

蛋內接種伏馬鐮孢毒素對鴨胚發育之影響

鄭永祥¹ 張銘煌² 趙智宇³

- 1.國立宜蘭技術學院畜產學系(通訊作者)
- 2.國立嘉義技術學院獸醫學系
- 3.國立宜蘭技術學院畜產學系

摘要

本研究之目的旨在探討，不同濃度伏馬鐮孢毒素(Fumonisin B₁；FB₁)蛋內接種後對鴨胚發育之影響。試驗使用 200 枚萊鴨受精蛋，逢機分配於 5 組，每處理二重複，每重複 10 顆蛋，分別於蛋內接種 0、20、40、80 或 160 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 純化之 FB₁；接種用 FB₁ 分別溶於 160 μl 二次蒸餾水並經過濾滅菌 (稀釋液)，而對照組者僅接種稀釋液。試驗一，蛋於孵化第 1 日接種，試驗期間記錄死亡率及接種後 14 日時之體測性狀。試驗二則在孵化第 14 日接種，記錄死亡率及接種後 7 日時之體測性狀。試驗結果顯示死亡率會隨著時間及劑量增加，試驗一中以 20 μg 、40 μg 、80 μg 或 160 μg FB₁ 接種者，其死亡率分別為 10%、20%、20% 及 100%；而在第 14 日接種者，除 40 及 160 μg FB₁ 有 10% 死亡率，其餘均無死亡。在體測性狀方面，僅試驗一中 20 μg 接種組有顯著較長之頸長。無論是第 1 日或第 14 日 40 μg 以上接種者，鴨胚之肝、腎及心臟均可觀察到組織病理學變化。

關鍵詞:鴨胚、伏馬鐮孢毒素、蛋內接種

Effect of Fumonisin Inoculation on Duck Embryo Development *in ovo*

Yeong-Hsiang Cheng¹ Ming-Haung Chang² Chi-Yu Chao³

1. Department of Animal Science, National I-Lan Institute of Technology (Corresponding Author)

2. Department of Animal Science, National I-Lan Institute of Technology

3. Department of Animal Science, National I-Lan Institute of Technology

Abstract

This study was design to investigate the different concentration of Fumonisin B1 (FB1) on duck embryo development after *in ovo* inoculation. There were 200 fertile eggs of Tsaiya being used, and allotted randomly into five treatment groups as follows 0, 20, 40, 80 or 160 μ g/egg. FB1 was dissolved in 160 μ l of double-distillated water and sterilization by millipore filtration, and control group was inoculated with sterilized water only. In experiment 1, fertile eggs were inoculated at day one, the mortality and the 14th day old body performance were recorded. In experiment 2, eggs were inoculated at 14th day old, and the mortality and the old body performance was recorded at the 7th day after inoculation.

In experiment 1, the results showed that the mortality was increased along with dose and time dependent manner. The rate of mortality were 10%, 30%, 30% and 100% for 20, 40, 80 or 160 μ g/egg, respectively. However, there were 10% mortality for 40 and 160 μ g/egg and the other doses were hatched appearance normally in experiment 2. The histopathology alteration of liver, kidney and heart was observed, after above 40 μ g inoculated, both in experiment 1 and experiment 2.

Key Words: Duck embryo, Fumonisin, *in ovo*

一、緒言

伏馬鐮孢毒素(Fumonisin)為一種常在性存於發黴玉米中之黴菌毒素，1902年，發現飼餵發黴的玉米與馬的一種致命性疾病有關，當時將此疾病稱為"moldy corn poisoning"，病馬因大腦白質的軟化病變，造成臨床上的共濟失調，痙攣致死。學者Butler [1,2]將此病稱為馬腦白質軟化症(equine leukoencephalomalacia, ELEM)。而在1988年，由Marasas所帶領的研究群[(Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis (PROMEC))]由發黴玉米中培養出 *Fumonisin spp.*，並由其中萃取出一種新的黴菌毒素--伏馬鐮孢毒素，並首次分析出伏馬鐮孢毒素的化學結構[3,4]。依其結構式可區分為6種：fumonisin A1(FA1)、A2(FA2)、B1(FB1)、B2(FB2)、B3(FB3)、B4(FB4)，其中以 fumonisin B1 (FB1)為最重要，致害也最大。近十年來有更多的學者投入於伏馬鐮孢毒素的研究，陸續在田間或以動物試驗結果發現，伏馬鐮孢毒素的中毒可致豬的肺水腫[5]、大鼠的肝癌[4,6]，禽類的免疫力傷害[7,8]，並且可能與南非和中國大陸某些地區食道癌高發生率有關[9,10]。以伏馬鐮孢毒素污染的玉米餵飼(10~25ppm FB1)可致白肉雞高死亡症候群(spiking mortality syndrome)，且將FB1接種受精蛋中，其所造成的胚胎死亡率會隨著劑量提高而上升，胚胎早期變化包括有腦水腫、喙變厚和頸部延長等[11]。在生體外(*in vitro*)的條件下，FB1會造成雞隻腹腔巨噬細胞的存活率與其吞噬能力的降低[8]，也會造成火雞淋巴球的細胞增殖反應降低[12]。禽類胚胎曾廣泛被使用於黴菌毒素之生物分析上[13]。此乃因禽類胚胎有幾點特性可供胚胎致突變性及病理性之研究，其具有易操作且胚胎較大可供肉眼觀察，且在較短時間內可取得欲測試物之毒性效果。但在解釋此類試驗時必須注意的是胚胎不能分泌外來物質，因此在孵化期間某一階段其抑制細胞分裂和細胞成長易產生先天性異常。此外，胚胎本身顯少有能力對測試性化合物行代謝或去毒作用[14]亦應加以考量。本試驗之目的即在探討鴨胚經蛋內接種FB1時對其存活率及組織病理學之影響。

二、材料與方法

(一)、FB1之製備

純品之FB1 (Sigma ; F1147)10mg 以無菌水稀釋為1mg/ml之stock solution，再以二次蒸餾水稀釋製備成總體積160 μ l含不同之FB1，其稀釋液並以0.22 μ m之minipore過濾備用。

(二)、蛋內接種

200枚菜鴨(*Anas platyrhynchos var. domestica*)受精蛋購自商業種鴨場，蛋重介

於 60-64 gm 間，試驗一及試驗二分別於孵化第 1 日及第 14 日接種不同濃度 FB₁ (0、20、 40、 80 或 160 µg/egg)，處理詳如表 1，每處理二重複，每重複 10 顆蛋。

處理組均接種總體積為 160 µl 二次蒸餾水並經過濾滅菌(稀釋液)。對照組只接種稀釋液，蛋以石蠟密封後置於孵化器內孵化 28 天。其孵化溫度為 100 (37.5)，相對濕度為 98 %；第 25 天移入發生室其溫度 98 ，相對濕度為 98 %。試驗一於試驗期間記錄死亡率及接種後 14 日時之體測性狀包括胚重、喙長及頸長。試驗二則在孵化第 14 日接種，記錄死亡率及接種後 21 日時之體測性狀及肝、腎及心臟重及相對臟器重量。

(三)、組織病理學檢查

試驗結束後對鴨胚進行肉眼外觀形態學檢查，包括體表及臟器，鴨胚採取肝、腎及心臟，經 10%中性福馬林固定 24 小時，在石臘包埋後切成 3µm 之組織切片，再以蘇木紫與伊紅 (hematoxylin and eosin) 染色後，觀察照相。

(四)、統計分析

體測性狀及相對臟器重量資料經 SAS[15]套裝軟體分析；並先經一般線性模式 GLM(general linear models)行變方分析，再以鄧肯氏新多次變域測定法(Duncan's new multiple range test)比較各處理組的差異顯著性。死亡率行 PROBIT procedure[16] 計算出半致死劑量(LD₅₀)及直線迴歸方程式。

三、結果與討論

(一)、胚重、體測性狀及相對臟器重量

不同濃度 FB₁ 於 1 日齡接種後對鴨胚重及體測性狀之影響，結果示於表 2。由表 2 顯示胚重及喙長並不受 FB₁ 處理之影響，但當以 20 µg/egg 接種時、頸長顯著高於 40 及 80 µg/egg 者(P<0.05)。Bacton et al.[17]以 FB₁ 接種於雞胚胎時，觀察其具有致畸胎性(tetratogenicity)，產生之畸胎中有頸長及喙長較對照組為長，其造成原因未明。本試驗中量測顯示僅低濃度頸長較長，高濃度反有較短之趨勢，是否低濃度具有刺激頸部軟骨細胞之增生所致，應進一步探究其因。表 3 為不同濃度 FB₁ 於 14 日齡接種後對鴨胚重、體測性狀及相對臟器重量之影響。結果顯示 14 日齡接種時對鴨胚重、體測性狀及相對心、肝臟重量均無顯著之影響，顯見 14 日齡接種時對其胚發育較 1 日齡接種者不敏感，此可能與毒素代謝能力之發展在 14 日齡後之發育較為健全有關。

(二)、鴨胚死亡率

對照蛋在第 1 日及第 14 日接種無菌稀釋液均孵化出正常的雛鴨。蛋在第 1 日接種 20 μg FB₁ 接種有 10 % 的死亡率、40 μg FB₁ 有 20 % 死亡率、80 μg FB₁ 亦有 20 % 死亡率、160 μg FB₁ 有 100 % 死亡率(如圖 1)；而在第 14 天接種的蛋除 40 及 160 μg FB₁ 有 10 % 死亡率，其餘均無死亡(如圖 2)。因此，在第 14 日接種的胚，比第 1 日毒素接種較不敏感。Wu et al.[18]以 1mM FB₁ 對生體外初代培養之肝細胞、心肌細胞及骨骼細胞處理 48 小時後，發現並無毒性效應，但對軟骨細胞具有毒性效果，故可能因此影響雞胚胎骨骼之成長。Bacton et al.[17]以 FB₁ 接種於雞胚胎時，發現 21 日齡時隨接種劑量之升高(自 10 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 升高至 100 $\mu\text{g}/\text{egg}$)，雞胚胎死亡率由 15% 升至 90%，且 FB₁ 與 fusaric acid 一同接種於蛋內時，可致雞胚死亡率協同性增加。飼餵含 *Fusarium moniliforme* 培養物之雞隻，可致體增重顯著下降、飼料利用率變差及骨骼異常[19]，而且鴨比雞及火雞更敏感，但均可致心臟及肝臟退化及壞死，試驗結果當以 fumonisin 濃度 75-525ppm 飼餵時，須在 150 ppm 以上方可見產生體增重及採食量下降、下痢和肝壞死等毒性效應[14]。Javed et al.[11]指陳孵化前接種 FB₁ 之死亡率高於 10 日齡接種者，但當以 *F. proliferatum* 培養萃取物接種時，結果產生之毒性大於純品 FB₁ 接種者，因培養萃取物同時含有 FB₁ 及 moniliforme。由實驗一資料，經以 PROBIT procedure 後，計算 LD₅₀ 為 67 $\mu\text{g} \pm 16.4\mu\text{g}$ ，如圖 3 所示。

(三)、組織病理學檢查:

在組織學研究中，曾顯示 FB₁ 可抑制神經脂質(sphingolipids)的生合成及致使神經鞘胺醇(sphingosine)及 sphoinganine 之蓄積，此兩種 sphingoid base 乃自 serine 及 palmitoyl coenzyme A 合成，且 FB₁ 會抑制 sphoinganine 之酵素性醯基化(acylation)及脫水作用[21]和其他相關酵素作用[22]進而阻斷神經脂質之合成。由於新孵出雛雞腦內含短暫但大量之脂質(10-40%)，且以神經脂質佔大部份[19]，因雞胚腦內含有供 ceramide 合成之酵素，以供支持雞胚腦之早期快速發育所需[23]。

由組織病理學檢查中發現，試驗一中 160 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 處理組之肉眼及組織病理變化之程度高於其他濃度之處理組，相同之情形亦見於試驗二之 160 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 處理組。

腎臟：FB₁ 處理組中，可見腎腫大，呈水樣狀。組織中腎間質擴大且有炎症細胞浸潤(如圖 A1)。腎小管管腔擴大，內可見細胞碎片或粉紅色均質樣物(如圖 A2)。近端及遠端腎曲細小管上皮腫大，且有嚴重空泡化現象(如圖 A3)，核濃染或消失，細胞質呈嗜酸性樣之紅色濃染，上皮細胞自變性(degeneration)到壞死不等程度之變化。鮑氏囊腔充滿粉紅色均質樣物，部份絲球體之微血管消失(如圖 A4)。

心臟：部份心肌及心外膜可見出血之現象(如圖 B1)。心肌細胞核濃縮及程度不同之空泡化，心肌橫紋消失(如圖 B2)。肝臟：肉眼下可見肝臟顏色變淡。組織切片下可見中央靜脈擴大，因肝臟竇狀隙(sinusoid)擴張致肝索清晰可見(如圖 B3)。肝細胞呈

不同程度之空泡化至壞死之變化。肝細胞核濃縮或消失(如圖 B4)。

在本試驗中胚胎期間之腎臟功能應是極少發揮功用，但由組織切片鏡檢所得，確知腎臟鮑氏囊腔及腎小管管腔內皆填充粉紅色均質樣物質，該是組成絲球體過濾層 (glomerulus filter)之微血管內皮(capillary endothelium)、微血管基底膜(capillary basement membrane)、足細胞(podocyte)受到毒素破壞而致使物質直接由血液中露出，或引起免疫反應所致。唯其傷害程度尚待以電子顯微鏡行高倍率觀察及免疫學檢測才能確知。綜合組織病理所得，FB₁主要是以腎毒性為主之傷害，其他亦對肝臟及心臟引發不同程度之傷害。

四、謝 誌

本試驗感謝蕭龍城先生免費提供試驗鴨蛋及台大獸醫系郭宗甫教授慨借器材在此一併致謝。

參考文獻

1. Butler, T. (1902), " Notes on feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive result" , Am. Vet. Rev. 26:748-751.
2. Dutton, M. G. (1996), " Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects" , Pharmacol. Ther. 70:137-161.
3. Bezuidenhout, S. C., W. C. A. Gelderblom, C. P. Gorst-Allman, R. M. Horak, W. F. O. Marasas, G. Spiteller, and R. Vleggaar (1988), " Structure elucidation of the fumonisin, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* " , J. Chem. Soc. Chem. Commun. 743-745.
4. Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek (1988), " Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme* " , Appl. Environ. Microbiol. 54: 1806-1811.
5. Harrison, L. R., B M. Colvin, J. T. Greene, L. E. Newman and J. R. Cole (1990), " Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme* " , J. Vet. Diagn. Invest. 2:217-221.
6. Gelderblom, W. C. A., W. F. O. Marasas, R. Vleggaar, P. G. Thiel, and M. E. Cawood (1992), "Fumonisin: Isolation, chemical characterization and biological effects" , Mycopathologia 117: 11-16.
7. Chatterjee, D., S. K. Mukherjee, and A. Dey (1995), " Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophage exposed to fumonisin B₁ from Indian maize" , Lett. Appl. Microbiol. 20:184-185.
8. Qureshi, M. A. and W. M. Hagler (1992), " Effect of fumonisin B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro" , Poultry Sci. 71: 104-112.

9. Chu, F. S. and G. Y. Li (1994), " Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer" , Appl. Environ. Microbiol. 60:847-852.
10. Yoshizawa, T., A. Yamashita, and Y. Luo (1994), " Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China" , Appl. Environ. Microbiol. 60:1626-1629.
11. Javed, T., J. L. Richard, G. A. Bennett, M. A. Dombrink-Kurtzman, R. M. Bunte, K. W. Koelkebeck, L. M. Cote, R. W. Leeper, and W. B. Buck (1993), " Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B, or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos" , Mycopathologia. 123:185-193.
12. Dombrink-Kurtzman, M. A., G. A. Bennett, and J. L. Richard (1994), " An optimized MTT bioassay for determination of cytotoxicity of fumonisins in turkey lymphocytes" , J. AOAC Int. 77: 512-516.
13. Legator M. S. (1969), " Biological assay for aflatoxins. In: Goledblatt LA, ed. Aflatoxin-scientific background, control, and implications" , New York: Academic Press. 107-149.
14. Carter S. B. (1965), " Problems in interpreting effects in eggs" , Proc. Eur. Drug. Tox. 5:142-149.
15. SAS. (1988), " SAS/STAT User's Guide (Release 6.04) " , SAS Inst., Cary, NC, USA.
16. Finney, D. J. (1985), " The median lethal dose and its estimation" , Arch. Toxicol. 56 : 215-218.
17. Bacton C. W., Porter J. K., Norred W. P. and K. A. Kenndey (1995), " Toxic interaction of fumonisin B₁ and measured by injection into fertile chicken egg" , Mycopathologia. 129(1):29-35.
18. Wu, W., T. Liu, and R. F. Vesonder (1995), " Comparative cytotoxicity of fumonisin B₁ and moniliformin in chicken primary cell cultures" , Mycopathologia 132:111-116.
19. Sivarama, R. , L. A. Witting and M. K. Horwitt (1964), " Studies on the lipids of chick brain and newborn rat brain" , Fed. Proc. 23:228.
20. Engelhardt, J. A., W. W. Carlton and J. F. Tuite (1989), " Toxicity of *Fusarium moniliforme var subglutinans* for chicks, ducklings and turkey poults" , Avian Dis. 33:357-360.
21. Weibking, T. S., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, J. R. Turk and G. E. Rottinghaus (1993), " Effects of feeding fusarium moniliforme cultural material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick" , Poultry Sci.

72:456-466.

22. Riley, R. T., N. H. An, J. L. Showker, H. S. Yoo, W. P. Norred, W. J. Chamberlain, E. Wang, A. H. Merrill, Jr., and G. Motelin (1993), "Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisincontaining feeds in pigs" , *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1 18: 105-112.
23. Basu S. and B. Kaufman (1965), " Conversion of Tay-Sachs ganglioside to monosialoganglioside by brain uridine diphosphate D-galactose: Glycolipid galactosyl transferase" , *J. Biol. Chem.* 240:4115-4117.

Table 1. Trial treatment of FB1 inoculation in ovo

表 1. 鴨胚接種 Fumonisin B1 之試驗處理

處理 組別	孵化日齡	Toxin	濃度(μ g/egg)
----------	------	-------	------------------

試驗 1	1	稀釋液 ^a	---
試驗 2	14	稀釋液	---
試驗 1	1	FB1 ^b	20
試驗 2	14	FB1	20
試驗 1	1	FB1	40
試驗 2	14	FB1	40
試驗 1	1	FB1	80
試驗 2	14	FB1	80
試驗 1	1	FB1	160
試驗 2	14	FB1	160

a.稀釋液為二次蒸餾水，經過濾滅菌。 Double-distillated water sterilized with millipore was as diluent.

b.FB1= Fumonisin B1

Table 2. Effect of embryo weight and body performance after the 14th inoculation at day one by different concentration

of FB1(experiment 1)

表 2.第 1 日齡時接種不同濃度 FB1 對胚重、體測性狀之影響(試驗 1)

組 別	頸 長 Neck length (cm)	喙 長 Beak length (cm)	胚 重* Embryo weight (gm)
0 μ g	1.45 ^{ab}	3.80 ^a	20.42 ^a
20 μ g	1.50 ^a	3.70 ^a	18.24 ^a
40 μ g	1.35 ^b	4.00 ^a	20.96 ^a
80 μ g	1.35 ^b	4.10 ^a	18.36 ^a
160 μ g	1.40 ^{ab}	4.10 ^a	18.33 ^a
pooled SE	0.003	0.032	4.453

a,b:同一列中數據不同字母者，表差異顯著(P<0.05)。

Data within the same column without the same superscripts differ significantly (P<0.05).

*不含卵黃囊。Yolk sac was not included.

Table 3. Effect of embryo weight , body performance and relative organ weight after the 7th inoculation at 14th day old by different concentration of FB1

(experiment 2)

表 3. 第 14 日齡時接種不同濃度 FB1 後第 7 日對胚重、體測性狀及相對臟器重量之影響(試驗 2)

Treatment	頸長 Neck length (cm)	喙長 Beak length (cm)	胚重* Embryo weight (gm)	心臟重 Heart weight (gm)	肝臟重 Liver weight (gm)	H/E*	L/E*
0 μ g	1.45	3.83	24.53	0.17	0.47	0.007	0.019
20 μ g	1.44	3.81	24.63	0.18	0.46	0.007	0.017
40 μ g	1.42	3.66	22.14	0.18	0.35	0.008	0.019
80 μ g	1.47	3.81	24.24	0.20	0.43	0.009	0.018
160 μ g	1.44	3.74	23.51	0.17	0.47	0.007	0.019
Polled SE	0.007	0.025	4.652	0.002	0.009	0.0001	0.00001

*胚重不含卵黃囊；H/E：心臟重/胚重；L/E：肝臟重/胚重。

*Yolk sac was not included when embryo weight calculation；H/E:heart weight/embryo weight；L/E: liver weight/embryo weight.

圖 B1.心外膜及心肌細胞層出血(↑)橫紋消失。H&E , 100× ,
試驗一 40 μ g。

圖 B2.心肌細胞空泡化(↑)橫紋消失。H&E , 100× , 試驗二 40 μ g。

圖 B3.肝細胞(hepatocyte)細胞核濃縮甚至消失,肝細胞空泡化(V)。H&E ,
100× , 試驗一 40 μ g。

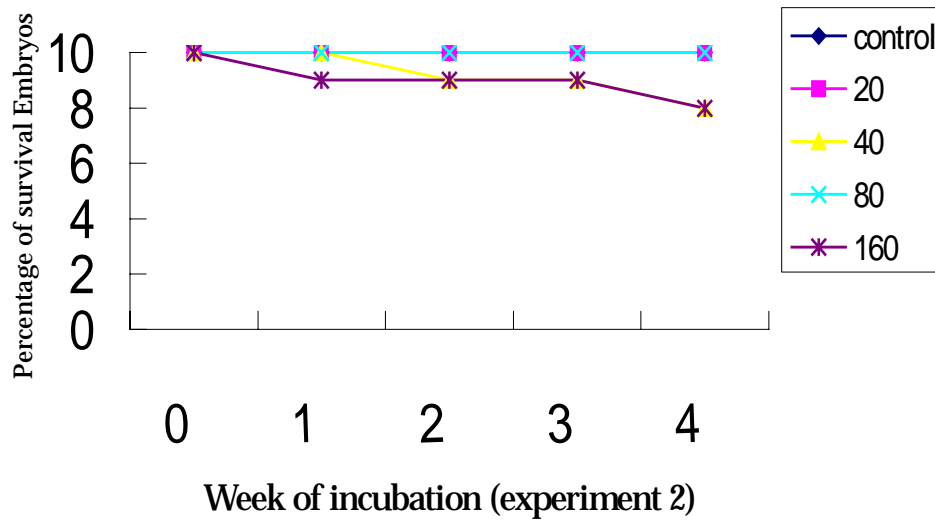
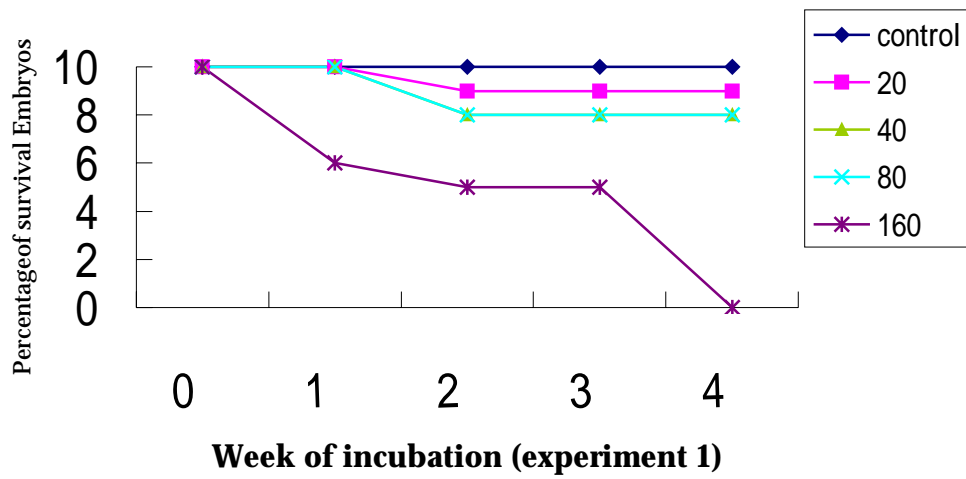
圖 B4.肝竇狀隙(hepatic sinusord)擴張(dilatation) (S)。肝細胞細胞核濃縮
(▲)。H&E , 100× , 試驗二 40 μ g。

圖 A1.腎曲小管(Renal tube)上皮細胞空泡化(▲)。腎間質擴大(*)。H&E , 25 × , 試驗— 40 μ g。

圖 A2.腎絲球之鮑氏囊腔(Bowman's space)充塞均質粉紅色樣物質(P)。H&E , 100x , 試驗— 40 μ g。

圖 A3.腎間質擴大且有炎症細胞浸潤 (▲) , 腎小管上皮細胞細胞核濃縮(Pyknosis)及細胞空泡化(▲)。腎小管充塞均質粉紅色樣物質(P)。H&E , 100x , 試驗— 160 μ g。

圖 A4.腎小管上皮細胞嚴重空泡化(▲) 。細胞核濃縮甚至消失(▲)。腎間質擴大且有炎症細胞浸潤。H&E , 100 × , 試驗— 40 μ g。



審查意見回覆

敬致審查委員:

依如下修改說明如下

- 1.圖 1 與圖 2 依建議修改為存活率(percentage of survival embryo)，曲線由於 overlape 關係所以較難看出各組之走勢，圖 1 之 40ug 的 tick 改為如同圖 2 之三角形較容易辨識，並補上圖 3。
- 2.謝謝建議改為等張之生理鹽水，非常好之建議。若在進行相似實驗當以 saline 為 diluent。
- 3.原稿中圖 1 與圖 2 為誤植相同之圖，已修正。
- 4.摘要中最後一句，已說明為”無論是第 1 日或第 14 日 40 μ g 以上接種者，鴨胚之肝、腎及心臟均可觀察到組織病理學變化”，英文修改亦同。

謝謝費心修正!!

後學 鄭永祥敬上