

農藥免賴得致胚胎畸形及其測試方法之建立

* 呂水淵 王順成

臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系 台中縣
(收稿日期: 87年8月29日。接受日期: 87年11月27日)

摘要 取出懷孕第 9.5 天之大鼠胚胎培養於 36°C，攪動速率為 30 rpm 之恆溫培養箱 48 小時，其後評估胚胎生長發育情形、形態及培養液之酸鹼值。結果顯示，免賴得各供試濃度對卵黃囊長度、胎體頭部至臀部長度、頭部長度、發育等級、體節數、死亡或萎縮比率及胎體外觀異常比率具明顯作用，免賴得誘發大鼠第 9.5 天胎體異常現象有小眼、無眼、前腦發育不全、頭部扁平、前腦發泡、頭部或軀幹壞死、軸體異常旋轉、軀幹短而鈍及共泄腔外翻、背脊與後腦嚴重分裂、前腦與中腦分裂、及中腦與後腦分裂等。並對胎體頭部至臀部長度、頭部長度、發育等級及體節數具濃度一反應關係，必芬諾則在各評估項目與對照組無顯著差異。由此可知，生體外快速致畸胎性評估方法具有鑑識輔助之功用。[*呂水淵、王順成。農藥免賴得致胚胎畸形及其測試方法之建立。中華獸醫誌 25 (1): 69-76, 1999。*聯絡人 TEL: 04-330 2101-505, FAX: 04-332 3073, e-mail: lusueyen@tactri.gov.tw]

關鍵詞: 致畸胎性、大鼠、生體外

緒 言

目前上市約六至九萬種化合物中僅三千種已經進行生體內致畸胎試驗，過去曾使用結構相似性 (structure-activity relationship, SAR) 方法篩選化學物質潛在危險，此法既快速且花費少，但經過多位學者證實此一簡便方法並不適用於致畸胎性評估，可能是由於化學藥劑對生殖系統之作用機制較一般毒性檢測複雜之故 [9]，目前發展出之生體外致畸胎評估方法較 SAR 適用於測試化學藥劑對動物之潛在致畸胎性，因利用自大鼠、雞、小鼠 [13] 之動物等已可發展出足供試驗之胚胎量，並可直接測試胚胎對藥劑之反應。傳統上利用生體外方法測定毒性物質已發展近十五年 [15]，但生體外致畸胎測試法之發展為近來年才較完整且廣受注目，目前此法其準確率達八成以上 [9]，儘管生體外致畸胎試驗不完全類似生體內之母體胚胎系統之完整代謝系統，但經過良好試驗設計，可選擇生體內與生體外最相似之胚胎發育階段做為評估重點，因此在致畸胎篩選上已具相當代表性。不可諱言，生體外致畸胎評估方法仍無法完全取代傳統生體內

致畸胎毒性測試，但卻可做為輔助之用，尤其在開發新產品或新藥劑劑型之先期致畸胎性篩選上，則是十分有價值的工作。

外來物質造成子代外觀畸形現象乃由於致畸胎性物質在母畜懷孕期間，接觸致畸胎性物質所致。因此毒理學家選擇在器官發生時之敏感時期，探討胚胎之致畸胎性，儘管著床後之胚胎培養曾在多種哺乳動物上發展，但目前利用動物胚較成功以大、小鼠與雞 [13] 為最重要。大、小鼠子代器官發生期間 (organogenesis) 分別為懷孕第 7-15 天及 6-12 天，New (1978, 1979) 首先發展出生體外之大鼠胚胎培養技術 [16, 17]，1980 年 Sadler 將之用於小鼠之生體外評估 [19]，生體外胚胎培養技術中最重要為胚胎選擇之時期，目前所使用之培養胚胎組織包括已形成子代之組織如外胚結構 (extra-embryonic structures)、內卵黃囊 (visceral yolk sac)、羊膜 (amnion)、絨毛膜 (chorion)、尿膜 (allantois) 及胎盤 (placenta, ectoplacenta cone)，其他關鍵技術為培養前必需去除者有多餘胚組織 (extra-embryonic tissue)、壁層卵黃囊 (parietal yolk sac)、滋養葉 (trophoblast) 及賴休德氏膜 (Reichert's membrane)。另一生體外致畸

胎性培養技術上，培養時間訂定亦十分重要，目前以培養時間為 48 小時為最適合。而胚胎畸形性研究最終目的在於訂定評估標準，目前評估標準訂定較完整者為 Brown 和 Fabro (1981) 所訂定 [6]，近年來已有多位學者利用此一方法評估人類常用之化工產品如甲酸及其鹽類 [4]、甲醇及其代謝產物 [7]、乙醇 [14]、鹵乙酸 [18]、Valproic acid [5]、視黃酸 [19] 及乙炔甘油 [8] 之潛在致畸胎性。此外，也有學者以探討含類似官能基之系列化合物之毒理動力學及結構相關性 [10]，及利用此一方法探討細胞之自然凋亡 (apoptosis) 現象 [21] 及胚胎毒性 [3]，均與生體內致胚胎畸形性具良好相關性。

上述試驗大多應用於生藥或化工產品上，但在農藥上之研究則不多見，往昔許多農藥多缺乏畸胎之毒理資料，若利用傳統之致畸胎性重新測試需要大量人力、財力及時間，若以此快速之評估方法，則可節省大量人力與財力。因此本實驗希冀建立以生體外之致畸胎性評估法以供篩選化學藥劑之潛在致畸胎性。並確立生體外致畸胎性之研究法。

材料與方法

材料

培養基 自大鼠抽取血液經離心之血清供作培養基。

緩衝液 胚胎自子宮蛻膜瘤中移出時以 Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 8.35, 作為緩衝液。

供試藥劑 免賴得 (benomyl) 95% 原體與必芬諾 (Bifenox) 99% 原體，由本國農藥公司提供。

賦形劑 二甲亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Merck Co.)

供試動物 Wistar 品系大鼠 (*Rattus norvegicus*)，購自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心 SPF 動物房之四週齡雌、雄大鼠 (雌， 73 ± 6 g; 雄， 81 ± 8 g) 於本系 SPF 動物房飼養至 8 週齡 (雌， 233 ± 11 g; 雄， 304 ± 13 g)，使其配種進行生體外試驗。

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，黑暗 12 小時，飼料為粒狀 (Purina Laboratory Chow[®], No.5001, U.S.A.)，飲水任食。

方法

血清培養基之製備 配種淘汰之雄大鼠重約 500 g，以乙醚麻醉並利用 18 G 針頭自腹腔動脈採血。血液凝固前立即以 $2000 \times g$ ，離心 5 分鐘，靜置 30-60 分鐘後再以 $2000 \times g$ 離心 10 分鐘，再將血清冷凍於 -20°C 中。取出血清使用時，自 -20°C 冷凍庫中取出於 37°C 或室溫中解凍，再以 56°C ，30 分鐘之水浴加溫使血清中酵素不活化，當加溫時將瓶蓋打開，以利血清中之乙醚揮發。並用 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾膜過濾後保存備用。

胚胎收集與培養 雌雄大鼠飼養至 8 週齡，二雄二雌同一籠進行配種，翌日檢視雌鼠精子腔道栓塞 (sperm vaginal plug)，出現者即視為配種成功，當日視為懷孕第 0 天，隔天視為懷孕第 1 天，依此類推，計算懷孕第 9.5 日時，行解剖取胚工作，並採血、離心後將血清冷凍於 -20°C ，供培養用。大鼠晚期頭部皺褶階段 (late-head-fold stage) 之胚於懷孕第 9.5 日 (0 體節) 取出胚，培養於 HBSS 中，培養前去除賴休德氏膜 [14]，取出含完整卵黃囊、胎盤外圓錐及羊膜的胚胎，逢機培養於不同處理之培養液中。

培養步驟 以容量為 50 mL 之培養瓶 (25T flask, Nunclon[®], Denmark) 加入 5 mL 之大鼠無菌血清，另含 2.5 IU penicillin G/mL、2.5 g streptomycin/mL serum 及含 2-5 個胚，胚置於 50 mL 培養瓶，於 36°C 恆溫培養箱 (LT1-613, TKS, Taiwan, R.O.C.) 培養 48 小時，其中培養箱中搖擺振盪器 (RS-01, TKS, Taiwan, R.O.C.) 之上下擺動速率為 30 rpm (如 Fig.1)。於培養前先進行 5% O_2 ，5% CO_2 ，90% N_2 充氣 2 min；經過 24 小時後再以 10% O_2 ，5% CO_2 ，85% N_2 充氣 2 min；另於培養第 40 小時後再以 20% O_2 ，5% CO_2 ，75% N_2 充氣 1 min。48 小時培養結束時將胚轉置於盛有 HBSS 之培養盤中，再於解剖顯微鏡下檢視其生長發育、形態及測定培養基酸鹼值。

處理濃度 以免賴得 (0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為陽性對照藥劑，必芬諾 (0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.2, 12.8, 25.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為陰性對照藥劑，兩藥劑分別溶於 DMSO，前試驗結果顯示，處理濃度之體積不超過培養總體積之 0.2% 時 DMSO 不產生毒性，本實驗培養液總體積為 5 mL，因此 DMSO 之最高容許量為 10 μL 。

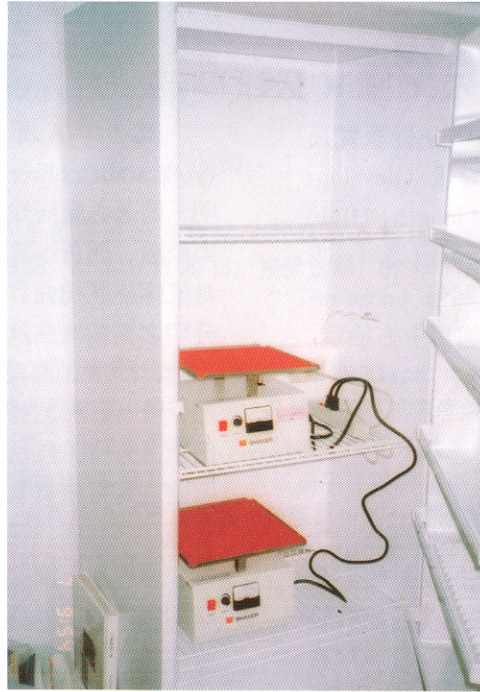


Fig. 1 With 30 rpm embryo shaker (RS-01) was put on the incubator (Lti-613), which keeps temperature at 36°C .

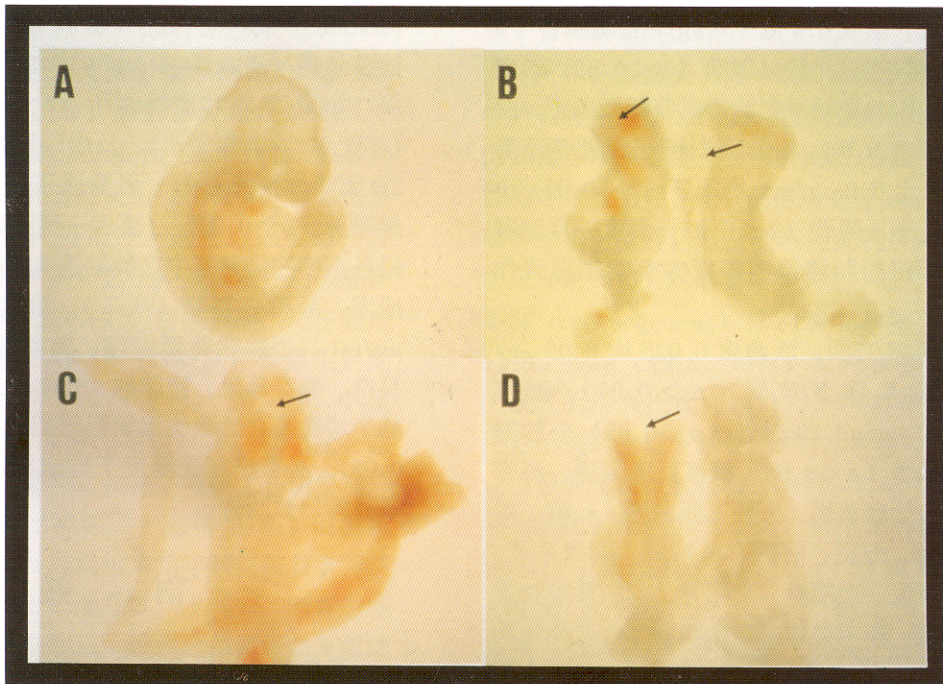


Fig. 2 Wistar rat embryos explanted at pregnant day 9.5 after 48 hours culture . A. normal embryo; B. flat head and split trunk ; C. split fore and mid brain; D. split mid and hind brain.

評估方法 依 Brown 和 Fabro (1981) 方法評估胚胎發育 [6]，評估項目包括胚胎生長性狀和發育階段，若胚卵黃囊循環系統不明顯或心臟停止跳動，則視為死亡。

統計方法 最後依 t-test 和相關關係分析頭臀長 (crown-rump length, CRL)、發育等級 (developmental score, DS)、頭部長度 (head length, HL)、體節數 (somite number, SN)、卵黃囊直徑 (yolk sac diameter, YSD) 等之濃度-反應關係 (dose-response)，死亡和不正常胚則與對照組用卡方檢定。做為判定藥劑胚胎畸形性研究之依據。

結 果

免賴得對大鼠懷孕第 9.5 天之頭狀期胚在培養 48 小時後之卵黃囊直徑、胎體頭臀長度、頭部長度、發育等級、體節數、死亡率、異常率及培養終了培養基之酸鹼值如表一所示，卵黃囊直徑，除濃度 0.0125、0.8 與 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未顯著小於對照組外，其餘濃度組均顯著 ($p < 0.05$) 小於對照組，濃度一反應關係未呈顯著 ($p > 0.05$) 現象，但免賴得對大鼠第 9.5 天胚胎卵黃囊產生輕微傷害。至於其對胎體頭臀長度，除濃度 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與對照組無顯著差異，濃度 0.4 至 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均顯著 ($p < 0.05$) 小於對照組，且呈顯著 ($p < 0.05$) 濃度一反應關係，因此免賴得對胎體具有明顯傷害。頭部長度，除濃度 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與對照組無顯著差異外，濃度 0.2 至 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均顯著 ($p < 0.05$) 小於對照組，且亦呈顯著 ($p < 0.05$) 濃度一反應關係，顯示免賴得對胎體頭部長度亦有明顯傷害作用。

在發育等級方面，除濃度 0.025 與 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$)，濃度 0.0125 至 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均顯著 ($p < 0.05$) 小於對照組，且呈顯著 ($p < 0.05$) 濃度反應關係，發育等級上傷害包括卵黃囊、尿膜、屈曲度、心臟、尾神經管、後腦、中腦、前腦、耳系統、視覺系統、嗅覺系統、鰓板、上頷骨、下頷骨、前肢及後肢等項成績之總和，顯示免賴得對胎體各部位之作用明顯。

對體節數之作用，各濃度組均顯著小於對照組，且均呈顯著 ($p < 0.05$) 濃度一反應關係，表示免賴得對體節影響顯著。死亡率，從濃度 0.2 至

4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之死亡率由 50 至 100%，均顯著 ($p < 0.05$) 高於對照組，故此藥劑具胚胎毒性。異常率評估上，除濃度 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 因死亡外，其餘濃度之異常率均為 100% (如圖 2)。

圖 2 中 A 圖為正常胎體，其卵黃囊蒂閉鎖 (yolk stalk obliterated)，動脈與靜脈血管分佈鮮明，隨著心臟規律跳動，血液流動清晰可見，尿膜與動脈，卵黃小管及臍帶原已分離，背部凸起，全身成螺旋狀扭曲，尾部神經管閉合，後腦中可見有分明之橋腦彎曲及透明之第四腦室頂部，並可分隔中腦與間腦，而前腦中可見終腦半球較平面稍突起，但有關於胎體腦部之構造僅可在穿透光解剖顯微鏡下分辨，無法在圖片中清楚表示。此外，正常胎體之耳系統具有內淋巴管或隱窩，視神經系統中有袋狀晶狀體，嗅覺系統為側鼻突起，第二鰓門發育快速但第三鰓門不甚清楚，前肢有脊狀突起而後肢則有夾板墊形成。

免賴得誘發大鼠第 9.5 天胎體異常現象有小眼 (microphthalmia)、無眼 (anophthalmia)、前腦發育不全 (prosencephalic hypoplasia)、頭部扁平 (flat head) (如圖 2B 圖左側箭頭所示)、前腦發泡 (prosencephalic blisters)、頭部或軀幹壞死 (head or trunk necrosis)、軸體異常旋轉 (abnormal axial rotation)、軀幹短而鈍 (short blunt trunk) 及共泄腔外翻 (cloacal extrophy)、背脊與後腦嚴重分裂 (如圖 2B 圖右側箭頭所示)、前腦與中腦分裂 (如圖 2C 圖箭頭所示)、及中腦與後腦分裂 (如圖 2D 圖箭頭所示) 等。培養終了培養基之酸鹼值，無顯著 ($p > 0.05$) 之濃度一反應關係，推測免賴得各濃度在培養基中之酸鹼值並非造成胚胎異常之成因。至於必芬諾 (表二)，濃度從 0.8 至 25.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，不論卵黃囊直徑、胎體頭臀長度、頭部長度、發育等級、體節數、死亡率、異常率及培養終了培養基之酸鹼值等與對照組無明顯差異 ($p > 0.05$)，必芬諾在高濃度下均未有異常現象，顯見必芬諾無致胎性。

討 論

早期有多位學者利用生體外致畸性評估法探討大眾經常曝露之化工產品或環境衛生用藥之潛在致畸胎性 [3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18, 19]。在本實驗室曾進行已知免賴得為一典型之致畸胎藥劑，

Table 1. Embryotoxic effects of benomyl on GD-9 rat embryos cultured for 48 hours.

Concentrate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	YSD (mm)	CRL ¹ (mm)	HL ¹ (mm)	DS ¹	SN ¹	D or A (%)	ABN (%)	Ending pH
0	3.89 ± 0.54	2.96 ± 0.41	1.61 ± 0.42	46.4 ± 2.1	25.1 ± 0.9	0	0	7.23 ± 0.07
0.0125	4.58 ± 0.60	3.03 ± 1.38	1.75 ± 0.35	40.5 ± 0.7*	12.5 ± 3.5*	0	100*	7.34 ± 0.08
0.025	5.00 ± 0.35*	3.00 ± 0.00	1.63 ± 0.18	43.5 ± 3.5	17.5 ± 2.1*	0	100*	7.43 ± 0.08
0.05	5.38 ± 0.53*	3.00 ± 0.71	1.75 ± 0.00	47.5 ± 3.5	18.0 ± 2.8*	0	100*	7.37 ± 0.08
0.1	5.65 ± 0.21*	3.50 ± 0.71	1.63 ± 0.18	51.5 ± 2.1*	15.5 ± 0.7*	0	100*	7.31 ± 0.08
0.2	3.17 ± 0.15*	2.47 ± 0.15	1.03 ± 0.15*	36.0 ± 2.0*	16.0 ± 1.0*	57*	100*	7.36 ± 0.08
0.4	2.63 ± 0.17*	2.45 ± 0.21*	0.90 ± 0.18*	33.0 ± 1.8*	15.0 ± 0.8*	50*	100*	7.32 ± 0.07
0.8	3.55 ± 0.21	2.05 ± 0.07*	1.15 ± 0.07	33.5 ± 0.7*	16.5 ± 0.7*	82*	100*	7.28 ± 0.05
1.6	3.75 ± 0.07	2.70 ± 0.42	0.90 ± 0.14*	29.5 ± 0.7*	14.5 ± 0.7*	85*	100*	7.33 ± 0.06
2	2.45 ± 0.07*	2.05 ± 0.07*	1.05 ± 0.07*	29.0 ± 1.4*	16.5 ± 0.7*	87*	100*	7.32 ± 0.07
2.5	2.95 ± 0.07*	1.75 ± 0.07*	0.65 ± 0.07*	17.5 ± 0.7*	2.5 ± 1.5*	90*	100*	7.41 ± 0.08
3.0	2.75 ± 0.07*	1.45 ± 0.07*	0.65 ± 0.07*	15.5 ± 0.7*	2.5 ± 0.7*	92*	100*	7.34 ± 0.06
4.0	-	-	-	-	-	100*	-	7.31 ± 0.08

YSD: yolk sac diameter, CRL: crown-rump length, HL: head length, DS: developmental score, SN: somite number, D or A: dead or atrophy, ABN: abnormal (including all kinds of abnormalities from little to severe)

- : dead embryos and data is not available.

* $p < 0.05$ compared to control

¹ $p < 0.05$ for dose response

Table 2. Embryotoxic effects of bifenoxy on GD-9 rat embryos cultured for 48 hours.

Concentrate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	YSD (mm)	CRL (mm)	HL (mm)	DS	SN	D or A (%)	ABN (%)	Ending pH
0	3.89 ± 0.54	2.96 ± 0.41	1.61 ± 0.42	46.4 ± 2.1	25.1 ± 0.9	0	0	7.23 ± 0.07
0.8	4.20 ± 0.14	2.80 ± 0.42	1.60 ± 0.14	45.0 ± 1.4	25.0 ± 1.2	0	0	7.31 ± 0.05
1.6	4.10 ± 0.14	2.80 ± 0.28	1.65 ± 0.07	42.5 ± 0.7	24.5 ± 0.7	0	0	7.32 ± 0.07
3.2	4.15 ± 0.21	2.85 ± 0.35	1.65 ± 0.07	44.0 ± 2.8	25.0 ± 1.4	0	0	7.34 ± 0.03
6.4	4.25 ± 0.07	3.05 ± 0.07	1.70 ± 0.14	44.5 ± 2.1	25.5 ± 0.7	0	0	7.37 ± 0.06
12.8	4.23 ± 0.06	3.04 ± 0.05	1.65 ± 0.07	43.5 ± 2.3	24.5 ± 0.7	0	0	7.31 ± 0.05
25.6	4.11 ± 0.06	3.01 ± 0.05	1.43 ± 0.06	41.5 ± 2.3	22.5 ± 0.7	0	0	7.37 ± 0.05

YSD: yolk sac diameter, CRL: crown-rump length, HL: head length, DS: developmental score, SN: somite number, D or A: dead or atrophy, ABN: abnormal (including all kinds of abnormalities from little to severe)

* $p < 0.05$ compared to control

¹ $p < 0.05$ for dose response

本實驗以往之生體內致畸胎性資料結果可知，免賴得 [2] 具露腦 (exencephaly)、裂腹 (gastroschisis)、無尾 (anury)、彎尾 (bent tail)、全身水腫 (edema)、軸骨彎曲 (bent trunk)、海豹肢 (phocomelia)、及無口 (astomia) 等外觀畸形，至於必芬諾則無任何外觀異常；此外，免賴得亦具細部骨骼及內臟異常，必芬諾則無 (未發表資料)。由生體外致畸胎性測試方法結果與生體內之結果相符，

可初步證明此一生體外致畸胎性測試方法可部份取代生體內之測試。

生體外胚胎畸形評估技術建立包含較重要三項因素，一為胚胎培養基之開發，二為混合氣體給予之適當時機與濃度，三為供選作培養之胚胎日齡與培養時間。早期使用於胚胎培養之培養基均為 100% 大鼠血清，學者發現在製備大鼠血清時有一關鍵因素，即於血液凝固前即進行離心之血清培養

效果遠大於血液凝固後給進行離心之血清 [11]，至於稀釋大鼠血清或利用綿羊、馬、牛及小牛之血清作為胚胎培養用，或用人類血清，添加 3 mg/mL 葡萄糖至人類血清之效果均不佳。故培養基之選擇上，本試驗採用 100% 大鼠血清為培養基進行培養，結果成效良好。

培養瓶中氣體之需求對胚胎之正常發育甚為重要，隨著胚胎日齡增加，氧化代謝途徑所需之氧氣濃度亦隨之增加，根據 New (1978) 所測試結果，大小鼠在 8.5 至 12.5 日齡所需之氧分壓由低至高濃度為 5%、20%、40%、95% [11]，氣體濃度與 24 至 48 小時內之培養時間之組合隨使用者而做不同調整 [3,4,5,7,8,17]，本實驗室嘗試胚胎培養，前 24 小時，以 5% O₂、5% CO₂、90% N₂，充氣 3 分鐘，後 24 小時，以 40% O₂、5% CO₂、55% N₂，充氣 1 分鐘，及培養第 40 小時，以 40% O₂、5% CO₂、55% N₂，充氣 2 分鐘，培養第 9.5 天大鼠胚胎；前 24 小時，以 40% O₂、5% CO₂、45% N₂，充氣 2 分鐘，後 24 小時，40% O₂、5% CO₂、55% N₂ (早上)，充氣 2 分鐘，95% O₂、5% CO₂、balanced N₂ (下午)，充氣 2 分鐘，培養第 40 小時，以 95% O₂、5% CO₂、balanced N₂，充氣 2 分鐘培養第 10.5 天大鼠胚胎，培養效果雖佳但不穩定，可能因為氧氣分壓太高之故 (未發表資料)，經本實驗室長時間測試發現，就大鼠而言，不論第 9.5 或 10.5 天胚胎，如以前 24 小時，5% O₂、5% CO₂、90% N₂，充氣 2 分鐘，後 24 小時，10% O₂、5% CO₂、85% N₂，充氣 2 分鐘，及培養第 40 小時，20% O₂、5% CO₂、75% N₂，充氣 1 分鐘，培養效果甚佳且品質穩定，因此本實驗以此混合氣體濃度為主要培養模式，亦得到相當穩定試驗結果。

由於大、小鼠之著床時間約為配種後 4-5 天，而胚胎在子宮著床後開始分化 (differentiation) 及器官發生，此時期大約自配種後第 6 至 15 天，在此器官發生期間為胚胎對致畸胎物質最敏感時期，New (1978) 利用生體外比照生體內之懷孕第 6 至 10.5 天之胚胎發育比較結果，生體內懷孕第 9.5 至 11.5 天之胚胎與同時間生體外培養者極為相似，因此以此作為測試致畸胎性試驗 [11]，其後多位學者均證實此一結果並利用其相似性進行各類藥劑之致畸胎性試驗 [3,4,5,7,8,17]，本實驗室亦利用大鼠懷孕第 9.5 及 10.5 天體外培養測試各

類農藥之致畸胎性，結果發現同一藥劑及同一濃度對大鼠懷孕第 9.5 天胚有異常反應但對 10.5 天胚則無，其可能原因為第 9.5 天胚對藥劑反應較 10.5 天者敏感。基於此，本試驗以大鼠懷孕第 9.5 天胚為培養胚胎。

生體外致畸胎性評估方法最有用之處乃為其胚胎在培養 48 小時後仍可保有正常之胚胎形態及生物化學特性，表一中卵黃囊直徑、胎頭頸長度、頭部長度、發育等級、體節數、死亡率、異常率及培養終了培養基之酸鹼值等資料均可符合檢定標準。此外，New 等 (1979) 所探討生體內與生體外試驗中胚胎組織學上之差異 [14]，報告亦指出，大鼠在懷孕第 9.5 天取出體外培養至 11.5 天之胚胎，其組織分化情形與在生體內，除在視神經發育與後腦神經閉合稍微超前生體內者外，此與本文結果接近，此亦說明生體外胚胎研究之重要性。

哺乳動物在生殖過程中頗為複雜，尤其在母體與胎盤及胎兒之間形成一種密切關連，包括內分泌平衡、血液輸送、營養物質及身體內循環系統之新陳代謝等，因此在生體外欲模擬生體內之母體-胚胎間系統極為困難，所以利用生體外之致畸胎性評估之正確性受到一些學者之懷疑，然而生體外致畸胎評估法儘管無法完全具備生體內之母體-胚胎系統，但經過類似本實驗設計及選擇生體內與生體外生長系統相似之階段進行，生體外之評估系統仍可作為致畸胎毒性之探討，雖然無法如生體內之完整性研究致畸胎毒性，但在快速大量篩選潛在致畸胎之藥劑，則用途甚廣。此外，生體外致畸胎性評估對部份致畸胎機制之探討有強化功能，透過生體外致畸胎性評估瞭解藥劑對動物標的器官之作用位置及作用機制以印證生體內致畸胎性評估之正確性及毒理作用之生物生化原理。則有相輔相成之功效，綜合本文結果，顯見生體外致畸胎畸形性研究技術，對國內探討致畸胎藥劑已具有相當之價值。

誌 謝

本研究承蒙行政院農委會經費補助 [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 (Ben-

- myl) 對大鼠胚胎畸形性之探討。中華獸醫誌 20 (4): 348-356, 1995。
- 呂水淵、王順成。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。臺灣畜牧獸醫學會會報 66: 161-172, 1998。
 - Ambroso JL, Harris C. *In vitro* embryotoxicity of the cysteine proteinase inhibitors benzyloxycarbonyl-phenylalanine-alanine-diazomethane (Z-Phe-Ala-CHN₂) and benzyloxycarbonyl-phenylalanine-phenylalanine-diazomethane (Z-Phe-Phe-CHN₂). *Teratology* 50: 214-228, 1994.
 - Andrews JE, Ebron-McCoy M, Kavlock RJ, Rogers JM. Developmental toxicity of formate and formic acid in whole embryo culture: a comparative study with mouse and rat embryos. *Teratology* 51: 243-251, 1995.
 - Andrews JE, Ebron-McCoy M, Bojic U, Nau H, Kavlock RJ. Validation of an *in vitro* teratology system using chiral substances: stereoselective teratogenicity of 4-yn-valproic acid in cultured mouse embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132: 310-316, 1995.
 - Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development *in vitro*: A morphological Scoring system. *Teratology* 24: 65-78, 1981.
 - Brown-woodman PDC, Huq F, Hayes L, Herlihy C, Picker K, Webster WS. 5. *In vitro* assessment of the effect of methanol and the metabolite, formic acid, on embryonic development of the rat. *Teratology* 52: 233-243, 1995.
 - Carney EW, Liberacki AB, Bartels MJ, Breslin WJ. Identification of proximate toxicant for ethylene glycol developmental toxicity using rat whole embryo culture. *Teratology* 53: 38-46, 1996.
 - Daston GP. The theoretical and empirical case for *in vitro* developmental toxicity screens, and potential applications. *Teratology* 53: 339-344, 1996.
 - Fisher HL, Sumler MR, Shrivastava SP, Edwards B, Oglesby LA, Ebron-McCoy MT, Copeland F, Kavlock RJ, Hall LL. Toxicokinetics and structure-activity relationships of nine para-substituted phenols in rat embryos *in vitro*. *Teratology* 48: 285-297, 1993.
 - Freeman S, Coakley ME, Brown NA. Post-implantation embryo culture for studies of teraogenesis. In: Biochemical toxicology. Snell K, Mullock B, eds. Irl Press, Oxford Washington DC. pp. 83-107, 1987.
 - Harris C, Stark KL, Juchau MR. Glutathione status and the incidence of neural tube defects elicited by direct acting teratogens *in vitro*. *Teratology* 37: 577-590, 1988.
 - 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. *Toxic. In Vitro* 7 (6): 785-798, 1993.
 - Maele-fabry GV, Gofflot F, Clotman F, Picard JJ. Alterations of mouse embryonic branchial nerves and ganglia induced by ethanol. *Neurotoxicol. Teratol.* 17: 497-506, 1995.
 - Mirkes PE. Prospects for the development of validated screening tests that measure developmental toxicity potential: view of one skeptic. *Teratology* 53: 334-338, 1996.
 - New DAT. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122, 1978.
 - New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Comparison of growth *in vitro* and *in vivo* of post-implantation rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36: 133-141, 1979.
 - Richard AM, Hunter III ES. Quantitative structure-activity relationships for the developmental toxicity of haloacetic acids in mammalian whole embryo culture. *Teratology* 53: 352-360, 1996.
 - Sadler TW. Culture of early somite mouse embryos during organogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 49: 17-25, 1979.
 - Sulik KK Dehart DB, J Rogers M, Chernoff N. Teratogenicity of low dose of cis-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. *Teratology* 51: 398-403, 1995.
 - Thayer JM, Mirkes PE. Programmed cell death and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene-induced apoptosis in the rat embryo. *Teratology* 51: 418-429, 1995.

Setting up and Validation of Whole Rat Embryo Cultures in Pesticides

* Shui-Yuan LU, Shun-Cheng WANG

Department of Applied Toxicology, Taiwan

Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung Hsien, Taipei 413, ROC

(Received: August 29, 1998. Accepted: November 27, 1998.)

ABSTRACT In order to set up the *in vitro* teratology for pesticides, we cultured the whole embryos of pregnant day 9.5 rats at 36°C and 30 rpm incubator for 48 hours and compared the benomyl with bifenoxy in developmental score, morphology, and medium pH. Abnormalities induced by benomyl were microphthalmia, anophthalmia, prosencephalic hypoplasia, flat head, prosencephalic blisters, head or trunk necrosis, abnormal axial rotation, short and blunt trunk, cloacal extrophy, dorsally trunk and hind brain splited, fore brain and trunk splited, mid-hind brain splited. The results showed that yolk sac diameter, crown-rump length, head length, developmental score, somite number, dead or atrophy and abnormal rate were treatment-related in benomyl but not in bifenoxy. Based on the consistency of results in *in vivo* and *in vitro* for benomyl and bifenoxy, we concluded that *in vitro* assessment for teratology served as a screen of the teratologic potential of pesticides in rats. [* Lu SY and Wang SC. Setting up and validation of whole rat embryo cultures in Pesticides. *J Chin Soc Vet Sci* 25 (1): 69-76, 1999. * Corresponding author TEL: 04-330 2101-505, FAX: 04-332 3073, e-mail: lusueyen@tactri.gov.tw]

Keywords: *Teratogenicity, Rat, In vitro*