

以 Ames test 及大腸菌 SOS 功能誘導活性 篩選致突變性飼料添加物

林士鈺 李新進 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

以 *Salmonella typhimurium* TA98 測試八種飼料添加物顯示 Carbadox, Olaquinox 及 Furazolidone 具突變性, 而以後者最強。Amprolium 具弱突變性, 而 Nitrovin, Pyrimethamine, Sulfamethazine 及 Nicarbazine 則否。

以大腸菌 SOS 功能誘導活性測試 Carbadox, Nitrovin, Furazolidone 及 Olaquinox 之致突變性, 除後者外, 其餘三者不論是否添加 S-9 mix 均具誘導活性且有 metabolic inactivation 作用。

台灣地處亞熱帶高溫多濕, 又因地窄人稠, 畜牧業一般均採密集飼養, 故病菌繁殖傳播迅速, 對畜牧經營影響頗大, 除改善環境衛生並注射疫苗以增強抵抗力外, 均大量使用動物用藥品, 尤以飼料添加物為最。

這些含藥物飼料添加物之使用, 較具危險性且對公共衛生影響較大者, 莫過於致癌性或致突變性飼料添加物。有些藥物被證實具突變性^(2,3,4,6,7,8), 本報告係以 Ames test 及大腸菌 SOS 功能誘導活性篩選致突變性飼料添加物。

材料與方法

藥物: Carbadox (CBX) (台灣輝瑞公司)、Olaquinox (OLQ) (科威化成公司)、Furazolidone (FZ)、Pyrimethamine (PY)、Sulfamethazine (SMT) (U.S.P.C. INC)、Nitrovin (NTV) (台灣氰胺公司)、Amprolium (APL) 及 Nicarbazine (NCZ) (裕成企業公司) 等均溶於 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (1000 µg/ml), 以

10% DMSO 稀釋後當日使用。

化學物: L-histidine-biotin 為 Sigma 產品。S-9 Fraction: Organon Teknika Corporation 產品。

Ames test 用菌株 *Salmonella typhimurium* TA98 由藥物食品檢驗局分讓, SOS Chromotest kit 購自 Organics 公司 (以色列)。

Ames test⁽¹⁾:

2ml 上層寒天 (含 10% 之 5 mM histidine-biotin) 內加入 0.1ml 檢體溶液及 0.1 ml 菌液, 混合後倒入已凝固之 25~30 ml 底層寒天, 37°C 培養 2 天, 計算菌落數。

最低抑菌濃度:

2 ml Nutrient broth 內加入 0.1ml 檢體溶液及 0.1ml 菌液, 混合後 37°C 培養 24 小時。大腸菌 SOS 功能誘導活性測定⁽⁵⁾:

取二倍稀釋之藥物溶液、陽性對照液及空白液 (10% DMSO) 10 µl 入 96 孔塑膠盤, 加入 100 µl 菌液 (*E. coli* PQ 37, OD 600 = 0.05), 37°C 作用 2 小時後加入 100 µl 反應物, 37°C 作用 60 分, 以 405 nm 及 600 nm 判

讀 O. D. 值。

S-9 mix 加入菌液內，以測試代謝活化作用。

S-9 mix 之組成爲 0.1 ml (A) (1.65 M $KCl + 0.4 M MgCl_2$) + 0.05 ml (B) (0.5 M glucose - 6 - phosphate) + 0.1 ml (C) (0.1 M NADP) + 2.5 ml (D) (0.2 M Tris HCl, pH 7.4) + 2.05 ml (E) (DDW) + 0.2 ml (F) (S-9 Fraction)。

不加及加 S-9 mix 之陽性對照物質爲 4 - nitro-quinoline-oxide (4-NQO) 及 2 - aminoanthracene (2-AA)。

$SOSIP = 10 \times (OD_2 - OD_1) / (C_2 - C_1)$

式中 C_1, C_2 以 nmole / 孔計算之。

結 果

(1) Ames test - 由表 1 可知 CBX, OLQ 及 FZ 具突變性, APL 具弱突變性⁽¹⁾, 而 NTV, PY, SMT 及 NCZ 則不具突變性。

由表 2 知 FZ 及 NTV 對 *S. typhimurium* TA 98 之毒性遠較 CBX 及 OLQ 強。

(2) 大腸菌 SOS 功能誘導活性 - 4 NQO 之線性關係良好 ($r=0.968$), 如圖 1 所示, 顯示在不含 S-9 mix 條件下, 以測試套組良好。由表 3 可知, CBX, FZ 及 NTV 在不含 S-9 mix 下可誘導 SOS 功能活性, 但 OLQ 則否。FZ 在 2.5 $\mu g/ml$ 以上時具毒性。

表 1. 飼料添加物對 *S. typhimurium* TA 98 之突變作用

藥 物	每一平板之 revertants 數目									
	1000*	500	200	100	50	20	10	5	2	1
CBX	-	-	24	19	98	-	48	-	-	-
OLQ	-	-	12	76	72	-	22	-	-	-
FZ	-	-	-	-	0	0	1	18	40	19
NTV	-	-	-	-	0	0	0	0	1	7
APL	9	5	-	3	2	-	-	-	-	-
PY	5	2	-	4	2	-	-	-	-	-
SMT	6	2	-	4	4	-	-	-	-	-
NCZ	6	7	-	19	15	-	-	-	-	-

註：50% DMSO 之 revertants 數爲 20。

*：平板內濃度 (ppm)

-：未測定

表 2. 飼料添加物對 *S. typhimurium* TA 98 抑菌作用 *

藥 物	濃 度 (ppm)									
	1000	200	100	50	20	10	5	2	1	
CBX	-	±	+	++	ND	+++	ND	ND	ND	
OLQ	-	+	++	+++	ND	+++	ND	ND	ND	
FZ	ND	ND	ND	-	±	+	++	+++	+++	
NTV	ND	ND	ND	-	+	++	++	+++	+++	

* 依培養液混濁程度判定

ND：未測定

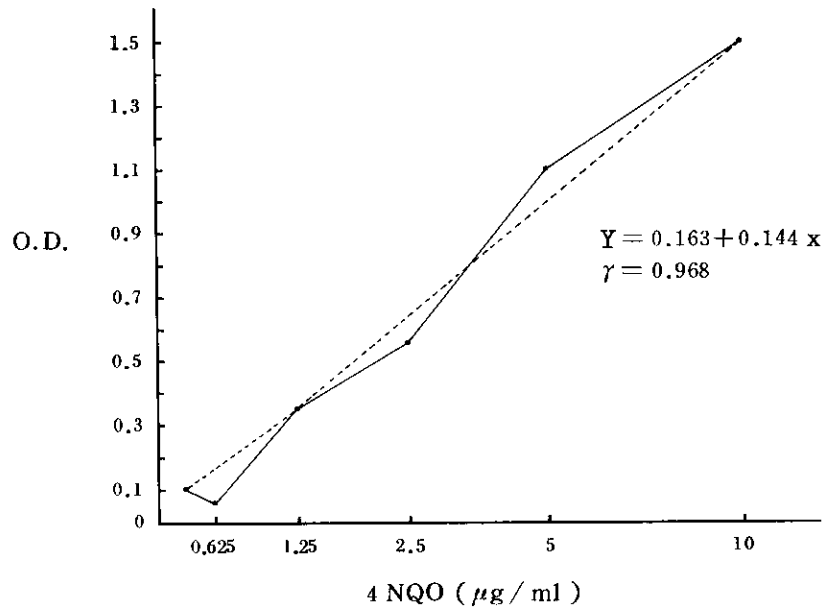


圖 1. 4NQO 之 SOS 功能誘導活性

表 3. 飼料添加物在不加 S-9 mix 下之 SOS 功能誘導活性*

藥 物	濃 度 (µg / ml)									
	0.01	0.02	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
CBX	0	0	0	0	0.022	0.052	0.191	0.497	0.524	0.956
FZ	0	0.023	0.115	0.193	0.459	0.574	1.107	1.472	1.324	1.089
NTV	-**	0.083	0.070	0.154	0.218	0.268	0.455	1.083	1.046	1.507
OLQ	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 以 O.D. 值表示之，OD_{DMSO} = 0.273 - : 未測定

2-AA 之線性關性良好 ($\gamma=0.922$) (圖 1)，顯示在 S-9 mix 存在下，以測試套組良好。由表 4 可知 CBX, FZ 及 NTV 在 S-9

mix 存在下可誘導 SOS 功能活性，但 OLQ 則否。FZ 在 5.0 µg / ml 時具毒性。

表 4. 飼料添加物在 S-9 mix 下之 SOS 功能誘導活性*

藥 物	濃 度 (µg / ml)									
	0.01	1.02	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
CBX	0	0	0	0	0	0.018	0.047	0.218	0.165	0.433
FZ	0	0	0	0.053	0.136	0.308	0.525	0.606	0.873	0.479
NTV	-**	0	0	0	0	0.039	0.010	0.193	0.538	0.819
OLQ	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* -: 同表 3

OD_{DMSO} = 0.391

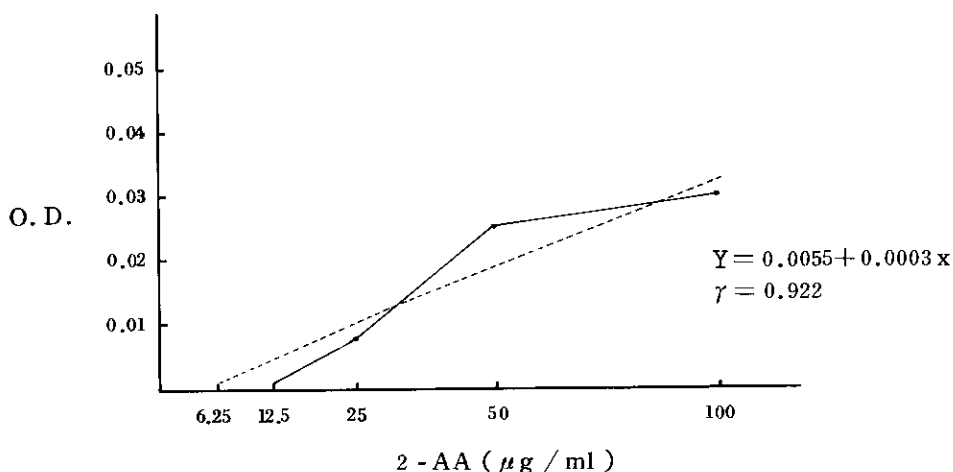


圖 2. 2-AA 之 SOS 功能誘導活性

由表 5 可知不論是否有 S-9 mix, FZ 之誘導活性最強, NTV 次之, CBX 最弱。加入 S-9 mix 會降低此三者之活性, 可見其為 metabolic inactivation, 其中以 FZ 影響最大。

表 5 S-9 mix 對 CBX, FZ 及 NTV 之 SOS 功能誘導活性之影響

藥物	SOSIP		百分比
	未加 S-9 mix	加 S-9 mix	
CBX	48.69	21.32	43.8
FZ	262.84	70.27	26.7
NTV	104.41	65.81	63.0

討 論

S. typhimurium TA 98 用來檢索 frame shift 之突變⁽¹⁾, CBX, FZ 及 OLQ 可引起此種突變, 與他人所作結果相似^(2,3,6,7,8), 但 NTV 則否, 此與 Ohta 等⁽³⁾所作結果不符, 在這些濃度下對細菌之抑制作用不大(表 2), 但為何如此, 原因不明。

APL 在 100,000~300,000 µg/ml 時, 有致突變性⁽³⁾, 顯示其為弱突變劑, 本試驗支持法項結果。

致畸胎性藥物 PY 不會引起突變。誘導性 error-prone SOS 修復在 base-pair 及 frameshift 突變似乎扮演重要的角色⁽⁴⁾, CBX, FZ 及 NTV 可誘導此種活性, 此結果與 Ohta 等⁽⁴⁾所作結果相似。在 S-9 mix 存在下, 三者之誘導活性降低, 可見肝臟抽出物具有解毒作用。

參 考 文 獻

1. 白須泰彦、吐山豐秋。1985。新毒性試驗法—方法と評價—。リアライズ社, 東京。
2. Beutin, L., E. Preller and B. Kowalski. 1981. Mutagenicity of quindoxin, its metabolites, and two substituted quinixaline-dioxides. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 20: 336-343.
3. Ohta, T., M. Moriya, Y. Kaneda, K. Watanabe, T. Miyazawa, F. Sugiyama and Y. Shirasu, 1980. Mutagenicity screening of feed additives in the microbial system. *Mutation Research*. 77: 21-30.
4. Ohta, T., N. Nakamura, M. Moriya

- Y. Shirasu and T. Kada, 1984. The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*, *Mutation Research*.131: 101-109.
5. Organics Ltd. 1990. *Instruct/ sosb ON*. Isreal.
6. Skeggs, H.R., R.M. Berglund. W.J. A. Vander Herwel, H. Mrogik. P.G. Wislocki and F.J. Wolf. 1984. Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitro heterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1,2-diazisoxazole and deactivation of nitrofurans in the Ames test. *Mutation Research*. 136: 1-8.
7. Vooga, C.E., J.J. van der Stel and J.J.J.A.A. Jacobs. 1980. The mutagenic action of quinoxin, carbadox, olaquinox and some other N-oxides on bacteria and yeast. *Mutation Research*. 78:233-242.
8. Yoshimura, H., M. Nakamura and T. Koeda. 1981. Mutagenicity of Carbadox and olaquinox-growth promoter for, pigs. *Mutation Research*. 90: 49-55.

Mutagenicity Screening of Feed Additives by The Ames Test and The SOS Function Induction Activity in Escherichia coli

S.Y. Lin, S.C. Lee and S.Y. Chiu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Eight feed additives were tested for mutagenicity by Salmonella typhimurium TA98. Carbadox, olaquinox and furazolidone were positive and the last was the strongest. Amprolium was weak. but nitrovin, primethamine, sulfamethazine and nicarbazin were negative.

The SOS function induction activity of carbadox, nitrovin, furazolidone and olaquinox were investigated in Escherichia coli. All of them except olaquinox could induce the SOS function whether adding S-9 mix and showed metabolic inactivation