

農藥之生殖與發育毒理及 荷爾蒙干擾作用研究與展望

呂水淵

前 言

哺乳動物的生殖週期可歷經雌、雄交配後受胎(conception)、形成受精卵(zygote)、子宮中著床(implantation)、形成胚(embryo)、軟顎關閉期胚胎(palate closure)、成胎(fetus)、出生(birth)、嬰兒期(infant)、離乳(weaning)、少年期(juvenile)、青春期(adolescence)、發身(puberty)、成熟前(premature)、性成熟(sexual maturity)、雄/雌生殖細胞(male/female gametes)、配種/懷孕(mating/fertility)及細胞衰老(senescence)(圖1.)。上述生殖週期都包括在生殖與發育毒性測試範圍內(Christian, 2008)。不論是USPEA或OECD的化學物質毒性測試指引，均建議以嚙齒類大鼠和非嚙齒類兔子為進行生殖與發育毒性研究之試驗動物，此乃由於此兩種動物的基因特性和生理性狀已被研究很多，不論在飼養管理配合或繁殖性狀研究等都極為完備，對生殖發育毒理研究亦屬敏感動物，因此適合做為本項測試之試驗動物。近年來除生殖與發育毒理研究外，衍生出的生殖內分泌之荷爾蒙干擾作用漸受重視，歐盟已分別於2007與2009年公告雌、雄性荷爾蒙干擾作用測試指引(表1.)。

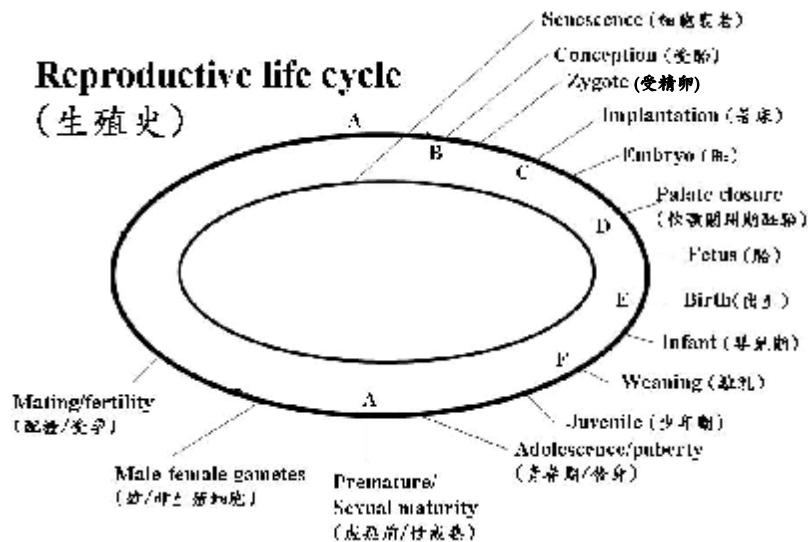


圖1. 生殖與發育的影響階段(Christian, 2008)。

表1. OECD與EPA OPPTS生殖與發育毒及荷爾蒙干擾作用試驗指引

試驗體系	試驗指引		試驗目的
	OECD ^a	EPA OPPTS ^b	
出生前發育毒性試驗(Prenatal development toxicity study)	Test No. 414.	870.3700	研究藥物對測試懷孕動物與仔代發育中器官的影響，包括母獸生長性狀與生殖性狀、仔代身體結構異常、生長及死亡等。
一代生殖毒性試驗(One-generation reproduction toxicity study)	Test No. 415.	-	研究藥物對雌、雄性測試動物生殖性狀包括性腺功能、動情週期、交配行為、懷孕、分娩、泌乳及離乳等影響。同時提供出生前發育毒性試驗有關仔獸出生前後瀕死、死亡率、行為及死致畸胎性等訊息。
二代生殖毒性試驗(Two-generation reproduction toxicity)	Test No. 416.	870.3800	研究藥物對雌雄性測試動物生殖性狀包括性腺功能、動情週期、交配行為、受胎、懷孕、分娩、泌乳、離乳及連續二個仔代發育與生長性狀等影響。同時提供出生前與出生後及後續發育毒性試驗有關仔獸出生前、後瀕死、死亡率、行為及致畸胎性等訊息。

試驗體系	試驗指引		試驗目的
	OECD ^a	EPA OPPTS ^b	
生殖/發育毒性篩選測試 (Reproduction/developmental toxicity screening test)	Test No. 421.	870.3550	研究藥物對測試動物生殖與發育可能影響，提供藥物早期毒性評估參考。
結合重覆劑量生殖/發育毒篩選測試(Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test)	Test No. 422.	870.3650	研究藥物在一定時間內重複暴露對測試動物生殖與發育毒性作用，提供長期毒性試驗參考。
發育中神經毒性試驗 (Developmental neurotoxicity study)	Test No. 426.	870.6300	研究藥物暴露懷孕階段與出生早期生長期間如哺乳期等對發育中仔代神經系統功能與外觀潛在之劑量-反應關係影響。
嚙齒類動物子宮激性分析：動情素作用短期性篩選 (Uterotrophic bioassay in rodents : A short-term screening test for oestrogenic properties)	Test No. 440.	-	研究類動情素化合物促進或拮抗動情素受體 α 與 β ，轉錄動情素受體作用，誘發生殖與發育毒性。
Hershberger 氏分析 (Hershberger bioassay)	Test No. 441.	-	研究類雄性素化合物促進或拮抗雄性素受體，轉錄雄性素受體作用，誘發生殖與發育毒性。

^aOECD (<http://titania.sourceoecd.org/vl=17633093/cl=11/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm>)

^bEPA OPPTS (http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series870.htm)

由於生殖毒試驗中具潛在生殖毒藥物作用多與荷爾蒙有關，而發育毒試驗中之致畸胎性藥劑推測主要攻擊分裂與複製中的細胞所致，因此生殖與發育毒性測試為慢毒性試驗中屬作用較敏感類型者，也因此類毒性試驗可作為所有測試項目中指標性試驗。本文將討論農藥之生殖與發育毒及荷爾蒙干擾作用，在現行測試種類與其在法規面要求、相關測試方法指引、簡要測試過程、生殖與發育毒作用與可能作用機制、荷爾蒙干擾作用可能作用機制及本實驗室研究心得等。期望本文有助於管理農藥有關生殖與發育毒及荷爾蒙干擾作用等議題，避免農藥使用危及農藥從業人員與消費大眾健康。

農藥之生殖與發育毒及荷爾蒙干擾作用測試種類 與其在法規面要求

要將前述生殖與發育過程涵蓋在毒性測試中，需要何種測試方法，現行法規面大致可分成表2.所列內容（藥品非臨床試驗安全性規範第三版，2000年），但全世界各不同主管單位對於生殖與發育毒測試區分又有如表3.所列之差異（USFDA,1996；Committee on the Safety of Medicines, 1974；European Economic Community,1988；Ministry of Health and Welfare,1975, 1984；Tanimura et al.,1989；OECD, 1981, 1996；U.S.EPA, 1991, 1993, 1998；U.S.FDA, 2000, 1993, 1994；Chernoff and Kavlock, 1982；Hardin, 1987；Lamb,1985；orrissey et al.,1989；Narotsky et al., 1995）。雖然不同國際組織在生殖與發育毒測試分類有些不同，但大致原則相似。現行本國一個全新農藥登記上市，其所需具備毒理資料中，有二項與生殖與發育毒有關之試驗，即為農藥原體之生殖毒性試驗與出生前發育毒試驗，其中生殖毒性試驗為至少連續2仔代的試驗結果，得以一種哺乳類動物進行試驗，一般以啮齒類之大鼠為試驗動物。另一項，出生前發育性試驗應含二種動物試驗，其中一種應與生殖毒性試驗之動物種類相同，一般以大鼠與非啮齒類之兔子為試驗動物。

表2. 生殖與發育毒性測試種類與目的及投藥時間

測試種類	測試目的	投藥時間
生殖與發育毒性第一期試驗(第一期，Segment I)	試驗物質對雄、雌兩性的生殖力影響及受精卵之運送與著床	懷孕前期與初期
生殖與發育毒性第二期試驗(第二期，Segment II)	試驗物質對胚胎發育之影響及造成畸胎之可能性	胚胎著床至器官形成完全之階段
生殖與發育毒性第三期試驗(第三期，Segment III)	試驗物質對母體、胚胎發育及新生兒之影響及引起畸胎之可能性	自器官形成後至授乳完全之階段

測試種類	測試目的	投藥時間
後代繁殖毒性試驗	試驗物質對雄、雌兩性生殖功能表現包括性腺功能、動情週期、配種行為、受胎、懷孕、分娩、泌乳、離乳及仔代發育生長等，同時可探討仔代出生時死亡率與出生前與後仔代發育毒性，供後續試驗參考。	親代兩性與連續兩仔代在配種前、後、懷孕、泌乳均投藥。

藥品非臨床試驗安全性規範第三版 (2000年)

表3. 國際調和會議針對哺乳動物生殖與發育階段與各種研究型態之相似觀察指標之比較

國際調和會(ICH)	美國食品藥物管理局指引(FDA Guidelines ^a)	英國與歐洲經濟組織指引(Great Britain and EEC Guidelines ^b)	日本指引 (Japanese Guidelines, Tanimura ^c)	美國環保署、歐洲經濟共同組織、及美國食品藥物管理局紅皮書指引(EPA OPPTS, OECD and FDA Redbook Guidelines ^d)	替代方法或額外評估 (Alternative or Additional Evaluations ^e)
A. 配種前到受胎：成年動物生殖功能包括胚發育與成熟、配種行為及受孕	1. 第一期。	1. 第一期。	1. 第一期。	1. 多代生殖毒。 2. 一代生殖毒。	持續配種修正後 Chernoff Kavlock 方法
B. 受胎到著床：成年雌性動物生殖功能、胎體在著床前與著床階段	1. 第一期。	1. 第一期。	1. 第一期。	1. 多代生殖毒。 2. 一代發育毒。	持續配種修正後 Chernoff Kavlock 方法
C. 著床到硬顎閉合：成年雌性動物生殖功能和胚發育到主要器官形成	1. 第一期。 2. 第二期。	1. 第一期。 2. 第二期。	1. 第二期。	1. 多代生殖毒。 2. 第一代發育毒。 3. 發育中神經毒。	持續配種修正後 Chernoff Kavlock 方法
D. 硬顎閉合到懷孕結束：成熟雌性動物生殖功能、仔代發育、生長及器官發育	1. 第一期。 2. 第二期。 3. 第三期。	1. 第一期。 2. 第二期。	1. 第二期。	1. 多代生殖毒。 2. 一代發育毒。 3. 發育中神經毒。	持續配種修正後 Chernoff Kavlock 方法

國際調和會(ICH)	美國食品藥物管理局指引(FDA Guidelines ^a)	英國與歐洲經濟組織指引(Great Britain and EEC Guidelines ^b)	日本指引(Japanese Guidelines, Tanimura ^c)	美國環保署、歐洲經濟共同組織、及美國食品藥物管理局紅皮書指引(EPA OPPTS, OECD and FDA Redbook Guidelines ^d)	替代方法或額外評估(Alternative or Additional Evaluations ^e)
E. 出生到離乳：成熟雌性動物生殖功能、接近出生到子宮外之適應包括離乳前發育、生長(出生後年齡計算根據交配後年齡為準)	1.第一期。 2.第二期。 3.仔獸毒性。	1.第一期。 2.第二期。 3.第三期。	1.第二期。 2.第三期。	1.多代。 2.一代發育毒性。 3.發育中神經毒。	修正後的 Chernoff Kavlock 方法
F. 離乳到成熟：評估仔鼠當離乳後發育和生長、適應獨立生活及性成熟	1.仔獸毒性。	1.第一期。	1.第二期。 2.第三期。	1.多代生殖毒。 2.發育中神經毒。 3.發育中免疫毒。	

Note: ICH: The International Conference for Harmonization; FDA: U.S. Food and Drug Administration; EEC: European Economic Community directive; EPA OPPTS: U.S. Environmental Protection Agency, the Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances; OECD: The Organization for Economic Cooperation and Development

^a Data from USFDA (1996).

^b Data from Committee on the Safety of Medicines (1974) and European Economic Community (1988).

^c Data from Ministry of Health and Welfare (1975; 1984) and Tanimura et al (1989)

^d Data from OECD (1981;1996), U.S.EPA (1991; 1993; 1998), U.S.FDA (2000; 1993; 1994).

^e Data from Chernoff and Kavlock (1982), Hardin (1987), Lamb (1985), Morrissey et al. (1989), and Narotsky et al. (1995).

農藥之生殖與發育毒及荷爾蒙干擾作用測試方法指引

經濟合作開發組織(The Organization For Economic Cooperation and Development, OECD)與美國環保署(Environmental Protection Agency, USEPA)針對化學物質之安全性評估方法指引如表1.所示(<http://titania.sourceoecd.org/vl=17633093/cl=11/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm>) and EPA OPPTS (http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series870.htm)。一如前述，本國全新農藥登記上市，其所需具備毒理資料為農藥原體之生殖毒性試驗與出生前發育毒試驗，因此表1.測試指引主要為出生前發育毒(Test No. 414與USEPA 870.3700)與後代繁殖毒性試驗(Test No. 416與USEPA

870.3800)。至於一代繁殖毒試驗(Test No. 415與USEPA 870.3550)與生殖/發育毒篩選試驗及結合重覆暴露與生殖/發育毒篩選試驗(Test No. 422與USEPA 870.3650)則是提供試驗單位初步評估或篩選目的之測試方法，一般而言，此些試驗結果較少做為正式農藥登記用毒理報告，多作為輔助說明用。另外，發育中神經毒理試驗(Test No. 426與USEPA 870.6300)主要測試化合物透過母體胎盤與哺乳暴露是否造成荷爾蒙干擾作用之發育中神經毒性，此一指引點出經由後代繁殖毒性衍生出的荷爾蒙干擾作用議題，本實驗室未發表資料顯示，具荷爾蒙干擾作用的化合物透過僅暴露親代第一代母體(懷孕第0~20天時投藥)，爾後第二、三及四代均未處理藥劑，同劑量組選不同親代來源之仔代配種，依此類推至第四代，荷爾蒙干擾作用竟然可以傳遞至第四代仔代產生生殖器官與組織重增加、肛門與生殖器官距離改變等荷爾蒙干擾作用、肥胖與甘迺迪氏症(Kennedy's disease, KD)，KD為一種因雄性素受體基因中(CAG)重複增生出現有關的脊髓延肌肉萎縮症 (spinal bulbar muscular atrophy, SBMA) (Fischbeck et al., 1999； Au et al., 2003； Merry, 2005； Finsterer, 2009)。因此，OECD已經增加Test No. 440與Test No. 441，分別為雌性素與雄性素荷爾蒙干擾作用測試指引。但USEPA則尚未公告相關指引。有關荷爾蒙干擾作用的會議早在多年前即已經受到重視，因此不論是美國、歐盟或日本針對荷爾蒙干擾作用相關會議均持續進行中，其中美國環保署在1998年完成會議結論，可在網站取得Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC)Final Report(EDSTAC)報告(<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)。其中比較具體的測試方法如表4.所述(<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)。除針對哺乳動物進行測試外，荷爾蒙干擾作用也對其他生物進行多代測試，如表5.所述(<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)，但本文仍以哺乳動物為討論重點。

表4. 荷爾蒙干擾作用第一階段篩選與第二階段測試項目

第一階段三項體外試驗

- 1.雌性激素受體鍵結效應及指標性基因測試(an estrogen receptor binding or reporter gene assay)
 - 2.雄性激素受體鍵結效應及指標性基因測試(an androgen receptor binding or reporter gene assay)
 - 3.睪丸剝碎勻漿培養之類固醇增生效應(a steroidogenesis assay with minced testis)
-

第一階段五項體內試驗

1. 為期三天之鼠體子宮增生試驗(a rodent 3-day uterotrophic assay)
 2. 為期二十天之青春期雌鼠甲狀腺試驗(a rodent 20-day pubertal female assay with enhanced thyroid endpoints)
 3. 鼠體Hershberger分析試驗(a rodent 5 to 7-day Hershberger assay)
 4. 青蛙成長過程期間之型態變化測試(a frog metamorphosis assay)
 5. 魚性腺再現分析(a fish gonadal reproductive screening assay)
-

第二階段測試

1. 哺乳類二代間生育繁殖系統毒性測試(two-generation mammalian reproductive toxicity study)
-

EDSTAC(<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)

表5. 荷爾蒙干擾作用其他生物多代測試項目

-
1. 鳥類生育繁衍影響測試(鵪鶉與野鴨) (avian reproduction with bobwhite quail and mallard)
 2. 魚類生命週期測試(鱒魚) (fish life cycle, fathead minnow)
 3. 糠蝦生活史(Americamysis) (Mysid life cycle, Americamysis)
 4. 兩棲類成長及生育繁衍能力的測試(amphibian development and reproduction, Xenopus)
-

EDSTAC (<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)

生殖與發育毒性各階段簡要測試過程

以農藥原體登記上市所需必備之二種哺乳類動物之出生前發育毒試驗與一種與出生前發育毒試驗相同之後代繁殖毒試驗為例，另外，針對不同化學物質現在相關毒性資料，可能需要先進行第一或第三期生殖毒性試驗，下列提供相關試驗簡要流程圖。圖2.為美國食品與藥物管理局第一、二、三期生殖毒性測試流程圖，第一期試驗可以大約5週齡大鼠，雌、雄分別投藥14、60天，再進行配種，於懷孕與泌乳過程期間均需投藥，此一期目的在評估試驗物質對雄、雌兩性的生殖力影響及受精卵之運送與著床影響。第二期試驗可以性成熟大鼠經配種後，開始計算懷孕日期(陰栓檢出日為第0天)，懷孕第6~15天為投藥期間，第20天為解剖日期;兔子一般以人工授精為主，授精日為懷孕第0天，懷孕第6~18天為投藥期間，第29天為解剖日期。此期目的在評估試驗物質對胚胎發育之影響及造成畸胎之可能性。第三期試驗可以性成熟大鼠經配種後，懷孕第15天-分娩後21天離乳時為投藥期間。此期目的在評估試驗物質對母體、胚胎發育及新生兒之影響及引起

畸胎之可能性(Christian, 2008)。

圖3.為以大鼠進行後代繁殖毒試驗之流程圖，雌、雄大鼠大約在30~40日齡時開始投藥至100~120日齡，接著配種生下第一胎仔代，但此一次仔代在離乳後即犧牲；離乳後1~2週，母鼠再次配種，生下第二胎仔代，此胎離乳後經飼料投藥飼養至性成熟，供選擇做為親代用。再重覆前述過程，生下第二胎仔代離乳時犧牲才結束。儘管不同國際組織會稍為修飾其測試指引，但第一、二、三期及後代繁殖毒測試原則不變(Manson et al., 1982)。

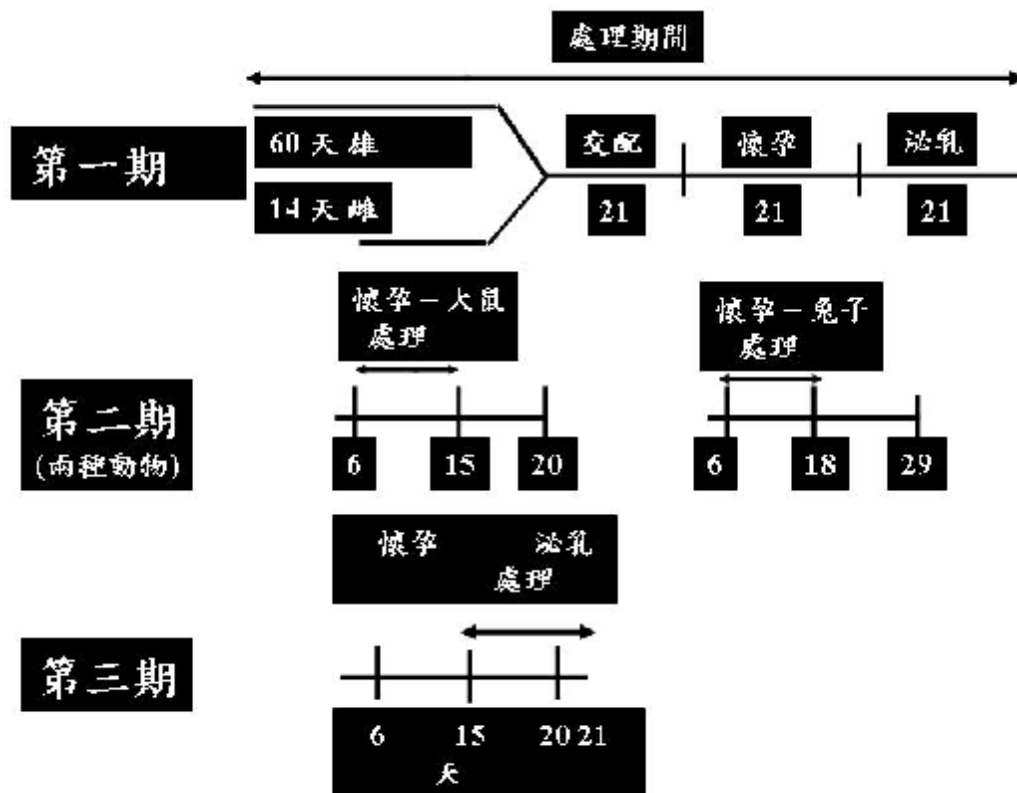


圖2. 美國食品與藥物管理局第一、二、三期生殖毒性測試流程圖(Christian, 2008)。

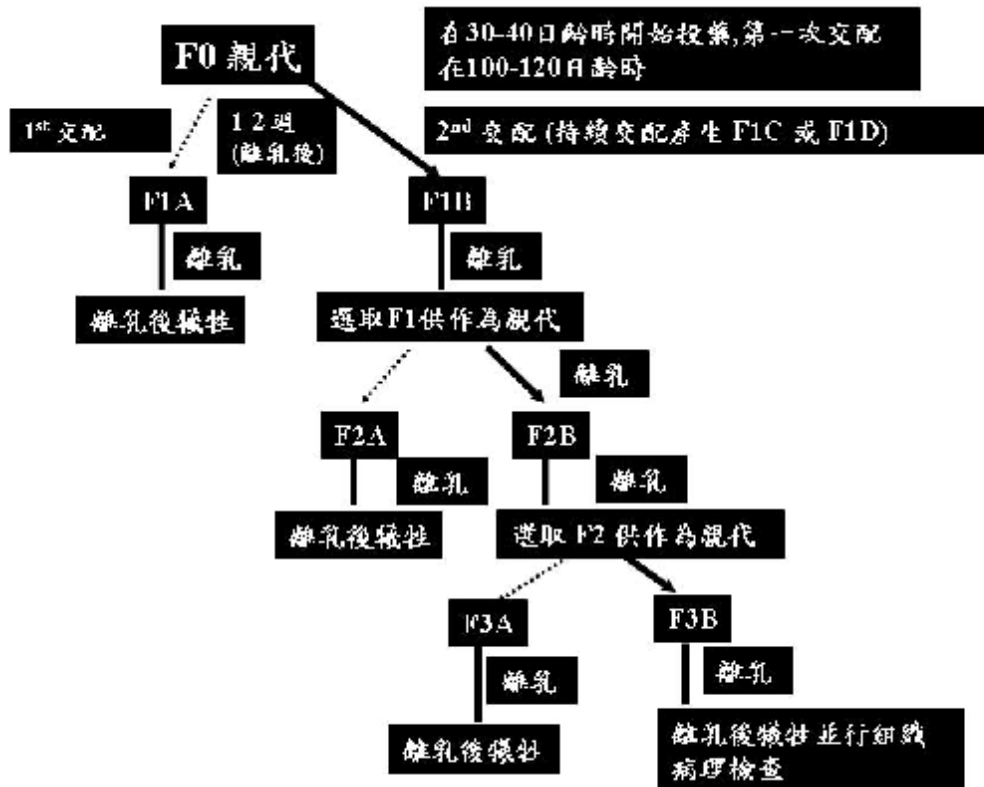


圖3. 後代繁殖毒測試流程圖(Manson et al., 1982)。

誘發生殖與發育毒性之藥劑、作用及可能作用機制

探討毒性作用機制乃毒理學重要的工作之一，儘管困難度高，但對預防與後續工作如補救措施等極為重要，有關藥劑誘發生殖與發育毒性之較明確作用機制不多。可從探討具生殖與發育毒性藥劑之影響過程，再歸納化學物質代謝過程與毒性反應，有助於研究此類藥劑之作用機制。以不同處理期間探討大鼠為主之試驗動物受藥劑之影響，再從生殖毒性反應推測此類藥劑之可能作用機制，例如，表6.為經由不同生殖階段受藥劑處理之影響，進而推測此類藥劑之作用標的器官(Chapin and Heindel, 1993)。一些被研究過具誘發雌性生殖毒性的藥劑族群及其可能基因層面影響機制如表7.所示 (Cassidy et al., 1996; Cummings and Perreault, 1990; Elger et al., 1990; Haney 1985; Heindel et al., 1989; Pfaff and Schwartz-Giblin, 1988)。另外，針對具誘發發育毒性藥劑之可能一般作用機制如表8.所示 (Faustman et al., 1997; Brent, 1999; Koebe et al., 1999; Gelineau-VanWaves et al., 1999)。胚胎器官對致畸胎藥劑敏感性假說模式早在1965年時已被提出(Wilson and Warkany, 1965)，大鼠在懷孕期間暴露到具發育毒性藥劑，不同時段暴露可能誘發不同器官

之異常，乃因其懷孕期間不同時期器官發生時細胞分裂正在進行致易遭受攻擊(圖4.)。發育毒性藥劑可分為三類，第一類在低劑量時即可誘發嚴重畸形，當升高劑量時則導致胚胎生長遲滯現象，若再提高劑量則導致胚胎死亡(圖5.A)。第二類在誘發嚴重畸形、胚胎生長遲滯及死亡之劑量極為接近，此類藥劑最不易進行試驗，因其劑量範圍很窄(圖5.B)。第三類則不產生致畸胎性，當劑量提高時導致胚胎生長遲滯現象，劑量更高時則造成胚胎死亡(圖5.C)。

表6. 推測藥劑對雌性生殖過程之影響(摘自Chapin and Heindel, 1993)

過程	處理	作用	潛在副作用
1	處理前(14 天)	動情週期	發情週期異常，如發生率異常高時考慮環境因素
2	處理期間(雌、雄併籠前14天)	動情週期	處理前改變否，推測荷爾蒙變化
3	處理期間從雌雄併籠到懷孕	雌性動物與未處理雄性動物1：1併籠，觀察交配行為-接受度，受精-發情間期與，陰道腔栓檢出定為懷孕第0天	減少或無交配行為，發情週期異常
4	處理期間從懷孕第0天至犧牲前為止	犧牲半數懷孕第21天時動物-依據交配表現預先選取，排除那些影響結果者，觀察組織肉眼傷害、黃體、懷孕否、著床數、活與死胎數、仔代重量及性別等	減少黃體數、著床數、活仔數-點出發生時機點、減少仔獸體重、改變性比率
5	處理期間從出生至泌乳	半數動物自然分娩，觀察懷孕期間、分娩、母獸分娩前後行為、仔獸數、活力、仔獸重量、性別及外觀、活力、生長、臨床症狀、母獸與仔獸互動至離乳、著床數與肉眼外觀異常	減少著床數、改變懷孕與分娩期間、減少母獸照顧/泌乳行為、減少窩仔數、與/或仔獸活力、減少或增加仔獸重、改變仔獸性比率與外觀、減少仔獸生長與活力及功能

本實驗室多年來進行農藥在大鼠之生殖與發育毒性試驗結果(呂等, 1995a, 1995b; 呂與王, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000; Lu et al., 2004, 2006), 發現藥劑化學結構與其生殖與發育毒性作用息息相關, 具官能基benzimidazole者為一強度生殖與發育毒性藥劑之重要必備項目之一, 其另一組合官能基若是具有可形成氫鍵者則構成一強烈生殖與發育毒性藥劑; 但另一組合官能基若是較無法形成氫鍵者則相對減弱其強度。而benzimidazole此官能基結構極相似去氧核糖核酸中之鹼基, 因此本實驗室推論發育毒性就合理推估應是細胞分裂時產生異常所致, 極可能是化學結構類似去氧核糖核酸中鹼基如腺嘌呤(adenine, A)、鳥嘌呤(guanine, G)、尿嘧啶(uracil, U)、胞嘧啶(cytosine, C)及胸腺嘧啶(thymine, T)等之化合物在細胞分裂時去氧核糖核酸複製、轉錄及轉譯成蛋白質時混入所致, 至今雖無明確研究報告, 但這推論極為合理。其他化學結構雖然可能產生輕微之生殖與發育毒性反應, 但往往不具劑量-反應關係, 因此化學結構與生殖與發育毒性具明顯關係。當然若代謝反應後才形成上述具強度生殖與發育毒性藥劑結構時, 則無法在原始化學結構判斷出來, 但是此種情形似乎不多。

表7. 一些對雌性生殖毒性之可能作用機制與潛在作用藥劑範例

基因層次機制	潛在作用	範例
改變發身與動情週期或月經週期	改變卵巢活性與下視/丘腦下垂體迴饋作用	Alcohol, o, p'-DDT, isoflavones
傷害排卵作用	改變內分泌訊息	o, p'-DDT, kepone
改變交配行為	改變調節作用	β-Endorphin, naloxone
改變配子或胚運輸	增加子宮收縮	Progesterone, diethylstilbestrol, estrogens, methoxychlor
子宮內膜環境稍為不正常	-	Estrogens, DDT, methoxychlor, kepone, EGME
卵巢毒性、卵子破壞與停滯	化學結構類似內源性荷爾蒙之化合物, 一般化學反應	Alkylating agents, chemotherapeutic agents (e.g., prednisone, vincristine, vinblastine, 6-mercaptopurine, radiation, methotrexate, adriamycin), alcohol, polycyclic aromatic hydrocarbons, 4-vincyclohexene, cyclophosphamide

基因層次機制	潛在作用	範例
改變類固醇合成	抑制類固醇生成酶	Aminoglutehimide, 3-methoxybenzimidine, cyanoketone, estrogens, azastene, danazol, spironolactone epostane traizole fungicide (L151775)
拮抗類固醇作用	抑制類固醇作用	Clominiphe citrate, cimetidine, spironolactone, opioid peptides
抑制激性腺素	改變下視丘作用濃度	Marijuana (Δ -9-tetrahydrocannabinol)
改變母獸行為/泌乳	改變下視丘作用濃度	Tranquilizers
破壞泌乳	改變泌乳素濃度	Tranquilizers

Cassidy et al. (1996) ; Cummings and Perreault (1990) ; Elger et al. (1990) ; Haney (1985) ; Heindel et al. (1989) ; Pfaff and Schwartz-Giblin (1988)

表8. 藥劑誘發發育毒性之一般作用機制範例

一般作用機制	潛在作用	範例	文獻
干擾有絲分裂	抑制DNA合成	Hydroxyurea, cytosine arabinoside, 5-fluorouracil	Faustman et al.(1997)
	染色體不穩定, 單鏈斷裂, DNA-蛋白質交聯, 有絲分裂延遲	Radiation	Brent (1999)
	在有絲分裂紡錘體擾動導致細胞週期阻滯, 非整倍體, 改變細胞分裂速度, 和/或細胞死亡	Antitubulin agents (e.g., benzimidazole carbamates, colchicine)	Faustman et al.(1997)
改變細胞膜功能/訊息傳遞)	抑制細胞週期	Methylmercury	Faustman et al.(1997)
	啟發或縱容誘導	Low level lead, methylmercury	Faustman et al.(1997)
改變能量來源	改變粒線體功能	Riboflavin deficiency, iron deficiency, diphenylhydantoin, chloramphenicol, sodium Phenobarbital, cocaine	Faustman et al.(1997)

一般作用機制	潛在作用	範例	文獻
酵素抑制	抑制細胞生長與分裂重要酵素	Methotrexate, 5-fluracil, mevinolin	Faustman et al.(1997)
核酸交互作用	干擾DNA和RNA的正常合成與功能	Hycroxyurea, cytosine arabinodide	Faustman et al.(1997)
變異	改變DNA核苷系列	Ionizing radiation, alkylating agents, aromatic amines	Faustman et al.(1997)
改變基因表現	誘發轉錄表現	Retinoic acid, dioxin, cocaine Phenytoin	Koebbe et al.(1999) Gelineau-VanWaves et al.(1999)
細胞凋亡	改變正常細胞凋亡	Retinoic acid, dioxin, DNA-damaging agents	Faustman et al.(1997)

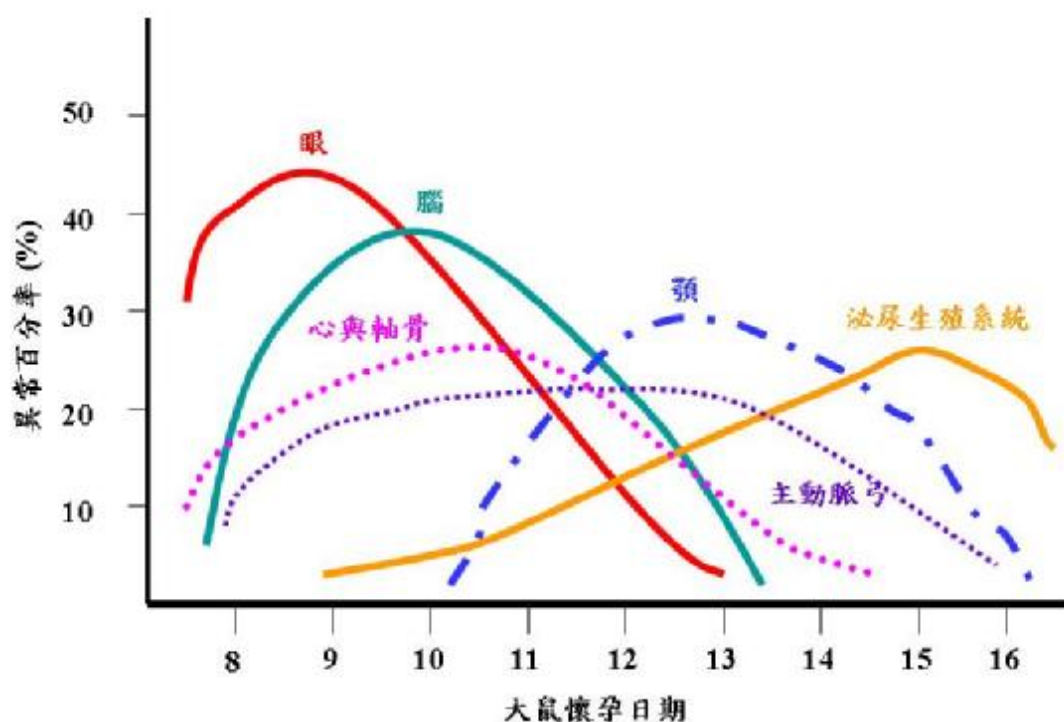


圖4. 大鼠懷孕日期中暴露藥劑誘發不同器官異常比率(Wilson and Warkany, 1965)。大鼠懷孕第8~13天時為眼睛對藥劑敏感時期，在懷孕第10天時誘發眼睛異常敏感度最高；腦，懷孕第8~14天時對藥劑較敏感，在懷孕第9天時誘發眼睛異常敏感度最高；頸，懷孕第10~16天時對藥劑較敏感，在懷孕第9天時誘發眼睛異常敏感度最高；泌尿系統，懷孕第9~17天時對藥劑較敏感，在懷孕第15天時誘發眼睛異常敏感度最高；心與軸骨，懷孕第7~15天時對藥劑較敏感，在懷孕第10~11天時誘發眼睛異常敏感度最高；主動脈弓，懷孕第8~16天時對藥劑較敏感。

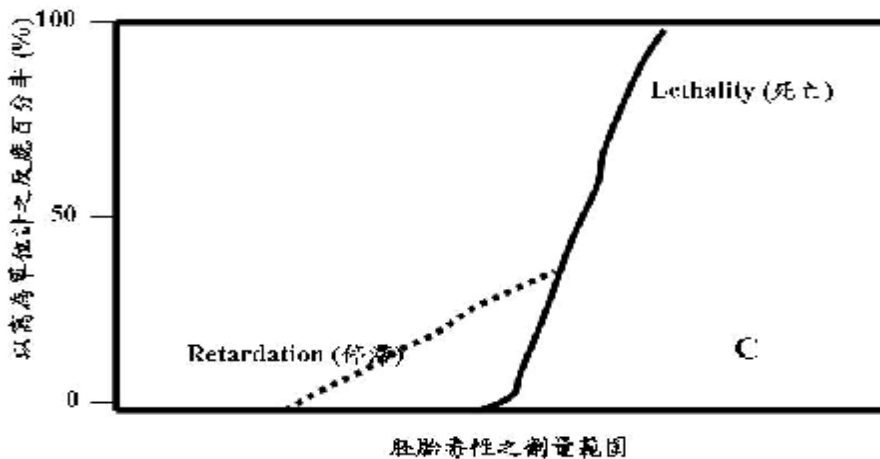
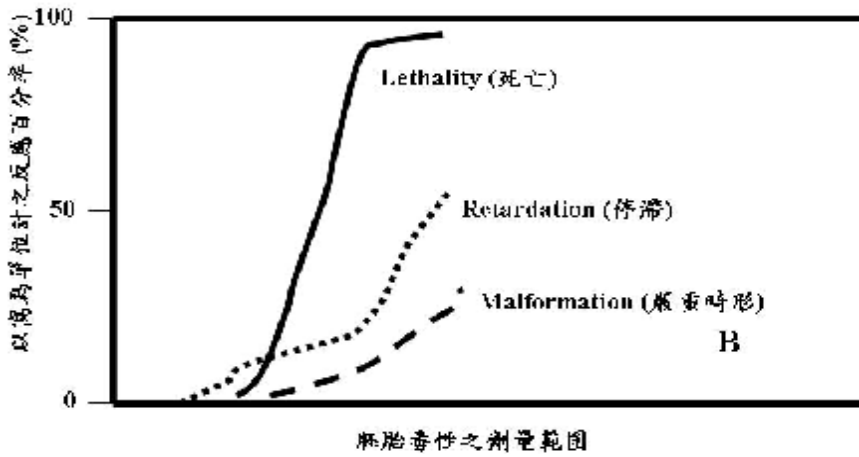
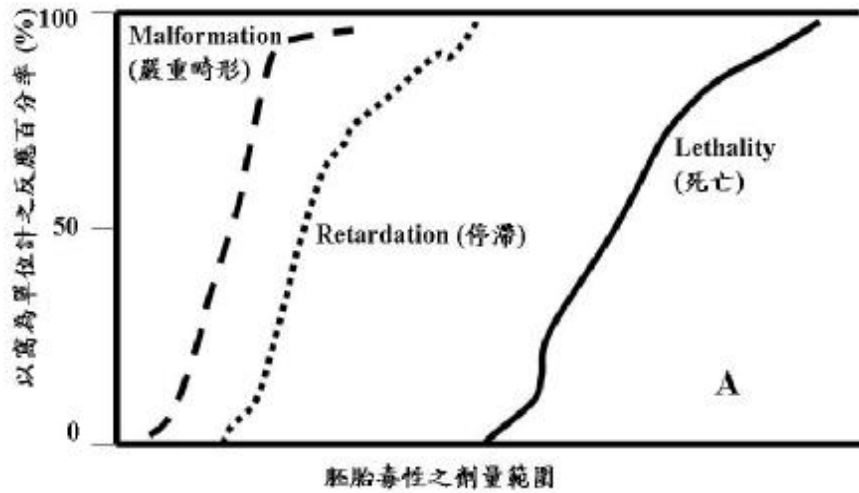


圖5. 發育毒藥劑之劑量反應模式圖(A到C) (Neubert et al., 1980)。發育毒性藥劑可分為三類，圖A：第一類在低劑量時即可誘發嚴重畸形，當升高劑量時則導致胚胎生長遲滯現象，若再提高劑量則導致胚胎死亡。圖B：第二類在誘發嚴重畸形、胚胎生長遲滯及死亡之劑量極為接近，此類藥劑最不易進行試驗，因其劑量範圍很窄。圖C：第三類則不產生致畸胎性，當劑量提高時導致胚胎生長遲滯現象，劑量更高時則造成胚胎死亡。

荷爾蒙干擾作用未來相關研究與可能作用機制

1998年日本環境廳公佈70種環境荷爾蒙物質加以規範(<http://www.eic.or.jp/eanet/e/end/sp98.html>)。環境荷爾蒙的定義為任何外來的物質會干擾體內的產生、釋放、運輸、新陳代謝、結合、活動或會干擾體內荷爾蒙的正常排除，造成體內荷爾蒙不平衡。前述OECD已經加Test No. 440與Test No. 441，分別為雌性素與雄性素荷爾蒙干擾作用測試指引，雖然USEPA尚未公告相關指引，但仍顯示荷爾蒙干擾作用測試漸受重視。另外，不論OECD或USEPA均早已公告有關發育中神經毒理測試指引，即OECD Test No. 426與USEPA 870.6300(表1)，此項測試旨在探討荷爾蒙干擾作用在發育中之哺乳動物行為與神經毒理的作用。近來OECD在一些更新測試指引草案項目中，有一項結合第一代後代繁殖毒性與發育中神經毒理測試指引草案(OECD, 2008)，由於此一測試內容繁多，本實驗室未發表資料，參考此指引但未進行神經毒性行為評估程序，但評估則增加仔代至第四代，純探討藥劑僅對第一親代母鼠暴露而後續均未暴露對第一至第四代生長與生殖性狀影響，發現雄性素受體在仔代神經發育毒性扮演重要角色。類似前述測試荷爾蒙干擾作用在發育中神經毒性之相關研究，亦有學者提出相關測試規劃(Christian, 2008)，但因測試模式仍不斷在改進中，因此不列出其詳細流程圖。

前述發育毒性就合理推估其可能作用機制應是細胞分裂時產生異常所致，極可能是化學結構類似去氧核糖核酸中鹼基等之化合物在細胞分裂時去氧核糖核酸複製、轉錄及轉譯成蛋白質時混入所致。但荷爾蒙干擾作用可能作用機制則是因為藥劑化學結構類似與該荷爾蒙受體鍵結的ligand，導致此類荷爾蒙化學藥劑競爭性鍵結到該內源性荷爾蒙對應受體，造成內源性受體受抑制或無法正常或減少與內源性ligand如雄性素之睪固酮或動情素之雌素二醇鍵結，以進行一系列訊息傳遞製造所需蛋白質所致。基本上，荷爾蒙干擾作用之原理在日本環境廳有關動情素與雄性素(圖6.)的假說圖解(<http://www.eic.or.jp/eanet/e/end/sp98.html>)極為明朗。但詳細作用機制仍有待進一步設計試驗加以釐清。

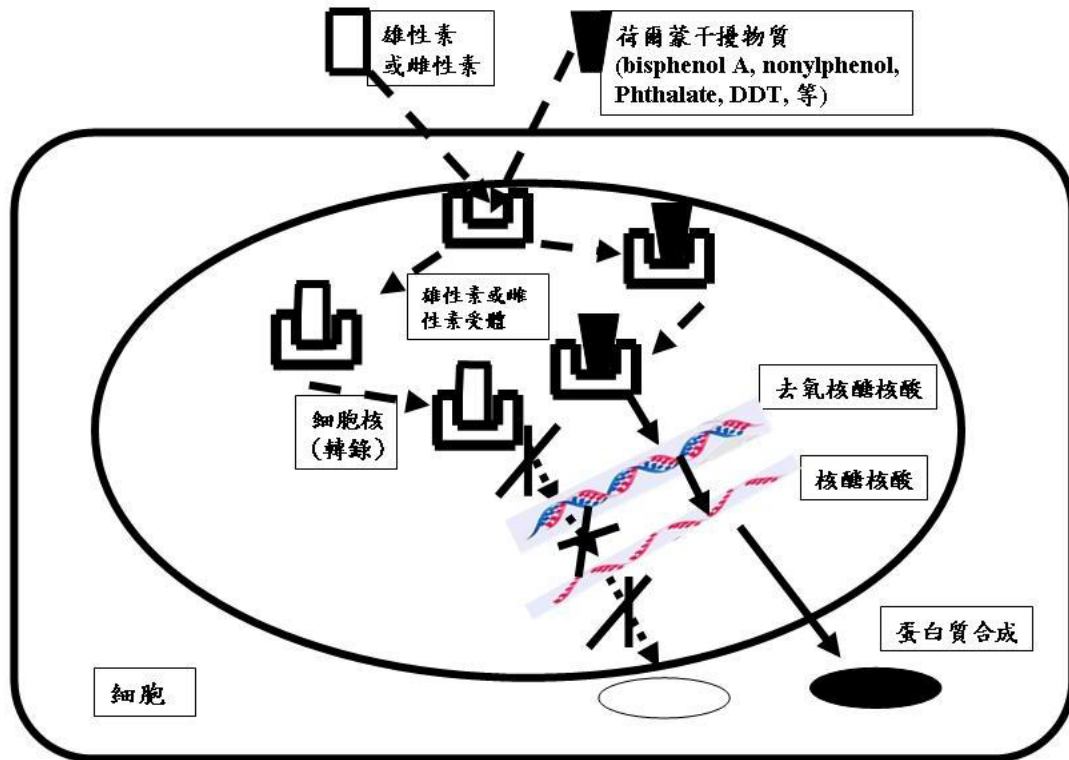


圖6. 動情素與類動情素及雄性素與類雄性素藥劑作用機制(<http://www.eic.or.jp/eanet/e/end/sp98.html>)。

研究心得

貝芬替與免賴得屬benzimidazole類化合物之殺菌劑農藥，可廣泛用於各種農作物抗菌與殺蟲用。為探討農藥貝芬替與其前驅物免賴得誘發大鼠生殖與發育毒性可能作用機制，筆者實驗室已完成下列實驗項目：貝芬替與免賴得對親代雄大鼠生殖毒性、對親代雄大鼠生殖毒性與雄性素受體關係、對親代雄性素受體親和性、對親代雄大鼠生殖毒性緩解作用、對去勢雄大鼠副性腺激性作用、對卵巢切除雌大鼠子宮激性作用、對親代雌大鼠與仔代生殖毒性、對親代雌大鼠與仔代生殖毒性緩解作用、及對雄大鼠性腺與副性腺中雄性素受體mRNA與蛋白表現及血清中荷爾蒙濃度之影響等。上述試驗結果，貝芬替在低、中劑量時隨劑量增加而降低睪丸絕對與相對重，而在高劑量時因睪丸腫脹而增加組織重。貝芬替也隨劑量增加而降低副睪絕對與相對重。貝芬替隨劑量顯著增加睪丸與副睪組織傷害指數，也隨劑量增加而降低副睪尾精子活動力與濃度。免賴得也有相似作用。生體外，貝芬替顯著隨濃度增加而增加取代放射性標幟二氫睪固酮與睪丸中雄性素受體結合率；生體內，貝芬替隨劑量增加而增加睪丸與副睪中雄性素受體結合活性。因

此，隨貝芬替劑量增加，睪丸與副睪在組織重降低、精子品質下降及組織病理傷害程度等均與雄性素受體活性呈正相關。同時處理貝芬替與雄性素受體拮抗劑 Flutamide，隨Flutamide劑量增加而顯著緩解貝芬替降低雄大鼠睪丸絕對與相對重，也改善副睪尾精子活動力與濃度，但未達顯著水準，及顯著改善睪丸與副睪組織病理傷害指數。聚合酶鏈鎖反應、組織免疫染色及西方墨點法分別顯示，貝芬替隨劑量增加睪丸中雄性素受體mRNA及蛋白表現，Flutamide則有相反作用，同時處理貝芬替與Flutamide，隨Flutamide劑量可抑制睪丸中雄性素受體mRNA及蛋白表現。

雌、雄大鼠分別處理貝芬替或免賴得28天後配種，兩藥劑均誘發8週齡仔代雌大鼠子宮角單側萎縮、尿道口雄性化及陰道口缺失，貝芬替更在兩側子宮角誘發一對貯精囊，免賴得誘發8週齡仔代雄大鼠左右睪丸與左右副睪萎縮。雌大鼠於懷孕第0~20天時口服投予6.25、12.5及25 mg/kg貝芬替，0.6、2.5及10 mg/kg Flutamide，或25與50 mg/kg免賴得。對仔代雄大鼠而言，處理12.5與25 mg/kg貝芬替可誘發增加出生後第2天肛門-陰莖距，它是一種雄性素作用指標。投予免賴得同樣可增加仔代雄大鼠肛門-陰莖距。當同時處理貝芬替與Flutamide時可阻斷貝芬替所增加之肛門-陰莖距。貝芬替與免賴得對仔代雄大鼠誘增之肛門-陰莖距，在仔代出生後第22天及其後即漸漸消失。貝芬替對出生後56天仔代雄大鼠其它與雄性素有關之指標如睪丸與副睪異常、陰莖尿道下裂及貯精囊與球海棉體肌等組織重無明顯作用，貝芬替可拮抗Flutamide對上述與雄性素有關之組織重。對仔代雌大鼠而言，貝芬替可與Flutamide產生協同作用，較單處理Flutamide更增加出生後56天雌大鼠之肝與腎重。貝芬替對仔代雌大鼠生殖器官無明顯作用。這些結果顯示，懷孕期間暴露貝芬替對仔代雄大鼠誘發暫時性且微弱的雄性素激性作用，另外，貝芬替對仔代雌大鼠促進Flutamide所誘發增加肝與腎重。

研究結果發現雄性素受體在雄大鼠生殖毒性與雌、雄大鼠發育毒性扮演重要角色，雄性素受體可能參與雄大鼠睪丸毒性及仔代雌、雄大鼠生殖器官發育毒性作用。

結 論

生殖與發育毒性測試為農藥慢毒性試驗之一，目前各國際相關組織不斷更新測試指引，朝減量化(reduction, R)、精緻化(refinement, R)及取代性(replacement, R)等3R精神之毒性試驗。值得重視的是生殖與發育毒性衍生出的荷爾蒙干擾作用問題，最近研究顯示，荷爾蒙干擾作用與各種慢性疾病有關如乳癌、雌性個體雄性化、雄性個體雌性化、發育中神經毒性及肥胖等問題。參考不斷更新的生殖與發育及荷爾蒙干擾作用測試指引及相關文獻進行毒性試驗，此外，作用機制的探討為另一貫徹3R精神之毒性試驗之重要關鍵，因為掌握毒性作用機制時，即可以利用最簡便的方法判斷或測試化學物質之毒性，農藥之生殖與發育及荷爾蒙干擾作用試驗除可供管理參考外亦可提供醫藥研究發展之用。

參考文獻

1. 呂水淵、林宏偉、王順成(1995a)：氨基甲酸鹽農藥免賴得(Benomyl)對大鼠胚胎畸形性之探討。中華民國獸醫學會會誌 20(4)：348-356.
2. 呂水淵、林宏偉、王順成(1995b)：殺菌劑貝芬替(Carbendazim)對鼠致胚胎畸形性評估。植保會刊 37：331-338.
3. 呂水淵、王順成(1996)：五種農藥對大鼠子代外觀畸形與骨骼之影響。中華民國獸醫學會會誌 22(6)：402-412.
4. 呂水淵、王順成(1997)：結構相似之免賴得與甲基多保淨農藥誘發大鼠畸形性之比較。台灣畜牧獸醫學會會報 67(3-4)：161-171.
5. 呂水淵、王順成(1998)：甲氧基護谷與 2,4-地除草劑誘發大鼠子代外觀、細部骨骼及內臟異常性評估。中華民國獸醫學會會誌 24(1)：29-41.
6. 呂水淵、王順成(1999)：農藥免賴得致胚胎畸形及其測試方法之建立。中華民國獸醫學會會誌 25(1)：69-76.
7. 呂水淵、王順成(2000)：三種農用藥劑對小鼠精子活力、體外受精率及胚胎發育之影響。中華民國獸醫學會會誌 26(1)：24-35.
8. 行政院衛生署(2000)：藥品非臨床試驗安全性規範第三版。
9. Au, K. M., Lau, K. K., Chan, A. Y. W., Sheng, B., and Li, H. L.(2003)：Kennedy's disease. Hong Kong Med. J. 9(3)：217-20.
10. Brent, R. L.(1999)：Utilization of developmental basic science principles in the evaluation of reproductive risks from pre- and postconception environmental radiation exposures. *Teratology*, 59：182-204.
11. Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K.(1996)：Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60：333-340.

12. Chapin, R. E. and Heindel, J. J.(1993) : Introduction. In: *Methods In Toxicology*. Vol. 3B. Female Reproductive Toxicology, edited by J. J. Heindel and R. E. Chapin, pp. 1-15. Academic Press, San Diego, CA.
13. Chernoff, N. and Kavlock, R. J.(1982): An in vivo teratology screen utilizing pregnant mice. *Toxicol. Environ. Health*, 10 : 541-550.
14. Christian, M. S.(2008) : Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In : *Principles and Methods of Toxicology*, 5th ed., edited by A. Wallace Hayes, pp. 1641-1711. Informa Healthcare USA Inc., New York.
15. Committee on the Safety of Medicines.(1974): *Notes for Guidance on Reproduction Studies*. Department of Health and Social Security, Great Britain.
16. Cummings, A. M. and Perreault, S. D.(1990) : Methoxy-chlor accelerates embryo transport through the rat reproductive tract. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102 : 110-116.
17. Elger, W., Beier, S., and Faehnrich, M.(1990) : Interference with hormonal control of rodent reproduction and its implications for human risk assessment. In: *Proc. Of the Fifth Int. Congress of Toxicology*, edited by G. N. Valans, J. Sims, F. M. Sullivan, and P. Turner, pp. 445-456. Taylor & Francis, New York.
18. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report (EDSTAC) (<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>)
19. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (EPA OPPTS).(http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series870.htm)
20. European Economic Community.(1988) : *The Rules Governing Medicinal Products in the European Community*. Vol III. *Guidelines on the Quality, Safety and Efficacy of Medicinal Products for Human Use*. Office of Official Publications of the European Communities, Brussels, Belgium.
21. Faustman, E. M., Ponce, R. A., Seeley, M. R. and Whittaker, S. G. (1997) : Experimental approaches to evaluate mechanisms of developmental toxicity. In: *Handbook of Developmental Toxicology*, edited by R. D. Hood, pp. 13-41. CRC Press, Boca Raton, FL.
22. Finsterer, J.(2009) : Bulbar and spinal muscular atrophy (Kennedy's disease) : a review. *European J. Neurology* 16 : 556-61.
23. Fischbeck, K. H., Lieberman, A., Bailey, C. K., Abel, A., and Merry, D. E.(1999) : Androgen receptor mutation in Kennedy's disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354 : 1075-8.
24. Gelineau-Van Waes, J., Bennett, G. D., and Finnell, R. H.(1999) : Phenytoin-induced alterations in craniofacial gene expression. *Teratology*, 59 : 23-34.
25. Haney, A. F.(1985) : Effects of toxic agents on ovarian function. In: *Endocrine Toxicology*, edited by J. A. Thomas et al., pp. 181-210. Raven Press, New York.
26. Hardin, B. D.(1987) : Evaluation of the Chernoff/Kavlock test for developmental toxicity. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 7 : 1-127.
27. Heindel, J. J., Thomford, P. J., and Mattison, D. R.(1989) : Histological assessment of ovarian follicle number as a screen for ovarian toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, edited by A. N. Hirshfield, pp. 421-425. Plenum Press, New York.
28. Koebbe, M. J., Golden, J. A., Bennett, G., and Finnell, R. H.(1999) : Effects of prenatal cocaine exposure on embryonic expression of *Sonic Hedgehog*. *Teratology*, 59 : 12-19.

29. Lamb, J. D.(1985) : Reproductive toxicity testing: evaluating and developing new systems, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 4 : 163-171.
30. Lu, S. Y., Liao, J. W., Kuo, M. L., Wang, S. C., Hwang, J. S., and Ueng, T. H. (2004) : Endocrine-disrupting activity carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. *J. Toxicol Environ. Health, Part A* 67 : 1501-1515.
31. Lu, S. Y., Liao, J. W., Kuo, M. L., Hwang, J. S., and Ueng, T. H. (2006) : Antagonistic and synergistic effects of carbendazim and flutamide exposures in utero on reproductive and developmental toxicity in rats. *J. Food Drug Anal.* 14(2) : 120-132.
32. Manson, J. M., Zenick, H., and Costlow, R. D.(1982) : Teratology test methods for laboratory animals. In: *Principles of Toxicology*, 3rd. edited by J. A. Hayes, pp. 141-184, Raven Press, New York.
33. Merry, D. E. (2005) : Animal models of Kennedy disease. *J. Am. Soc. Experiment. Neuro. Therapeutics* 2 : 471-9.
34. Ministry of Health and Welfare.(1975) : *On Animal Experimental Methods for Testing the Effects of Drugs on Reproduction*, Notification No. 529 of the Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Japan.
35. Ministry of Health and Welfare. (1984): *Information on the Guidelines of Toxicity Studies Required for Applications for Approval to Manufacture (Import) Drugs*, Notification No. 118 of the Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Japan.
36. Morrissey, R. E., Lamb, 4th, J. C., Morris, R. W., Chapin, R. E., Gulati, D. K., Heindel, J. J. (1989) : Results and evaluation of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fund. Appl. Toxicol.*, 13 : 747-777.
37. Narotsky, M. G., Weller, E. A., Chinchilli, V. M., and Kavlock, R. J.(1995) : Nonadditive developmental toxicity in mixtures of trichloroethylene, di(2-ethylhexyl) phthalate, and heptachlor in a 5×5×5 design. *Fund. Appl. Toxicol.*, 27 : 203-216.
38. Neubert, D., Barrach, H. J., and Merker, H. J.(1980) : Drug-induced damage to the embryo or fetus: molecular and multilateral approach to prenatal toxicology. *Curr. Top. Pathol.*, 69 : 241-331.
39. Organization for Economic Cooperation and Development(OECD)([http : //titania.sourceoecd.org/vl=17633093/cl=11/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/ contp1-1.htm](http://titania.sourceoecd.org/vl=17633093/cl=11/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm))
40. OECD.(1981) : Guidelines for Testing of Chemicals: Teratogenicity, Section 4, No. 414. adopted May 12, 1981. Organization for Economic Cooperation and Development, Brussels, Belgium.
41. OECD.(1996) : *OECD Guidelines for Testing of Chemicals Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, Section 4 No. 422, adopted March 22, 1996. Organization for Economic Cooperation and Development, Brussels, Belgium.
42. OECD.(2008) : Draft extended one-generation reproductive toxicity test guideline. pp. 1-37.
43. Pfaff, D. W. and Schwartz-Giblin, S.(1988) : Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *The Physiology of reproduction*, edited by E. Knobil and J. Neill, pp. 1957-1568. Raven Press, New York.

44. Tanimura, T., Kameyama, Y., Shiota, K., Tanaka, S., Matsumoto, N., and Mizutani, M. (1989) : *Report on the Review of the Guidelines for Studies of the Effect of Drugs on Reproduction*, Notification No. 118. Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Japan.
45. USEPA.(1991) : *Pesticide Assessment Guideline, Subdivision F, Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals*. Addendum 10. Neurotoxicity. Health Effects Division, Office of Pesticide Programs: U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
46. USEPA.(1993) : *Health Effects Division Draft Standard Evaluation Procedure: Developmental Toxicity Studies*. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
47. USEPA.(1998) : *Health Effects Test Guidelines: Prenatal Developmental Toxicity Study*, OPPTS 870.3700. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
48. USFDA.(1966) : *Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use*. U. S. Food and Drug Administration, Washington, D. C.
49. USFDA.(2000) : *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 20000)*. Office of Food Additive Safety, U. S. Food and Drug Administration Washington, D. C. ([http : //www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html](http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html)).
50. USFDA.(1993) : *Draft: toxicological principles for the safety assessment of direct food (Redbook II)*. In: *Guidelines for Reproduction and Developmental Toxicity Studies*, pp. 123-134. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, Washington, D. C.
51. USFDA.(1994) : *International Conference on Harmonization: guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products*. *Fed. Reg.*, 59(183) : 48746-48752.
52. Wilson, J. G and J. Warkany, J., Eds.(1965): *Teratology: Principles and Techniques*, lectures and demonstrations given at the First Workshop in Teratology, University of Florida, February 2-8, 1964. University of Chicago Press, Chicago, IL.

藥毒所專題報導

發行人： 高清文
發行所： 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
地址： 台中縣霧峰鄉舊正村光明路 11 號
網址： <http://www.tactri.gov.tw>
電話： (04)23302101
總編輯： 李貽華
編輯委員： 馮海東 游碧瑄 何明勳 李宏萍
高穗生 蔣慕琰 蘇文瀛

展售書局：

- 1.國家書店松江門市/台北市松江路 209 號 1 樓 (02)25180207
網路書店/ <http://www.govbooks.com.tw> (02)26598074
- 2.五南文化廣場/台中市中山路 6 號 (04)22260330

印刷： 財政部印刷廠
地址： 台中縣大里市中興路一段 288 號
電話： 04-24953126

中華民國 99 年 10 月出版

定價： 新台幣 30 元

GPN：2007600007

ISSN：1017-9569(平裝)