

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 建立環境荷爾蒙物質之魚類毒性測試系統(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-041-008-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

計畫主持人：陳健民

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 5 月 29 日

# 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(1/2)

### Study of a fish toxicity test system for endocrine disrupting compounds (1/2)

計畫編號: NSC 91-2313-B-041-008

計劃執行時間: 民國 91 年 8 月 1 日至 92 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: 蘇于菁 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，目前雖有水中生物測試方法，但往往費時、費工。因此本計畫最主要目的是使用已開發的快速檢驗組來測試環境荷爾蒙物質對魚體的影響，以瞭解其可行性為何？

第一年計畫是延續去年的工作，主要工作之一是利用不同業者所開發出的酵素免疫法 ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) 來檢測卵黃先驅蛋白質在雄魚體內的含量；另一工作是將本實驗室所建立的檢測方法應用於實際測試環境水樣的仿雌激素活性。雖然實驗進度受隔壁實驗室火災而有所延誤，但仍完成部分工作。針對 ELISA 檢測法的測試工作結果顯示兩種不同來源的檢測組皆有良好的檢量線關係，而所測試的青將魚肝臟細胞質液樣本所得的結果也相近，顯示此兩組檢測組具相當的準確度及可靠度，可考慮做為未來相關生物檢測工作的主要工具。

**關鍵字:** 環境荷爾蒙、青將魚、卵黃蛋

白先質、酵素免疫法

#### 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. Although at the present, there is chronic or sub-chronic toxicity test suitable for fish in detecting EDCs in the water system, these protocols are either expensive or labor intensive, or both. This study was to test two bio-analytical kits developed by two companies for determination of effects of these chemicals on Japanese medaka (*Oryzias latipes*), and to evaluate their applicability of both products.

One of the objectives of this project is to utilize commercialized bio-analytical screening kit (ELISA assay) to determine vitellogenin, an inducible protein by environmental estrogens, in fish. The other objective is to apply different bioassays for xenoestrogens established in our laboratory on samples collected from fields. Due to a fire accident occurred neighbor laboratory,

which damaged some of our equipments and experiment setups, our experiment had been hampered, but still there was some results. Results showed that these two kits could establish good antigen concentration dependent relationship. After quantification, VTG concentrations in the fish serum samples using two kits were similar. This indicates accuracy and reliability of the products. These two kits can be considered as a bio-analytical tool for future works.

**Keywords:** Environmental Hormones, Japanese medaka, vitellogenin, ELISA

## 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，雖然已有許多以發展出的水中生物測試方法，但大多費時、費工。這些方法有由經濟合作開發組織 (Organization for Economic Development and Cooperation, OECD) 的幼期發展階段(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鱖魚及鹹水鱖魚(sheephead minnow, *Cyprinodon variegatus*)之全生命週期毒性試驗之標準方法，主要觀察的毒性終點包括整體生殖能力之表現(如產卵力、成熟時間等)。Patyna 等人(1999)

曾提出青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。在這些方法當中，有使用卵黃先驅蛋白作為觀察的生物指標。

卵黃蛋白先質(vitellogenin, VTG)為雌魚體內受雌激素作用後所產生的蛋白質。一旦在肝臟被製造出後，VTG 將被運送至卵巢並被分解為卵黃。雄魚體內由於僅有極為微量的雌激素，因此其應不具有卵黃蛋白先質於其體內。許多文獻皆指出暴露於環境荷爾蒙物質能導致雄魚體內卵黃蛋白先質的發生並被檢測出。Purdom 等人(1994)將未成熟之彩虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)及鯉魚(*Cyprinus carpio*)置於都市廢水處理廠廢水排放口之箱網中，並發現其體內之卵黃蛋白先質(VTG)被明顯的提高。Harries 等人(1996)亦指出置於都市廢水處理廠排放水下游之箱網中養殖三周的彩虹鱒體內 VTG 同樣有升高之現象。而都市廢水中所含之 alkylphenol ethoxylates 及其衍生物則被認為是對魚類產生微弱雌激素作用之主要化合物(Jobling and Sumpter, 1993)。因此，VTG 的誘導可做為魚類暴露於環境雌激素物質的生物指標。本計畫主要結合不同種類的魚毒試驗發展適合本土的環境雌激素測試系統，並將其利用於實際測試環境水樣。現階段主要工作包括以生物技術業者所開發出的快速生物蛋白質檢測組(assay kit)來分析 VTG 含量，並與傳統的西方點墨法所得之結果進行比對。

本計畫將青將魚(原計畫使用吳郭魚，但應無相對應的 ELISA 檢測組而改用青將魚)連續暴露於 nonylphenol 與 bisphenol-A 中共計有 30 天，然後取其

肝臟細胞加以分析。前述的快速檢測組是以以 ELISA(酵素連結免疫吸附法, enzyme-linked immunosorbent assay)為主要原理, 方法與步驟已於原計畫書中有詳細說明, 不在此贅述。

### 三.結果與討論

由於本系所屬一實驗室於今年 3 月底不幸發生火災意外, 也不幸波及本實驗室(剛好在該實驗室隔壁), 造成本實驗室內部分儀器、實驗器具與設備的毀損。再加上電力及供水的中斷所造成的魚群損失, 以致造成原正進行的實驗的中斷, 以及計畫所預定時間表的延誤。以下略述在意外事件前所完成工作及成果。

#### 1.西方點墨法

青將魚 VTG 誘導實驗共測試了 2 種化合物, 分別為 nonylphenol (NP) 與 bisphenol-A。圖一與二為青將魚肝臟中 VTG 含量的表現。對照組與各暴露組之雄魚對 nonylphenol 皆無 VTG 的反應(圖一)。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。暴露於不同濃度 bisphenol-A 之雄魚並未如預期的有被誘導的現象發生(圖二), 此結果與 nonylphenol 相似。

#### 2.ELISA

我們以挪威 Biosense 以及日本 Transgenic 公司的 ELISA kit 檢測暴露於 nonylphenol 雌魚體內的 VTG。兩組檢測組的檢量線如圖三與圖四所示, 皆有相當好的線性關係。經檢量線推估所求得不同暴露組的 VTG 含量如表一所示, 其中兩公司檢測組的分析結果相似, 僅有在較高濃度時有較明顯的差異。由本實驗結果可知此兩產品皆有極佳的準確度及可靠度, 而在操作及使用上皆相當快速及簡易。因此, 若能善加利用此類產品, 並多應

用於實際的田野工作上, 在未來對相關評估調查工作上的進行將有莫大的助益, 不僅能降低分析成本、檢測時間, 並能兼顧環境分析所需的精準度以及對低濃度樣本的敏感度。

### 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.原預定進行的環境水樣因火災意外事故而致中斷。另外多數對溫度敏感的生物試劑或抗體也因停電而失效, 因此此次本實驗室經歷此次意外損失可為慘重。唯一值得慶幸的是實驗室內培育多年的青將魚多數仍存活。近期首要工作需先行將魚群數量增加。
2. ELISA kit 測試結果相當良好, 未來可多利用此類檢測組。
- 3.未來研究工作重點(第二年計畫)將對都市或特定工廠廢污水之仿雌激素作用進行測試, 以及發展以初級肝培養細胞作為檢測之工具。

### 五.參考文獻

- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, Ryecroft R, Sumpter JP, Tyløe T. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1993-2002.
- Jobling S and Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27:361-372.
- Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut Bull.* 34:34-41.
- 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.

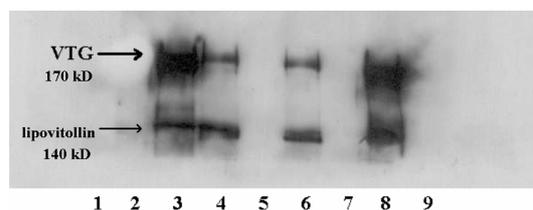
Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Eco.* 8:275-285.

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

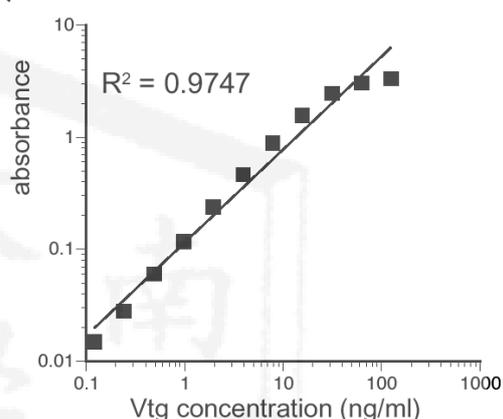
圖一. 暴露於nonylphenol之青鱗魚肝臟內 VTG 的表現(1 為對照組雄魚, 2 為對照組雌魚, 3 為 0.1ppb 的雄魚, 4 為 0.1ppb 的雌魚, 5 為 1 ppb 的雄魚, 6 為 1 ppb 的雌魚, 7 為 10ppb 的雄魚, 8 為 10ppb 的雌魚, 9 為 50ppb 的雄魚, 10 為 50ppb 的雌魚)



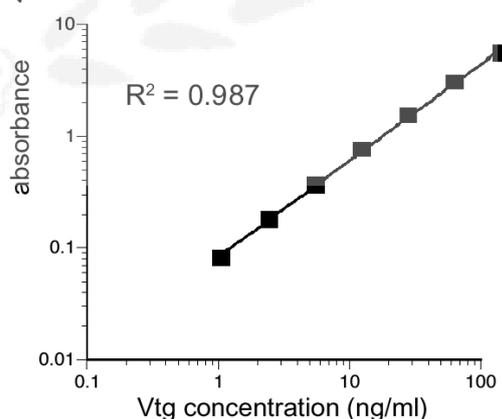
圖二. 暴露於bisphenol-A之青鱗魚肝臟內 VTG 的表現(1 為 marker, 2 為對照組雄魚, 3 為對照組雌魚, 4 為暴露在濃度 0.005 ppb 的雌魚, 5 為暴露在劑量 0.005 ppb 的雄魚, 6 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雌魚, 7 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雄魚, 8 為暴露在劑量 5 ppb 的雌魚, 9 為暴露在劑量 5ppb 的雄魚)



圖三. Biosense ELISA kit 標準品檢量線



圖四. Transgenic ELISA kit 標準品檢量線



表一、以 Biosense 與 Transgenic 檢測組所測之青將魚肝臟中所含 VTG 含量

| Bisphenol-A 濃度(i g/l) | Biosense (ng/ml) | Transgenic (ng/ml) |
|-----------------------|------------------|--------------------|
| 對照組                   | 7.9              | 16.3               |
| 0.1                   | 4.3              | 8.9                |

---

|    |       |       |
|----|-------|-------|
| 1  | 25.8  | 25.6  |
| 10 | 53.5  | 77.4  |
| 50 | 126.2 | 150.9 |

---

