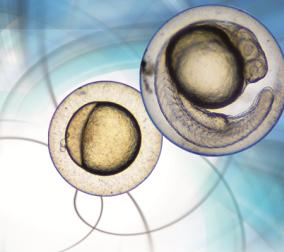


斑馬魚－水中毒性物質偵測家



謝淑秋、王俊堯、葉信利

水產試驗所海水繁養殖研究中心

隨著科技的突飛猛進，人們的生活水平大幅提升，但也製造出越來越多的污染物質，包括農漁牧用藥（除草劑、殺蟲劑和抗生素）、工業廢水（重金屬）、民生污水（界面活性劑）、塑化劑、人工雌激素、溴化阻燃劑和人造奈米顆粒等。眾多的污染物質大量散布至大氣及水環境中，不僅危害人類健康甚至破壞全球生態環境。

污水毒性與生態環境具有高度關聯性，近十幾年間已成為生態毒理學上受關注的議題。各國開始應用水生生物進行水生環境毒性試驗，評估特定物質是否對水生生物具傷害性，同時也能偵測水質是否遭受有毒物質的污染。生物毒性試驗中最常以急性致死效應做為毒性終點 (toxic endpoints)，藉由觀察生物在短時間內暴露於不同濃度的毒性物質下的死亡率，判定其毒性強弱，一般以半數致死濃度 (lethal concentration 50%, LC₅₀; 動物實驗中，施用之化學物質能使 50% 實驗動物發生死亡時所需之濃度) 及半數致效應濃

度 (effective concentration 50%, EC₅₀; 動物實驗中，施用之化學物質能使 50% 實驗動物產生反應所需之有效濃度) 方式表示。根據我國針對農藥（有毒物質）對水生物毒性分類，依其對水生生物毒性強弱可分成劇毒、中等毒、輕毒和低毒四大類型（表 1）。由於急性致死效應無法反應在低濃度、長時間暴露下對水生生物之影響，因此，為更貼近真實水體環境狀況，有些會改以低濃度、長時間的毒物試驗模式，檢測毒性物質對水生生物的亞致死效應 (sublethal effects)。目前國際間對水生生物急毒性 (acute toxicity) 試驗，有不同的生物預測系統，包括無脊椎動物、脊椎動物及藻類等。在水生脊椎動物的急毒性試驗，經常以魚類作為試驗體，其中斑馬魚 (*Danio rerio*) 為經濟合作暨發展組織 (Organization of Economic Cooperation and Development, OECD) 和美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) 推薦使用於水生急毒性試驗之魚種（表 2）。

表 1 農藥對水生物毒性分類

類型	淡水魚類急毒性 LC ₅₀ (96 hr)	淡水無脊椎生物急毒性 EC ₅₀ (48 hr)
劇 毒	< = 1 mg/L	< = 1 mg/L
中等毒	> 1 - < = 10 mg/L	> 1 - < = 10 mg/L
輕 毒	> 10 - < = 100 mg/L	> 10 - < = 100 mg/L
低 毒	> 100 mg/L	> 100 mg/L

註：淡水魚類：以虹鱈、藍鰶魚或鯉魚為主；淡水無脊椎生物：以 Daphnidae 科之水蚤為主

資料來源：農藥對水生物毒性分類及其審核管理規定

表 2 水生生物毒性試驗常用的淡、海水魚類

淡水魚種
斑馬魚 (zebra fish, <i>Brachydanio rerio</i>)
胖頭鱥 (fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i>)
鯉魚 (common carp, <i>Cyprinus carpio</i>)
青鱈魚 (ricefish, <i>Oryzias latipes</i>)
孔雀魚 (guppy, <i>Poecilia reticulata</i>)
藍鰓魚 (bluegill, <i>Lepomis macrochirus</i>)
虹鱒 (rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>)
海水魚種
潮間美洲原銀漢魚 (tidewater silverside, <i>Menidia peninsulae</i>)
鲱魚 (herring, <i>Clupea harengus</i>)
鳕魚 (cod, <i>Gadus morhua</i>)
綿羊頭鱥魚 (sheepshead minnow, <i>Cyprinodon variegatus</i>)

修改自 OECD guideline for testing of chemicals 212, 1998

斑馬魚（圖 1）身上具有斑馬樣之條紋，故名為斑馬魚，又名藍條魚、花條魚、藍斑馬魚、印度魚、印度斑馬魚，屬淡水魚種，原棲息於印度、巴基斯坦、孟加拉共和國、緬甸和尼泊爾等地之內陸水域，因其色彩鮮豔種類繁多，且環境適應力強，成功引進世界各地，成為水族館中常見的淡水觀賞魚種之一。

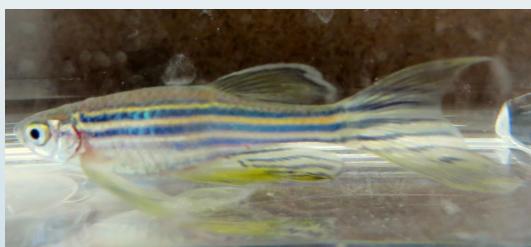


圖 1 斑馬魚 (*Danio rerio*) 身上具斑馬樣之條紋

自 1970 年代後，此種小型魚類開始受到注意，在脊椎動物發生學之胚胎發育、神經發育、細胞凋亡、藥物篩選及毒性測試等研

究中，逐漸成為重要的水生脊椎模式動物 (model animal)。斑馬魚能廣泛應用於不同科學領域，主要因為其具有諸多優點，例如：(1)斑馬魚為體外受精，胚胎透明無色，易於觀察其發育變化過程（圖 2）；(2)成長快速，成熟期短（約 3–6 個月），且繁殖力強，一次可產出 100–300 個卵；(3)體型小（1–1.5 英吋），飼養方便，養殖設備簡單，所需成本較低；(4)胚胎發育快速，且發育機制與哺乳動物相似；(5)具有近似人類的各種器官系統，例如：心臟血管系統、消化系統、神經系統，適合用來研究脊椎動物的胚胎及器官發育；(6)已建立完整的基因資料庫，利於進行基因突變、基因功能和基因轉殖等研究。

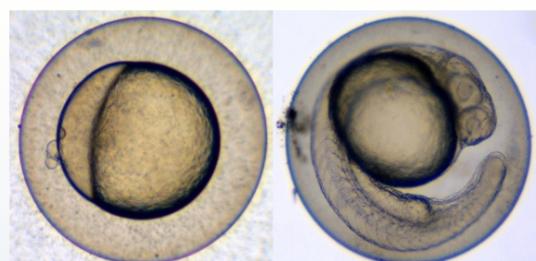


圖 2 斑馬魚胚胎呈透明狀

斑馬魚已成為發育生物學及分子遺傳生物學研究之模式物種，近年來，更廣泛的被應用在生殖毒性 (reproductive toxicity)、發育毒性 (developmental toxicity)、急毒性、神經毒性 (neurotoxicity)、心臟毒性 (cardiotoxicity)、視覺毒性 (ocular toxicity)、內分泌失常 (endocrine disruption)、神經行為毒性 (neurobehavioral toxicity)、肌肉毒性 (vascular toxicity) 及致癌性 (carcinogenicity) 等毒性試驗中 (Hill et al., 2005)。因此，斑馬魚已成為水生生態毒理學上非常重要的研究對象，其能夠敏感地偵測到微量環境污染物

的亞致死毒性，透過觀察魚類行為、活存率、胚胎發育、孵化率以及外部型態發育等，作為毒性終點判斷依據。

生物行為可反映出生理壓迫與生存環境之優劣，當魚類受到環境污染物質的影響，感覺系統接收到緊迫訊息，經由中樞神經系統 (central nervous system) 調控內分泌、代謝、激素及心肺系統等生理機制，最終呈現於魚類的攝食、運動、警戒避敵和生殖等行為上。林 (2010) 指出，將斑馬魚暴露於奈米顆粒二氧化鈦 (濃度 0.1、0.5、1、5 及 10 mg/L) 中，其孵化率、活存率、畸形率皆無顯著差異，但仔魚平均泳速及活動力下降。Smolder (2002) 將斑馬魚暴露於工業污水中，結果導致魚隻的呼吸速率顯著增加，母魚產卵率及受精卵孵化率下降。

雖然魚類行為可作為評估生理及生態之優良毒性指標，但近來在人道團體的呼籲下，開始提倡「人道科學」，避免使用活體進行毒物試驗造成生物的痛苦，加上斑馬魚胚胎呈透明且發育快速等特性，因此，研究學者開始以斑馬魚胚胎取代成魚，甚至利用基因改造魚種進行毒性試驗。Oliveira 等 (2009) 指出，將斑馬魚胚胎暴露於 0.5 mg/L 之三氯沙 (triclosan)，會導致胚胎延遲孵化及仔魚大量死亡。Zhang and Gong (2013) 研究顯示，斑馬魚暴露於神經性毒物 (包括 acetaminophen、atenolo、ethanol、lindane 和 mefenamic acid) 中，皆會降低其活存率、孵化率及心搏率，且造成胚胎不同程度之畸形及變異現象產生，如尾部無分離、無體節、水腫及白化等。另以螢光基因轉殖斑馬魚魚苗 - *Tg (nk × 2.2a : mEGFP)*，利用其螢光蛋白

在中樞神經系統的表現特性，進行神經毒性物質之篩選，相較於一般斑馬魚及胚胎發育之表現型篩選模式，更為快速且具高度敏感性。

香港水中銀 (國際) 生物科技有限公司 (Vitargent)，2015 年於國際三大發明展之一的瑞士日內瓦國際發明展中獲獎的研究題材，即首創利用基因改造青鱈魚和斑馬魚胚胎進行毒理測試，藉由牠們綠色螢光發光程度及胚胎發育情形，來判定是否具有有害物質及毒物含量，可在短時間內 (48–72 小時) 快速篩選 1,000 種毒性物質。此項生物檢測技術不僅能偵測水體環境之有害物質，亦可應用於食品、藥品及化妝品等多個範疇的產品安全檢驗上。在接二連三發生食品安全問題的臺灣，其中包含水產品養殖過程的水體環境、禁藥使用及藥物殘留等問題，使消費者產生購買疑慮，除了藉由水產品安全認證標準、產銷履歷及危害分析重要管制點 (HACCP) 認證等安全管制措施來保障消費者外，亦可透過此項檢測技術，快速且準確的進行各項安全性檢測及風險評估，讓消費者吃得安心。

斑馬魚無論在體型上、飼養及胚胎發育等均具有優勢，已被廣泛的應用於各項研究領域，尤其在聞毒色變的氛圍下，藉由量測其行為、新陳代謝、生理反應、胚胎發育等變化，和使用基因轉殖魚特性進行毒物檢測，使斑馬魚成為了水中最佳的毒物偵測專家。然而，事後毒物檢測並非根本的解決之道，如何降低生態環境污染，減少毒物使用和釋放，以及落實食品安全的觀念，才是真正的治本之道。