

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

*呂水淵 王順成

臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系 臺中縣霧峰鄉
(收稿日期：86年8月26日 接受日期：86年12月1日)

摘要 以胃管投藥法探討甲氧基護谷 (chlormethoxylin) 及 2,4-地 (2,4-D) 兩種本省常用除草劑其潛在致子鼠外觀、細部骨骼與內臟異常之影響。試驗結果顯示，兩藥劑在測試劑量下，均未引起子鼠外觀畸形 (external malformation)。在誘發子鼠細部骨骼異常 (skeletal variation and malformation) 方面，甲氧基護谷藥劑可造成子鼠頭顱窗門張大、胸骨小於 6 根、胸骨異常或發育不全、肋骨融合、波浪狀肋骨或肋骨異常及啞鈴狀胸椎中心等症狀；2,4-地藥劑使子鼠形成頭顱窗門張大、胸骨異常或發育不全、波浪狀肋骨或肋骨異常及啞鈴狀胸椎中心等現象。就子鼠之內臟異常 (visceral variation and malformation) 而言，甲氧基護谷及 2,4-地均可造成氣管不規則、腎臟左右大小不一、腦積水與腦室異常及大腦兩側大小不一及咽裂等異常；此外，甲氧基護谷藥劑另可產生胸腺分裂。兩藥劑所造成之子鼠畸形均屬輕度畸形性。[*呂水淵、王順成。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。中華獸醫誌 24(1): 29-41, 1998。*聯絡人 TEL: 04-330 2101 轉 505, FAX: 04-332 3073]

關鍵詞： 甲氧基護谷，2,4-地，外觀畸形，骨骼畸形，內臟異常

緒 言

甲氧基護谷 (chlormethoxylin) 及 2,4-地 (2,4-D) 均為本省田間廣泛使用之舊農藥，由於往昔農藥上市登記之毒理規範較不完備，因此至今部份農藥之毒理資料或缺如或不正確，需重新評估以確保使用者安全。本實驗目的即針對目前毒理資料較不完備之舊農藥或化學結構類似已產生畸形被列為禁止之葯劑，評估其致畸胎之潛在性，以確保農藥使用者及消費者之安全。甲氧基護谷為聯苯醚系藥劑，其結構與著名的致畸胎禁藥護谷 (nitrofen) 相似；2,4-地為苯氧醋酸系藥劑，往昔報告顯示 2,4-地可於鼠隻三代生殖毒性試驗中，明顯減少子鼠離乳時存活數，可能具潛在子鼠生殖毒性[14]。基於上述原因，本實驗室即針對此二藥劑進行致畸性評估，並提供其結果作為政府農藥管理的參考。

材料與方法

一、材料

- 1. 供試藥劑** 甲氧基護谷 (chlormethoxylin) 80% 原體，2,4-地 (2,4-D) 80% 原體，均由本國農藥公司提供。
- 2. 賦形劑** 聚乙二醇 (polyethylene glycol 200, PEG 200)，購自臺灣默克公司。
- 3. 供試動物** Wistar 品系 SPF 雌、雄大鼠 (*Rattus norvegicus*) (雌，70 ± 8 g；雄，80 ± 10 g)，係購自行政院國科會實驗動物中心，於本系 SPF 動物房飼養至 10 週齡 (雌，255 ± 16 g；雄，326 ± 24 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 ± 2°C，光照 12 小時，飼料為粒狀 (Purina Laboratory Chow[®], No. 5001, USA)，飲水任食。

二、方法

1. 藥劑配製、投予及解剖 (1) 將甲氧基護谷及 2,4-地兩種藥劑分別溶於聚乙烯甘醇中，試藥劑量配製以雌鼠懷孕第 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) 各藥劑試驗劑量：

甲氧基護谷：125、250、500、1000、1500、2000 mg/kg/day

2,4-地：8、25、74、221 mg/kg/day。

(3) 大鼠於 10 週齡開始配種，每個聚碳酸鹽 (polycarbonate, Clear,[®] Japan) 籠子 (長 265 mm × 寬 425 mm × 高 200 mm) 置雌、雄鼠各 2 隻，背部塗抹苦味酸作為標記，定時檢視陰道，腔栓出現視為懷孕第 0 天，雌鼠依其體重逢機分配至各處理組。於懷孕第 6 至 15 天為藥劑投予期，以胃管方式投予，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, 3]。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 及 Trammell [17] 等所發表者修正而來，為節省人力並配合儀器操作，將製程修改為 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) 儀器中進行，自儀器中取出子鼠後置於含適當量之 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，大約兩週，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 之切割線為檢查口蓋之剖線，圖 1-B 五條切割線為檢查頭部內部骨骼之剖線。頭部異常檢查含腦室、顎、鼻、眼睛等部位。

4. 外觀或內部骨骼異常等級分類 (1) 嚴重畸形 (malformation)：子鼠骨骼結構發生永久性改變，而此改變可危及子鼠生長與生存，包括無頭 (acephaly)、無腦 (anencephaly)、露腦 (exencephaly)、腦積水 (hydrocephalus)、小腦

(microcephaly) 及裂顎 (cleft palate)。

(2) 中度畸形 (anomaly)：屬輕至中等程度之永久性可復原之骨骼結構變化，而此種改變不至影響子鼠生存，含多餘之第 14 肋骨骨化 (supernumerary ossification center of 14th rib)、兩肋骨融合 (fusion of the basis 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) 及血腫 (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，含骨骼骨化不完全或骨化缺失 [18]。

5. 內臟異常之檢查 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、卵巢或睪丸等。

6. 統計方法 子代外觀畸形及內臟和骨骼異常等各項觀測值均以百分率表示。畸形性之定義可從二方面決定，如測定母鼠、子鼠及胚胎等毒性，以卡方分佈 (χ^2 distribution) (表 4, 5 及表 7, 8) 進行細部骨骼與內臟異常統計分析，t-test (表 1, 2) 配合劑量-反應關係 (dose-response relationship, D-R) 分析母鼠、胚胎及子鼠毒性各觀測值之顯著性 [22]，如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 (表 3)

++ (high toxic effect)：經分別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，判定對母鼠、胚胎或子鼠具強毒性。考量方法為：母鼠毒性，以母鼠增重指標為主，母鼠肝重 / 母鼠體重之比值為輔，凡中、高處理劑量之母鼠增重顯著小於對照組且母鼠肝重 / 母鼠體重之比值劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (\pm) 或母鼠增重劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.8 (+)；胚胎毒性，凡中、高處理劑量之著床後胚損失數顯著小於對照組且著床後胚損失數之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (\pm)；子鼠毒性，以子鼠出生體重為主要指標，凡中、高

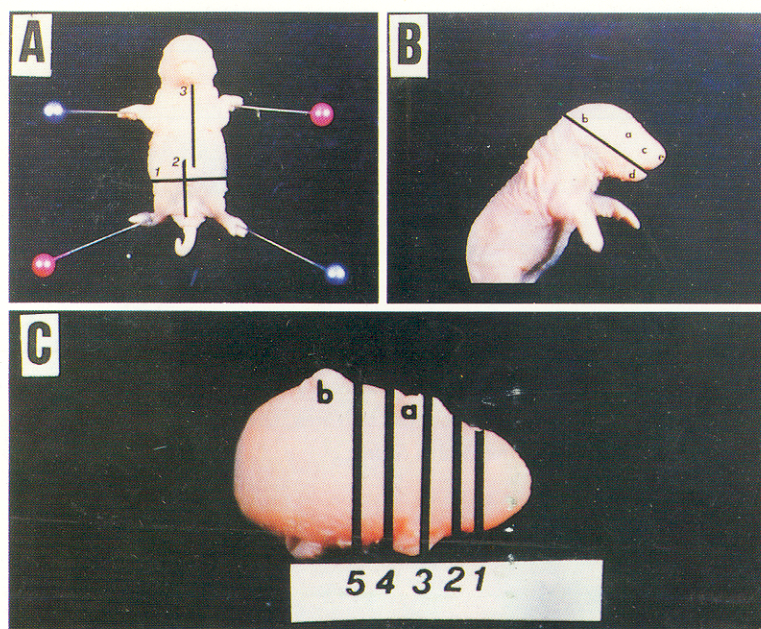


Fig.1 A: Rat fetus, ventral side, pinned to board in preparation for internal visceral examination; lines 1 and 2 show where cuts are made to examine abdominal viscera, and line 3 shows where to cut to expose thoracic viscera. B: Normal head of a rat fetus, a: eyelid, b: ear (pinna), c: nare, d: lower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

Table 1. The maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic effects of chlormethoxyinil in rats.

Toxic signs	Dose (mg/kg/day)							D-R
	0	125	250	500	1000	1500	2000	
No.F/L	12.8 ± 2.8	12.5 ± 2.0	6.9 ± 3.0 *	2.7 ± 2.4 *	0.7 ± 1.1 *	0.2 ± 0.7 *	0.5 ± 1.0 *	±
No.PIML	0.4 ± 1.0	0.6 ± 0.8	1.9 ± 3.7	10.5 ± 4.4 *	13.0 ± 1.2 *	13.4 ± 4.1 *	13.6 ± 1.2 *	±
W(g)	64.0 ± 27.7	67.4 ± 11.7	69.7 ± 12.4	62.6 ± 17.1	64.3 ± 12.2	64.5 ± 22.1	46.3 ± 16.1	-
F(♂, g)	3.9 ± 0.9	3.2 ± 0.2 *	3.4 ± 0.3 *	3.4 ± 0.6 *	2.7 ± 0.3 *	2.7 ± 0.4 *	-	±
F(♀, g)	3.8 ± 0.7	3.2 ± 0.3 *	3.4 ± 0.5 *	2.6 ± 0.7 *	-	-	-	+
L/B(%)	3.6 ± 0.4	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.3 *	4.6 ± 0.3 *	4.8 ± 0.5 *	4.9 ± 0.5 *	5.2 ± 0.7 *	+

No. F/L, No.PIML, W(g), F(♂, g), F(♀, g) and L/B(%) stand for number of fetus in a litter, number of post implantation loss, weight gain, male fetus weight, female fetus weight, and maternal liver weight/ maternal body weight, respectively.

* The value of treated group differs significantly ($P < 0.05$) from that of control.

-: No fetus in treated group were born because of embryoletality.

D-R means dose-response relationship (r^2)

+ : ($r^2 \geq 0.8$)

± : ($0.6 \leq r^2 < 0.8$)

- : ($r^2 < 0.6$)

Table 2. The maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic effects of 2,4-D in rats.

Toxic signs	Dose (mg/kg/day)					D-R
	0	8	25	74	221	
No.F/L	12.8 ± 2.8	13.8 ± 0.8	12.6 ± 1.8	12.6 ± 3.6	13.0 ± 1.0	-
No.PIML	0.4 ± 1.0	0.2 ± 0.4	1.2 ± 1.3	2.4 ± 3.8	1.3 ± 1.5	-
W(g)	64.0 ± 27.7	53.4 ± 23.1	57.5 ± 3.9	64.3 ± 21.7	37.9 ± 19.5 *	±
F(♂, g)	3.9 ± 0.9	4.0 ± 0.7	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.5	3.6 ± 0.3 *	+
F(♀, g)	3.8 ± 0.7	3.8 ± 0.7	3.8 ± 0.3	3.5 ± 0.5 *	3.2 ± 0.3 *	+
L/B(%)	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.2 *	4.3 ± 0.8 *	+

No. F/L, No.PIML, W(g), F(♂, g), F(♀, g), and L/B(%) stand for number of fetus in a litter, number of post implantation loss, weight gain, male fetus weight, female fetus weight, and maternal liver weight/ maternal body weight, respectively.

* The value of treated group differs significantly ($P < 0.05$) from that of control.

D-R means dose-response relationship (r^2)

+ : ($r^2 \geq 0.8$)

± : ($0.6 \leq r^2 < 0.8$)

- : ($r^2 < 0.6$)

Table 3. The summary of the maternal toxic, embryotoxic, and fetotoxic effects of chlormethoxylin and 2,4-D in rats.

Toxic signs	chlormethoxylin	2,4-D
Maternal toxic	-	+
Embryotoxic	++	-
Fetotoxic	++	+

++ : high toxic effect

+ : moderate toxic effect

- : little or no toxic effect

Table 4. Skeletal anomalies and variations observed in chlormethoxylin-treated rats.

Anomalies/variations	Dose (mg/kg/day)					
	0	125	250	500	1000	1500
No. examined	557	65	35	13	9	1
Large open fontanelle	62(11)	0	7(20)	2(15)	0	0
No. of sternum < 6	5(1)	17(27)	3(9)	4(31)	6(66) ^a	0
Hypoplastic or split sternum	35(6)	37(58)	27(77) ^a	8(62) ^a	7(77) ^a	1(100) ^a
Fused rib	2(0)	1(2)	1(3)	3(23)	4(44)	1(100) ^a
Wavy rib	16(3)	6(9)	9(26)	10(77) ^a	3(33)	0
Dumbbell-shaped thoracic center	31(6)	20(30)	20(57) ^a	9(69) ^a	8(88) ^a	1(100) ^a

(): the number of affected fetuses in a dose / the number of examined fetuses in the same dose × 100% .

^aThe value of treated group is significantly ($P < 0.05$) different from that of control.

處理劑量之子鼠出生體重顯著小於對照組且子鼠數之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (±) 或子鼠出生體重之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.8 (+)。

+ (moderate toxic effect)：經分別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，判定對母鼠、胚胎或子鼠具中等毒性。考量方法為：母鼠毒性，以

母鼠增重指標為主，母鼠肝重 / 母鼠體重之比值為輔，凡中、高處理劑量之母鼠增重與對照組差異不顯著且母鼠肝重 / 母鼠體重之比值劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (±) 或母鼠增重劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (±)；胚胎毒性，凡中、高處理劑量之著床後胚損失數與對照組差異不顯著且著床後胚損失數之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6 (±)；子鼠毒性，以子鼠出生體重為主要指標，凡中、高處理劑量之子鼠出生體重與對照

Table 5. Skeletal anomalies and variations observed in 2,4-D-treated rats.

Anomalies/variations	Dose(mg/kg)				
	0	8	25	74	221
No. examined	557	21	25	13	17
Large open fontanelle	62(11)	7(33)	8(32)	5(38)	7(41)
No. of sternum <6	5(1)	1(5)	0	0	4(23)
Hypoplastic or split sternum	45(8)	13(62) ^a	21(84) ^a	9(69) ^a	17(100) ^a
Fused rib	2(0)	0	3(12)	0	1(6)
Wavy rib	16(3)	4(19)	7(28)	2(15)	5(29)
Dumbbell-shaped thoracic center	31(6)	6(29)	10(40)	2(15)	1(6)

(): the number of affected fetuses in a dose / the number of examined fetuses in the dose × 100%.

^aThe value of treated group is significantly ($P < 0.05$) different from that of control.

Table 6. Historical datas of the skeletal anomalies and variations observed in 2400 (TACTRI LAB)^a and 5500 fetuses (Merck LAB)^b of control Wistar rats.

Anomalies(A)/variations(V)	Incidence ^c	
	TACTRI LAB	MERCK LAB
Large open fontanelle(A)	0.47	0.02
No. of sternum < 6(V)	0.86	0.62
Hypoplastic or split sternum(V)	9.23	8.18
Fused rib(A)	0.03	0.02
Wavy rib(V)	0.56	0.38
Dumbbell-shaped thoracic center(V)	0.52	0.2

^aTACTRI LAB stand for Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute laboratory

^bMERCK LAB stand for Merck Research Laboratory

^cThe fetus was used as the basic unit of calculation. Incidence (%) values were obtained by dividing the number of fetuses affected in the total population

組差異不顯著且子鼠數之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6(±) 或子鼠出生體重之劑量-反應關係之 r^2 值大於等於 0.6(±)。

— (little or no toxic effect)：經分別考量母鼠增重與母鼠肝重 / 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，判定對母鼠、胚胎或子鼠具低毒性或無毒性。考量方法為：母鼠毒性，以母鼠增重指標為主，母鼠肝重 / 母鼠體重之比值為輔，凡中、高處理劑量之母鼠增重與對照組差異不顯著且母鼠肝重 / 母鼠體重之比值劑量-反應關係之 r^2 值小於 0.6 (—) 或母鼠增重劑量-反應關係之 r^2 值小於 0.6 (—)；胚胎毒性，凡中、高處理劑量之著床後胚損失數與對照組差異不顯著且著床後胚損失數之劑量-反應關係之 r^2 值小於

0.6 (—)；子鼠毒性，以子鼠出生體重為主要指標，凡中、高處理劑量之子鼠出生體重與對照組差異不顯著且子鼠數之劑量-反應關係之 r^2 值小於 0.6 (—) 或子鼠出生體重之劑量-反應關係之 r^2 值小於 0.6 (—)。

至於判定內部骨骼 (表 4、5、7) 及內臟與頭部 (表 8、9、11) 異常標準，除利用卡方分佈 (X^2 distribution) 統計分析處理組與對照組外，並參考試驗觀測值與本實驗室長久試驗對照組之背景值 (表 6、10) 做比較，將其畸形程度訂為三級 [17]：

+ (嚴重異常, serious effect)：觀察值 $\geq 1.2 \times$ 背景值，或卡方分佈統計分析差異顯著 ($P < 0.05$)，表示內部骨骼畸形顯著。

± (中度異常, moderate effect)：卡方分佈統計分析差異不顯著，但 $1 \times$ 背景值 $<$ 觀察值 < 1.2

Table 7. Summary of the skeletal anomalies and variations observed in chlormethoxyinil-treated rats.

Anomalies (A)/variations (V)	chlormethoxyinil	2,4-D
Large open fontanelle (A)	+	+
No. of sternum $<$ 6 (V)	+	+
Hypoplastic or split sternum (V)	+	+
Fused rib (A)	+	+
Wavy rib (V)	+	+
Dumbbell-shaped thoracic center (V)	+	+

+ : serious effect
± : moderate effect
- : normal

Table 8. Visceral anomalies and variations observed in chlormethoxyinil-treated rats.

Anomalies/Variations	Dose (mg/kg)					
	0	125	250	500	1000	1500
No. examined	557	60	35	13	9	1
Irregular trachea	8(1)	0	1(3)	1(8)	0	0
Side-weighted kidney	10(2)	5(8)	2(6)	1(8)	1(11)	0
Enlarged brain ventricle	12(2)	8(14)	6(18)	3(24)	4(45)	1(100) ^a
Split thymus	0	2(2)	1(3)	1(7)	0	0
Cleft pharynx	0	0	1(3)	1(7)	0	0

(): the number of affected fetuses in a dose / the number of examined fetuses in the same dose $\times 100\%$

^aThe value of treated group is significantly ($P < 0.05$) different from that of control.

Table 9. Skeletal anomalies and variations observed in 2,4-D-treated rats.

Anomalies/Variations	Dose (mg/kg)				
	0	8	25	74	221
No. examined	557	21	25	13	17
Irregular trachea	8(1)	0	0	1(8)	2(12)
Side-weighted kidney	10(2)	4(19)	4(16)	2(15)	6(35)
Enlarged brain ventricle	12(2)	3(14)	5(21)	4(30)	8(47)
Cleft pharynx	0	0	0	1(8)	0

(): The number of affected fetuses in a dose / the number of examined fetuses in the same dose $\times 100\%$.

Table 10. Historical datas of Viseral malformations and anomalies observed in 2400 (TACTRI LAB)^a and 5500 fetuses (Merck LAB)^b of control Wistar rats

Malformations (M)/Anomalies (A)	Incidence ^c	
	TACTRI LAB	MERCK LAB
Irregular trachea (A)	0.6	0
Right-sided kidney (A)	0.7	0.5
Enlarged brain ventricle (M)	0	0
Split thymus (M)	0	0
Cleft pharynx (M)	0	0

^aTACTRI LAB stand for Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute laboratory

^bMERCK LAB stand for Merck Research Laboratory

^cThe fetus was used as the basic unit of calculation. Incidence (%) values were obtained by dividing the number of fetuses affected in the total population.

Table 11. Viseral malformations and anomalies observed in chlormethoxyinil and 2,4-D-treated rats.

Malformations (M)/Anomalies (A)	chlormethoxyinil	2,4-D
Irregular trachea (A)	+	+
Right-sided kidney (A)	+	+
Enlarged brain ventricle (M)	+	+
Split thymus (M)	+	-
Cleft pharynx (M)	+	+

+ : serious effect

± : moderate effect

- : normal

×背景值，表示內部骨骼異常中度畸形。

— (正常, normal) : 卡方分佈統計分析差異不顯著，但觀察值 $\leq 1 \times$ 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 malformation、

anomaly 或 variation 等異常項目。

有關整體評估藥劑對動物影響，包括外觀、內部骨骼及內臟畸形，亦訂定三種標準 (表 12) :

+ (嚴重畸形, obvious effect) : 外觀、內部骨骼及內臟等三項中，其畸形數如有下列中一種

Table 12. The external, skeletal, and visceral malformation and variation induced by chlormethoxylin and 2,4-D in rats.

Toxic signs	chlormethoxylin	2,4-D
External	-	-
Skeletal	+	+
Visceral	+	+

+ : obvious effect

± : moderate effect

- : normal

(1) 有三項或以上之 variation, (2) 二種或以上之 anomaly, (3) 有一種或以上之 malformation 者, 表示嚴重畸形。

± (中度畸形, moderate effect): 外觀、內部骨骼及內臟等三項中, 其畸形數如有下列中一種 (1) 有二項 variation, (2) 有一種 anomaly, 表示中度畸形。

- (輕度或無異常, normal): 外觀、內部骨骼及內臟等三項中, 其畸形數如有下列中一種 (1) 有一項 variation, (2) 無 variation 者, 表示輕度或無畸形。

結 果

一、測試藥劑的母鼠毒性 (maternal toxicity)、胚胎毒性 (embryotoxic effect) 及子鼠毒性 (fetotoxic effect) 供試藥劑對大鼠是否產生母鼠毒性、胚胎毒性及子鼠毒性, 可從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) 加以鑑定。對照組在子鼠數 (fetus number per litter, No. F/L)、著床後胚損失數 (post implantation loss, No. PIML)、母鼠增重 (weight gain, WG)、雌與雄子鼠出生體重 (fetus weight, FW) 及母鼠肝重 / 母鼠體重之百分比 (liver weight/body weight, LW/BW) 值分別為 12.8 ± 2.8 隻、 0.4 ± 1.0 個、 64.0 ± 27.7 g、 3.8 ± 0.7 g (♀) 及 3.9 ± 0.9 g (♂) 及 $3.6 \pm 0.4\%$ 。甲氧基護谷在 500 mg/kg/day 劑量時, 除母鼠增重 (62.6 ± 17.1 g) 未受影響外, 其餘子鼠數、著床後胚損失數、雌與雄鼠出生體重及母鼠肝重 / 母鼠體重百分比分別為 2.7 ± 2.4 隻、 10.5 ± 4.4 個、 2.6 ± 0.7 g (♀) 與 3.4 ± 0.6 g (♂) 及 $4.6 \pm 0.3\%$, 均較對照組顯著減少。甲氧基護谷在 500 mg/kg/day 劑量以上處理時除對母鼠增重無

影響外, 其餘劑量處理組對子鼠數、著床後胚損失數、雌與雄鼠出生體重及母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率等均有顯著影響 (表 1), 且各試驗劑量組除母鼠增重之項外其劑量-反應關係 r^2 值大於等於 0.6 (D-R ± 及 D-R +)。2,4-地則在 221 mg/kg/day 劑量時, 除子鼠數與著床後胚損失數影響不顯著外, 其餘如母鼠增重、雌與雄子鼠出生體重及母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率等均有明顯影響 (表 2), 劑量-反應關係評估亦有相似關係。由表 1 可知, 甲氧基護谷之母鼠增重 D-R (-)、母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率 D-R (+), 著床後胚損失數 D-R (±), 子鼠出生體重 (雄) D-R (±) 與子鼠出生體重 (雌) D-R (+) 及子鼠數 D-R (±)。甲氧基護谷在母鼠毒性、胚胎毒性及子鼠毒性之之綜合評估, 儘管甲氧基護谷在母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率 D-R (+) 且自 250 至 2000 mg/kg 等劑量中均顯著高於對照組, 但母鼠增重 D-R (-) 且各處理劑量組均與對照組無明顯差異, 表示在此些處理劑量範圍內對母鼠代謝生理正常, 故對母鼠毒性評為無明顯影響。甲氧基護谷在著床後胚損失數 D-R (±), 但各處理劑量均顯著小於對照組, 且由數值可知 500 mg/kg 及以上劑量時遠大於對照組, 故評為明顯胚胎毒性。至於甲氧基護谷在子鼠毒性之影響, 子鼠出生體重 (雄) D-R (±) 與子鼠出生體重 (雌) D-R (+) 及子鼠數 D-R (±), 且上述三項中各處理劑量絕大多數值顯著小於對照組, 因此評定甲氧基護谷具明顯子鼠毒性; 2,4-地在母鼠毒性、胚胎毒性及子鼠毒性之之綜合評估, 表 2 可知, 2,4-地之母鼠增重 D-R (±)、母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率 D-R (+), 著床後胚損失數 D-R (-), 子鼠出生體重 (雄) D-R (+) 與子鼠出生體重 (雌) D-R (+) 及子鼠數 D-R (-), 2,4-地在母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率 D-R (+), 在中、高劑量時顯著高於對照組, 而母鼠增重 D-R (±) 且於高劑量組與對照

組有明顯差異，在以母鼠增重為重要指標原則下評定 2,4-地具中等母鼠毒性。2,4-地在著床後胚損失數 D-R (-)，且各處理劑量均與對照組無顯著差異，因此評定 2,4-地不具胚胎毒性。至於 2,4-地在子鼠毒性之影響，子鼠出生體重 (雄) D-R (+) 與子鼠出生體重 (雌) D-R (+) 及子鼠數 D-R (-)，且上述子鼠出生體重 (雄、雌) 中僅中、高劑量數值顯著小於對照組，子鼠數之各處理劑量均與對照組無明顯差異，因此評定 2,4-地具中等子鼠毒性，2,4-地處理之母鼠肝重 / 母鼠體重之比值百分率 D-R (+)，且在中、高劑量時數值顯著大於對照組，再者，母鼠增重之 D-R (±) 及高劑量時顯著大於對照組，因此評定為中等母鼠毒性。綜合上述評估結果，甲氧基護谷不具母鼠毒性，但具胚胎毒性及子鼠毒性；至於 2,4-地則具母鼠毒性及子鼠毒性、不具胚胎毒性 (表 3)。

二、測試藥劑對大鼠子代造成之外觀、細部骨骼、內臟與頭部異常 甲氧基護谷及 2,4-地兩藥劑處理組之子鼠外觀均正常，而其半窩子鼠經 70% 酒精固定後，以 Varistain 24-T 製作成透明鼠，於解剖顯微鏡下檢視。細部骨骼異常，結果於甲氧基護谷 1000 mg/kg/day 處理組，雖無頭顱窗門張大現象，但胸骨小於 6 之鼠隻達 66%、胸骨異常或發育不全為 77%、肋骨融合為 44%、波浪狀肋骨或肋骨異常為 33%、啞鈴狀胸椎中心為 88% (表 4 及圖 2)。2,4-地於處理劑量 8 至 221 mg/kg/day，均產生較對照組顯著之內部骨骼異常現象，其中以 221 mg/kg/day 組最明顯，頭顱窗門張大之鼠隻佔 41%、胸骨小於 6 為 23%、胸骨異常或發育不全為 100%、肋骨融合為 6%、波浪狀肋骨或肋骨異常為 29%、啞鈴狀胸椎中心為 6% 等 (表 5 與圖 3)。綜合卡方分佈統計分析，並參考試驗觀測值與本實驗室長久試驗對照組之背景值結果，甲氧基護谷與 2,4-地在頭顱窗門張大、胸骨小於 6、胸骨異常或發育不全、肋骨融合、波浪狀肋骨或肋骨異常及啞鈴狀胸椎中心等各項內部骨骼異常均顯著 (表 7、圖 2、圖 4)。內臟與頭部異常，甲氧基護谷在供試 125-1500 mg/kg/day 劑量下均有內臟異常現象，以 250 mg/kg/day 組最明顯，有 3% 鼠隻出現氣管不規則、6% 腎臟左右大小不一、18% 腦積水與腦室異常及大腦兩側大小不一、3% 胸腺分裂、3% 咽裂 (表 8、圖 5)；當劑量達 1000 mg/kg/day 以上時，供試鼠隻多已死亡，受檢數減少，唯內臟異常數明顯。2,4-地在 8-221 mg/kg/day 所有供試劑量組內臟異常均

十分明顯，在 74 mg/kg/day 組氣管不規則佔 8%、腎臟左右大小不一佔 15%、腦積水與腦室異常及大腦兩側大小不一佔 30% 及咽裂佔 8% (表 9、圖 5)；因此，甲氧基護谷和 2,4-地均會造成子鼠輕度內臟畸形 (表 11)。甲氧基護谷對子鼠外觀無影響，但會造成輕度內臟受損及較嚴重細部骨骼畸形；而 2,4-地對子鼠外觀亦無影響，但僅造成輕度內臟及細部骨骼畸形 (表 12)。

討 論

本實驗結果顯示甲氧基護谷無母鼠毒性但有胚胎毒性及子鼠毒性，而 2,4-地無胚胎毒性但在高劑量 221 mg/kg 時具母鼠毒性及子鼠毒性。基本上進行畸胎試驗時，高劑量下產生母鼠毒性時之藥劑劑量對畸形性實驗並無意義，因高劑量若造成母鼠死亡則無法進行下一步實驗，因此應避免藥劑於高劑量下產生母鼠死亡毒性。護谷為著名之致畸胎藥劑極相近，大鼠曝露於 100 ppm 或更高劑量護谷時會導致新生子鼠死亡 [7, 16, 23]，由於在胚胎中所測得之殘留物大部份為護谷本身物質，因此推測護谷本身為導致胚胎及子鼠毒性之重要因素 [6, 20]。甲基氧基護谷之結構主體與護谷極為相似，唯因另含甲氧之官能基，因而推測可能抵消聯苯醌基產生自由基的機會，因此對胚胎毒性大為下降，但仍可產生部份毒性，包括造成胚胎早期死亡及子鼠體重下降胚胎毒性與子鼠毒性為一互動關係，但本研究結果顯示 2,4-地無胚胎毒性但在高劑量 221 mg/kg 卻具母鼠毒性及子鼠毒性，且在大於 221 mg/kg 時甚至具母鼠毒性，為何不具胚胎毒性卻出現子鼠毒性，可能部份是導因於 2,4-地對母鼠之直接毒性，造成母鼠飼料攝食量下降，因而導致子鼠體重下降。往昔 2,4-地的相關研究 [4, 14, 21] 即認為其可減少子鼠至離乳的存活率及存活子鼠的體重。此外，Aleksashina 等 (1979) 曾指出 2,4-地對大鼠的毒性主要視其衍生物的種類而定，如銨鹽 (amine) 和鈉鹽形式衍生物之 2,4-地不會影響胚發育，但氫鹽 (ammonium salt) 和 butyl ester 形式之 2,4-地衍生物則可誘發胚胎死亡率顯著增加 [5]，本實驗所測試之 2,4-地為銨鹽衍生物。

甲氧基護谷對大鼠子代不造成外觀畸形但會造成細部骨骼異常，包括胸骨小於 6、胸骨異常或發育不全、肋骨融合、波浪狀肋骨或肋骨異常及啞鈴狀胸椎中心；此外，亦會導致內臟與頭部異常包括氣管不規則、腎臟左右大小不一、腦積水與腦室異常及大腦兩側大小不一、胸腺分裂及咽裂。護谷之

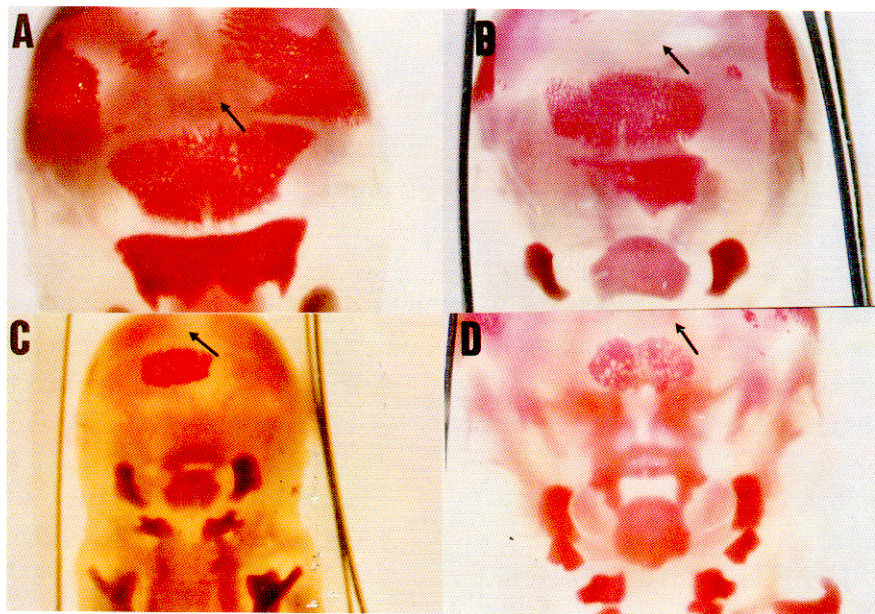


Fig.2 A: large open fontanelle was induced by chlormethoxynil 250mg/kg/day. B: large open fontanelle was induces by chlormethoxynil 500 mg/kg/day. C: Serious fontanelle was induced by 2,4-D 74 mg/kg/day. D: Serious fontanelle was induced by 2,4-D 221 mg/kg/day.

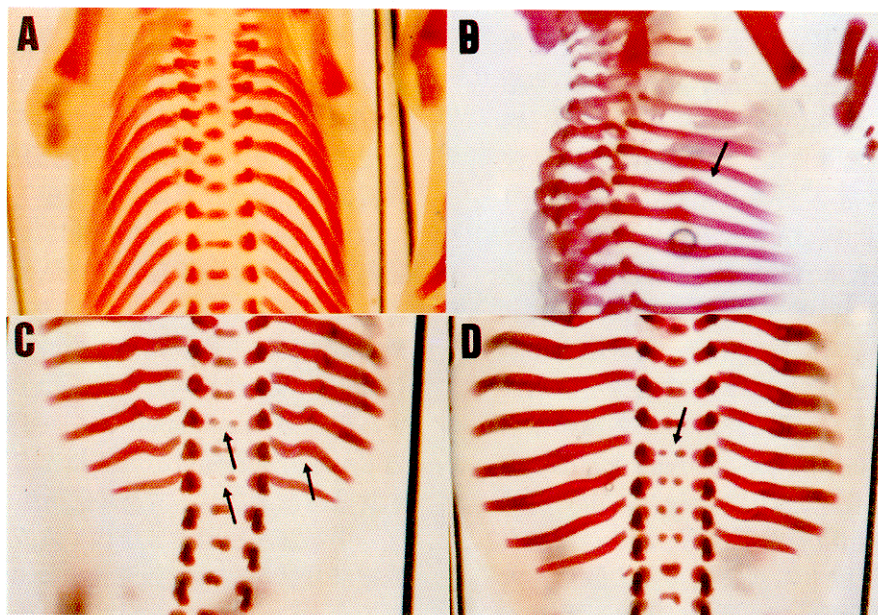


Fig.3 A: Normal rat ribs. B: Wavy ribs (arrow, 250 mg/kg/day), C: wavy ribs and dumbbell-shaped thoracic center (arrows, 500 mg/kg/day), and D: dumbbell-shaped thoracic center (arrows, 1000 mg/kg/day) were induced by chlormethoxynil.

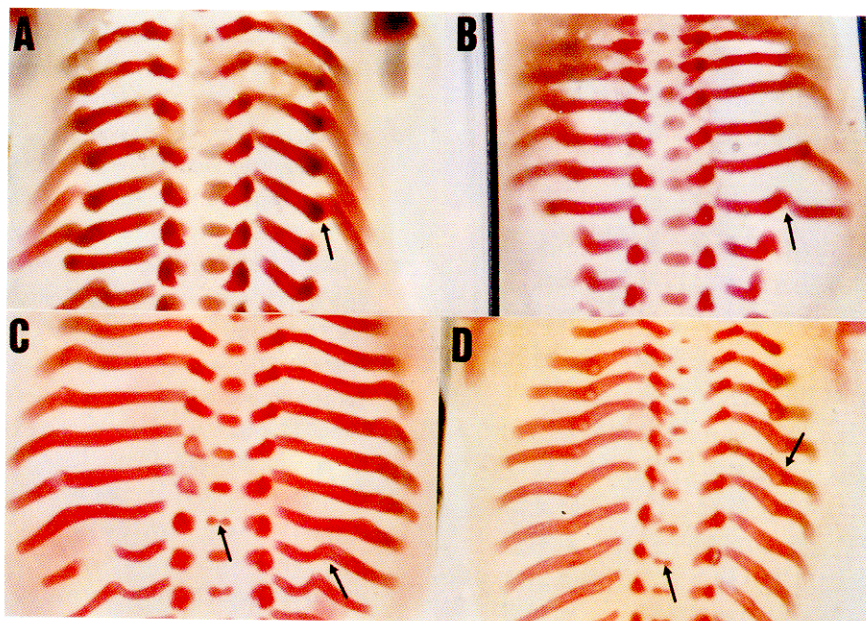


Fig.4 A: wavy ribs(arrow, 8 mg/kg/day), B: wavy ribs(arrow, 25 mg/kg/day), C: wavy ribs and dumbbell-shaped thoracic center(arrows, 74 mg/kg/day), and D: wavy ribs and dumbbell-shaped thoracic center(arrows, 221 mg/kg/day) were induced by 2,4-D.

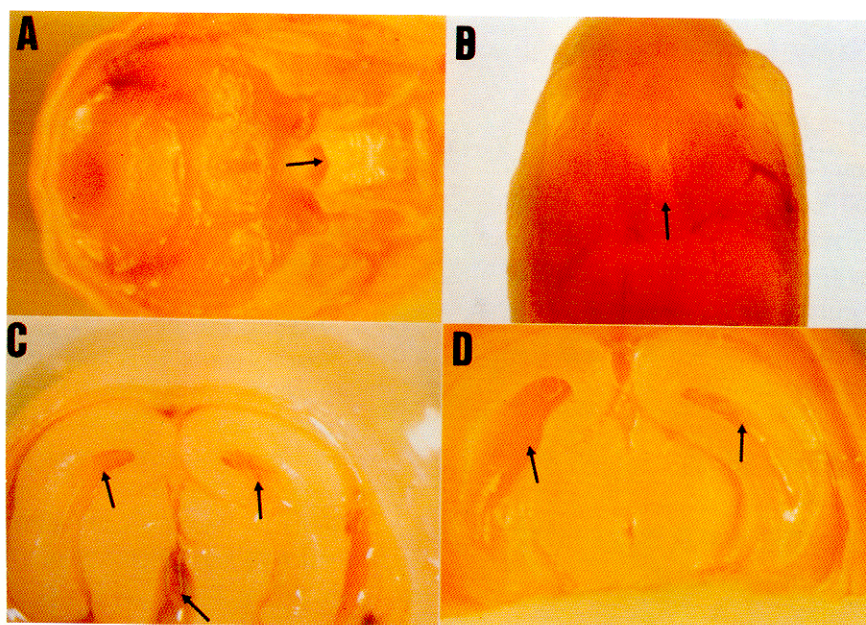


Fig.5 A: Normal pharynx B: cleft pharynx was induced by both chlormethoxylin 250 and 2,4-D 74 mg/kg/day. C: Hydrocephalus was induced by chlormethoxylin 500 mg/kg/day. D: Hydrocephalus was induced by 2,4-D 74 mg/kg/day.

致畸胎性包括新生子鼠因呼吸困難及肺功能改變而死亡、腎臟縮小、小眼畸形和哈得氏腺 (Harderian gland) 破壞、腦積水、甲狀腺異常及過度活動 [8-13, 19]。甲氧基護谷較護谷之致畸胎性為弱，除氧基護谷不易形成護谷自由基外，可能甲氧基護谷與護谷在動物中代謝產物亦有不同，然而代謝產物是否亦為造成畸形之一關鍵物，目前則仍無研究可知。

2,4-地，在子代外觀雖無影響，但仍可造成子鼠細部骨骼異常，如頭顱窗門張大、胸骨異常或發育不全、波浪狀肋骨或肋骨異常，以及內臟與頭部異常，如氣管不規則、腎臟左右大小不一、腦積水與腦室異常、大腦兩側大小不一及咽裂。往昔研究部份學者認為 2,4-地除具母鼠及子鼠毒性外，亦可產生輕微骨骼異常 [24]。但部份學者則認為 110 mg/kg/day 高劑量以上，2,4-地始對小鼠具致畸胎和胚胎毒性 [15]。綜合上述報告，過去研究，2,4-地可造成子鼠死亡或至離乳時子鼠死亡但不造成外觀畸形。本試驗則呈現外觀正常，內部骨骼及內臟輕度畸形，此與往昔研究稍有不同，推測其可能為大鼠品系及劑量不同或藥劑衍生物形式不同所致。

從生物實驗背景值得知，若產生外觀異常，則一般為嚴重畸形 (malformation) 佔絕大多數，中度畸形 (anomaly) 次之；若為內臟與頭部異常，則一般會產生中度畸形或輕度畸形 (variation)，若僅產生細部骨骼異常，則大部分為輕度畸形，中度畸形很少見，綜論之，在畸形程度出現頻度上之順序為 malformation < anomaly < variation；同理，畸形種類出現頻度上之關係為 外觀異常 < 內臟與頭部異常 < 細部骨骼異常。本研究結果顯示，甲氧基護谷和 2,4-地對大鼠子鼠細部骨骼及內臟等均僅有輕微的畸形作用，均為可回復性畸形，且又不具子鼠外觀畸形作用，因此可推斷甲氧基護谷與 2,4-地應屬弱致畸胎藥劑。

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。氨基甲酸鹽農藥免賴得 (Benomyl) 對大鼠胚胎形性之探討。中華獸醫誌 20: 348-356, 1994。
2. 呂水淵、林宏偉、王順成。殺菌劑貝芬替 (Carbend-

- azim) 對鼠致胚胎畸形性評估。植保會刊 37: 331-338, 1995。
3. 呂水淵、王順成。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, 1996。
4. Aleksashina, ZA, Buslovich SYu, Kolosovskaia VM.. Embryotoxic effect of 2,4-D diethylamine salt. Gig. Sanit. 38: 100-101, 1973.
5. Aleksashina ZA, Buslovich SYu, Kolosovskaia VM. Characteristic features of embryotoxic effect of herbicide-derivatives of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Gig. Sani. 44: 40-71, 1979.
6. Brown TJ, Manso J M. Further characterization of the distribution and metabolism of nitrofen in the pregnant rat. Teratology 34: 129-139, 1986.
7. Costlow RD, Manson JM. The heart and diaphragm: Target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). Toxicology 20: 209-227, 1981.
8. Costlow RD, Hirsekorn JM, Stiratelli RG, O'Hara BP, Black DL, Kane WW, Burke S S, Smith JM, Hayes AW. The effects on rat pups when nitrofen (4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrobenzene) was applied dermally to the dam during organogenesis. Toxicology 28: 37-50, 1981.
9. Costlow RD, Manson JM. Distribution and metabolism of the teratogen nitrofen (2,4-dichloro-4-nitro diphenyl ether) in pregnant rats. Toxicology 26: 11-23, 1983.
10. Francis BM. Teratogenicity of bifenoX and nitrofen in rodents. J. Environ. Sci. Health part B B21 303-317, 1986.
11. Francis BM. Role of structure in diphenyl ether teratogenesis. Toxicology 40: 297-309, 1986.
12. Gray LE, Jr., Kavlock RJ., Chernoff N, Ferrell J., McLamb J., Ostby J. Prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether destroys the rodent Harderian gland. Science 215: 293-294, 1982.
13. Gray LE, Jr., Kavlock RJ, Chernoff N, Ostby J, Ferrell J. Postnatal developmental alterations following prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether: A dose response evaluation in the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 67: 1-44, 1983.
14. Hansen WH, Quaife ML, Habermann RT, Fitzhugh OG. Chronic toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats and dogs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 20: 122-129, 1971.
15. Khera KS, Mckinley WP. Pre- and postnatal studies on 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and their derivatives in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 22: 14-28, 1972.
16. Kimbrough RD, Gaines TB, Linder RE. 2,4-Dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (TOK). Effects on the lung maturation of rat fetus. Arch. Environ. Health

- 28: 316-320, 1974.
17. Kimmel CA, Trammell CA. Rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol* 56: 271-273, 1981.
18. Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: *Principles and methods of toxicology*. edited by A. W. Hayes pp. 1034. Raven Press, New York, 1994.
19. Manson JM, Brown T, Baldwin DM. Teratogenicity of nitrofen (2,4-dichloro-4'-nitrodiphenyl ether) and its effects on thyroid function in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 323-335, 1984.
20. Manson JM. Mechanism of nitrofen teratogenesis. *Environ. Health Perspec.* 70: 137-147, 1986.
21. Schwetz BA, Sparschu GL, Gehring PJ. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and esters of 2,4-D on rat embryonal, foetal and neonatal growth and development. *Food Cosmet. Toxicol.* 9: 801-807, 1971.
22. Steel RGD, Torrie JH. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A. 1980.
23. Stone LC, Manson JM. Effects of the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (nitrofen) on fetal lung development in rats. *Toxicology* 20: 195-207, 1981.
24. Unger TM, Kliethermes J, Van Goethem D, Short RD. Teratology and postnatal studies in rats of the propylene glycol butyl ester and isooctyl esters of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. U.S. NTIS, PB Rep. PB 81-191, 140, 1981.

The Effects of the Herbicide Chlormethoxynil and 2,4-D on External, Skeletal and Visceral Anomalies of Fetuses in Rats

Shui-Yuan LU *, Shun-Cheng WANG

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

(Received August 26, 1997. Accepted December 1, 1997)

ABSTRACT This study evaluated the teratologic effects as external, visceral, and skeletal examinations of fetus in rats. The test was administered by a gavage with the chlormethoxynil and 2,4-D. Experimental/Analysis results did not detect any external malformations in the two herbicides. However, these herbicide-treated rats contained common skeletal anomalies and variations such as large open fontanelle, number of the sternal < 6, hypoplastic or split sternal, fused ribs, wavy ribs, dumbbell-shaped thoracic center. In addition, among the visceral defects in the herbicides included irregular trachea, side-weighted kidney, enlarged brain ventricles, and cleft pharynx. Split thymus was found only in chlormethoxynil. Based on the results presented herein, we can conclude that chlormethoxynil and 2,4-D are weakly teratogenic agents in rats. [* Lu SY and Wang SC. The effects of the herbicide chlormethoxynil and 2,4-D on external, skeletal and visceral anomalies of fetuses in rats. *J Chin Soc Vet Sci* 24(1): 29-41, 1998. * Corresponding author TEL 04-330 2101 ext 505, FAX 04-332 3073]

Keywords: *Chlormethoxynil, 2,4-D, External malformation, Skeletal abnormality, Visceral abnormality*