43.7 \pm 19.2 \mu\text{m/min}$ ，在 S9 之存在下的傳遞速率為 $125.9 \pm 36.4 \mu\text{m/min}$ ，雖然 dieldrin 經 S9 代謝後對 GJIC 的抑制效果減弱，但其抑制性仍具統計差異顯著性 1%。

快得寧農藥在 50 μM 以上的濃度直接處理細胞 3 小時，對細胞具有部分的殺傷力，在非致死濃度範圍內（0.1~10 μM ）之各處理皆對細胞的 GJIC 沒有影響。當快得寧與 S9 同時處理細胞時，藥劑之細胞毒性增大，50 μM 之濃度處理使細胞悉數死亡，在 0.1~10 μM 之濃度範圍內的處理，亦皆不影響螢光染劑在細胞之 GJIC 間的傳遞。快得寧農藥原體無論加肝臟酵素活化與否，對 V79 細胞的 GJIC 皆無影響（表四）。

表三、快得寧對 CHO 細胞之姊妹染色體交換影響

Table 3. Effects of oxine copper on SCE in CHO cells

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	SCEs/cell (n = 60) ¹⁾	
	Without S9 activation	With S9 activation
1.6	8.2 ± 1.2	8.6 ± 1.3
8	$8.7 \pm 1.3^*$	8.4 ± 1.6
40	8.5 ± 1.1	$9.4 \pm 1.9^*$
200	$9.4 \pm 1.4^{**}$	$11.1 \pm 2.2^{**}$
Check control	8.2 ± 1.2	8.7 ± 1.4
DMSO	8.1 ± 1.2	8.4 ± 1.3
Positive control ²⁾	$23.6 \pm 3.9^{**}$	$23.0 \pm 4.3^{**}$

¹⁾ Means of sister chromatid exchanges were observed from 60 cells in each treatment. Data within a column followed by "*" and "**" represent significant difference between check control and treatments at level of 5% and 1%, respectively.

²⁾ Positive controls: 3.14 mM of ethyl methanesulfonate in assay without S9 bioactivation and 0.01 mM of cyclophosphamide in assay with S9 bioactivation.

表四、快得寧對 V79 細胞之細胞間隙連繫的影響

Table 4. Effects of oxine copper on GJIC in V79 cells

Oxine copper (μM)	Distance of dye transfer ($\mu\text{m}/\text{min}$) ¹⁾	
	Without S9 activation	With S9 activation
0.1	148.9 \pm 16.8	183.7 \pm 20.6
0.5	181.5 \pm 24.2	185.9 \pm 15.4
1	185.2 \pm 24.2	192.2 \pm 13.6
5	159.3 \pm 14.7	175.6 \pm 22.9
10	181.5 \pm 39.1	194.8 \pm 11.4
Check control	185.2 \pm 41.7	180.7 \pm 22.0
Dieldrin 10 μM ²⁾	43.7 \pm 19.2 **	125.9 \pm 36.4 **

¹⁾ Means of dye transfer distance in each treatment was scored in three replicates each in four scrapes. Data within a column followed by “***” represent significant inhibition in GJIC at level of 1%.

²⁾ Positive control used in both assays with and without S9 bioactivation.

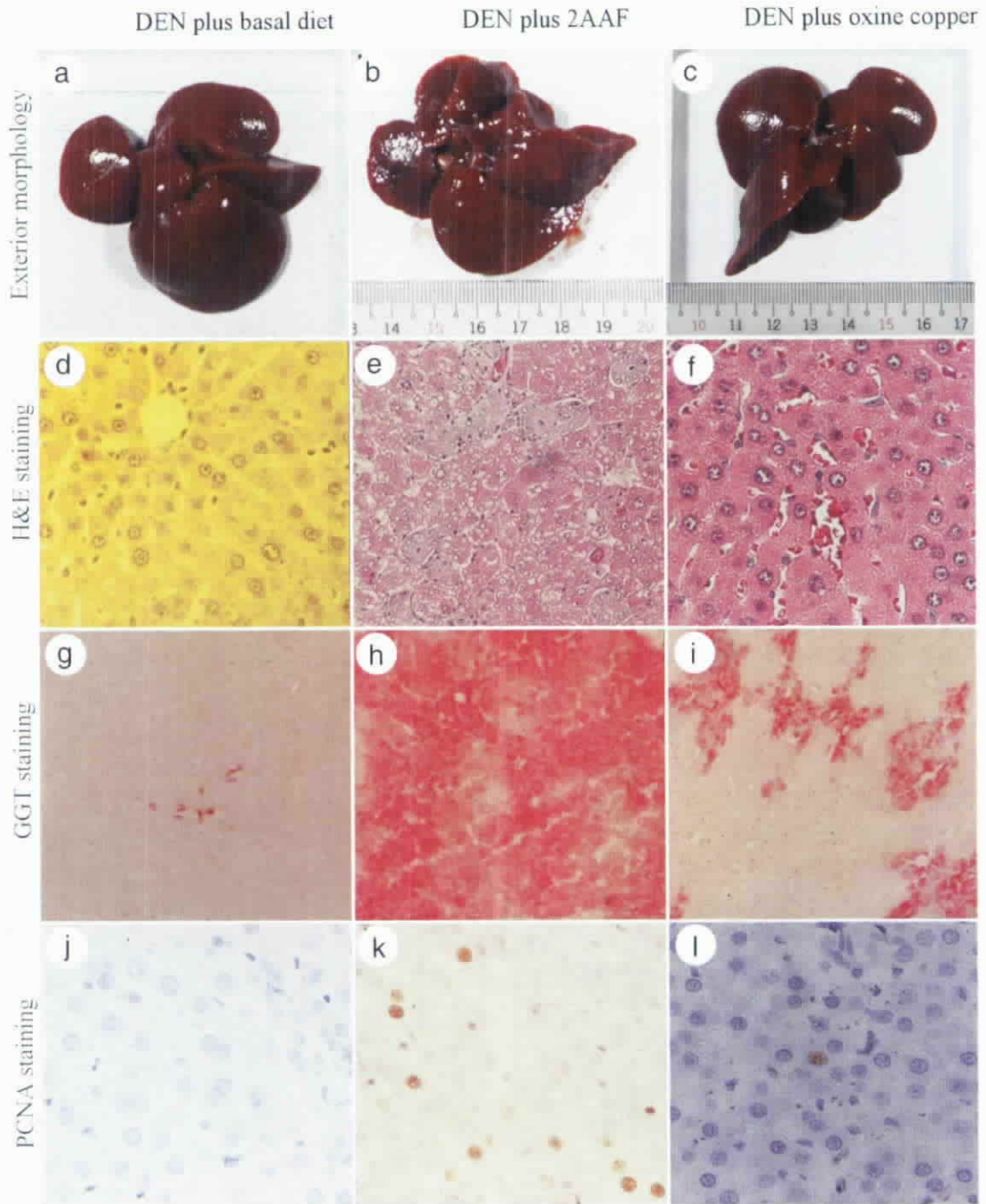
快得寧不會促使 Wistar 大鼠之肝臟腫瘤形成

Wistar 大鼠經 DEN 處理後，以含藥劑或一般飼料餵食之二階段肝腫瘤促進試驗 12 週期間，各組動物之取食量經 t-test 分析結果並無顯著差異，試驗過程中飼料之含藥與否對動物的取食並無影響（數據未列）。由每週之飼料消耗量及體重變化所估算的攝入藥劑劑量，在 2AAF 處理組平均為 14.7 \pm 1.5 mg/kg b.w./day，在快得寧處理組平均為 104.6 \pm 16.1 mg/kg b.w./day。

試驗結束時三組動物血清中的 ALT、AST 及總蛋白含量彼此間並無顯著差異（其皆在標準值範圍內：AST 含量為 143.0 \pm 16.7 U/L，ALT 含量為 68.3 \pm 7.1 U/L，總蛋白含量為 5.79 \pm 0.43 g/DL），顯示藥劑之餵食處理在 12 週時未見肝細胞之壞死現象。

2AAF 飼料餵食組如期看到肝癌之發生，其使動物體重明顯下降，肝臟外觀腫大並見結節（nodules），組織冷凍切片的

GGT-正染病灶（foci）遍佈全肝，石蠟切片之 H&E 染色則見病灶內的細胞形態多呈卵圓形，細胞核比較大而且有些呈空泡化，核仁也較正常細胞者大些，甚至可見到正在進行有絲分裂的染色體，而且細胞增殖指標分子^(7, 23)PCNA-正染細胞核數目也較多（圖一）。與一般飼料餵食組相比，2AAF 之對照處理使鼠隻的肝比重增加 63.1%，GGT-正染面積增多 21.5 倍，PCNA-正染細胞核數增多 7.6 倍（表五）。而在快得寧飼料餵食組，動物體重並無改變，肝臟外觀形態也未見任何異狀，但肝比重顯著下降 18.8%，石蠟切片之 H&E 染色可見肝組織中有許多的空隙，肝細胞略有萎縮現象，且有一些血球滲入組織間隙中（圖一），雖然 GGT-正染面積顯著上升 3.4 倍（顯著水準 1%），然而 PCNA-正染細胞核數目並未顯著增多（表五），快得寧農藥並未促成 Wistar 大鼠之肝臟腫瘤形成。



圖一、二階段肝腫瘤試驗 12 週之 Wistar 大鼠經 DEN 腹腔注射處理後以一般飼料 (左欄)、含 2AAF 飼料 (中欄) 及含快得寧飼料 (右欄) 飼食之肝臟組織病理切片檢查。a-c: 肝臟外觀形態 (尺標單位為 cm); d-f: 石蠟切片之蘇木素及伊紅素 (H&E) 染色 (200×顯微鏡觀察); g-i: 冷凍切片之 γ -羧胺醯轉化酶 (GGT) 活性染色 (100×顯微鏡觀察); j-l: 石蠟切片之增殖細胞核抗原 (PCNA) 組織免疫染色 (200×顯微鏡觀察)。

Fig. 1. Histologic examination of liver tissues from animals given DEN injection i.p. followed by basal, 2AAF- and oxine copper-containing diet (left-, middle-, and right-column, respectively) in two-step hepatocarcinogenesis assay at the 12th week of the experimental regime. (a-c: exterior morphology; d-f: 200× magnification of H&E staining in paraffin section; g-i: 100× magnification of GGT staining in cryosection; j-l: 200× magnification of PCNA immunostaining in paraffin section). Liver morphology from animal treated with DEN only was shown in figure (a). Paraffin section of this tissue in H&E staining observed regular arrangement of cells in liver lobule (d). Activity of GGT in red color was rarely occurred just at bile duct (g). Proliferating hepatocytes at S-phase were almost non-observed in the PCNA-immunostaining in which the negative response of blue nuclei was resulted from a contrast staining with hematoxylin (j). Positive control in DEN plus 2AAF treatment, many nodules were obviously appeared on the outlook liver (b). Abnormal hepatocytes, e.g. oval cells or enlarged nuclei, were frequently observed in paraffin section of H&E staining (e). This neoplastic nature of lesions was identified with GGT activity in hepatocyte (h). Proliferating hepatocytes at S phase were immunostained with PCNA-positive nuclear in brown color (k). Although the exterior morphology of rat livers was not changed by the treatment of DEN plus oxine copper (c), some cavities were occurred in lobules with penetration of blood cells (f). Activity of GGT was also appeared in hepatocytes besides in bile duct (i). However, few PCNA-positive nuclei were observed in this tissue (l). These results suggested that oxine copper did not promote the hepatocarcinogenesis but probably damage on rat liver in chronic.

表五、快得寧在肝腫瘤促進試驗中對大鼠體重、肝比重、 γ -羧胺醯轉化酶活性及細胞增殖的影響¹⁾

Table 5. Effects of oxine copper on body weight, relative liver weight, GGT, and PCNA in examination of two-step hepatocarcinogenesis in Wistar rat at 12th-week¹⁾

Feeding group ²⁾	Body weight (g)	Relative liver weight (%)	GGT area ³⁾ (mm ² /cm ²)	PCNA positive nuclei (no./mm ²) ⁴⁾
Basal diet	494.0 ± 20.1	3.14 ± 0.11	1.01 ± 0.48	2.91 ± 2.37
0.02% 2AAF	393.3 ± 17.9 ^{###}	5.12 ± 0.69 ^{**}	21.71 ± 5.15 ^{**}	22.24 ± 9.35 ^{**}
0.15% Oxine copper	467.9 ± 45.0	2.55 ± 0.22 ^{###}	3.44 ± 1.37 ^{**}	4.76 ± 3.17

¹⁾ Five animals of male Wistar rats were examined in each treatment. Data within a column followed by "***" and "###" represent significant higher and lower than basal diet treatment at level of 1%, respectively.

²⁾ All animals were received DEN injection i.p. (100 mg/kg b.w.) and then fed with basal, 2AAF- or oxine copper-containing diet.

³⁾ Three continuous cryosections of liver tissue from each animal were cut in thickness of 5-10 μm and activity of GGT was histochemically stained on the method of Rutenburg *et al.* ⁽²⁾. Quantitative assessment of GGT-positive area in liver tissue was analyzed with the aid of an image analyzer (Leica Quantimet 500).

⁴⁾ Paraffin sections of liver tissue in thickness of 3-5 μm were immunostained with mouse anti-PCNA monoclonal antibody (19A2) based on the menu in Universal Immunostaining Kit (Immunotech #1474). Number of PCNA-positive nuclei in each slide was scored in 100 continuous frames each in area of 0.045 mm².

討 論

快得寧不會直接引起沙門菌之基因變異、傷害枯草菌之 DNA 以及誘增 CHO 細胞之 SCE，可見快得寧農藥原體本身並無基因毒性。然而快得寧若經 S9 之處理後，其基因毒性反應即增強，包括使沙門菌 TA100 的回復突變數增多且劑量反應關係存在（表一），對枯草菌之 DNA 的傷害能力增強（表二），且隨劑量之增加而使 CHO 細胞的 SCE 增多（表三）。雖然快得寧經代謝後轉而具有基因毒性，但其既不影響 V79 細胞的 GJIC，也不會促進大鼠肝臟腫瘤之發生，其可能不具有轉化細胞及促進腫瘤形成等“非基因毒性”方面的影響，快得寧之致癌潛力大致上可被視為“具有基因毒性的非致癌（mutagenic non-carcinogen）”。

代謝後的快得寧所引起沙門菌的基因變異反應僅見於 TA100 菌種而非 TA98，其基因毒性作用模式乃限於鹽基置換而非框構位移突變反應，可能藥劑對基因位置的攻擊只限於“點”的方式而非整段 DNA 的嚴重破壞。由於重組檢定中枯草菌的 H17 (*rec*⁺) 及 M45 (*rec*⁻) 菌種是針對 DNA 聚合酶之修復能力差異而設計的，代謝後的快得寧對枯草菌之基因毒性測試結果得到“接近正反應界閥”的結果似可推測菌種 DNA 的受害可能不是很嚴重而可被其它修復系統加以部分修復的，可能快得寧代謝物對枯草菌之 DNA 傷害也是屬於“點攻擊”的方式而非激烈的片段傷害。在 SCE 試驗中，代謝後的快得寧雖使 CHO 細胞的 SCE 增加並見劑量反應關係，但增多的 SCE 並未嚴重到超過 2 倍以上，可能在 CHO 細胞內存在某些酵素可以代謝快得寧而使其基因毒性表現比在微生物裡要弱些。

在二階段肝腫瘤促進試驗中，動物經餵食而攝入的快得寧劑量平均為 104.6±16.1 mg/kg b.w./day，此約為大鼠急性口服 LD₅₀ 的 1/10，乃根據一般亞慢毒性試驗採用為

最高測試劑量之原則，此劑量對動物的體重及取食量皆無影響。試驗結果雖見肝細胞異常表現 GGT 活性，但由於細胞增殖不明顯，肝臟外觀形態亦無異狀，且肝比重下降，可見快得寧農藥之餵食處理並未促成大鼠肝臟腫瘤的形成。然而，由 GGT 活性異常增加、肝細胞萎縮及肝比重下降 18.8% 等結果看來，快得寧對大鼠之肝臟可能具有慢性傷害的風險。雖然試驗中僅用一組劑量處理，就試驗設計而言尚不夠嚴謹，然而由於腫瘤促進劑（tumor promoter）為具有劑量反應關係的特性，而試驗中的最高測試劑量即無致腫瘤影響，因此未進一步選取多個較低劑量處理繼續追究。

γ-羧胺醯轉化酶（GGT）活性的增加常見於肝癌組織中^(11, 19, 31)，致癌劑 2AAF 之餵食結果也的確看到 GGT 活性的增加與肝癌之間的關聯性。雖然快得寧使動物肝臟之 GGT 活性上升，卻未造成肝腫瘤，甚至使肝比重下降，由於 GGT 的生化功能乃在分解抗氧化分子 glutathione (GSH) 或與其結合的代謝物，因此，快得寧引起 GGT 活性之上升可能與引起生物的氧化性傷害（oxidative damages）有關。由於一些 quinone 類化合物可在動物肝臟被代謝為含自由基結構的 semiquinone 類代謝物⁽²⁶⁾，或經由 Fenton reaction 而產生活性氧化物，進而傷害 DNA⁽⁹⁾。因此，快得寧進入動物體內有可能在肝臟代謝為氧化性中間產物而傷害肝細胞或是 DNA，而在另一方面，肝臟細胞內既有的抗氧化分子如 GSH、catalase 等亦可能扮演著解毒的功能，因而使快得寧之餵食處理在最終並未引發肝癌的產生。

筆者亦從 DuPont 公司獲得不同純度（95%）的農藥原體重複致變異性試驗，亦得到與獲自 Aldrich（純度 98%）的農藥原體類似的結果（數據未列），以 GC-MS 分析此二農藥原體的不純物成分主要為 OHQ（數據未列），Zeiger 等⁽³⁵⁾曾以 OHQ 進行沙門菌回復突變試驗結果指出，OHQ 在

33-66 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 時使 TA100 菌種之回復突變數增加 2 倍，而本文中的快得寧農藥原體則在 111-333 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 處理時使 TA100 菌種之回復突變數增加 2 倍，若由原體之純度推算，快得寧農藥原體經 S9 代謝後致變異性增強的原因可能不全是不純物 OHQ 所致。其可能經由肝臟酵素代謝後分解為 OHQ 而引起基因毒性反應，或是因代謝分解而釋出大量的銅離子，促進細胞內的 Fenton reaction 而增加了對細胞的氧化性傷害，其間之詳細關聯性如何則有待進一步探討。而 Willem 氏⁽³⁴⁾曾檢測 quinoline 及其衍生的 23 種經基化合物的致變異性，OHQ 為其中 5 種具有致變異性化合物之一，快得寧亦有可能因與 OHQ 具有類似的結構而有類似的毒性反應。無論如何，快得寧經肝臟酵素代謝後基因毒性增強的事實，值得吾人對該農藥使用之安全性加以重新評估與考量，舉凡慢毒性之無毒害藥量 (non-observable adverse effect level) 的重新評估、每日容許攝入量 (acceptable daily intake) 的重新定訂、乃至解毒策略的研擬等措施，皆有待加強改進以維國人之健康福祉。

為了避免農藥的使用引起人畜之腫瘤危害，我政府在核准農藥使用前所嚴審的相關毒理資料，主要以致變異性及二種哺乳動物之二年長期餵食試驗為依據；而若有人類流行病學之傷害報告則可隨時禁止該農藥之使用。此項考慮固然周嚴但還是有漏洞的，因為流行病學之資料可遇不可求，不能防患於未然，而且事發時已付出高昂的代價；基因毒性測試固然快速又經濟地篩檢出藥劑的致變異性，但不能預測後繼的腫瘤促進作用 (tumor promotion effects)；而哺乳動物之二年試驗耗費時日與經費既可觀，僅由兩種動物之試驗結果其實不能解決種間差異性 (species specificity) 的問題，而且試驗過程中的單一藥劑投藥方式，其實無助於瞭解促進腫瘤作用的問題。事實上，環境中天然的致

變因子比比皆是，陽光中的紫外線、高溫烤炸的肉食^(5, 16, 24, 25)、空氣中的溶劑(如 vinyl chloride)、醫療用藥(如 MMC)等，實為人體難以避免曝露的先天危機。因此，農藥(或其它毒性化學物質)在促進腫瘤作用方面的影響評估，實為評估藥劑致腫瘤性當中不可或缺的一環。未來在藥劑的致癌風險評估過程中，非基因毒性方面的致癌可能影響，其實比二年長期餵食試驗更值得吾人正視。

謝 辭

本研究經費由行政院農業委員會補助 (87-AST-1.3-FAD-26 (6-2) -3)，謹此致謝。

引用文獻

1. 臺灣省政府農林廳編印 1998 植物保護手冊
2. Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
3. Armstrong, M. J., Bean, C. L., and Galloway, S. M. 1992. A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 265: 45-60.
4. Ashby, J., Mohammed, R., Lefevre, P. A., and Bandara, L. 1989. Quinoline: Unscheduled DNA synthesis and mitogenesis data from the rat liver in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 14: 221-8.
5. Connors, M. S., Malfatti, M. A., and Felton, J. S. 1995. The metabolism and DNA binding of the cooked-food mutagen, 2-amino-1-

- methyl-6-phenyl imidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in precision-cut rat liver slices. *Chemico-Biological Interactions* 96: 185-202.
6. D'Andrea, P. D., and Vittur, F. 1996. Gap junctions mediate intercellular calcium signaling in cultured articular chondrocytes. *Cell Calcium* 20: 389-397.
 7. Dietrich, D. R. 1993. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *CRC Rev. Toxicol.* 23: 77-109.
 8. El-Fouly, M. H., Trosko, J. E., and Chang, C. C. 1987. Scrapeloading and dye-transfer: A rapid and simple technique to study gap junction intercellular communication. *Exp. Cell Res.* 168: 422-430.
 9. Flowers, L., Ohnishi, T., and Penning, T. M. 1997. DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: Role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals. *Biochemistry* 36: 8640-8648.
 10. Gershon, H., Grefig, A. T., and Cady, D. J. 1985. Evidence that the mechanisms of fungitoxicity of 8-quinolinol and its bischelatate with copper (II) are different. *Can. J. Microbiol.* 31: 707-710.
 11. Hanigan, M. H., and Pitot, H. C. 1985. Gamma-glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 6: 165-172.
 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 de Serres, F. J. & Hollaender, A. [eds.], *Chemical mutagens: principles and methods for their detection* Vol. 6. Plenum Press. New York and London.
 14. Kang, K. S., Wilson, M. R., Hayashi, T., Chang, C. C., and Trosko, J. E. 1996. Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures. *Environ. Health Persp.* 104: 192-200.
 15. Kier, L. E., Brusick, D. J., Von Halle, A. E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Ral, T. K., and Ray, V. 1986. The *Salmonella typhimurium* / mammalian microsomal assay. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 168: 69-240.
 16. Knize, M. G., Sinha, R., Rothman, N., Brown, E. D., Salmon, C. P., Levander, O. A., Cunningham, P. L., and Felton, J. S. 1995. Heterocyclic amine content in fast-food meat products. *Fd. Chem. Toxic.* 33: 545-551.
 17. Kumar, N. M., and Gilula, N. B. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
 18. 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 gene-tox program. *Mutat. Res.* 87:17-62.
 19. Liberman, M. W., Barrios, R., Carter, B. Z., Habib, G. M., Lebovitz, R. M., Rajagopalan, S., Sepulveda, A. R., Shi, Z.-Z., and Wan, D.-

- F. 1995. γ -Glutamyl transpeptidase. *Am. J. Pathol.* 147: 1175-1185.
20. Mancini, R., Marucci, L., Benedetti, A., Jezequel, A. M., and Orlandi, F. 1994. Immunohistochemical analysis of S-phase cells in normal human and rat liver by PC10 monoclonal antibody. *Liver* 14: 57-64.
21. Maron, D. M., and Ames, B. N. 1983. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
22. McFee, A. F. 1989. Genotoxic potency of three quinoline compounds evaluated in vivo in mouse marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 325-331.
23. Mehra, R. 1995. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. *Cancer Letter* 93: 85-102.
24. Nagao, M., Ochiai, M., Hasegawa, R., and Ito, N. 1994. Dietary carcinogens and mammary carcinogenesis. *Cancer* 74: 1063-1069.
25. Nukaya, H., Koyota, S., Jinno, F., Ishida, H., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Kim, I.-S., Yamaizumi, Z., Ushiyama, H., Sugimura, T., Nagao, M., and Tsuji, K. 1994. Structural determination of a new mutagenic heterocyclic amine, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline (7,9-diMeIgQx). *Carcinogenesis* 15: 1151-1154. (Abstr.)
26. Parkinson, A. 1996. Biotransformation of xenobiotics. pp. 113-186. In Klassen, C. D., Amdur, N. O., and Doull, J. [eds.] *Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Press.
27. Perry, P., and Wolff, S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature* 251: 156-158.
28. Rinkus, S. J., and Legator, M. S. 1979. Chemical characterization of known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.* 39: 3289-3318.
29. Rutenburg, A. M., Kim, H., Fishbein, J. W., Hanker, J. S., Wasserkrug, H. L., and Seligman, A. N. 1969. Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 517-526.
30. Sideropoulos, A. S., and Specht, S. M. 1984. Evaluation of microbial testing methods for the mutagenicity of quinoline and its derivatives. *Curr. Microb.* 11: 59-65.
31. Solt, D. B., and Farber, E. 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogens. *Nature* 263: 701-703.
32. 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.
33. TOXNET Data Bank. 1998. National Library of Medicine Specialized Information Services.
34. Willems, M. I., Dubois, G., Boyd, D. R., Davies, R. J. H., Hamilton, L., McCullough, J. J., and Van Bladeren, P. J. 1992. Comparison of the mutagenicity of quinoline and all monohydroxyquinolines with a series of arene oxide, trans-dihydrodiol, diol epoxide, N-oxide and arene hydrate derivatives of quinoline in the Ames/*Salmonella* microsome test. *Mutat. Res.* 278: 227-236.

35. Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., and Mortelmans, K. 1988. *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ. Mol. Mutagen 11 (Suppl.12): 1-158.

ABSTRACT

You, B. Y.^{1,2}, Wang, Y. H.², and Kuo, M. L.¹ 1999. Evaluation of genotoxicity and carcinogenicity on fungicide, copper 8-hydroxyquinolate, by short-term tests. Plant Prot. Bull. 41: 119-132. (¹Institute of Toxicology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.; ²Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic substances Research Institute, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Copper 8-hydroxyquinolate (oxine copper, Quinolate) is one of the most widely used fungicides in Taiwan. Recently, the parent compound of oxine copper, 8-hydroxyquinoline, has been found to be a mutagen as well as a potent carcinogen. In this context, it seems necessary to re-evaluate the mutagenicity/carcinogenicity of oxine copper. To evaluate the genotoxicity of oxine copper, a battery of short-term tests, *i.e.*, *Salmonella*/microsomal reversion assay (Ames test), *rec* assay and sister chromatid exchanges (SCEs) assay, were employed in this study. Furthermore, the tumor promoting effects of oxine copper were also examined by using *in vivo* hepatocarcinogenesis as well as *in vitro* gap junctional intercellular communication assay. In the presence of rat liver S9 extract, oxine copper significantly induced base-pair substitution of *his* gene in *S. typhimurium* TA100, DNA damages in *Bacillus subtilis* and SCEs in CHO cells. However, oxine copper did not induce genotoxic responses in these systems in the absence of rat liver S9 extract. In two-step hepatocarcinogenesis examination, oxine copper did not alter the morphology of rat liver and the number of proliferating cells; yet, the relative liver weight was reduced. Oxine copper failed to inhibit the GJIC in V79 cells either in the presence or absence of S9 bioactivation. These results suggest that oxine copper did not promote hepatocarcinogenesis in Wistar rats. However, γ -glutamyltranspeptidase activity was increased in oxine copper-treated rats implying that a chronic toxic response occurred in treated liver. Toxicity of oxine copper in mammals should be evaluated further and more detailed mechanisms should be studied to diminish the risk of oxine copper-induced mutagenicity and/or carcinogenicity.

(Key words: copper 8-hydroxyquinolate, Ames test, *rec* assay, SCE assay, GJIC, two-step hepatocarcinogenesis)