

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

建立環境荷爾蒙物質之魚類毒性測試系統

Study of a fish toxicity test system for endocrine disrupting compounds

計畫編號: NSC 90-2313-B-041-003

計畫執行時間: 民國 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人: 陳健民 嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

計畫參與人員: 詹惠齡、梁任賢、陳筱華、張貴香、林怡萍、張喬雯、華偉喬、謝莉芬 嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

一. 中英文摘要

環境荷爾蒙為近年來許多環境學者相當關切之環保問題。這些具有類似生物體內荷爾蒙作用之化學物質可能經由改變內分泌系統平衡而造成人類健康及生態危害。許多研究顯示一般家庭污水及事業廢水可能具仿雌激素之作用並可影響暴露魚類之正常生殖、發育及行為。然而，針對環境荷爾蒙物質對魚類之作用，目前並無較完整之水中生物測試方法。本計畫最主要目的是發展本土性魚種-吳郭魚及青魚將魚之幼期發展階段(early-life stage, ELS)及部份生命週期(partial-life-cycle)毒性試驗模式，以測試環境中此類物質對魚類發育或生殖之影響。

初步結果發現吳郭魚成魚可受環境荷爾蒙物質誘導產生卵黃蛋白先質(VTG)，而青魚將魚僅雌魚有此反應，但其暴露狀況不同。另外青鰐魚魚卵在暴露於較高濃度之nonylphenol時，雖無孵化或存活之影響，但其性別比卻明顯受改變，並產生較多的雌性。另外，青鰐魚成魚暴露於nonylphenol或bisphenol-A時，其產卵量及後代之孵化率及存活率皆受影響，而原雄魚之精巢重量有明顯的改變現象。我們目前正用同樣的暴露模式測試廢污水的仿雌激素作用。

關鍵字: 環境荷爾蒙、吳郭魚、青鰐魚、卵黃蛋白先質、幼期發展階段毒性試驗、部份生命週期毒性試驗

Abstract

Endocrine disrupting compounds (EDCs) are of major concern by environmentalists in recent years due to their potential to alter endocrine systems in human or wildlife leading to reproductive or developmental dysfunction and sequentially ecological damages. Studies showed that different effluents, such as discharges from municipal wastewater treatment plants, were also estrogenic to exposed fish resulted in reproductive, developmental, or behavior alterations. However, at the present, there is no chronic or sub-chronic toxicity test suitable for fish in detecting EDCs in the water system. This study was to develop early-life-stage (ELS) and partial-life-cycle toxicity test systems with the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*) for detection of environmental contaminants with reproductive or developmental effects. We found that some EDCs could induce vitellogenin production in tilapia, but only female medaka exhibited such induction. Results also show that development of medaka embryos were affected by exposed to higher concentrations of nonylphenol. Although this did not lead to an increase of the mortality or affect their hatchability when comparing to controls, the post-hatch survivorship was obviously altered. When the larva continuously exposed to higher concentrations of

nonylphenol, their sex ratio, determined by the notch at dorsal fin, was also skewed to female dominated. The fecundity of adult medaka exposed to nonylphenol or bisphenol was also evaluated in this study. At higher concentrations, females produced much less eggs in total than control after a 45-day or 30-day exposure period; however, the mortality and hatchability of the offsprings was not influenced. Nonylphenol and bisphenol-A also alter the gonad's weight of the male medaka. Currently, we are using the same protocol to study different effluents to determine their estrogenic activity.

Keywords: Environmental Hormones, tilapia, medaka, vitellogenin, early-life-stage (ELS) toxicity test, partial-life-cycle toxicity test

二.緣由與目的

環境荷爾蒙為近年來許多環境學者相當關切之環保問題。這些具有類似生物體內荷爾蒙作用之化學物質可能經由改變內分泌系統平衡而造成人類健康及生態危害。許多研究顯示一般家庭污水及事業廢水如紙漿/造紙廠排放水亦具仿雌激素作用並可影響暴露魚類之正常生殖、發育及行為。然而，針對環境荷爾蒙物質對魚類之作用，目前並無較完整之水中生物測試方法。

經濟合作開發組織(Organization for Economic Development and Cooperation, OECD)曾於1992提出幼期發展階段(early-life-stage, ELS)毒性試驗之標準方法(OECD, 1992)。此法觀察之毒性終點包括:存活率、孵化率、異常發育及行為、體重或長度差異等，但僅能顯示出內分泌干擾物對魚卵或幼魚(larval)發育之影響卻無法提供有關性別或性徵發展及生殖能力等受損之相關訊息。另外，USEPA(1986)

亦曾提出淡水之北美鯽魚及鹹水鯽魚(sheephead minnow, *Cyprinodon variegatus*)之全生命周期毒性試驗之標準方法。雖其觀察的毒性終點與ELS有許多相同處，且包括整體生殖能力之表現(如產卵力、成熟時間等)，但此法仍未包含記錄下代之性別比或雙性化(intersexing)狀況等重要資料，且下代之性發育亦無法評估。Patyna等人(1999)曾提出青魚將魚的多世代及多終點的毒性測試方法，其可涵蓋生化、生理、組織及系統功能(生殖能力)等各方面的作用，似為近年來較有可能成為不同研究機構所採用做為評估環境荷爾蒙對水中魚類影響的測試方法。然而，其應用於田野的調查則仍相當有限。

本計劃之主要目的是建立一經濟、精簡之青魚將魚及吳郭魚中、長期毒性試驗模式，其中包括幼期生命發展階段(ELS)及部份生命周期(PLC, partial-life-cycle)毒性試驗，以構成一研究環境荷爾蒙物質對水中魚類影響的測試系統，並期減少傳統全生命周期(full-life-cycle)方法的冗長試驗時間。目前我們已先初步瞭解一些環境荷爾蒙物質的急毒性，並建立一些測試指標或參數，如魚體內卵黃蛋白先質(vitellogenin, VTG)變化、EROD(cytochrome P4501A1 酵素)、肝體重比、生殖腺體重比、幼體的初期發育、生殖力、下代性別比等，然後再針對特定的環境荷爾蒙物質如phthalates、nonylphenol、bisphenol-A、DDT等進行測試其仿激素之效應。

三.結果與討論

1. 魚卵急毒性

青魚將魚幼體的發育明顯的會受到一些環境荷爾蒙的影響。暴露於濃度為0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/l diethylphthalate的青魚將魚卵，雖然其死亡率及孵化成功率無明顯的劑

量反應關係，但皆有少數幾顆會產生下列不正常的現象：心臟周圍水腫(pericardial edema)、出血(hemorrhage)或淤血現象(homeostasis)、孵化後軀體彎曲而無法伸展、發展緩慢(under-developed)、眼睛色素累積不明顯、眼部未完全發展、卵黃凹陷、不正常油脂堆積等(圖 1)。其中的一些現象進而造成魚體無法如期孵化而死亡，或者孵化後無游動能力而平躺於觀察瓶中，並於數日內死亡。上述畸形現象在對照組的所有魚卵中，則皆未發現。暴露於 0.01、0.1 以及 1.0mg/l 濃度的 2,4-dichlorophenol 的青魚將魚卵，則僅發現有出血及發展緩慢等現象。另外，暴露於 0.01~750 ppb 的 octylphenol 的青魚將魚卵亦產生不同的發育影響。暴露在高濃度者其魚卵畸形率相對提高；而低濃度者其生長時間與對照組之發育情形並無不同。另外，分別暴露於 0.001、0.01、0.05、0.2、0.5mg/l 的 2,4-dichlorophenol 青魚將魚卵，雖然其死亡率和孵化率並無明顯的劑量反應關係，但暴露於最高濃度 500ppb(ug/l)的青魚將魚卵有明顯的畸形、不正常油脂堆積及生長緩慢，而通常在孵化後即死亡。部分暴露於 200ppb(ug/l)之青魚將魚卵亦有不正常油脂堆積現象，孵化後則有腹部腫大(圖 2)，最後並死亡。而在畸形率方面，由低至高濃度則有明顯增加的趨勢。對照組及丙酮溶劑對照組則無不正常發展。暴露於 1、10、50、100、300ppb(ug/l)濃度的 dicyclohexyl phthalate 之青魚將魚卵，有一些不正常的現象如：在 300ppb(ug/l)濃度下有正常的油脂堆積造成魚體腹部腫大，50ppb(ug/l)濃度下則有膽囊腫大且呈深綠色及發展緩慢的現象。其中的一些現象並造成魚體無法孵化而死亡，或孵化後游動能力較差並於 1~2 日內死亡。上述不正常現象在對照組及丙酮溶劑對照組的所有魚卵中皆未發現。

2. 吳郭魚的 VTG 誘導

吳郭魚 VTG 誘導實驗共測試了 3 種化合物，此 3 種化合物分別為 17- β estradiol(E2)、o,p'-DDT 及 nonylphenol(NP)。在各組劑量中，雄魚與雌魚各使用 3 隻。對照組的雄魚在第四天暴露後所取之血清，以西方點墨發現並無 VTG 的表現，但暴露在 5mg/kg 及 30mg/kg 的 17- β Estradiol 兩種不同劑量下的雄吳郭魚，皆出現 VTG，且其高劑量暴露者其含量明顯比暴露在低劑量者為高。對照組的雌魚有微量的 VTG 表現，而暴露在低劑量的雌魚體內 VTG 含量則明顯高於對照組的雌魚。另外，暴露在較高劑量的雌魚其體內 VTG 含量亦比暴露在低劑量者為高。吳郭魚在第七天所取的血清經西方點墨所之分析結果與第四天者相似。對照組雄魚體內並沒有 VTG 的反應。而低劑量的雄魚體內仍有 VTG，但較為減少。暴露在高劑量的雄魚體內也仍有 VTG 的存在，但其含量也低於第四天。在第七天後，對照組的雌魚體內仍有微量的 VTG，而暴露在低劑量者，仍有相當高量之 VTG。暴露在高劑量的雌魚體內，其第七天的 VTG 含量，部份高於第四天者，其於則低於第四天者。

暴露於兩種不同劑量下 5mg/kg 及 30mg/kg NP 之雄吳郭魚，於第四天後所採集的血清可發現 VTG，其中暴露在高劑量的雄魚，僅一隻體內有 VTG 的反應，且含量低於暴露在低劑量的雄魚。暴露在低劑量的雌魚，也僅一隻檢出 VTG，而暴露在高劑量者，卻無 VTG 的表現。暴露後第七天的雄吳郭魚血清中，也僅一隻體內有微量的 VTG 反應，且其 VTG 含量明顯低於第四天。暴露在高劑量的雄魚，其體內均有 VTG 的表現，與第四天者有明顯差異。另外，暴露在低劑量的雌魚體內有 VTG 的存在，但同隻在第四天者則無；暴露在高劑量的雌魚體內有 VTG 的存在，但同隻於第四天者亦未

測出 VTG。

o,p'-DDT 暴露劑量為 5mg/kg 之吳郭魚肝臟中(第四與第七天血清樣本無法取得)可發現 VTG 的含量,而暴露在 30mg/kg 劑量的雄魚,也可測出 VTG,此含量與低劑量者相當。暴露在低劑量的雌魚皆有 VTG 的表現,但暴露於高劑量者,卻僅有微量的 VTG。有關此部份的結果總結如下:

- a. 經藥物暴露後,大部分的吳郭魚體內都可檢測出 VTG,並隨著劑量的增加,其體內的 VTG 含量亦增加。
- b. 於不同暴露天數(四天與七天)後所取的樣品中 VTG 含量通常是第七天者較第四天者為低。

3. ELS 試驗

在此階段的工作,我們將魚卵暴露於低於致死濃度的 nonylphenol 中。實驗結果數據顯示,在魚卵孵化過程中,對照組與暴露組的死亡率與孵化率並無明顯的劑量反應關係,但 0.1ppb~50ppb 壬酚暴露組,其孵化後仔魚的存活率有明顯的下降(表 1)。0.1ppb~50ppb 濃度之部份青鱈魚卵有油滴堆積現象、生長遲緩、眼部發育不正常、出血、卵黃凹陷等不正常的發展狀況;而空白對照組與丙酮對照組之胚胎並無不正常的發展現象。

在性別比例方面,以顯微鏡觀察青鱈魚的背鰭以判斷其性別所得之結果,我們發現暴露於 1ppb~50ppb 濃度得魚卵,其發展成雌魚之比例與對照組相較後,有較高的趨勢(表 1)。

4. PLC 試驗

在本階段之工作中,我們將總計有 30 隻含雄與雌之青鱈魚暴露在濃度 0.1、1、10、50 ppb 的 NP 中後發現:暴露於濃度 1 ppb 之青鱈魚總產卵量與對照組比較下並無明顯的差異(對照組:661 顆;1 ppb:695 顆);而暴露於濃度 0.1 ppb 者的總產卵量僅 488 顆,較對照組低,可能是由於在實驗過程中

母魚死亡數過多之故。暴露於 10 ppb 及 50 ppb NP 之青鱈魚總產卵量和對照組比較下皆有明顯的降低(10 ppb:283 顆,50 ppb:233 顆),由此可知暴露較高濃度之 NP(10 ppb 與 50 ppb)的青鱈魚受到 NP 的影響,使產卵量減少(圖 3)。另外,在實驗過程中,我們取出暴露於 0.1, 1, 10, 50 ppb NP 青鱈魚在第 15、30、45 天所產的卵做進一步的培養,以觀察孵化情形。結果發現:暴露在各濃度中之青鱈魚,在第 15 天所產的卵其孵化率與對照組比較下並無明顯的差異(對照組孵化率:58%;0.1ppb 孵化率:50%;1ppb 孵化率:43%;10ppb 孵化率:46%;50ppb 孵化率:46%),而暴露第 30 及第 45 天各組所產下的卵,在培養過程中,由於發霉的因素造成魚卵死亡,所以無法確切的比較各濃度間孵化率的差異。

在此實驗結束後(連續暴露 45 天),我們將魚體解剖取出生殖腺與肝臟,以瞭解生殖腺重量的變化情形,並以生殖腺體重比(GSI)值表示。在和對照組比較下,結果發現:暴露於濃度 0.1、1、10、50ppbNP 中之雄青鱈魚之 GSI 值有明顯較小的現象(圖 4),而雌魚間之 GSI 值並無明顯的差異。

在此階段實驗中,在 VTG 之誘導方面,對照組與各暴露組之雄魚皆無 VTG 的反應(圖 5)。對照組雌魚有微量的 VTG,但 nonylphenol 暴露濃度為 0.1ppb 者並沒有測出 VTG;而暴露在濃度 1 ppb、10 ppb、50 ppb 者皆有 VTG 的反應,且有明顯之劑量與反應關係。

我們也以前述之同樣方法測試另一種環荷爾蒙 bisphenol-A,而所得之結果則與 nonylphenol 類似,既減少母魚之產卵量、魚卵孵化率明顯降低、雄魚精巢體重改變等影響。(圖 6、7)。但針對個體之 VTG 表現,暴露於不同濃度之雄魚並未如預期的有被誘導的現象發生(圖 8),此結果與 nonylphenol 相似。

總括我們的研究結果如下:青鱈將魚在暴露於接近環境中濃度的環境荷爾蒙物質時(主要是 nonylphenol, 丁望賢, 2000), 其成體的生殖能力與幼體的發育生長皆會受到影響。這些結果與其他使用同一魚種的許多研究報告相近(Foran et al., 2000、Shioda and Wakabayashi, 2000、Koger et al., 2000)。但以 VTG 之表現做為暴露指標則未如預期, 原因可能是暴露時間過長所產生之適應結果。相對而言, 吳郭魚的 VTG 同時對兩種的環境荷爾蒙(DDT 與 nonylphenol, 另包含 17 β -estradiol 做為正對照組)的短時間暴露皆有反應, 惟其相對應生殖影響的評估並未包含於本計畫工作中。

四. 計劃成果自評

以下幾點說明本計劃執行上與原計劃出入或缺失之處以及原因的探討:

1. 青鱈將魚與吳郭魚的 EROD 活性測定因儀器故障之故, 未能於第一時間(微粒體取得之三日之內)完成, 因此無相關數據。未來須注意樣本之低溫保存。
2. 青鱈將魚由於體型較小, 無法取得血液樣本以進行 VTG 之測定, 而必須由肝臟中分離後在檢測。目前我們已可將青鱈將魚之數量降低至三隻即可取得足夠之肝臟做為 VTG 分析之用, 減少動物犧牲之數量。但值得一提的是吳郭魚可直接抽血檢測而不須犧牲活體。
3. 未來研究工作將對都市或特定工廠廢污水之仿雌激素作用進行判定。

五. 參考文獻

OECD, Organization for Economic

Development and Cooperation. 1992. Fish, early-life stage toxicity test. Organization for Economic Development and Cooperation, Guideline for testing of chemicals No.210. Paris France: OECD.

Patyna PJ, Davi RA, Parkerton TF, Brown RP, Cooper KR, 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Sci Total Environ.* 233:211-220.

USEPA, US Environmental Protection Agency. 1986. Fish life-cycle toxicity tests. USEPA Standard Evaluation Procedure. EPA 540/9-86-137.

Koger CS, The SJ, Hinton DE. 2000. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol or testosterone. *Mar Environ Res.* 50:201-206.

Shioda T, Wakabayashi M. 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 40:239-243.

Foran CM, Bennett ER, Benson WH 2000. Exposure to environmentally relevant concentrations of different nonylphenol formulations in Japanese medaka. *Mar Environ Res.* 50:135-139.

丁望賢、吳建誼。2000。環境荷爾蒙-壬基苯酚與雙酚 A 在台灣水環境中之分析與流布調查。環境檢驗雙月刊 33:12-21。

圖 1. 青鱈將魚魚卵在包心處(箭頭所指)有明顯之出血現象。

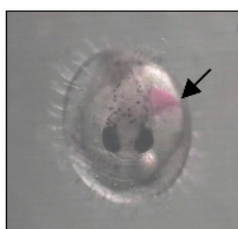


圖 2. 青鱈將魚魚卵在包心處(箭頭所指)有明顯之水腫現象。

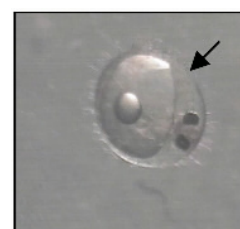


圖 3. 暴露在各濃度 nonylphenol 青魚將魚之總產卵量

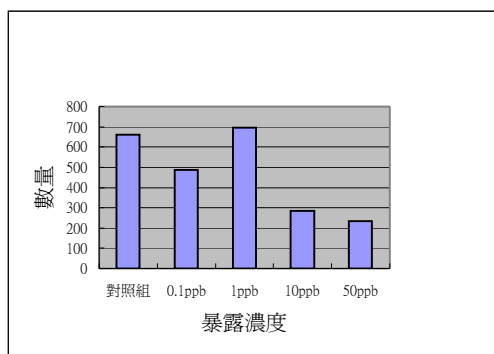


圖 4. 暴露在各濃度 nonylphenol 之雄青魚將魚 GSI 值與標準偏差

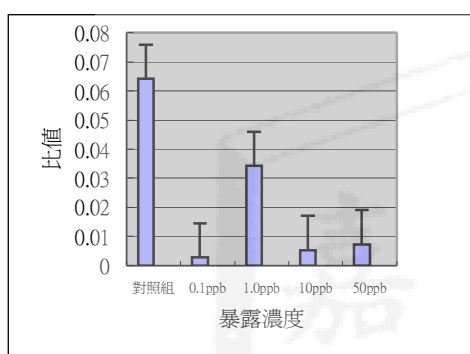


圖 5. 暴露於 nonylphenol 之青魚將魚肝臟內 VTG 的表現(1 為對照組雄魚, 2 為對照組雌魚, 3 為 0.1ppb 的雄魚, 4 為 0.1ppb 的雌魚, 5 為 1ppb 的雄魚, 6 為 1ppb 的雌魚, 7 為 10ppb 的雄魚, 8 為 10ppb 的雌魚, 9 為 50ppb 的雄魚, 10 為 50ppb 的雌魚)

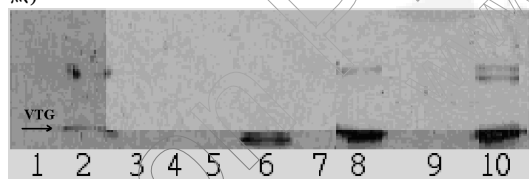


圖 6. 暴露在各濃度 bisphenol-A 青魚將魚之總產卵量

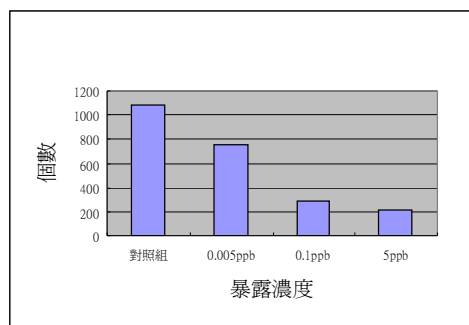


圖 7. 暴露在各濃度 bisphenol-A 之雄青魚將魚 GSI 值與標準偏差

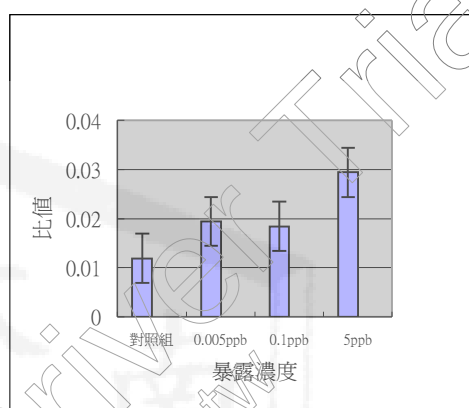


圖 8. 暴露於 bisphenol-A 之青魚將魚肝臟內 VTG 的表現(1 為 marker, 2 為對照組雄魚, 3 為對照組雌魚, 4 為暴露在濃度 0.005 ppb 的雌魚, 5 為暴露在劑量 0.005 ppb 的雄魚, 6 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雌魚, 7 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雄魚, 8 為暴露在劑量 5 ppb 的雌魚, 9 為暴露在劑量 5ppb 的雄魚)

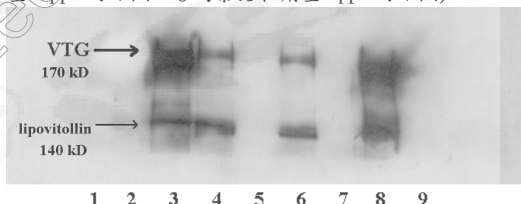


表 1. 青魚將魚暴露於低濃度之 nonylphenol 對其存活、孵化、孵化後存活、性別比之影響(D%：死亡率、H%：孵化率、S%：孵化之仔魚存活率)

濃度 ppb	D%	H%	S%	性別比例	
control	3.9%	96.1%	92%	52%	48%
control+acetone	16.7%	83.3%	80%	55%	45%
0.1	7.4%	92.6%	56%	雄 48%	雌 52%
1	7.0%	93.0%	56%	42%	58%
10	11.5%	88.5%	52%	35%	65%
50	11.0%	89.0%	60%	32%	68%