

## 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

\* 呂水淵 王順成

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所應用毒理系 台中縣霧峰鄉  
(收稿日期: 88年8月2日。接受日期: 89年1月19日)

### The Effects of Three Pesticides on Sperm Motility, *in Vitro* Fertilization and Embryo Development in Mice

\* Shui-Yuan LU and Shun-Cheng WANG

*Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute,  
Wu-Feng, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC*

(Received: August 2, 1999. Accepted: January 7, 2000.)

抽印自中華民國獸醫學會雜誌第26卷第1期

中華民國89年3月

Reprinted from Journal of the Chinese Society of Veterinary Science  
Taipei, Taiwan, ROC  
Vol.26 No.1, March

## 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

\* 呂水淵 王順成

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所應用毒理系 台中縣霧峰鄉  
(收稿日期: 88年8月2日。接受日期: 89年1月19日)

**摘要** 本試驗利用具致胚胎畸形性藥劑免賴得 (benomyl)、無致胚胎畸形性之甲基多保淨 (thiophanate-methyl) 及具生殖毒性之 Aroclor-1254 藥劑測試對小鼠精子活力及對精子、卵子之生體外受精率及胚發育之影響, 期建立生殖毒性藥劑活體外測試之部分模式。結果顯示, 當精子與卵子同時以免賴得與甲基多保淨處理, 僅在最高濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時顯著降低小鼠受精率, 而 Aroclor-1254 則隨濃度增加而降低受精率。若卵子先以藥劑處理 6 小時而精子不處理時, 甲基多保淨並不影響受精率, 而免賴得與 Aroclor-1254 則在中、高濃度 ( $\geq 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 均顯著降低受精率 ( $P < 0.05$ )。若精子先處理 1.5 小時而卵子不處理時, 甲基多保淨亦不影響受精率, 但免賴得與 Aroclor-1254 則在最高濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時降低受精率 ( $P < 0.05$ )。至於在精子活動力方面, 暴露初期 (2 小時) 之精子活動力均較對照組低, 但無濃度-反應相關; 處理 8 和 10 小時後, 精子之活動力均顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ ), 且呈濃度-反應關係。胚發育影響上, 三藥劑處理 48 小時後, 高濃度均顯著影響胚發育; 處理 96 小時後, 則於低濃度即可影響胚之發育。綜合上述結果, 甲基多保淨、免賴得及 Aroclor-1254 等三藥劑均會影響小鼠之生體外受精率及胚之發育, 其影響程度以免賴得與 Aroclor-1254 為較嚴重, 而甲基多保淨則較輕微。[\* 呂水淵、王順成。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。中華獸醫誌 26 (1): 24-35, 2000。\* 聯絡人 TEL: 04-330 2101 ext. 505, FAX: 04-332 3073, E-mail: lusueyen@tactri.gov.tw]

**關鍵詞:** 小鼠, 體外受精, 生殖毒性

### 緒 言

目前全世界三大毒理規範中評估藥劑之後代生殖毒性測試方法中, 均利用為期一至二年之大鼠餵飼試驗, 以連續三代之大鼠子代於動情週期、配種、懷孕、分娩、泌乳及哺乳等生殖性狀與攝食量、子代體重等生長性狀為主要毒性評估指標。在毒理規範中之評估項目雖較能顯示出藥劑之生殖毒性, 但全程費時耗財, 因此近來對欲上市登記藥劑所舉行之毒理規範國際協調會議 (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH), 曾經提出修正之草案 [18], 建議傳統生殖毒性測試應增加對雄性受精率之測試, 包括精子數目及活力, 可見精子品質在後代生殖毒性試驗中日漸受重視, 其主要原因可能是社會工業化後造成環境污染, 根據研究結果顯示,

近五十年來全球男人的精液濃度有逐漸下降趨勢 [3], 究竟原因為何? 實有詳加探討之必要。生體外 (*in vitro*) 毒性物質之致畸胎性評估方法發展已近十五年, 試驗對象為藥劑對實驗動物之卵子 (oocyte)、精子 (spermatozoa)、胚 (embryo) 或胎 (conceptus) 之毒性影響 [13,16]。目前此法在致畸胎性測試報告甚多, 其試驗方法之理論與應用, 可協助快速篩選潛在致畸胎性化合物 [4], 但利用生體外生殖毒性測試相關研究並不多, 有人曾利用生體外測試方法評估多氯聯苯族系化合物 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 對小鼠生體外受精率之影響 [10,11], 認為此生體外測試方法可快速評估化工產品是否具潛在生殖毒性, Aroclor - 1254 因具有較強之毒性, 因此被選為毒性實驗正對照藥劑。本實驗室曾探討免賴得 [1,2] 及甲基多保淨之生體內 (*in vivo*) 致畸胎性及生殖毒性, 與前人研究趨勢相似 [15]。免賴得具明顯致畸胎性及生殖毒性, 而甲基多保淨雖可代謝成具致畸胎

性之貝芬替 (carbendazim), 但受限於腸道中之酸鹼值, 致其代謝量有限, 因此不具明顯之致畸胎性及生殖毒性。本實驗將以此兩藥劑之毒性比較, 建立生體外之測試方法。

本試驗之目的即利用已知於生體內致生殖毒性及畸胎性藥劑免賴得 (benomyl) [1,2]、不具致畸胎性之甲基多保淨 (thiophanate-methyl) [2] 及具生殖毒性之多氯聯苯族系之 Aroclor-1254 為正對照測試藥劑 [10,11,17], 期建立生體外致生殖毒性快速測試方法及生體外受精率測試技術。

## 材料與方法

### 材料

**供試藥劑** 免賴得 (benomyl) 95% 原體與甲基多保淨 (thiophanate-methyl) 95% 原體, 由本國農藥公司提供。Aroclor-1254 (Sigma<sup>®</sup>, mix of isomers)。

**溶劑** 二甲亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 99.5%, Merck Co.), 酒精 (99.5%), 均購自臺灣默克公司。

**供試動物** ICR 小鼠, 購自行政院國科會實驗動物繁殖及研究中心之三週齡雌、雄小鼠 (雌, 10 ± 1 g; 雄, 12 ± 2 g) 於本系 SPF 動物房飼養至 7 週齡 (雌, 33 ± 3 g; 雄, 37 ± 4 g), 飼料為粒狀 (Purina Laboratory Chow<sup>®</sup>, No.5001, U.S.A.), 飼料與飲水採任飼。

**培養基** 收集卵子用 M16 (8) (Sigma<sup>®</sup>) 培養基, 而採集精子及體外受精則以 Whittingham's medium (8) (Sigma<sup>®</sup>), M16 medium 與 Whittingham's medium 使用前分別添加 4 與 30 mg/mL 之胎牛血清 (USB<sup>®</sup>)。

**動物房環境** 溫度為 22 ± 2°C, 相對溼度為 40-60%, 12 小時光照/黑暗週期。

**劑量** 三藥劑濃度之配製均稱取 100 mg 粉末溶於 1 mL 之酒精或二甲亞砜溶劑中, 以此為最高濃度

再以十倍間距稀釋, 得到濃度分別 100、10、1 及 0.1 mg/mL, 由於處理時之體積均為 1 μL。

免賴得與甲基多保淨均以二甲亞砜為賦形劑, 而 Aroclor-1254 則以酒精為溶劑, 由預備試驗結果得知為不影響體外受精率, 本試驗三種藥劑各濃度處理及賦形劑對照組均以 1 μL 進行。

**小鼠超量排卵** 雌小鼠腹腔 (IP) 注射 10 IU 之孕馬血清素 (pregnant mare's serum; PMS, 日本三共公司), 間隔 48 小時後再給予 10 IU 之人類絨毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG, 中國化學製藥公司, 台灣)。

**體外受精率之評估** 生體外受精後 20-24 小時開始評估體外受精率 (*in vitro* fertilization, IVF), 而 IVF 評估前先製作細胞核活體染色的 Stock solution (2 mg/10mL BMOC), 其成份為 H33258 (Sigma<sup>®</sup>)。染核染劑 (0.1 mL) 加到每一個培養皿中, 評估 IVF, 最終染劑濃度為 20 mg/mL。觀察精子及卵子則使用位相差倒立顯微鏡 (Diaphot inverted microscope, Leica<sup>®</sup>, DM IRB)。

### 方法

**超量排卵及生體外受精試驗** 超量排卵方法及體外受精步驟詳如前人報告所述 [10,11]; 於雌小鼠腹腔注射 10 IU 之孕馬血清素後, 間隔 48 小時, 再注射 10 IU 之人類絨毛膜促性腺激素。雌小鼠經 hCG 注射後 12-15 小時, 同時犧牲雄鼠, 並取下副睪尾部 (cauda epididymides) 置於含 1.0 mL Whittingham's 培養基之培養皿中, 然後用 25-G 針頭刺副睪尾, 以釋放出精液, 上層覆蓋礦物油再置於二氧化碳培養箱 (37°C) 培養 1.5 小時, 經 30 分鐘開始評估其活力, 超過 60% 者, 供生體外受精用。精液收集後 45 分鐘, 犧牲 5-7 隻超排卵處理之雌小鼠, 收集卵子於輸卵管壺腹處用鑷子擠壓出卵坳細胞 (cummulus cell mass), 逢機將此卵坳細胞置於培養皿中, 每個培養皿中之卵子數從 15 至 30 個不等。直接加 100 μL 精子懸浮液 (約 200-300 萬個精子) 至每個處理之培養皿, 再將所有培養皿放置培養箱 24 小時。

## 試驗評估項目

**藥劑對生體外受精 (in vitro fertilization, IVF) 之影響** 卵坵細胞用 1 mL M16 培養基收集，首先在 M16 培養基中洗濯一次後轉到對照組或處理組培養皿中 (1 cumulus cell mass/dish)，卵子數從 15-30 不等。精子以 Whittingham's medium 自成熟雄鼠副睪收集後，再於 1 mL Whittingham's medium (無化學藥劑處理) 行獲能作用 (capacitation)，100  $\mu$ L 精子懸浮液直接加入每一個培養皿，全部培養皿置培養箱中 20-24 小時。檢視其受精率，受精定義為以螢光顯微鏡觀察若含有 2 個極體 (polar bodies) 或一個細胞有 2 個原核 (pronuclei) 或 2-細胞胚形成者，表示卵子已完成受精，反之則否。

**卵子暴露藥劑後對 IVF 之影響** 卵坵細胞以 1 mL M16 培養基收集，洗濯一次，然後轉置到對照組或含各種不同供試藥劑濃度之處理組培養液，再將培養皿置於培養箱中 6 小時。在卵坵細胞收集後 4.5 小時，自成熟小鼠副睪取副睪尾部精子，以 Whittingham's medium 收集，並於培養箱中培養 1.5 小時，卵子收集後 6 小時，卵子再於 1 mL M16 培養基中洗濯 3 次，然後再轉置於 1 mL Whittingham 培養基，100  $\mu$ L 精子懸浮液直接加入每一培養皿，然後培養皿置於培養箱中 20-24 小時。

**培養於藥劑中之精子對 IVF 之影響** 自成熟小鼠副睪尾收集精子，置於含不同藥劑濃度之 1 mL Whittingham's medium 中。再將培養皿放置培養箱中 1.5 小時。大約精子收集後 45 分鐘，卵坵細胞同時收集完成，並於 M16 培養基中洗濯一次，再轉置到含 1 mL M16 培養基 (不含測試藥劑) 之培養皿。精子培養後大約 1.5 小時，對照組或處理組之 100  $\mu$ L 精子懸浮液加入含卵坵細胞之對應組中，所有培養皿放入培養箱中 20-24 小時。

**藥劑對精子活動力之影響** 副睪精子自成熟小鼠 (每組 6 隻) 取出置於 1 mL 含 0.1、1、10 或 100  $\mu$ g/mL 藥劑之 Whittingham 培養基中，所有培養皿放入培養箱中。精子收集後之 2、8、10 小時分別評估精子活力，評估方法為 20  $\mu$ L 精子懸浮液置

於預熱 37°C 之載玻片上，蓋上蓋玻片，於位相差光學顯微鏡 (200 $\times$ ) 觀察精子活力，以百分率來記錄其活動力。

**藥劑對胚發育之影響** 以 hCG 注射後之雌鼠即與雄鼠併籠，翌日檢查雌小鼠陰道墜栓，hCG 注射後 18-20 小時收集原核胚 (pronuclear preembryos, PNE)。PNE 自雌鼠輸卵管於含 M16 培養基之培養皿中以鑷子撕開釋出，洗濯一次，然後轉置至另一培養皿中。培養 24 小時後，大部份 PNE 將發育成兩細胞期胚，將其分離並轉置 (15-20 胚/培養皿) 至 1 mL M16 培養基或含各種不同供試藥劑濃度之 1 mL M16 培養基中。培養皿放置於培養箱中。然後利用倒立顯微鏡於 48 和 96 小時觀察胚發育情形，至於評估之標準，第 48 小時時胚應為四細胞或八、十六細胞期胚或桑椹胚 (morular)；96 小時為具有明顯之內細胞塊 (inner cell mass) 及清晰之囊胚腔 (blastocoel space) 之囊胚或囊胚孵化，未達預期階段胚視為遲滯 (atretic or arrested)。

**統計分析** 每次生體外受精試驗每一藥劑為 5-7 隻雌鼠，每個試驗重覆 3-5 次，每一濃度與對照組均為 2 重覆，並求其平均值。IVF 試驗數據 (平均卵子受精百分率) 和胚發育均以變方分析 (analysis of variance) 檢定，對照組與處理組間之其他各項差異用卡方分佈 (Chi-square,  $\chi^2$ ) 檢驗。

## 結 果

**藥劑對生體外受精率及後續胚發育之影響** 如 Table 1 所示，精子和卵子同時經標準濃度之藥劑處理 24 小時後，甲基多保淨和免賴得二藥劑僅在最高濃度顯著影響 ( $P < 0.05$ )。對 Aroclor-1254 而言，除 0.1  $\mu$ g/mL 組外，生體外受精率均顯著下降 ( $P < 0.05$ )。Table 1 為胚發育成二細胞期之體外受精率，但為觀察藥劑對胚在二細胞期後之發育影響，記錄精子與卵子在藥劑處理 24 小時後，將胚置於不含藥劑處理之培養基，於體外受精後 96 小時檢視胚發育，結果如 Table 4 顯示，甲基多保淨、免賴得與 Aroclor-1254 各劑量均與對照組呈顯著 ( $P < 0.05$ ) 差異。

**Table 1.** Percentage of *in vitro* fertilization incubated with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 24 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	148/165 (90) <sup>1</sup>		
0.1	15/19 (79)	18/18 (100)	8/8 (100)
1	25/27 (93)	15/15 (100)	6/9 (67)*
10	9/9 (100)	13/17 (76)	5/8 (63)*
100	13/23 (57)*	7/31 (23)*	10/22 (45)*

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

<sup>1</sup> Percentage of ova fertilization (%) = fertilized ova/total ova

**Table 2.** Percentage of *in vitro* fertilization of preincubated oocytes with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 6 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	36/40 (90) <sup>2</sup>		
EtOH	38/40 (95)		
DMSO	20/20 (100)		
0.1	27/30 (90)	44/46 (96)	61/64 (95)
1	37/40 (93)	48/52 (92)	57/67 (85)
10	47/57 (82)	42/71 (59)*	14/50 (28)*
100	51/64 (80)	22/61 (36)*	22/86 (26)*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Values are shown as fertilized ova/total ova (percentage).

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

**Table 3.** Percentage of *in vitro* fertilization of preincubated epididymal spermatozoa with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 1.5 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	148/165 (90) <sup>2</sup>		
EtOH	28/31 (90)		
DMSO	34/28 (89)		
0.1	31/40 (78)	34/40 (85)	24/30 (80)
1	21/23 (91)	50/65 (77)	56/59 (95)
10	39/46 (85)	63/74 (85)	51/63 (81)
100	75/84 (89)	31/76 (41)*	38/54 (70)*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Values are shown as fertilized ova/total ova (percentage).

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

**Table 4.** Percentage of embryo development *in vitro* after 96<sup>2</sup> hours incubation with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 24 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	105/165 (64) <sup>1</sup>		
0.1	5/19 (26)*	3/18 (17)*	2/8 (25)*
1	4/27 (15)*	1/15 (7)*	1/9 (11)*
10	1/9 (11)*	0/17 (0)*	0/8 (0)*
100	0/23 (0)*	0/31 (0)*	0/22 (0)*

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

<sup>1</sup> Percentage of ova fertilization (%) = fertilized ova/total ova.

<sup>2</sup> Embryo stage on morular or expanded blastocysts at 96 hours.

**Table 5.** Percentage of embryo development *in vitro* after 96<sup>3</sup> hours preincubated oocytes with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 6 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	148/165 (90) <sup>2</sup>		
EtOH	28/40 (70)		
DMSO	13/20 (65)		
0.1	21/30 (70)	15/46 (33)*	24/64 (38)*
1	27/40 (68)	7/52 (13)*	14/67 (21)*
10	23/57 (40)*	5/71 (7)*	5/50 (10)*
100	18/64 (28)*	0/61 (0)*	1/86 (1)*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Values are shown as fertilized ova/ total ova (percentage).

<sup>3</sup> Embryo stage on morular or expanded blastocysts at 96 hours.

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

#### 卵子暴露藥劑後對 IVF 及後續胚發育之影響

卵子經標準濃度之藥劑處理 6 小時後，甲基多保淨處理組與對照組之體外受精率無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，而免賴得與 Aroclor-1254 組則在中、高濃度顯著 ( $P < 0.05$ ) 降低體外受精率 (Table 2)。為觀察藥劑對胚在二細胞期後之發育影響，精子與卵子在體外受精 24 小時後，將胚置於不含藥劑處理之培養基，於體外受精後 96 小時檢視胚發育，結果如 Table 5 顯示，除甲基多保淨在濃度 0.1 與 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下之胚發育與對照組無明顯差異 ( $P > 0.05$ ) 外，其餘 10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  兩濃度及免賴得與 Aroclor-1254 各濃度均與對照組顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

#### 精子暴露藥劑後對 IVF 及後續胚發育之影響

精子先經標準濃度之藥劑處理 1.5 小時後，甲基多保淨與對照組之體外受精率無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；免賴得與 Aroclor-1254 二藥劑均在最高濃度時顯著 ( $P < 0.05$ ) 降低體外受精率 (Table 3)。為觀察藥劑對胚在二細胞期後之發育影響，精子與卵子在體外受精 24 小時後，將胚置於不含藥劑處理之培養基，於體外受精後 96 小時檢視胚發育，結果如 Table 6 顯示，除甲基多保淨在濃度 0.1 與 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下之胚發育與對照組無明顯差異 ( $P > 0.05$ ) 外，其餘 10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  兩濃度及免賴得與 Aroclor-1254 各濃度均與對照組顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

**Table 6.** Percentage of embryo development *in vitro* after 96<sup>3</sup> hours preincubated epididymal spermatozoa with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 for 1.5 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl	benomyl	Aroclor-1254
Control	28/42 (67) <sup>2</sup>		
EtOH	22/31 (71)		
DMSO	25/38 (66)		
0.1	29/40 (73)	19/40 (48)*	14/30 (47)*
1	15/23 (65)	17/65 (26)*	14/59 (24)*
10	22/46 (48)*	10/74 (14)*	10/63 (16)*
100	29/84 (35)*	0/76 (0)*	2/54 (4)*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Values are shown as fertilized ova/ total ova (percentage).

<sup>3</sup> Embryo stage on morular or expanded blastocysts at 96 hours.

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

**Table 7.** Effects of epididymal spermatozoa motility incubated with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 after 2, 8 and 10 hours in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl			benomyl			Aroclor-1254		
	2 hr	8 hr	10 hr	2 hr	8 hr	10 hr	2 hr	8 hr	10 hr
Control	92 <sup>2</sup>	68	35						
EtOH	90	71	28						
DMSO	91	73	30						
0.1	90	74	15*	64*	58	21*	85	55	20*
1	85	51*	10*	67*	12*	19*	71*	36*	19*
10	77*	38*	11*	64*	10*	18*	64*	21*	14*
100	66*	0*	3*	70*	2*	0*	62*	8*	6*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Motility (%): one hundred spermatozoa were counted.

\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.

**藥劑對精子活動力之影響** 精子經三種藥劑以標準濃度分別處理 2、8 及 10 小時後，精子活力多隨濃度及時間之增加而顯著 ( $P < 0.05$ ) 降低，在三藥劑各濃度處理 2 小時後之精子活力均可維持在 60%，但在處理時間達 8 及 10 小時後，精子活性隨三藥劑濃度之增加而急劇下降 (Table 7)。

**藥劑對胚發育之影響** PNE 在 M16 培養基中培養 24 小時，達兩細胞階段胚再經三種藥劑標準濃度處理 48 及 96 小時，期間培養基均不予更新，三

藥劑不論在 48 或 96 小時均隨濃度之增加而顯著影響胚發育 ( $P < 0.05$ )；處理達 48 小時後，除 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度外，其餘濃度影響多不明顯；但處理 96 小時後，三藥劑則僅在 0.1 及 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下不受影響。三藥劑處理對小鼠胚發育之影響均有劑量-反應關係 (Table 8)。

正常胚發育為自受精後發育成對稱二細胞期胚，再發育成對稱四細胞期胚、對稱八細胞期胚、對稱十六細胞期胚、三十二細胞期胚或桑椹胚 (Fig. 1A 單粗箭頭)、囊胚 (Fig. 1A 雙粗箭頭)

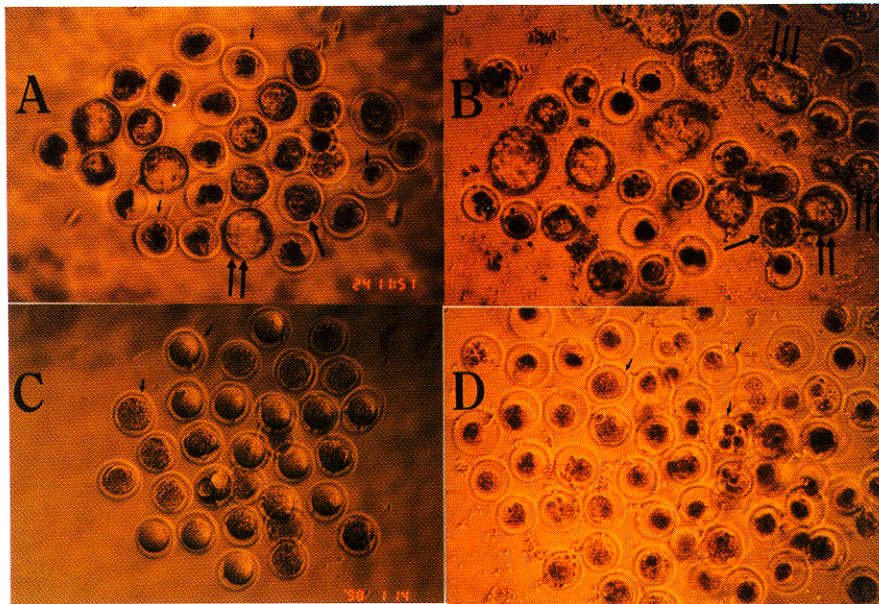
**Table 8.** Effects of two-cell embryos development incubated with thiophanate-methyl, benomyl or Aroclor-1254 after 48 and 96 hours on *in vitro* fertilization in mice.

Concentrate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>1</sup>	thiophanate-methyl		benomyl		Aroclor-1254	
	48 hr	96 hr	48 hr	96 hr	48 hr	96 hr
Control	11/14 (79) <sup>2</sup>	9/14 (64)				
EtOH	16/16 (100)	11/16 (69)				
DMSO	15/15 (100)	9/15 (60)				
0.1	30/32 (94)	21/32 (66)	19/20 (95)	11/20 (55)	5/7 (71)	5/7 (71)
1	13/13 (100)	8/13 (61)	20/23 (87)	12/23 (52)	8/10 (80)	1/10 (10)*
10	6/13 (46)*	0/13 (0)*	16/16 (100)	0/16 (0)*	6/9 (67)	0/9 (0)*
100	0/10 (0)*	0/10 (0)*	0/24 (0)*	0/24 (0)*	8/24 (33)*	0/24 (0)*

<sup>1</sup> EtOH: 1  $\mu\text{L}$  ethanol as a vehicle control; DMSO: 1  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide as a vehicle control.

<sup>2</sup> Values are shown as development embryo/total embryos (percentage); 48 hr: embryo stage on 4-cells or greater at 48 hr; 96 hr: embryo stage on morular or expanded blastocysts at 96 hr.

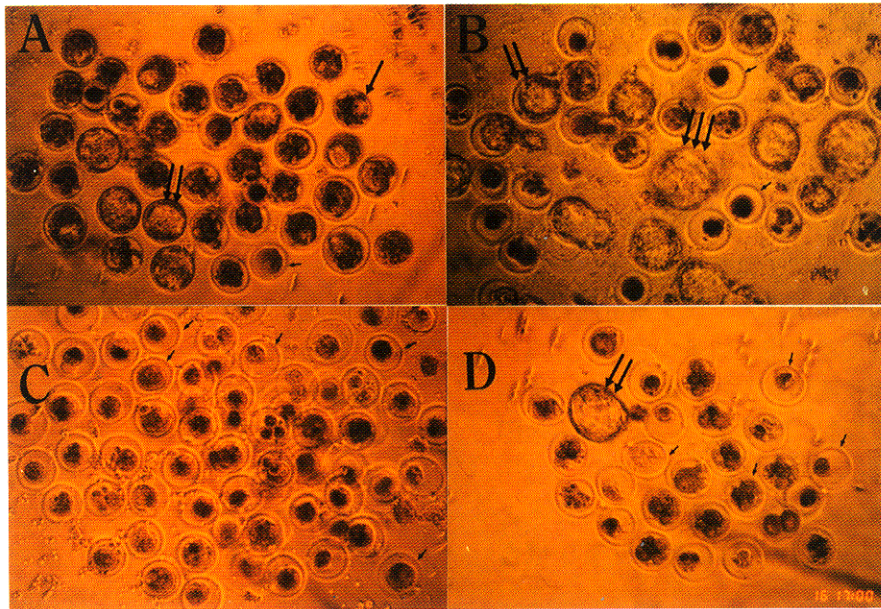
\*  $P < 0.05$ , treatment group is significantly different from control.



**Fig. 1** Most of the embryos are normal compacted morulae (single broad arrow), blastocyst (double broad arrow), and expanded blastocyst (triple broad arrow) but there are still a few dead embryos (narrow arrow) in the control group (A) and thiophanate-methyl-treated groups (B) at 72 hr. Most of the embryos are unfertilized (narrow arrow) at 24 hr (C) and dying (narrow arrow) at 72 hr (D) in the benomyl-treated groups.

及孵化囊胚 (Fig. 1B 三粗箭頭) 等程序, 其中對稱乃意指其中之胚葉細胞呈對稱性, 即使有缺一胚葉細胞在正常情形下也只是過渡時期, 在正常下仍會發育成對稱之各細胞期胚。此外, 正常胚之胚葉細胞為緻密性 (compacted) 而非分散性者, 且各胚葉細胞及透明帶形態均為有規則之圓形。三藥劑

對胚發育形態之作用隨濃度之高低而有不同, 一般而言, 低濃度造成之毒性可能為二細胞期胚之胚葉細胞分散或不對稱, 而中、高濃度則造成胚死亡 (Fig. 1ABCD 單細箭頭)、退化、萎縮 (Fig. 1ABCD 單細箭頭)、細胞溶解分散、碎裂、分裂細胞不規則、破洞及透明帶 (zonae pellucidae) 空洞



**Fig. 2** Most of the embryos are normal compacted morulae (single broad arrow), blastocyst (double broad arrow), and expanded blastocyst (triple broad arrow) but there are still a few dead embryos (narrow arrow) in the control group (A) at 96 hr and in thiophanate-methyl-treated groups (B) at 96 hr. All of the embryos are dead (narrow arrow) at 96 hr (C) in the benomyl-treated groups and in Aroclor-1254 except one blastocyst (double broad arrow) at 96 hr (D).

化等, Fig. 1A 為對照組在體外受精後 72 小時胚發育, 除少數胚發育停滯或死亡外大多可發育至桑椹胚或囊胚; B 為僅卵子先行以甲基多保淨 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 6 小時之體外受精後 72 小時, 除少數胚發育停滯或死亡外大多可發育至桑椹胚或囊胚甚至孵化囊胚; C 為僅卵子先行以免賴得 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 6 小時之體外受精後 24 小時, 可見幾乎無一受精之卵子; D 同為僅卵子先行以免賴得 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 6 小時之體外受精後 72 小時, 所有卵子逐漸退化或萎縮至死亡。Fig. 2A 為對照組在體外受精後 96 小時胚發育, 除極少數胚發育停滯或死亡外大多可發育至桑椹胚或囊胚; B 為僅精子先行以甲基多保淨 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 1.5 小時之體外受精後 96 小時, 除少數胚發育停滯或死亡外大多可發育至桑椹胚或囊胚甚至孵化囊胚; C 為僅精子先行以免賴得 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 1.5 小時之體外受精後 96 小時, 所有卵子逐漸退化或萎縮至死亡; D 為僅精子先行以 Aroclor-1254 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 1.5 小時之體外受精後 96 小時, 絕大多數胚停滯逐漸或萎縮至死亡, 其中尚有一個發育至囊胚。

綜合上述結果顯示, 甲基多保淨、免賴得及

Aroclor-1254 等三藥劑對體外受精均具毒性。其影響程度以免賴得與 Aroclor-1254 大於甲基多保淨。

## 討 論

目前試驗結果顯示, 陽性對照組 Aroclor-1254 對小鼠生體外受精具顯著影響, 以 Aroclor-1254 同時處理精子與卵子時, 體外受精率隨濃度增加而下降。卵子處理時間之選定主要考慮卵子在深夜 12 點左右排卵, 大約在翌日中午 12 點之前完成受精作用, 因此取其中間平均值 6 小時為卵子處理時間; 至於精子之處理時間選定, 由於本實驗評估項中包括藥劑對精子處理 2、8 及 10 小時等不同時間對精子活力之影響, 發現 2 小時內之藥劑處理仍可達 60% 以上, 另外因需考慮操作卵子收集所需時間, 而前人均以 1.5 小時之藥劑處理為基準 [10,11]。

本試驗中, 卵子先行處理 6 小時後之體外受精率則在免賴得與陽性對照 Aroclor-1254 於中、高濃度 (10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 時具顯著影響, 在精子先行處理 1.5 小時之體外受精率在高濃度 (100  $\mu\text{g}/$

mL) 下影響始達顯著, 此一結果前人報導相似 [10,11]。Aroclor-1254 對卵子之作用較精子大, 但由於精子曝露 1.5 小時而卵子 6 小時之生體外受精率比較, 兩者之曝露時間不同, 因此實無法比較。Table 4 中顯示精子曝露 2、8 及 10 小時後之活力中, 在 8 小時之精子活力已下降, 究因 Aroclor-1254 對卵子與精子之影響, 何者較大尚無法判斷。在生體外受精中精子與卵子同時置於培養液中, 由於卵子面積較精子為大, 故藥劑可能對卵子在受精過程中影響受精作用較精子為大。但此為表面推測, 真正原因及藥劑對卵子與精子之作用機制為何? 有待進一步探討。唯推測可能有相關生理因素參雜其中, 如精子與卵子之黏著性、精子獲能作用後對卵子之穿透性、細胞週期或胚細胞分裂上之混亂及染色體和/或基因損傷導致胚無法著床或自發性流產 [10,11]。

從 Table 1 至 Table 5 試驗結果可知, 免賴得對小鼠生體外受精率及且胚發育之影響與 Aroclor-1254 相似, 而甲基多保淨之作用似較小, 此與其在生體內之致畸胎及生殖毒性試驗結果相吻合 [1,2]。甲基多保淨與免賴得藥劑則於最高濃度 100 mg/mL 時始顯著降低體外受精率, 由於濃度選擇以十倍差距為準, 故無法在本試驗中得知介於 10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  間之濃度對體外受精率影響, 若就先前進行生體內之致畸胎性 [1,2] 與後代生殖毒性試驗 (未發表資料) 推論, 免賴得在濃度 10 至 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  中間對小鼠體外受精率具負面作用應遠較甲基多保淨強, 且在本試驗中免賴得與甲基多保淨在最高濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之小鼠體外受精率分別為 23 與 57%, 可知免賴得之作用遠大於甲基多保淨。根據本實驗室結果推測, 免賴得與甲基多保淨之結構相似且均可代謝產生具致畸胎性之貝芬替 (carbendazim) [5]。在生體內致畸胎性試驗中, 免賴得之致畸胎性極為明顯, 而甲基多保淨則不明顯 [1,2], 其原因可能為免賴得在弱酸至強鹼環境中均可代謝產生貝芬替, 而甲基多保淨僅在近 pH 9.1 之強鹼環境下代謝始可產生貝芬替, 而本實驗培養液中為微鹼性, 大約 pH 7.46, 不利於甲基多保淨代謝產生貝芬替。另外, 免賴得在大鼠胃腸道中大約 pH 2.5 之強酸環境下, 其所能代謝產生貝芬替之產量與機率較大 [9]。因此本試驗生體外試驗中甲基多保淨在高濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下之生體外受精率仍可達 57%, 遠高於免賴得之生體外

受精率, 但與對照組相較仍可達顯著降低現象 (Table 1)。此乃推測而已, 至於真正原因則有待進一步探討。

精子在三種藥劑中暴露 1.5 小時內, 除免賴得與 Aroclor-1254 在高濃度下顯著影響外, 均與對照組無顯著差異, 但在藥劑處理後 2 小時精子活動力已開始受影響, 三藥劑各濃度處理後之精子活動力大多較對照組或賦形劑對照組顯著降低, 而三藥劑與各濃度間對精子活動力影響彼此差異不大, 但在藥劑處理 8 及 10 小時後, 三藥劑處理下之精子活力均隨濃度增加而下降。根據本試驗對照組或賦形劑對照組下之精子活力資料顯示, 8 小時內之精子其活力已無法作為受精用, 尤其在免賴得與 Aroclor-1254 各濃度及甲基多保淨之中、高濃度更是如此。而在生體內之生殖毒性試驗結果, 雖然此種試驗基本條件似與本試驗不盡相同, 但基於均有探討藥劑對精子活力之影響, 將其作為討論與比較生體內與生體外之結果, 本實驗室曾以甲基多保淨及免賴得分別混拌於飼料中餵予大鼠, 探討其生殖毒性, 在高濃度 3000 ppm 時之甲基多保淨及免賴得對大鼠精子活動力及外觀形態均與對照組差異不顯著 (未發表資料), 但免賴得可藉著抑制睪丸細精管分化以致精細胞腐爛 (sloughing) 及生精小管閉合 [7,14]。至於造成本實驗室與上述二位作者在免賴得之差異之可能原因, 可能為本實驗室試驗乃經由餵飼方式給予, 與前述二位之胃管經口投予不同所致, 而甲基多保淨對精子之作用不論在生體外或生體內較不明顯。至於 PCBs 雖然大多數報告主在探討其對受胎率或受精率之影響, 但也有報告指出其傷害標的為睪丸及精子結構並降低精子數 [12], 此與本試驗結果相似。

若仔細比較 Table 1、2、3 及 4 之結果, 似發現在 Table 1 中藥劑處理長達 24 小時之體外受精率在最高濃度下尚有 23、45 及 57% 之受精率, 但在 Table 2 中卵子經藥劑處理 6 小時後之體外受精率已大幅下降, 且在 Table 4 中精子在藥劑處理 10 小時後之精子也已接近無活力狀態, 由此觀之似不合常理, 由於本試驗旨在探討藥劑對與受精率有關之各階段所受之影響, 探討重點在於點狀而非一系列者, 此為本試驗之缺點, 其實在 Table 1 中所示為精卵同時處理 24 小時之體外受精率, 由於在處理之前大約 4 小時卵子多已受精且發育成二細胞期胚, 因此雖然全程為精卵同時處理 24 小時, 事實

上發育成二細胞期胚的時間只在前大約 4 小時即已完成，因此雖然藥劑處理時間為 24 小時，但在前 4 小時之影響較小，由此與後面之藥劑對處理 2、8、10 小時之精子活力結果符合。因此在 Table 1、2 及 3 中之體外受精率均含 2 個極體或一細胞有 2 原核或 2-細胞胚形成者並不包括二細胞期胚之後繼發育情形。結果顯示有些藥劑濃度在 Table 1、2 及 Table 3 中以精子與卵子同時處理 (Table 1) 之體外受精率較單獨處理卵子 (Table 2) 或精子 (Table 3) 者低，但若繼續觀察至發育成桑椹胚或囊胚之結果，即可發現精卵同時處理者在觀察其發育成桑椹胚或囊胚數比單獨處理精子或卵子者少 (Table 4 至 Table 6)。表一中精卵同時處理雖然能發育成二細胞期胚，可隨藥劑之毒性及濃度之高低而受影響，因此發現雖受精成功而發育成二細胞期胚，但能繼續發育成四細胞、八細胞、十六細胞、桑椹胚 (morular)、囊胚 (blastocyst)、甚至孵化囊胚 (expanded blastocyst) 者，隨藥劑之毒性及濃度之高低，而逐漸減少。

由 Table 4、5 及 Table 6 中可知在精卵體外受精後 96 小時之胚發育結果與 Table 1、2 及 Table 3 差異頗大，儘管在初期體外受精過程中可完成受精作用，形成二細胞期胚 (Table 1、2 及 Table 3)，但此些二細胞期胚部份分裂細胞或胚葉細胞 (blastomere) 分散或不對稱，因此在後續發育即出現分裂異常或停滯，或雖然具有對稱之二細胞期胚，但在其後發育中部份出現停滯或發育至四細胞期即停滯，因此受精卵在發育成二細胞期胚過程中，二細胞期胚是否受藥劑之作用很難於一般顯微鏡上從外觀看出。其作用機制有待進一步探討，推測可能藥劑作用在受精過程中負責胚後續發育之生長因子，可能標的器官在精子或卵子或兩者均有。此外，在 Table 1、2 中可知精卵同時處理供試藥劑 24 小時後之體外受精率，免賴得與 Aroclor-1254 (Table 1) 部份濃度似較僅卵子先行藥劑處理 6 小時 (Table 2) 之受精率高，但在胚後續發育中 (Table 4 至 Table 5) 可知，免賴得與 Aroclor-1254 各濃度均顯著逐漸降低胚發育成桑椹胚或囊胚且與僅卵子先行處理 6 小時 (Table 1) 或僅精子先行處理 1.5 小時 (Table 2) 相對應各供試濃度之胚發育值均較低，因此藥劑對胚發育之影響必須長期評估，而非只觀察初期即加以判斷。

Table 8 為藥劑對取自小鼠輸卵管之二細胞期

胚發育，於藥劑處理達 48 與 96 小時對胚發育之影響，將之與 Table 4、5 及 Table 6 各藥劑在 96 小時之胚發育作比較，發現供試藥劑在 0.1 與 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等較低濃度下取自輸卵管二細胞期胚在 96 小時藥劑處理下對胚發育較以精卵同時處理 24 小時或僅卵子先行處理 6 小時或僅精子先行處理 1.5 小時之體外受精影響小，但在 10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等較高濃度下，除精卵同時處理 24 小時者與取自輸卵管二細胞期胚之胚發育相似外，僅卵子先行處理 6 小時或僅精子先行處理 1.5 小時之胚發育影響均較取自輸卵管二細胞期胚者小，其原因可能為取自輸卵管二細胞期胚在處理 96 小時期間對藥劑之敏感度不如精子與卵子於受精過程中者，加以二細胞期胚對低濃度之藥劑可能比受精過程中之細胞具有較強之耐受力，因此在 0.1 與 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等較低濃度下對取自輸卵管二細胞期胚在 96 小時藥劑處理之胚發育較以精卵同時處理 24 小時或僅卵子先行處理 6 小時或僅精子先行處理 1.5 小時者均佳，但在高濃度 10 與 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下，加以 96 小時長時間暴露對取自輸卵管二細胞期胚之胚發育較以精卵同時處理 24 小時或僅卵子先行處理 6 小時或僅精子先行處理 1.5 小時者差。

藥劑對二細胞期胚之發育結果之判斷標準，乃以其在 48 與 96 小時分別發育至大於等於四細胞期與桑椹胚、囊胚或孵化囊胚為基準 (Table 7)。在藥劑處理後 48 小時三藥劑除甲基多保淨在中濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亦達顯著影響胚發育外，均在最高濃度嚴重影響胚胎發育，而在藥劑處理後 96 小時，除陽性對照藥劑 Aroclor-1254 在低濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時即開始產生嚴重胚胎死亡外，免賴得與甲基多保淨在中、高濃度造成胚死亡、退化、碎裂、分裂細胞不規則、破洞及透明區空洞化等 [6]。可見三藥劑在中、高濃度對胚發育影響顯著，至於藥劑對胚發育作用機制則有待進一步探討。

Table 8 所列之藥劑對胚發育之影響，在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時陽性對照組 Aroclor-1254 在處理 48 小時時胚發育影響較甲基多保淨及免賴得弱，但此時之胚發育為四細胞期胚，而在 96 小時時因 Aroclor-1254 影響而無法繼續發育成桑椹胚或囊胚，就整體而言，其結果與甲基多保淨或免賴得相似，但在 48 小時時之結果的確較另兩藥劑影響弱，其真正原因有待了解。

本試驗利用小鼠精子與卵子在培養皿中對藥劑

之毒性反應，模擬藥劑在動物生殖道中之毒性作用，目前試驗結果與其在傳統生體內之試驗結果頗為吻合，間接證明藥劑對小鼠生體外之卵子、精子、受精率及胚發育影響試驗之可靠性，雖然此試驗本身具有無法代表溫血動物體內之生理現象，因此無法模擬動物體內各種干擾生殖生理之因子，但或許這可能也是它的優點，因為正因此一模式將各種干擾因素如藥劑在動物體內之吸收、排泄及運輸等去除後，使得試驗單純化，或可深入釐清藥劑對生殖毒性影響因子。因此小鼠體外受精率研究技術可廣泛應用於生殖毒性藥劑之前置試驗模式。

## 誌 謝

本研究承蒙臺灣省政府農林廳經費補助 [87 科技-1.3-糧-26 (6-2-1)]，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) 對大鼠胚胎畸形性之探討。中華民國獸醫學會會誌 20 (4): 348-356, 1995。
2. 呂水淵、王順成。免賴得與甲基多保淨誘發大鼠畸形性在結構相似關係 (structural-activity relationship) 與代謝產物上之應用。台灣畜牧獸醫學會會報 67 (3): 161-172, 1997。
3. Barsotti DA, Marlor RJ, Allen JR. Reproductive dysfunction in rhesus monkeys exposed to low levels of polychlorinated biphenyls (Aroclor-1248). *Food Cosmet Toxicol* 14: 99-103, 1976.
4. Daston GP. The theoretical and empirical case for in vitro developmental toxicity screens, and potential applications. *Teratology* 53: 339-344, 1996.
5. Fuchs A, Van Den Berg GA, Davidse LC. A comparison of benomyl and thiophanates with respect to some chemical and systemic fungitoxic characteristics. *Pestic Biochem Physiol* 2: 191-205, 1972.
6. Hernandez O, Dukelow WR. Aroclor-1254® effects on the in vitro development of 8-cell mouse embryos. *Bull Environ Contam Toxicol*, 60: 773-780, 1998.
7. Hess RA, Moore BJ, Forrer J, Linder RE, Abuel-Atta AA. The fungicide benomyl (methyl 1- (butylcarbomyl) -2-benzimidazolecarbamate) causes testicular dysfunction by inducing the sloughing of germ cells and occlusion of efferent ductules. *Fundam Appl Toxicol* 17: 733-745, 1991.
8. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. Recovery, culture, and transfer of embryos and germ cells. In: *Manipulating the mouse embryo*. 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 128-188, 1994.
9. Kaplan HM, Brewer NR, Blair WH. Physiology. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, ed. *The Mouse in Biomedical Research III*, Academic Press Inc., New York, USA, 257, 1983.
10. Kholkute SD, Rodriguez J, Dukelow WR. Reproductive toxicity of Aroclor-1254: effects on oocyte, spermatozoa, in vitro fertilization, and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol* 8 (6): 487-493, 1994.
11. Kholkute SD, Rodriguez J, Dukelow WR. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on in vitro fertilization in the mouse. *Reprod Toxicol* 8 (1): 69-73, 1994.
12. Kociba RJ, Schwetz BA. Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Drug Metab Rev* 13: 387-406, 1982.
13. Kucera P, Cano E, Honegger P, Schilter B, Zijlstra JA, Schmid B. Validation of whole chick embryo cultures, whole rat embryo cultures and aggregating embryonic brain cell cultures using six pairs of coded compounds. *Toxicol In Vitro* 7 (6): 785-798, 1993.
14. Lim J, Miller MG. The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-induced testicular toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 401-410, 1997.
15. Makita T, Hashimoto Y, Noguchi T. Mutagenic, cytogenetic and teratogenic studies on thiophanate-methyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 24: 206-215, 1973.
16. Mirkes PE. Prospects for the development of validated screening tests that measure developmental toxicity potential: view of one skeptic. *Teratology* 53: 334-338, 1996.
17. Orberg J, Kihlstrom JE. Effects of long-term feeding of polychlorinated biphenyl (PCB, clophen A-60) on the length of oestrous cycle and on the frequency of implanted ova in mice. *Environ Res* 6: 176-179, 1973.
18. Takayama S. Impact of establishment of ICH reproductive toxicity guideline. In: 1<sup>st</sup> international conference of Asian society of toxicology. June 29-July 2, Yokohama, Japan, 103, 1997.

## The Effects of Three Pesticides on Sperm Motility, *in Vitro* Fertilization and Embryo Development in Mice

\* Shui-Yuan LU and Shun-Cheng WANG

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute,  
Wu-Feng, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC

(Received: August 2, 1999. Accepted: January 7, 2000.)

**ABSTRACT** This study on reproductive toxicity was conducted utilizing teratogen, benomyl, nonteratogen, thiophanate-methyl *in vivo* test, and positive reproductive toxicity agent of Aroclor-1254 to investigate end point sperm motility, *in vitro* fertilization after 6-hour ovum-exposure was not influenced, to thiophanate-methyl while that to benomyl and Aroclor-1254 in mid-high doses was reduced ( $P > 0.05$ ). *In vitro* fertilization after 2-hour sperm-exposure to thiophanate-methyl was comparable to that of the control while that to benomyl and Aroclor-1254 in high dose was decreased. Sperm motility showed no dose-response relationship though it was not comparable to that of the control during the 2-hour exposure. Sperm motility during the 8- and 10-hour exposure to the three chemicals were more significantly ( $P < 0.05$ ) decreased than that of the control. Embryo development was influenced by the three chemicals in high doses during the 48-hour exposure while it was significantly ( $P < 0.05$ ) reduced by those in low doses during the 96-hour exposure. To sum up, there were different degrees of influence on sperm motility, *in vitro* fertilization and embryo development. The effect of benomyl and Aroclor-1254 on these parameters were larger than that of thiophanate-methyl. [Lu SY and Wang SC. The effects of three pesticides on sperm motility, *in vitro* fertilization and embryo development in mice. J Chin Soc Vet Sci 26 (1): 24-35, 2000. \* Corresponding author TEL: 04-330 2101 ext. 505, FAX: 04-332 3073, E-mail: lusueyen@tac-tri.gov.tw]

**Keywords :** Mouse, *In vitro* fertilization, Reproductive toxicity