

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

呂水淵⁽¹⁾* 王順成
臺灣省農業藥物毒物試驗所

摘要：利用胃管法探討農藥免賴得與甲基多保淨誘發子鼠外觀、細部骨骼與內臟異常之潛在性，並比較化學結構相似性對大鼠畸形性之影響。結果顯示，免賴得在外觀畸形(external malformations)上，出現露腦、裂腹、無尾、彎尾、浮腫、軸骨彎曲、海豹肢、無口及死亡等。細部骨骼異常(skeletal variations and malformations)上，可造成大鼠頭顱窗門張大、胸骨小於6根、胸骨異常或發育不全、肋骨融合、波浪狀肋骨及形成啞鈴狀胸椎中心。至於內臟異常(visceral variations and malformations)，可引起試驗鼠隻氣管不規則、腎臟左右大小不一、腦積水、腦室異常、大腦兩側大小不一、眼睛(無眼、獨眼、小眼)異常及咽裂等症狀。甲基多保淨則無任何外觀畸形。細部骨骼異常，部份試驗鼠隻呈現頭顱窗門張大。至於內臟異常，僅發現輕微氣管不規則及腎臟左右大小不一現象，綜上所述，免賴得具明顯致大鼠外觀畸形性、胚胎毒性及子鼠毒性；甲基多保淨則不具任何外觀畸形、但有輕微細部骨骼及內臟異常現象。免賴得與甲基多保淨在化學結構上所造成畸形差異，推測可能由於物化性質不同，於動物體代謝途徑迥異所造成。

關鍵詞：免賴得，甲基多保淨，大鼠，畸形性，結構相似性

緒 言

免賴得與貝芬替及甲基多保淨均為廣效性之農藥殺菌劑，分類上部份學者將免賴得與貝芬替歸類為氨基甲酸鹽類，但也有學者依其官能基將免賴得、貝芬替及甲基多保淨歸為有機氮劑及雜環化合物，由於三者化學結構相似，因此基於此結構相似關係(structure-activity relationship, SAR)比較其致畸胎之風險性具有相當意義。往昔研究(4,6,7,12,20)與本實驗室(1,2,3)以往均證實，免賴得與貝芬替可造成子鼠外觀畸形與細部骨骼異常，如露腦、裂腹及肋骨融合等，甲基多保淨則未出現嚴重症狀(3,15)，至於結構相似之甲基多保

淨未造成明顯致畸胎性之原因，目前則大多缺乏探討。由於結構相似關係為篩選化學物質安全性評估要素之一，為避免浪費大量實驗動物及減少人力物力損失，如能從SAR上探討化學物質之安全性，當有助於政府對化學安全管理之繁複性。本文之目的即針對兩種化學結構相似之免賴得及甲基多保淨殺菌劑，從物化、結構及致畸胎之差異做比較，供結構類似之化學藥劑評估致畸胎性之參考。

材料與方法

一、材料

1.供試藥劑

* 聯絡作者：臺中縣霧峰鄉舊正村光明路 11 號

免賴得 (benomyl) 95% 原體，甲基多保淨 (thiophanate-methyl, Topsin-m®) 95% 原體，均由興農農藥公司提供。

2. 賦形劑

聚乙烯甘醇 (polyethylene glycol 200, PEG 200)，購自臺灣默克公司。

3. 供試動物

Wistar 品系大鼠 (*Rattus norvegicus*)，購自行政院國科會實驗動物中心 SPF 動物房之週齡雌、雄大鼠 (雌， 72 ± 6 g；雄， 81 ± 11 g) 於本系 SPF 動物房飼養至 10 週齡 (雌， 251 ± 14 g；雄， 312 ± 20 g)，再進行相關試驗。

4. 動物房環境

飼育室為本所 SPF 動物房，溫度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照 12 小時，飼料為粒狀 (Purina Laboratory Chow, No. 5001, U.S.A.)，飲水任食。

二、方法

1. 藥劑配製、投予及解剖

(1) 將免賴得、甲基多保淨兩種藥劑分別溶於聚乙烯甘醇中，試藥劑量配製以預估雌鼠懷孕第 15 天時之平均體重為基準，配製量為 1 mL。對照組僅投予等量聚乙烯甘醇。

(2) 前試驗結果分別為：免賴得：50、100、200、300、400 及 500 mg/kg/day (各組均為 10 隻)，畸形性呈劑量-反應關係，且最高劑量未造成明顯胚胎早期死亡，因此可再升高劑量；甲基多保淨：0、100、200、300 及 500 mg/kg/day (各組均為 10 隻)，最高劑量未造成明顯胚胎死亡與母鼠中毒，可再提高劑量。各藥劑正式試驗劑量分別為免賴得：200、300、400、500、600、700、800、900、1000 mg/kg/day (各組均為 10 隻)。甲基多保淨：600、800、1000 mg/kg/day (各組均為 10 隻)。

(3) 大鼠於 10 週齡開始配種，每個聚碳酸鹽 (polycarbonate, Clea, Japan) 籠子 (長 265 mm × 寬 425 mm × 高 200 mm) 置雌、雄鼠各 2 隻，背部塗抹苦味酸 (picric acid) 作為標記，定時檢視陰道，膣栓 (vaginal plug) 出現，視為懷孕第 0 天，雌鼠依其體重逢機分配至各處理組。於懷孕第 6 至 15 天為以胃管方式投予藥劑，懷孕第 20 天時解剖，解剖

後，取出子宮稱重、計算黃體數、重吸收數、著床數、檢視活與死胎數、胎仔體重、畸胎數及畸胎種類 (1,2)。半窩胎兒以 70% 酒精固定，供屍體剖檢，檢查內臟及頭部骨骼是否異常；另半窩胎兒亦以 70% 酒精固定，製作透明鼠供檢查細部骨骼異常情形。

2. 透明鼠之製作與細部骨骼之檢查

製作方法依 Kimmel 等 (1981) 及 Kawamura 等 (1990) (13,14) 為主，但該方法全程由人工操作，費力且不易控制製作品質，本試驗為節省人力即配合儀器修改為 2% KOH 15 小時，0.005% Alizarin Red S 溶於 1% KOH 10 小時，以上步驟於 Varistain 24 T (Shandon Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) 儀器中進行，接著自儀器中取出子鼠置於含適當量之 2% KOH 之塑膠瓶中，當溶液呈混濁時即更新溶液，直到骨骼清晰及背脂溶解為止，所需時間視其被 2% KOH 溶解情況而定，一般大約兩週時間，最後以 100% glycerol 添加少許防腐劑 (Thymol) 保存於閃爍計數瓶，於解剖顯微鏡下行細部骨骼檢查。

3. 頭部之檢查

解剖方式如圖 1 所示，其中圖 1-A 一切割線為檢查口蓋，圖 1-B 五切割線為檢查頭部內部骨骼。頭部異常檢查有腦室、顎、鼻、眼睛等。

4. 外觀或內部骨骼異常等級分類

(1) 嚴重畸形 (Malformation)：造成子鼠骨骼結構永久性改變，此改變危及子鼠生長與生存，症狀包括無頭 (acephaly)、無腦 (anencephaly)、露腦 (exencephaly)、腦積水 (hydrocephalus)、小腦 (microcephaly)、裂顎 (cleft palate)。

(2) 中度畸形 (Anomaly)：輕至中等程度之永久性或可復原之骨骼結構變化，而此種改變不至影響子鼠生存，症狀如多餘之第 14 肋骨骨化 (supernumary ossification center of 14th rib)、兩肋骨融合 (fusion of two ribs)、腎盂擴張 (dilatation of renal pelvis)、橫隔膜突出 (herniation of diaphragm)、組織或器官囊腫 (cyst)、血腫 (haematoma)。

(3) 輕微畸形 (variation)，此一改變不致傷害子鼠生命，且此異常經常出現於對照組，症狀為骨骼骨化不完全或骨化缺失 (16)。

5. 內臟之檢查

解剖方式如圖1-C所示，第一、二切割線檢查腹腔內臟，第三切割線檢查胸腔內臟。內臟異常之檢查包括子鼠頸部（食道、氣管、胸腺）、心臟（頸動脈、動脈弧、靜脈腔、導管與動脈硬化、瓣膜、動脈瓣、心房、心室、中隔）、肺臟（支氣管、肺葉、橫隔膜）、肝、胃、腸、腎、腎上腺、膀胱、輸尿管、卵巢、睪丸等。

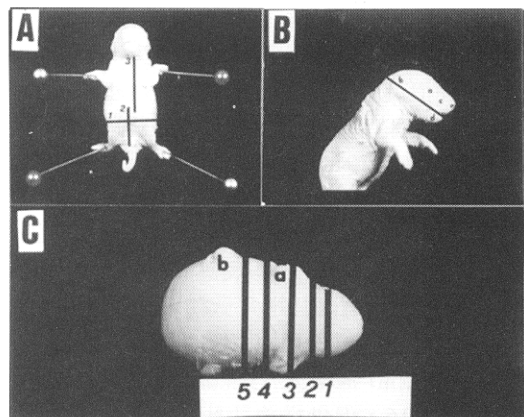


Fig 1. A: Rat fetus, ventral side, pinned to a board in preparation for internal visceral examination; lines 1 and lines 2 show where cuts are made to examine abdominal visceral, and line 3 where to cut expose thoracic visceral. B: Normal head of rat fetus, a: eyelids, b: ear (pinna), c: nares, d: lower jaw, e: nostrils. The line shows where section is made to examine the palatine shelf. C: Normal head of rat fetus, coronal view, a: eyelids, b: ear (pinna). Lines 1-5 show where sections is made.

6. 統計方法

子代外觀畸形及內部骨骼異常等各項觀測值通常均以百分率表示。畸形性之定義可從二方面決定，一為一般統計方法之顯著性，二為與背景值比較後之生物意義。本試驗之統計方法將考慮上述二種方法，並訂定評估標準進行。如測定母鼠、子鼠及胚胎等毒性，利用處理組與對照組直接進行統計檢測，以卡方分佈（ χ^2 distribution）檢定細部骨骼與內臟異常，而以T-test配合劑量-反應關係（dose-response relationship, D-R）檢定母鼠、胚胎及子鼠毒性各觀測值之顯著性（18），即利用母鼠增重或母鼠肝重/母鼠體重之比值（母鼠毒性）、著床後胚

損失數（胚胎毒性）及子鼠數與子鼠出生體重（子鼠毒性）等與對照組差異顯著性及是否呈劑量-反應關係加以判斷三種指數之變化

++（high toxic effect）：表示綜合考量母鼠增重或母鼠肝重/母鼠體重之比值（母鼠毒性）、著床後胚損失數（胚胎毒性）及子鼠數與子鼠出生體重（子鼠毒性）等測定項目後，將藥物對母鼠、胚胎或子鼠毒性評定為強毒性（++）。

+（Intermediate toxic effect）：表示綜合考量母鼠增重或母鼠肝重/母鼠體重之比值（母鼠毒性）、著床後胚損失數（胚胎毒性）及子鼠數與子鼠出生體重（子鼠毒性）等測定項目後，將藥物對母鼠、胚胎或子鼠毒性評定為中等毒性（+）。

-（little or no toxic effect）：表示綜合考量母鼠增重或母鼠肝重/母鼠體重之比值（母鼠毒性）、著床後胚損失數（胚胎毒性）及子鼠數與子鼠出生體重（子鼠毒性）等測定項目後，將藥物對母鼠、胚胎或子鼠毒性評定為低毒性或無毒性（-）。

至於測定細部骨骼與內臟異常標準，則利用試驗觀測值與本實驗室累積試驗對照組之背景值做比較，將其畸形程度訂為三級：

嚴重畸形（+）：觀察值 $\geq 1.2 \times$ 背景值，表示內部骨骼畸形顯著。

中度畸形（ \pm ）： $1 \times$ 背景值 $<$ 觀察值 $< 1.2 \times$ 背景值，表示內部骨骼異常中度畸形。

正常（-）：觀察值 $\leq 1 \times$ 背景值，表示內部骨骼異常不顯著。

其中觀察值或背景值均指畸形（malformation）、異常（anomaly）或變異（variation）等異常項目。

整體評估藥劑對動物影響包括外觀、內部骨骼及內臟整體畸形訂為三種標準：

A（嚴重畸形,+）：外觀、內部骨骼及內臟等三項中，其三種畸形之畸形數如有下列之一種如（1）有三項或以上之變異（variation），（2）含二種或以上之異常（anomaly），（3）一種或以上之畸形（malformation）者，表示試驗子鼠嚴重畸形。

B（中度畸形, \pm ）：外觀、內部骨骼及內臟等三項，其三種畸形之畸形數如有下列二種情形之一如

(1) 有二項或以下之變異 (variation), (2) 一種異常 (anomaly) 者, 表示試驗子鼠中度畸形。C(輕度或無異常, -): 外觀、內部骨骼及內臟等三項, 其三種畸形之畸形數如有下列二種情形之一如 (1) 一項變異 (variation), (2) 無變異 (variation) 者, 表示試驗子鼠輕度或無畸形。

結 果

藥劑對母鼠、胚胎及子鼠的毒性

免賴得對大鼠在黃體數、著床數及著床前胚損失數中除著床數在1000 mg/kg/day顯著低於對照組外, 其餘劑量均與對照組無顯著不同。在子鼠出生數, 免賴得除400 mg/kg/day與對照組差異不明顯外, 其餘劑量均顯著低於對照組, 而著床後胚損失數所有處理劑量均顯著大於對照組。母鼠增重, 免賴得所有劑量均與對照組無明顯差異。雌、雄子鼠出生體重, 免賴得所有劑量均顯著低於對照組。母鼠肝臟重/母鼠解剖時體重, 除1000 mg/kg/day劑量

時顯著高於對照組外, 其餘劑量均與對照組無明顯差異。雌、雄子鼠出生時體重與母肝重/母鼠解剖時體重比之劑量-反應關係相關係數平方值 (r^2) 大於等於0.6 (表1), 表示免賴得對子鼠產生顯著生長抑制作用, 而在母鼠肝臟負荷也隨劑量增加而增加, 但應屬可接受之毒性測試範圍內。甲基多保淨在黃體數、著床數、著床後胚損失數、母鼠增重、雌與雄子鼠出生體重及母鼠肝重/母鼠解剖時體重比等項目均與對照組無明顯不同, 但黃體數、著床數及著床前胚損失數隨劑量增加而增加之趨勢 (表2)。綜合上述結果, 免賴得在母鼠增重或母鼠肝臟重/母鼠體重比值 (母鼠毒性判斷指標) 中除在1000 mg/kg/day時母鼠肝臟重/母鼠體重比值顯著大於對照組外, 其餘均與對照組無明顯差異, 但母鼠肝臟重/母鼠體重比值依劑量-反應關係 $r^2 \geq 0.8$, 為具輕微母鼠毒性, 唯此種毒性不致於干擾藥劑對母鼠致畸胎之影響。而著床後胚損失數 (胚胎毒性判斷指標) 則在所有劑量均顯著大於對照組, 雖然其劑量-反應關係之 $r^2 < 0.6$, 但仍推論其具有胚胎毒性。而

Table 1. The effect of benomyl on maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic activities in rats¹.

Toxic sign	Dose (mg/kg/day)										D-R ¹¹
	0	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	
No. C/L ²	15.9± 1.6	15.7± 2.1	17.8± 3.8	17.2± 3.6	18.0± 5.7	18.1± 3.7	16.0± 4.2	18.0± 5.3	16.7± 5.2	14.9± 2.5	-
No. IM/L ³	14.8± 1.5	12.6± 4.6	15.7± 3.1	14.6± 2.2	15.5± 2.1	14.1± 3.3	13.2± 1.8	14.6± 2.1	14.6± 2.3	12.1± 2.4b	-
No. RIML/L ⁴	1.1± 1.5	3.1± 4.8	2.1± 3.0	2.6± 3.2	2.5± 4.2	4.0± 5.7	2.8± 4.2	3.4± 5.2	2.1± 4.2	2.8± 2.8	-
No. F/L ⁵	13.1± 1.0	6.6± 5.7b	7.1± 7.2b	9.5± 6.5	5.1± 7.3b	6.4± 6.3b	1.8± 4.7b	0.4± 1.3b	2.8± 5.1b	5.5± 5.4b	-
No. PIML/L ⁶	1.6± 1.2	6.0± 5.7b	8.6± 6.7b	5.1± 6.3b	10.4± 6.4b	7.7± 6.1b	11.4± 4.3b	14.2± 2.6b	11.8± 5.6b	6.6± 5.2b	-
W.g ⁷	60.3± 21.0	81.8± 16.1	74.1± 14.1	73.3± 14.3	50.9± 25.7	63.6± 18.9	64.2± 15.8	62.1± 25.7	60.1± 24.6	60.8± 17.6	-
F.g ⁸ (♂)	4.2± 0.5	3.9± 0.7b	3.5± 0.5b	3.6± 0.4b	3.2± 0.7b	3.1± 0.6b	3.1± 0.1b	2.4± 0.1b	3.1± 0.5b	2.9± 0.6b	±
F.g ⁹ (♀)	4.1± 0.5	3.5± 0.6b	3.5± 0.5b	3.3± 0.5b	3.2± 0.5b	2.8± 0.6b	3.1± 0.3b	2.8± 0.2b	2.9± 0.5b	2.3± 0.4b	+
L/B,% ¹⁰	3.9± 0.2	4.0± 0.4	3.9± 0.2	4.0± 0.4	4.1± 0.4	4.2± 0.4	4.1± 0.4	4.3± 0.5b	4.3± 0.6	4.4± 0.4b	+

¹Sample size in control and treated group are ten female.

²No. C/L: the number of corpus luteal per litter.

³No. IM/L: the number of implantation per litter.

⁴No. RIML/L: the number of pre-implantation loss per litter

⁵No. F/L: the number of fetus per litter

⁶No. PIML/L: the number of post-implantation loss per litter

⁷W, g: maternal weight gain

⁸F, g (♂): male fetuse weight

⁹F, g (♀): female fetu weight

¹⁰L/B, %: maternal liver weight/ maternal body weight.

¹¹D-R means dose-response relationship (r^2): +: ($r^2 \geq 0.8$), ±: ($0.6 \leq r^2 < 0.8$), -: ($r^2 < 0.6$).

¹²b means that data of treatment is significantly ($p < 0.05$) different from that of control.

Table 2. The effect of thiophanate-methyl on maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic activities in rats¹.

Toxic sign	Dose(mg/kg/day)				D-R ¹¹
	0	600	800	1000	
No. C/L ²	15.9 ± 1.6	16.0 ± 3.3	18.1 ± 3.8	18.5 ± 5.2	±
No. IM/L ³	14.8 ± 1.5	12.7 ± 4.3	15.5 ± 1.6	12.8 ± 1.3	±
No. RIML/L ⁴	1.1 ± 1.5	3.3 ± 1.8	2.6 ± 1.7	5.4 ± 1.3	±
No. F/L ⁵	13.1 ± 1.0	12.2 ± 4.3	14.7 ± 1.4	11.7 ± 1.6	-
No. PIML/L ⁶	1.6 ± 1.2	0.5 ± 1.2	0.8 ± 1.0	1.1 ± 1.2	-
W, g ⁷	60.3 ± 21.0	55.5 ± 7.0	47.4 ± 18.5	54.4 ± 24.2	-
F, g ⁸ (♂)	4.2 ± 0.5	4.5 ± 0.7	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.4	-
F, g ⁹ (♀)	4.1 ± 0.5	4.1 ± 0.6	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.5	-
L/B ¹⁰ , %	3.9 ± 0.2	4.8 ± 0.6	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2	-

1. Sample size in control and treated group are ten female.
2. No. C/L: the number of corpus luteal per litter.
3. No. IM/L: the number of implantation per litter.
4. No. RIML/L: the number of pre-implantation loss per litter
5. No. F/L: the number of fetus per litter
6. No.PIML/L: the number of post-implantation loss per litter
7. W, g: maternal weight gain
8. F, g (♂): male fetus weight
9. F, g (♀): female fetus weight
10. L/B, %: maternal liver weight/ maternal body weight.
11. D-R means dose-response relationship (r²): +: (r² ≥ 0.8), ±: (0.6 ≤ r² < 0.8), -: (r² < 0.6)
12. a means that data of treatment is not significantly (p > 0.05) different from that of control.

在子鼠數與子鼠出生體重(子鼠毒性判斷指標), 除400 mg/kg/day外各劑量之子鼠數均顯著小於對照組, 雖然劑量-反應之r² < 0.6, 再者, 雌、雄子鼠出生體重不但顯著小於對照組且劑量-反應之r² ≥ 0.6, 因此推斷其具有子鼠毒性(表3)。甲基多保淨之母鼠增重或母鼠肝臟重/母鼠體重比值、著床後胚損失數、子鼠出生數及雌、雄子鼠出生體重等除與對照組差異不明顯外, 其劑量-反應之r² < 0.6, 故推論其不具母鼠毒性、子鼠毒性及胚胎毒性(表3)。

藥劑對大鼠子代外觀、內臟、細部骨骼異常之影響

外觀畸形上, 免賴得處理組出現子鼠露腦、裂腹、無尾、彎尾、全身水腫、軸骨彎曲、海豹肢、無口及死亡等, 其中又以露腦、無尾及彎尾為最顯

Table 3. The effect of fungicides on maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic activities in rats.

Toxic sign	Fungicide	
	Benomyl	Thiophanate-methyl
Maternal toxic	-	-
Embryotoxic	++	-
Fetotoxic	++	-

++: high toxic effect, +: Intermediate toxic effect, -: little or no toxic effect

著, 而免賴得處理總畸形出現率從對照組及處理劑量之200至1000 mg/kg/day分別為0.1及5、31、20、15、21、6、50、16、53%, 處理組各劑量均顯著高於對照組(表4及圖2A,2B), 甲基多保淨則未出現任何外觀畸形。細部骨骼評估上, 免賴得除在600 mg/kg/day僅出現9%肋骨融合一項外, 處理劑量從200至1000 mg/kg/day均出現不同比例之頭顱窗門張大、胸骨數小於6根、胸骨發育不全或分裂、浮肋及啞鈴狀胸椎中心, 其中除肋骨融合一項外, 其餘評估項目均較對照組出現率顯著增加(表5及圖3,4), 而甲基多保淨除出現少數頭顱窗門張大外, 未檢出其他異常現象(表6)。為便於判定藥劑對大鼠子代細部骨骼及內臟異常之影響, 利用試驗觀測值與本實驗室累積長久之對照組背景資料之結果將此兩項畸形程度共訂為三級, 即嚴重畸形為"+", 中等程度"±", 輕微或無影響為"-", 免賴得在頭顱窗門張大、胸骨數小於6根、胸骨發育不全或分裂、肋骨融合及啞鈴狀之胸椎中心影響其程度分別為+、+、+、+、+、-及+, 免賴得可造成多

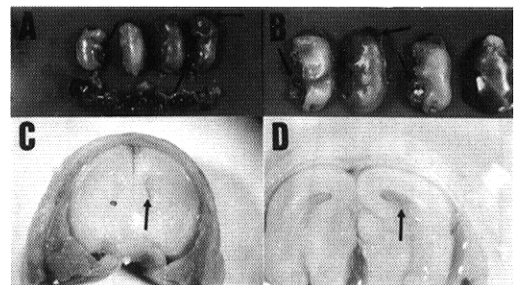


Fig. 2 A and B: Benomyl induce exencephaly and gastroschisis. C: Normal head. D: Malformation head section: hydrocephalic brain with marked dilation of lateral ventricles induced by benomyl.

Table 4. Types and incidence of external malformations observed in benomyl-treated rats.

Malformation	Dose(mg/kg)									
	0	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
No. examined	557	66	64	95	41	58	18	4	25	55
Exencephaly ^b	0	1(2) ^a	6(9)	6(6)	3(7)	5(9)	0	0	1(4)	9(16)
Gastroschisis ^b	0	0	0	0	0	2(3)	0	0	0	2(4)
Anury ^b	1(0.1)	0	3(5)	9(10)	3(7)	4(7)	0	1(25)	1(4)	9(16)
Bent tail	0	1(2)	6(9)	1(1)	0	1(2)	0	1(25)	1(4)	5(9)
Edema ^b	0	0	2(3)	1(1)	0	0	0	0	0	1(2)
Bent trunk	0	0	1(2)	0	0	0	1(6)	0	1(4)	2(4)
Phocomelia ^b	0	0	0	1(1)	0	0	0	0	0	0
Astomia ^b	0	0	0	1(1)	0	0	0	0	0	0
Death ^b	0	1(2)	2(3)	0	0	0	0	0	1(4)	0
Total ^b	1(0.1)	3(5)	20(31)	19(20)	6(15)	12(21)	1(6)	2(50)	4(16)	29(53)

^a Number of affected rats for a dose / the number of rats examined for a dose $\times 100\%$.

^b Values of treatments are significantly ($p < 0.05$) different from that of control by χ^2 distribution.

Table 5. Type and effect of skeletal anomalies and variations observed in benomyl-treated rats.

Anomaly/ variation	Dose(mg/kg)									
	0	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
No. examined	270	31	31	27	19	33	10	5	12	24
Large open fontanelle ^b	29(11)	18(58)	25(81)	18(66)	7(37)	5(15)	8(80)	0	10(83)	8(33)
No. sternal $<6^b$	5(2) ^a	16(52)	8(26)	14(52)	9(47)	17(52)	1(10)	4(80)	5(42)	14(58)
Hypoplastic or split sternal ^b	23(9)	18(58)	23(74)	23(85)	6(32)	20(61)	8(80)	4(80)	9(75)	20(83)
Fused ribs ^b	2(1)	2(6)	8(26)	8(30)	4(21)	4(12)	0	0	2(17)	3(13)
Wavy ribs ^b	7(3)	0	0	0	0	3(9)	0	0	0	0
Dumbbell-shaped thoracic ^b	14(5)	7(23)	12(39)	15(56)	7(37)	8(24)	1(10)	4(80)	6(50)	10(42)

^a Number of affected rats for a dose / the number of rats examined for a dose $\times 100\%$.

^b Means that values of treatments are significantly ($p < 0.05$) different from that of control by χ^2 distribution.

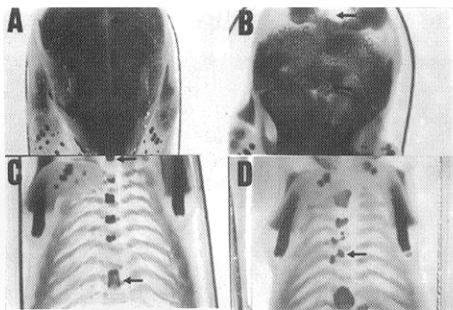


Fig. 3. A: Normal skull of rat fetus, dorsal view. B: Malformed skull of rat fetus induced by benomyl. C: Normal sternum of rat fetus: five sternabrae and xiphisternum. D: Malformed sternal centers: split and off center induced by benomyl.

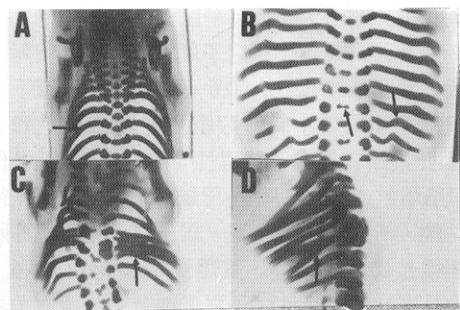


Fig. 4. A: Normal vertebral column and ribs. B: Malformed wavy ribs and dumbbell-shaped thoracic center and C: Fused ribs(4 ribs) and D: Fused ribs (2 ribs or 3 ribs) induced by benomyl.

Table 6. Type and effect of skeletal anomalies and variations observed in thiophanate-methyl-treated rats.

Anomaly/ variation	Dose(mg / kg)			
	0	600	800	1000
No. examined	270	60	71	55
Large open Fontanelle	29(11) ^a	2(3)	3(4)	4(7)
No. sternal<6	5(2)	0	0	0
Hypoplastic or split sterna	23(9)	0	0	0
Fused ribs	2(1)	0	0	0
Wavy ribs	7(3)	0	0	0
Dumbbell-shaped thoracic	14(5)	0	0	0

^a Number of affected rats for a dose / number of rats examined for a dose × 100 %.

Table 7. Type and effect of skeletal anomalies and variations observed in fungicide-treated rats

Anomaly/ variation	Fungicide	
	Benomyl	Thiophanate-methyl
Large open Fontanelle	+	-
No. sternal<6	+	-
Hypoplastic or split sterna	+	-
Fused ribs	+	-
Wavy ribs	-	-
Dumbbell-shaped thoracic	+	-

-: no effect; ±: little effect; +: obvious effect

Table 8. Types and effects of skeletal anomalies and variations observed in benomyl-treated rats

Anomaly/ variation	Dose(mg/kg)									
	0	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
No. examined	272	30	29	26	18	31	9	5	13	23
Irregular trachea ^b	8(3) ^a	4(13)	5(17)	4(15)	2(11)	6(19)	3(33)	1(20)	4(31)	4(17)
Side-weighted kidney ^b	10(4)	5(17)	6(21)	5(19)	4(22)	7(23)	4(44)	2(40)	3(23)	3(13)
Enlarged ventricles (hydrocephalus) ^b	12(4)	4(13)	3(10)	4(15)	5(28)	5(16)	4(44)	2(40)	3(23)	5(22)
Cleft pharynx ^b	0	0	2(6)	1(4)	0	0	0	0	0	0
Anophthalmia ^b	0	0	2(6)	0	0	3(10)	0	0	0	0
Micropthalmia ^b	0	0	2(6)	1(4)	0	3(10)	0	0	0	0
synophthalmia ^b	0	0	1(3)	2(8)	1(6)	0	0	0	0	0

^a Number of affected rats for a dose / number of rats examined for a dose × 100 %.

^b Values of treatments are significantly (p<0.05) different from that of control by χ^2 distribution.

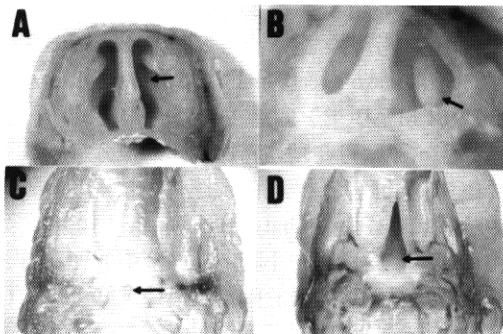


Fig. 5 A: Normal nasal septum, conchae and palatine shelf. B: Asymmetric conchae and C: Normal pharynx and D: Cleft pharynx induced by benomyl.

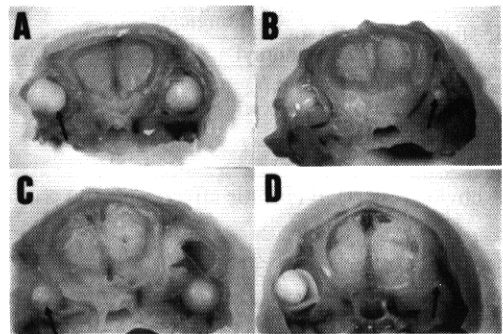


Fig. 6 A: Normal eyes. B: Micropthalmia and C: Micropthalmia and D: Anophthalmia induced by benomyl.

Table 9. Types and effects of visceral anomalies and variations observed in thiophanate-methyl-treated rats.

Anomaly/ variation	Dose (mg / kg)			
	0	600	800	1000
No. examined	272	62	73	58
Irregular trachea	8(3) ^a	1(2)	2(3)	1(2)
Side-weighted kidney	10(4)	3(5)	4(5)	4(7)
Enlarged ventricles (hydrocephalus)	12(4)	0	0	0
Cleft pharynx	0	0	0	0

^a means that the number of affected rat in a dose / the number of examined rat in a dose \times 100 %.

Table 10. Type and effect of visceral malformation and anomalies observed in fungicide-treated rats

Malformation/ anomaly	Fungicide	
	Benomyl	Thiophanate-methyl
Irregular trachea	+	-
Side-weighted kidney	+	-
Enlarged ventricles (hydrocephalus)	+	-
Cleft pharynx	+	-
Anophthalmia	+	-
Microphthalmia	+	-
Synophthalmia	+	-

-: no effect; ±: little effect; +: obvious effect

Table 11. The effects of fungicides on external malformations, skeletal, visceral malformations and variations in rats.

Toxic sign	Fungicide	
	Benomyl	Thiophanate-methyl
External	A	C
Skeletal	A	C
Visceral	A	C

A (+, obvious effect), B (±, little effect). C (-, no effect)

項細部骨骼異常；而甲基多保淨在上述細部骨骼評估則均為“-”反應(表7)，表示甲基多保淨不會造成細部骨骼異常現象。內臟異常，免賴得在200至1000 mg/kg/day劑量中均出現不同比率之氣管不規則、腎臟左右大小不一及腦室擴大(或腦積水)(圖2C, 2D)等異常，而在300、400、500及600 mg/kg/day劑量中均出現不同比例之咽裂、無眼、小

眼及獨眼等畸形(表8及圖5,6)，而甲基多保淨除600至1000 mg/kg/day劑量發生輕微氣管不規則及腎臟左右大小不一外，未出現其他症狀(表9)，評估藥劑對內臟異常之影響，由前述之內臟異常所訂之三級評估標準，免賴得產生氣管不規則、左右腎臟大小不一、腦室張或腦積水、咽裂、無眼、小眼及獨眼等均為“+”反應，可知免賴得具明顯之內臟異常；而甲基多保淨亦均為“-”反應(表10)，顯示甲基多保淨無內臟異常現象。整體評估免賴得與甲基多保淨對子鼠外觀、細部骨骼及內臟等異常，免賴得對大鼠子鼠在外觀、細部骨骼及內臟之影響程度分別為A級，而甲基多保淨分別為C級(表11)，亦即免賴得對大鼠具明顯之外觀、細部骨骼及內臟異常現象，而甲基多保淨則僅輕微或無外觀、細部骨骼及內臟異常情形。

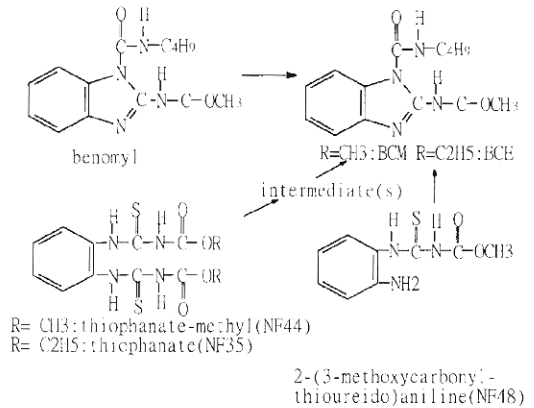
討 論

免賴得在本試驗劑量下可造成胚胎毒性、子鼠毒性、外觀畸形、內臟及細部骨骼異常，甲基多保淨對子鼠外觀、內臟及細部骨骼等三種評估均影響輕微或無影響，免賴得與甲基多保淨在結構上差異不大，且均可在適當條件下代謝成為具有畸胎作用之貝芬替(carbendazim)，為何兩者在畸胎作用表現上差異很大，顯然值得探討。

免賴得與甲基多保淨在室溫下與大鼠體內之代謝研究，Fuchs等(1972)和Vonk and Sijpesteijn(1971)證實(8,19)甲基多保淨在鹼性條件下可分解成殺菌劑貝芬替，進一步可轉變成ethyl ester，而這些benzimidazole carbamic acid的methyl及ethyl esters(BCM及BCE)即為主要殺菌作用成份。而往昔報告，免賴得在動物腸道中即易被分解成貝芬替(BCM)且此反應為可逆反應，免賴得易於動物體中分解成貝芬替與n-butyl isocyanate(10)，免賴得口服投予大鼠後一小時，在血液中68%為貝芬替，而原體免賴得成份於動物體迅速下降至少於15%(17)。可見免賴得若經口服方式在動物體內很快代謝成貝芬替及其他次要產物。免賴得在動物體內主要代謝途徑為水解方式(hydrolysis)可產生2-alkoxycarbonyl aminobenzimidazoles(2-methoxycarbonyl aminobenzimidazole或benzimidazole

carbamic acid methyl ester或BCM)，但甲基多保淨在體外主要以降解方式 (degradation) 進行環化作用 (cyclization) 而產生 2-alkoxycarbonyl aminobenzimidazol (2-ethoxyl-carbonyl aminobenzimidazole 或 benzimidazole carbamic acid ethyl ester 或 BCE)，其中BCM即為貝芬替，是強烈致畸胎藥劑 (如附件)，BCM與BCE均為不穩定之代謝產物，其間可互為轉換，雖然免賴得與甲基多保淨均在體外試驗可能產生BCM或BCE (8)，但由於免賴得與甲基多保淨之物化性質不同，在動物體內時所產生BCM及BCE量差異甚大。免賴得原體為白色結晶固體，可溶於氯仿 (chloroform)，不溶於水及油中；甲基多保淨原體為無色結晶固體，熔點為 181.5-182.5 °C，可溶於丙酮 (5.81%)、甲醇 (2.92%)、氯仿 (2.62%) 及 acetonitrile，微溶於其他有機溶劑，不溶於水。免賴得 25°C 室溫分解成貝芬替之適合條件 pH 值為 4.1 至 9.1 之間，而甲基多保淨室溫 25°C 則僅在 pH 值 9.1 易分解成貝芬替，免賴得分解成貝芬替之酸鹼值從弱酸至強鹼均可進行；而甲基多保淨則僅適合在強鹼中分解成貝芬替 (8)，由於動物胃中之酸鹼值均為弱酸性至強酸性，有時最高可達 pH 2.5 (11)，免賴得在動物消化道中有適合之弱酸性環境分解成貝芬替，甲基多保淨則在弱酸至強酸中均無法分解。故甲基多保淨在動物之最終代謝產物大部份為 6-hydroxy 衍生物 (5)，免賴得與貝芬替之最終代謝產物為 5-hydroxy-2-benzimidazolecarbamate (5-HBC) (大鼠)、5-HBC 和 4-hydroxy-2-amino benzimidazolecarbamate (4-HBC) (牛)、5-HBC 和 5-hydroxy-2-aminobenzimidazole (5-HAB) (小鼠、兔子和綿羊) (8,9) 均為致畸胎物質。因此可合理推測甲基多保淨不易在大鼠造成致畸形性之原因為甲基多保淨在動物體內僅可分解成少量致畸胎之 BCM，且大部份均從尿液中收集得

到，未出現在糞便中 (5)，甲基多保淨在弱酸至強酸性之胃腸道中無法代謝成貝芬替，少量分解成其他中間產物或甲基多保淨原體經動物體內之血液或淋巴進入肝臟代謝，再進入腎臟之排泄系統，故僅合成少量之貝芬替，此為導致甲基多保淨為弱致畸胎性可能之主因。



Appendix. Structural formulae of benomyl and thiophanates, and of their conversion products BCM (benzimidazole carbamic acid, methyl ester) and BCE (benzimidazole carbamic acid, ethyl ester)(code names between brackets). (Fuchs *et al.*, 1972)

誌 謝

本研究承蒙行政院農委會經費補助[86科技-1.6-糧-12 (3-2)]，始得完成，謹此致謝。

參考文獻

1. 呂水淵、林宏偉、王順成。1994。氨基甲酸鹽農藥免賴得 (Benomyl) 對大鼠胚胎畸形性之探討。中華獸醫誌 20 : 348-356。
2. 呂水淵、林宏偉、王順成。1995。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與骨骼之影響。中華獸醫誌 22 : 402-412。

4. Cummings, A. M., M. T. Ebron-McCoy, J. M. Rogers, B. D. Barbee, and S. T. Harris. 1992. Developmental effects of methyl benzimidazolecarbamate following exposure during early pregnancy. *Fund. Appl. Toxicol.* 18 : 288-293.
5. Edwards, I. R., D. G. Ferry, and W. A. Temple. 1983. Fungicides and related compounds. In *Handbook of Pesticide Toxicology III*, W. J. Hayes, Jr and E. R. Laws (ed.) , Academic Press Inc., California, USA, pp. 1457.
6. Ellis, W. G., J. L. Semple, E. R. Hoogenboom, R. J. Kavlock, and F. J. Zeman. 1987. Benomyl-induced craniocerebral anomalies in fetuses of adequately nourished and protein-deprived rats. *Terato. Carcino. Muta.* 7: 357-375.
7. Ellis, W. G., F. De Roos, D. J. Kavlock, and F. J. Zeman. 1988. Relationship of periventricular overgrowth to hydrocephalus in brains of fetal rats exposed to Benomyl. *Terato. Carcino. Muta.* 8: 377-391.
8. Fuchs, A., G. A. Van Den Berg, L. C. Davidse. 1972. A comparison of benomyl and thiophanates with respect to some chemical and systemic fungitoxic characteristics. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2: 191-205.
9. Gardiner, J.A., R. K. Brantley, and H. Sherman. 1968. Isolation and identification of a metabolite of methyl 1-(butylcarbomyl)-2-benzimidazolecarbamate in rat urine. *J. Agric. Food Chem.* 16: 1050-1052.
10. Gardiner, J. A., J. J. Kirland, H. L. Klopping, and H. Sherman. 1974. Fate of benomyl in animals. *J. Agric. Food Chem.* 22: 118-126.
11. Kaplan, H. M., N. R. Brewer, and W. H. Blair. 1983. Physiology. In *The Mouse in Biomedical Research III*, H. L. Foster, J. D. Small, and J. G. Fox (ed.) , Academic Press Inc., New York, USA, pp. 257.
12. Kavlock, R. J., N. Chernoff, L. E. Gray Jr., J. A. Gray, D. Whitehouse. 1982. Teratogenic effects of Benomyl in the Wistar rat and CD-1 mouse with emphasis on the route of administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62: 44-54.
13. Kawamura, S., A. Hirohashi, T. Kato, and M. Yasuda. 1990. Bone-staining technique for fetal rats specimens without skinning and removing adipose tissue. *Cong Anom.* 30 : 93-95.
14. Kimmel, C. A., and C. A. Trammell. 1981. Rapid procedure for routine double staining of cartilage and none in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 56 : 271-273.
15. Makita, T., Y. Hashimoto, and T. Nouchi. 1973. Mutagenic, cytogenetic and teratogenic studies on thiophanate-methyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24: 206-215.
16. Manson, J. M., Y. J. Kang. 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In *Principles and methods of toxicology*, A. W. Hayes (ed.) , Raven Press , New Work , USA, pp. 1034.
17. Sherman, H., R. Culik, R. A. Jackson. 1975. Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32: 305-315.
18. Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co., New York, USA.
19. Vonk, J. W., and A. K Sijpesteijn. 1971. Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate, the fungitoxic principal of thiophanate-methyl. *Pesti. Sci.* 2: 160-164.
20. Zeman, F. J., E. R. Hoogenboom, R. J. Kavlock, J. L. Semple. 1986. Effects on the fetus of maternal Benomyl exposure in the protein-deprived rat. *J. Toxicol. Environ. Health* : 323-336.

A Comparison of Teratologic Characteristics between Benomyl and Thiophanate-methyl in Wistar Rats

Shui-Yuan Lu* and Shun-Cheng Wang

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Abstract: The study was conducted by gavage to compare benomyl and thiophanate-methyl with respect to teratologic characteristics including external, visceral and skeletal anomalies of fetus in Wistar rats. Results showed that benomyl induced external malformations, visceral, and skeletal anomalies whereas thiophanate-methyl only caused a little large open fontanelle, irregular trachea, and side-weighed kidney. External malformations such as exencephaly, gastroschisis, anury, bent tail, edema, bent trunk phocomelia, astomia, and death were observed in the benomyl treated group. Skeletal defects including large open fontanelle, the number of the sternal less than 6, hypoplastic or split sternal, fused ribs, wavy ribs, and dumbbell-shaped thoracic center were discovered in benomyl-treated rats. Visceral defects including irregular trachea, side-weighed kidney, enlarged ventricles (hydrocephalus), cleft pharynx, abnormal eye (anophthalmia, microphthalmia, and synophthalmia), were induced by benomyl. Thiophanate-methyl has the similar chemical structure as benomyl. But thiophanate-methyl seems to be a weak or non-teratogen. The main reason may be the difference of the physical and chemical properties between benomyl and thiophanate-methyl.

Key words: benomyl, thiophanate-methyl, rats, teratogenesis, structural-activity relationship

* Corresponding author: 11 Kuang Ming Road., Wu-Feng, Taichung Hsien, Taiwan 413