

中文摘要

美國環保署於2012年開始運作Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)，計劃篩選85,000種新化合物確認是否有內分泌干擾效應，達成毒性預報的目標。生物分析法為一種被廣泛應用於污染物之篩檢工具，其快速且操作容易，可分析複雜化學混合物中的總毒性效應。因此，本研究目的為建立高通量篩選工具(HTS assays)，包含致癌性篩選平台(p53 bioassay)、綜合毒性篩選平台(ATP biosassay)、芳香族化合物毒性篩選平台(Ad-DR bioassay)及雌激素毒性篩選平台(T47D-KBluc assay)，可分析土樣品中環境化學品之毒性，並進一步進行風險評估。本研究土壤樣品位於高雄市某受重油品污染之區域，已完成30件次化學法分析與140件次四種HTS分析測定。本研究結果顯示，污染程度較高之土壤樣本其有機相平均細胞存活率為83%，顯著低於其他三種土壤樣本(低污染、輕微污染與背景土樣)，且與BTEX化合物均呈現負相關，但未達顯著；無論在有機相或無機相受污染土壤樣本所誘發之DNA損傷顯著高於背景土樣($p=0.002$)；戴奧辛與Non-Dioxin AhR濃度範圍分別為ND~1.50 pg BEQ/g d.w.與ND~29.7 pg BEQ/g d.w.，3種BTEX(苯、乙本與二甲苯)均與Non-Dioxin AhR數據呈現顯著正相關($p<0.05$)，在TPH方面則有邊緣顯著之現象($p=0.071$)；僅於有機相中檢測出微量之雌激素效應，部分樣本其濃度均低於本研究偵測極限。本研究已建立毒性預報系統流程圖，並遵循污染物指紋鑑定之概念，建立受油品污染土樣之生物指紋圖，後續應用本系統針對未知樣本測試時，可快速評估該地是否遭受油品污染之情形。

英文摘要

The Environmental Protection Agency (EPA) began the implementation of Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) in 2012 which aims to screen 85,000 new compounds for potential endocrine disrupting effects and tox-cast targets. Bioassays are becoming increasingly attractive screening tools due to the relative speed and ease of analysis, and can provide an integrated measure of toxicity potency in complex chemical mixtures. Therefore, the aim of this study is to establish high-throughput screening assays (HTS assays) including the carcinogenicity pathway (p53 bioassay), cytotoxicity (ATP biosassay), aryl hydrocarbon receptor pathway (AhR bioassay) and the estrogen receptor pathway (ER bioassay) to screen for toxicity of environmental chemicals and to do further risk assessment in soil samples. Thirty (30) and One hundred forty (140) samples were analyzed on GC/FID and four HTS assays, respectively which were located in a heavy oil pollutant area in Kaohsiung city. Compared to other samples in our study, our results showed low cell survival rate (83%) in samples heavily polluted with oil. In addition, Negative correlations of cell survival rate and BTEX pollutants were observed in whole samples. Significant increase in DNA induced damage were incurred in pollution soils either in the organic or inorganic extraction fractions. The range of dioxin and Non-Dioxin AhR luciferase responses are ND~1.50 pg BEQ/g d.w and ND~29.7 pg BEQ/g d.w. which was observed with positive correlation and marginal positive correlation with three BTEX compounds namely: benzene, ethyl benzene and dimethylbenzene and TPH. Notably, very low estrogenic activity was observed in organic fraction and most sample concentrations were lower than limit of detection. In conclusion, the toxicity report system based on four HTS assays have been established and to be able to make a bioassay fingerprinting of soil heavily contaminated with oil to further assess and evaluate on unknown soil samples.

目錄

(一)	前言	1
(二)	研究目的	5
(三)	文獻回顧	7
3-1	場址公告資料	7
3-1-1	場址沿革及營運現況	7
3-1-2	場址曾實施之土壤及地下水調查與措施	10
3-1-3	該場址曾執行之污染改善措施	11
3-2	環境荷爾蒙	11
3-3	環境荷爾蒙的一般分類	11
3-4	高通量篩選工具	17
3-4-1	綜合毒性篩選平台	17
3-4-2	致癌性篩選平台	18
3-4-3	芳香族化合物毒性篩選平台	18
3-4-4	雌激素毒性篩選平台	19
(四)	研究方法與過程	21
4-1	土壤採樣	21
4-2	儀器與材料	25
4-2-1	試劑與藥品	25
4-2-2	儀器與設備	27
4-3	樣品前處理	27
4-3-1	索氏萃取	27
4-3-2	減壓濃縮	28
4-3-3	矽膠管柱與酸性鋁管柱流程	28

4-3-4 樣品溶劑轉換	28
4-4 化學分析法	29
4-5 生物分析法	29
4-5-1 綜合細胞毒性分析 Cytotoxicity ATP bioassay	29
4-5-1-1 ATP bioassay 原理：	30
4-5-1-2 H4IIE 細胞培養與種殖細胞	31
4-5-1-3 ATP bioassay 樣品暴露及偵測	32
4-5-2 致癌毒性分析 p53 bioassay	33
4-5-2-1 p53 bioassay 原理：	33
4-5-2-2 Hela 細胞培養與種殖細胞	33
4-5-2-3 DNA 損傷樣品暴露及偵測	35
4-5-3 芳香族化合物毒性篩選平台 Ad-DR bioassay	36
4-5-3-1 Ad-DR bioassay 生物分析法原理	36
4-5-3-2 H4IIE 培養基配置	38
4-5-3-3 H4IIE 細胞培養與種殖細胞	40
4-5-3-4 腺病毒感染	41
4-5-3-5 Ad-DR bioassay 標準品及樣品暴露(檢量線)	41
4-5-4 雌激素毒性分析 T47D-KBluc assay	42
4-5-4-1 T47D-KBluc assay 原理	42
4-5-4-2 T47D-KBluc 細胞之培養基配置	42
4-5-4-3 T47D-KBluc 細胞之繼代培養及種殖	43
4-5-4-4 T47D-KBluc 細胞種殖	44
4-5-4-5 標準品及樣品暴露	44
4-5-4-5 冷光值單位轉換	45

4-6 品保品管(QA/QC).....	46
4-6-1 化學分析法 QA/QC.....	46
4-6-2 生物分析法 QA/QC.....	47
4-6-2-1 Ad-DR bioassay	47
4-6-2-2 P53 bioassay、ATP bioassay 與 T47D-KBluc assay.....	47
4-7 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	48
(五) 結果與討論	51
5-1 土壤樣品之化學分析	51
5-2 ATP bioassay 方法測試評估	52
5-2-1 土壤中綜合細胞毒性	53
5-3 致癌性篩選(P53 bioassay)	55
5-4 芳香族碳氫化合物分析	57
5-4-1 最佳實驗參數建立	57
5-4-2 土壤中芳香族碳氫化合物濃度評估	60
5-5 雌激素毒性分析	63
5-6 毒性預報系統評估	66
5-7 結論與建議	69
(六) 參考文獻	70
附錄	82

圖目錄

圖 3-1、加油站環境現況	8
圖 3-2、加油站平面圖	9
圖 4-1、實驗流程架構圖	21
圖 4-2、現場土壤採樣作業情形	22
圖 4-3、土壤樣品前處理流程圖	29
圖 4-4、ATP assay 作用原理示意圖	30
圖 4-5、細胞繼代培養步驟	31
圖 4-6、H4IIE 細胞種殖步驟	32
圖 4-7、ATP bioassay 分析步驟	32
圖 4-8、8-OhdG 作用原理示意圖	33
圖 4-9、HepG2 細胞繼代培養步驟.....	34
圖 4-10、HepG2 細胞種殖步驟.....	35
圖 4-11、ELISA 檢測法流程	36
圖 4-12、轉殖 DRE-luciferase reporter 載入 Adenovirus 載體.....	37
圖 4-13、Ad-DR bioassay 作用原理示意圖.....	37
圖 4-14、MEM 培養基配置.....	39
圖 4-15、細胞繼代培養步驟	40
圖 4-16、H4IIE 細胞種殖步驟	41
圖 4-17、2,3,7,8-TCDD 檢量線暴露.....	42
圖 4-18、T47D-KBluc assay 作用機制	42
圖 4-19、RPMI1640 培養基配置	43
圖 4-20、T47D-KBluc 細胞馴養步驟	44
圖 4-21、T47D-KBluc assay 分析步驟	45

圖 5-1、ATP assay 評估乙醇毒性劑量反應圖	53
圖 5-2、P53 bioassay 測試 8-OHdG 劑量反應曲線	56
圖 5-3 受污染與背景土壤樣本中 8-OHdG 之濃度	57
圖 5-4、比較不同病毒 MOI 參數之檢量線反應(1/2)	59
圖 5-5、比較不同病毒 MOI 參數之檢量線反應(2/2)	60
圖 5-6、化學分析法與 AhR-mediated 之相關性 (A)苯(B)乙苯 (C)二甲苯 (D)甲苯 (E) TPH	62
圖 5-7、T47D-KBlucassay 測試 E ₂ 劑量反應曲線	64
圖 5-8、高通量篩檢法毒性預報	67
圖 5-9 油品污染土壤樣本生物分析法指紋圖	68

表目錄

表 3-1、場址公告資料	7
表 3-2、加油站歷次調查及改善作業流程	10
表 3-3、日本 1998 年公布 66 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	13
表 3-4、美國 2009 年 4 月 15 日公布第一階段最終篩選清單 67 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	14
續表 3-4、美國 2009 年 4 月 15 日公布第一階段最終篩選清單 67 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	15
表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	15
續表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	16
續表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單	17
表 4-1 採樣點 S1 樣點紀錄表	23
表 4-2 採樣點 S1 樣點紀錄表	23
表 4-3 採樣點 S3 樣點紀錄表	24
表 4-4 採樣點 S4 樣點紀錄表	24
表 4-5 採樣點 S5 樣點紀錄表	25
表 5-1、土壤樣品中 BTEX 與 TPH 濃度	52
表 5-2、土壤樣品中細胞存活率分析	54
表 5-3 土壤樣品中細胞存活率與化學分析之相關性統計 (Spearman's rho)	55
表 5-4、比較不同病毒 MOI 參數平均檢量線 RSD 值(%)	58
表 5-5、比較不同病毒 MOI 參數 EC ₅₀ 與 LOD	58
表 5-6 土壤樣本中 AhR-mediated、戴奧辛與 Non-Dioxin AhR 活性反應	63

表 5-7、油品污染土壤之雌激素毒性當量	65
表 5-8、背景土壤中雌激素效應濃度	66
附表 7-1、受污染與背景土壤樣本中 8-OHdG 濃度(ng/mL).....	82
附表 7-2、T47D-kbLuc assay 土壤樣本偵測極限(LOD)與定量極限(LOQ).....	82

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

(一) 前言

環境荷爾蒙物質的檢測有兩個方向，一個方向是超微量檢測，另一個方向是大量且快速得知有那些環境荷爾蒙存在待檢樣品中。過去擁有這兩個方向，才有辦法及時且精確推測環境荷爾蒙對人體健康及環境的影響。然而，本專案計畫將使用四種細胞進行環境荷爾蒙的體外試驗(in-vitro)，直接推測土壤中的毒物對人體健康的潛在危害並且兼顧精確性，該概念與美國環保署於 2012 年開始執行的 Endocrine Disruptor Screening Program 計畫相仿。自斯德哥爾摩公約(Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants)發布以來，環保署密切關注環境荷爾蒙(Environmental hormone)在環境中的流佈與對人體健康的影響。環境荷爾蒙可干擾人體及其他動物的內分泌系統的運作(Kavlock et al., 1996)，但在許多情況中，卻不容易確認環境荷爾蒙與人體健康及生態效應(Ecological effects)間的因果關係。研究報告指出，在人類母乳及野生動物的體內可觀察到例如多氯聯苯(polychlorinated biphenyl, PCBs)或有機氯農藥(organochlorine pesticides)及戴奧辛(Dioxins)的生物累積(Jobling et al., 2012; Shy et al., 2012)，其中環境荷爾蒙對野生動物的雌激素效應(Estrogen)被廣為報導，母乳中的環境荷爾蒙也被報導與女生月經週期並可能影響下一代的智力發展(Bigsby et al., 1999; Chandrasekar et al., 2011; Cooper and Kavlock, 1997; Mahoney and Padmanabhan, 2010; Shy et al., 2011)。

1996 年，美國食物品質保護法案(Food Quality Protection Act)(FQPA, 1996)及安全飲用水法(Safe Drinking Water Act)(SDWA, 1996)，規範美國環保署於 1999 年前制訂並落實環境荷爾蒙的篩選計畫程序(Screening program)。該篩選程序包括確認所有農藥製劑的主要成分與其他成分是否有雌激素的生物累積作用，該篩選程序可提供人類從飲用水中獲得的污染物雌激素暴露程度。爾後，美國環保署擴大篩檢範圍，從雌激素效應增加雄激素(Androgen-hormone systems)及甲狀腺激素(Thyroid-hormone systems)檢測。總共有上萬種化學物質進行上述三種環境荷爾蒙效應的篩檢，其中包括農藥、非農藥食品添加劑、化妝品或營養補充劑。為了篩選這樣龐大數量的化學物質，美國環保署應用在藥物篩選常見的高通量篩選工具對這些物質進行檢測。在 2007 年展開 Tox21 計畫，並在 2012 年推動以 Tox21 為核心的 Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)作為回應。EDSP 計畫前後包含兩個階段，總共要求化學品製造商提供化學物質的生物體內(In vivo)與生物體外(In vitro)的評估數據，第一階段為細胞篩試，包含呈現所有可與內分泌機制或途徑有交互作用的評估數值，尤其是對可能干擾與破壞雌激素、雄激素與甲狀腺激素途徑的呈陽性篩選結果的化學品，這些陽性反應化學品須進入到第二階段作進一步的檢測(U.S. EPA, 2011)。EDSP 的第二階段是生物體毒性試驗，包含 24

個月的日本鵪鶉兩代毒性試驗(Japanese Quail two-generation toxicity test)、24 個月的青鱗魚單代成長繁殖試驗(Medaka extended one-generation reproduction test)、24 個月的兩棲類幼蟲成長與發展試驗(Larval Amphibian growth and development test)與 48 個月的生殖與生育力影響試驗(Reproduction and Fertility Effects) (U.S. EPA, 2015)。EDSP 計畫總共篩測 8,5000 種環境化學物質，若以過去的作法，需要耗費大量時間與經濟成本及眾多的動物資源才可能完成，因此以 EDSP 高通量工具進行的環境化學物質篩試，將是美國環保署未來進行相關實驗時的主要方法(U.S. EPA, 2011)。

本研究計畫應用類似美國 EDSP 第一階段計畫中的細胞高通量篩選工具，對受油品污染與未受污染的土壤進行四種環境荷爾蒙效應的快速檢測，本研究目標為環境荷爾蒙的高通量化前瞻性試驗。本計畫預定檢測土壤中的致癌性、綜合細胞毒性、雌激素與芳香族碳氫化合物毒性。依據台灣土壤及地下水污染整治場址環境影響與健康風險評估辦法第四條：「評估受體暴露各種關切污染物之總致癌風險」，本研究使用可對環境樣品總致癌性產生反應的報導基因法系統-P53 bioassay，進行致癌性篩檢，並測試細胞急毒性的 ATP bioassay 系統，並初步評估與生物體內急毒性的關係。本團隊曾應用細胞染色法探討 P53 與肺癌之間的關係並發表 SCI paper-Pulmonary CYP2A13 levels are associated with early occurrence of lung cancer—Its implication in mutagenesis of non-small cell lung carcinoma (Chiang et al., 2013)。此外，應用本研究團隊開發之 Ad-DR bioassay 篩測土壤中總芳香族碳氫化合物毒性(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)，Ad-DR bioassay 系統在過去與環保署合作之下已產出四篇 SCI 學術論文：2011 年初步應用於土壤底泥的檢測上，解釋力可達顯著的 0.962-Fast Cleanup System Combined with a Dioxin-responsive Element-driven Luciferase Bioassay for Analysis of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins/furans in Sediments and Soils (Chao et al., 2011)；2013 年應用於高污染場中的魚蟹類生物檢測-Use of a highly sensitive recombinant hepatoma cell method to determine dioxin concentrations in samples of fish and crab from a hotspot area (Lin et al., 2013)；2015 年發表敘述 Ad-DR bioassay 發展過程的論文-Reliable and sensitive adenovirus-based reporter system for high-throughput screening of dioxins (Chiang et al., 2015)；2016 年應用於土壤中戴奧辛濃度篩測-An AhR-luciferase adenovirus infection system for rapid screening of dioxins in soils (Shy et al., 2016)。在戴奧辛毒物偵測方面，本研究團隊除了應用 Ad-DR bioassay 系統，過去也曾運用人類肝腫瘤細胞株的戴奧辛偵測系統 Huh7-DRE-Luc cells 發表四篇 SCI 論文，如 2006 年檢測無機化合物:偏亞砷酸鈉(NaAsO_2)抑制戴奧辛的 P450 反應 -Arsenic inhibits induction of cytochrome P450 1A1 by

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatoma cells (Chao et al., 2006) ; 2007 年發現檳榔鹼(Arecoline)可以抑制人類肝腫瘤細胞的 CYP1A1 活性(CYP1A1 與戴奧辛毒性作用有關)-Differential effect of arecoline on the endogenous dioxin-responsive cytochrome P450 1A1 and on a stably transfected dioxin-responsive element-driven reporter in human hepatoma cells(Chao et al., 2007) ; 2009 年發表氯化鎘(Cadmium chloride)可抑制人類肝腫瘤細胞株表面戴奧辛接受器的活性-The inhibition effect of 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin-induced aryl hydrocarbon receptor activation in human hepatoma cells with the treatment of cadmium chloride(Chao et al., 2009) ; 2011 年 ; 2012 年改良 Huh7-DRE-Luc cells 戴奧辛偵測系統，利用降低培養溫度且添加致癌藥物提升 Huh7-DRE-Luc cells 的敏感度與穩定性，使其可偵測生物體內的較低濃度的戴奧辛-An Improved AhR Reporter Gene Assay for Analyzing Dioxins in Soil, Sediment and Fish (Chao et al., 2012)。最後，本專案計畫使用 T47D-KBluc assay 篩測雌激素毒性，該系統也發表兩篇 SCI papers 於期刊上，分別為 2016 年檢測飲用水及廢水中的雌激素效應-An improved estrogenic activity reporter gene assay (T47D-KBluc) for detecting estrogenic activity in wastewater and drinking water (Chou et al., 2016); 2016 年檢測自來水中原水與飲用水中的雌激素效應-Estrogenic effects in the influents and effluents of the drinking water treatment plants (Gou et al., 2016)。

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

(二) 研究目的

環境荷爾蒙散布對人體健康產生危害，若能快速得知環境樣品是否含有環境荷爾蒙毒性，對以生物毒性為主要精神的健康風險評估方法，將是一大助力。本研究結合四種生物分析方法：綜合細胞毒性分析(Cytotoxicity ATP bioassay)、致癌毒性分析(P53 bioassay)、芳香族碳氫化合物毒性分析(Ad-DR bioassay)、雌激素毒性分析(T47D-KBluc assay)，偵測受油品污染土壤樣品中的環境荷爾蒙毒性。上述方法可高通量化的篩檢土壤中環境荷爾蒙細胞毒性的特徵且定量，並可降低傳統利用活老鼠毒性試驗評估實驗所花費的時間與成本。此高通量分析工具能全面性的評估新興污染物是否具環境荷爾蒙效應，進而應用於追蹤新興污染物來保護人類與環境的健康，預期完成工作項目分述如下：

1. 蒐集並整理完成國內外綜合細胞毒性分析、致癌毒性分析、芳香族碳氫化合物毒性分析、雌激素毒性分析的生物高通量快篩相關技術文獻資料。
2. 以符合環保署土壤採樣方法 NIEA S102.63B，採集 60 件次土壤對照組樣品與 60 件次土壤實驗組樣品。
3. 建立標準化環境荷爾蒙高通量分析前處理流程。
4. 建立 96 孔盤綜合細胞毒性分析、致癌毒性分析、芳香族碳氫化合物毒性分析、雌激素毒性分析高通量生物分析方法及流程。
5. 各完成 30 件次 Cytotoxicity ATP bioassay、P53 bioassay、Ad-DR bioassay、T47D-KBluc assay 冷光分析土壤樣本數據，總共 120 件次：
6. 對照組：一般土壤樣本各 15 件次，共 60 件次
7. 實驗組：受油品污染土壤樣本各 15 件次，共 60 件次
8. 透過已知受油品污染之土壤中 HRGC/HRMS 的總石油碳氫化合物濃度數值，驗證本研究之高通量分析工具對土壤中內分泌干擾物質的毒性預測。
9. 本團隊預計投稿 1-2 篇 SCI 期刊與 2 篇研討會論文。

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

(三) 文獻回顧

3-1 場址公告資料

本研究採集位於高雄市某加油站(以下簡稱該場址)下方受油品污染之土壤，以符合環保署土壤採樣方法 NIEA S102.63B，該場址場址公告資料如表 3-1。

表 3-1、場址公告資料

場址名稱	高雄市某加油站
場址面積	1,136.55 平方公尺
場址現況概述	營業中加油站
列管狀況	高雄市政府(原高雄縣政府)依據「土壤及地下水污染整治法」第 12 條規定，於 99 年 7 月 6 日公告為土壤及地下水污染控制場址，並於 99 年 7 月 16 日公告為土壤及地下水污染管制區。
污染物	土壤中苯、乙苯、甲苯、二甲苯(BTEX)及總石油碳氫化合物(TPH)超過土壤污染管制標準
污染情形	土壤中苯濃度檢測值為 19.3 mg/kg(管制標準 5 mg/kg)、二甲苯濃度檢測值為 680 mg/kg(管制標準 500 mg/kg)及總石油碳氫化合物濃度檢測值為 28,1500 mg/kg(管制標準 1000 mg/kg)，均超過土壤污染管制標準。

3-1-1 場址沿革及營運現況

該場址位於高雄市，自 78 年開始營運至今均從事汽油及柴油之儲存及販售，營運期間未曾停工或歇業，歷年之經營者皆為某加油站股份有限公司，該場址經營加油站已逾 20 年以上，目前營業時間為 06:00~23:30，圖 3-1 為該場址環境現況。

該場址設置 30 及 50 公秉地下儲油槽共五座，油槽之材質皆為鋼槽，包含 92 無鉛汽油 1 座、95 無鉛汽油 2 座(1 座 50 公秉)，98 無鉛汽油及超級柴油(50 公秉)各 1 座。加油泵島 3 座，第 1 島與第 2 島各有 3 部加油機，第 3 島則有 2 部加油機，總計共有 8 部加油機，92、95 及 98 無鉛汽油加油機為自吸式系統，超級柴油各有一自吸與沉油式系統，場址內另設有一層樓之營業辦公室及自動洗車機具 1 組，除了加油站營運設施外，另為預防及監測土壤中油氣濃度的異常變化，該場址於油槽區內設置 13 支測漏管(於 78 年設置)、泵島管線區設置 5 支測漏管(於 96 年設置)，本研究於該廠共採集五個點，每個採樣點採樣深度至 7 公尺，採樣編號為 S5-1~S5-5(共五點)，該場址平面配置如圖 3-2 所示。另外，於 90 年間因

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物

篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

油量減少及加油時發現汽泡，判斷疑為管線破損所造成，隨即進行全場加油站管線更換，更換之新管線埋設深度約地面下 0.6 公尺，原舊管線並未移除，同時於 91 年間在油槽區設置一套 5 馬力垂直井 SVE 土壤氣體抽除設備。



圖 3-1、加油站環境現況

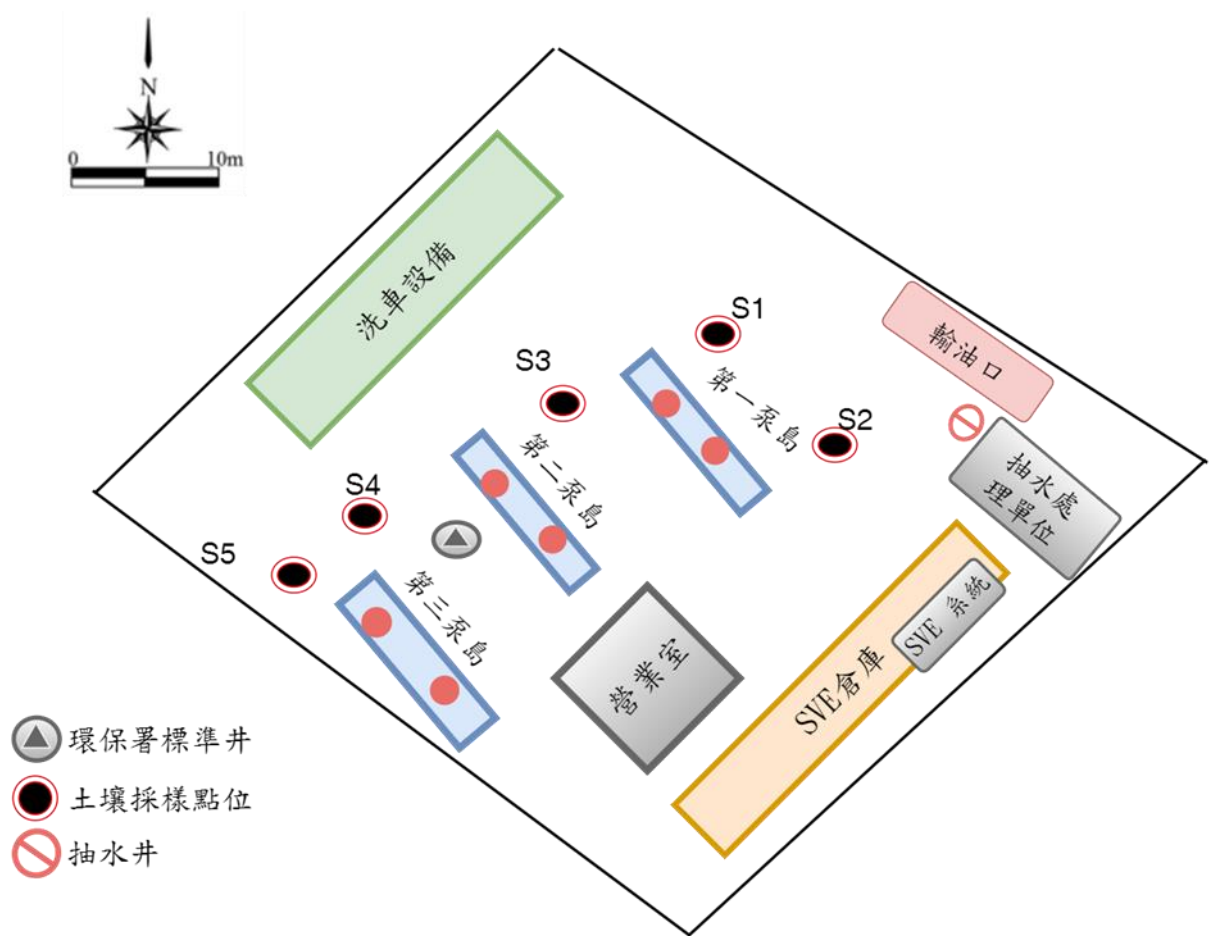


圖 3-2、加油站平面圖

3-1-2 場址曾實施之土壤及地下水調查與措施

該場址自 78 年開始營運，直至民國 90 年間曾發現該場址高級柴油與高級汽油之管線有發生洩漏之現象，並隨即進行全場管線更換工程。直到 98 年環保署所執行之「加油站土壤及地下水污染調查計畫（第五期）（乙）」被列為土壤及地下水污染調查對象，才進行本場址之土壤及地下水之污染調查及查證工作。環保署調查計畫共分為 3 階段：第 1 階段為污染潛勢評估（測漏管、土壤氣體檢測）；第 2 階段為土壤污染查證及地下水（簡易井）即時取樣分析；第 3 階段則為地下水（標準井）污染查證。針對本場址進行測漏管油氣檢測，發現部份測漏管有浮油且油氣測值有過高情形，遂進行土壤及地下水採樣調查、查證工作，結果顯示本場址土壤中之苯、二甲苯及總石油碳氫化合物達土壤污染管制標準，地下水中總醇、苯、茶及甲苯亦達第二類地下水污染管制標準，經確認污染事實並依土污法規定公告本站為土壤及地下水污染整治場址。本計畫彙整本場址所實施之調查及改善作業歷程如表 3-2。

表 3-2、加油站歷次調查及改善作業流程

日期	事件概述
民國 78 年	該場址核准設立，營運初期主要販售 92 無鉛汽油、高級汽油、二行程汽油及高級柴油。
民國 90 年	發現輸油管線有油品滲漏之現象，全面更新舊有管線。
民國 91 年	設置 SVE 系統進行運轉。
民國 94 年	委託彙迎公司進行輸油管線及油槽壓力密閉測試，測試結果無異常。
民國 97 年	委託彙迎公司進行輸油管線壓力密閉測試，測試結果無異常。
民國 98 年	環保署所執行之「加油站土壤及地下水污染調查計畫(第五期)(乙)」被列為土壤及地下水污染調查對象。
民國 99 年 4 月	委託彙迎公司進行輸油管線及油槽壓力密閉測試，測試結果無異常。
民國 99 年 7 月	高雄縣政府環境保護局於民國 99 年 07 月 06 日公告本站為土壤及地下水污染控制場址。
民國 99 年 7 月	高雄縣政府環境保護局於民國 99 年 07 月 16 日公告本站為土壤及地下水污染管制區。
民國 99 年 12 月	行政院環境保護署於民國 99 年 12 月 7 日公告本站土壤及地下水污染整治場址。
民國 100 年 4 月	委託彙迎公司進行輸油管線壓力密閉測試，測試結果無異常。

3-1-3 該場址曾執行之污染改善措施

該場址自 78 年開始營運，初期因相關法規尚未健全，故無相關資料或自行檢測資料以了解地下儲槽系統設施是否有洩漏之情形，直至民國 90 年間發現該場址高級柴油與高級汽油管線發生洩漏現象，隨即進行全站管線汰換工程，本站曾執行之污染改善措施如下：

一、管線更換

民國 90 年因總量管制差異及加油時產生氣體，為移除洩漏源，故進行全站管線汰換工程，新管線之埋設深度約地面下 0.6 公尺，原舊管線並未移除（埋設深度約地面下 0.8 公尺）。

二、密閉測試

本站為釐清加油管線及油槽有無洩露之情事，分別於民國 97、99 及 100 年，委託廠商進行加油管線及儲油槽密閉測試，測試結果指圓盤圖密合、無異常現象，因此本站初步排除目前營運中設備漏油而導致污染之原因。但民國 90 年因管線洩露時，並未將舊管線與污染土壤移除，故亦可能成為地下水污染的來源，並隨地下水位變動而污染土壤及地下水。

三、曾實施之污染改善作業

本站於 91 年間安裝有 1 台防爆型土壤氣體抽除設備，於油槽區設置抽氣井與土壤氣體抽除系統（SVD）並操作至今。

3-2 環境荷爾蒙

環境中許多造成人類或生物健康危害之化學物質均漸漸被各國所控管，但現今法令管制準則往往只對立即與明顯危害之化學物質有所警覺，忽略了絕大部分之化學物質是以低劑量存在環境中，經由食物鏈與生物體接觸，長時間儲存在動物及人類脂肪中慢慢累積與作用後才會顯現出其危害。

3-3 環境荷爾蒙的一般分類

上述化學物質科學上稱為內分泌干擾化學物質又稱之環境荷爾蒙大致可分為下述 4 大類：

1. 合成的雌性激素，如二乙基烯雌酚(DES)、口服避孕藥(HRT)。
2. 動物體中的生長激素，如 estrone、17 β -estradiol。

3. 植物型雌激素，如 isoflavones。

4. 工業、農業用化學物質，如戴奧辛、PCB、DDT 等。

上述化合物均為與荷爾蒙無關的環境污染物，因具有干擾生物體內荷爾蒙效應的能力，當進入生物體內時該化合物的結構類似體內的荷爾蒙，讓它們具有模仿、加強、干擾和抗拒生物體內荷爾蒙的正常活動，或進一步影響生物體內荷爾蒙的運送、調節、結合、訊號產生、細胞的代謝反應的過程(Han et al., 2011; Li et al., 2011; Oliveira et al., 2011)。

具有環境荷爾蒙效應的污染物常藉由空氣、水、土壤、食物等途徑進入生物體內，有些能與天然荷爾蒙的受體結合，促進或抑制核內受體接受器，某些環境荷爾蒙並不直接與荷爾蒙受體結合，但卻會影響細胞內訊息傳遞的路徑或活化遺傳物質，藉此產生特定蛋白質影響生理表現(Oliveira et al., 2011)。環境荷爾蒙對人體或野生動物之影響，會隨年紀或性別而有所差異；一般而言，以胎兒和新生兒所造成的影響最大。除了會影響胎兒發育階段生殖系統發育及動物性別的表現外，亦會影響中樞神經系統發展，造成孩童學習能力低落、無法集中注意力等問題。對於成年個體而言，環境荷爾蒙會降低人體免疫力，引發甲狀腺癌，亦會影響男性或女性的生育能力，增加男性攝護腺癌、女性乳癌、子宮內膜異位症的發生機率(Braun et al., 2011; Butt et al., 2011; Wu et al., 2011)。目前已知的環境荷爾蒙約有 70 種，其中 40 餘種為農藥(如：除草劑、殺蟲劑、殺菌劑等)，其它包括有機氯化物(戴奧辛、PCB、DDT 等)、清潔劑原料、塑膠原料...等，日本早在 1998 年依據「環境內分泌干擾物質因應策略」公布包括 66 種化學物質疑似為環境荷爾蒙名單(表 3-1)；美國已於 2009 年 4 月 15 日公布第一階段最終篩選清單 67 種化學物質(表 3-2、續表 3-2)，2010 年 11 月 17 日公告第二階段第一次篩選清單 134 種疑似環境荷爾蒙化合物名單(表 3-3~續表 3-5)。

表 3-3、日本 1998 年公布 66 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單

項目	化合物名稱	項目	化合物名稱	項目	化合物名稱
1	Dioxins and furans	24	Endosulfan (Benzoepin)	47	4-Nitrotoluene
2	Polychlorinated biphenyl(PCB)	25	Heptachlor	48	Octachlorostyrene
3	Polybromobiphenyl (PBB)	26	Hptahlor epoxide	49	Aldicarb
4	Heachlorobenene (HCB)	27	Malathion	50	Benomyl
5	Pentachlorophenol (PCP)	28	Methomyl	51	Kepone (Chlordecone)
6	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	29	Methoxychlor	52	Manzeb (Mancozeb)
7	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	30	Mirex	53	Maneb
8	Amitrole	31	Nitrofen	54	Metiram
9	Atrazine	32	Toxaphene (Camphechlor)	55	Metribuzin
10	Alachlor	33	Tributyltin	56	Cypermethrin
11	Simazine (CAT)	34	Triphenyltin	57	Esfenvalerate
12	Hexachlorocyclohexane, Ethyl parathion	35	Trifluralin	58	Fenvalerate
13	Carbaryl	36	Alkyl phenol (from C5 to C9) Nonyl phenol Octyl phenol	59	Permethrin
14	Chlordane	37	Bisphenol A	60	Vinclozolin
15	Oxychlordane	38	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	61	Zineb
16	trans-Nonachlor	39	Butyl benzyl phthalate	62	Ziram
17	1,2-dibromo-3-chloropropane	40	Di-n-butyl phthalate	63	Dipentyl phthalate
18	DDT	41	Dicyclohexyl phthalate	64	Diethyl phthalate
19	DDE and DDD	42	Diethyl phthalate	65	Dipropyl phthalate
20	Kelthane (Dicofol)	43	Benzo(a)pyrene	66	Styrens
21	Aldrin	44	Dichlorophenol		
22	Endrin	45	Diethylhexyl adipate		
23	Dieldrin	46	Benzophenone		

表 3-4、美國 2009 年 4 月 15 日公布第一階段最終篩選清單 67 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單

化合物名稱	CAS 編號	化合物名稱	CAS 編號
2,4-D	94757	Carbamothioic acid, dipropyl-, S-ethyl ester	759944
4,7-Methano-1H-isoindole-1,3(2H)-dione,2-(2-ethylhexyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-	113484	Carbaryl	63252
Abamectin	71751412	Carbofuran	1563662
Acephate	30560191	Chlorothalonil	1897456
Acetone	67641	Chlorpyrifos	2921882
Atrazine	1912249	Cyfluthrin	68359375
Benfluralin	1861401	Cypermethrin	52315078
Bifenthrin	82657043	DCPA (or lorthal-dimethyl)	1861321
Butyl benzyl phthalate	85687	Diazinon	333415
Captan	133062	Dibutyl phthalate	84742
Fenbutatin oxide	13356086	Metaxyl	57837191
Flutolanil	66332965	Methamidophos	10265926
Folpet	133073	Methidathion	950378
Gardona (cis-isomer)	22248799	Methomyl	16752775
Glyphosate	1071836	Methyl ethyl ketone	78933
Imidacloprid	138261413	Methyl parathion	298000
Iprodione	36734197	Metolachlor	51218452
Isophorone	78591	Metribuzin	21087649
Linuron	330552	Myclobutanil	88671890
Malathion	121755	Norflurazon	27314132
Quintozene	82688	Simazine	122349
Resmethrin	10453868	Tebuconazole	107534963
Dichlobenil	1194656	Oxamyl	23135220
Dicofol	115322	Permethrin	52645531
Diethyl phthalate	84662	Phosmet	732116
Dimethoate	60515	Piperonyl butoxide	51036
Dimethyl phthalate	131113	Propachlor	1918167
Di-sec-octyl phthalate	117817	Propargite	2312358
Disulfoton	298044	Propiconazole	60207901
Endosulfan	115297	Propyzamide	23950585
Esfenvalerate	66230044	Pyridine, 2-(1-methyl-2-(4-phenoxyphenoxy)ethoxy)-	95737681

續表 3-4、美國 2009 年 4 月 15 日公布第一階段最終篩選清單 67 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單

化合物名稱	CAS 編號	化合物名稱	CAS 編號
Ethoprop	13194484	Toluene	108883
o-Phenylphenol	90437	Triadimefon	43121433

表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單

化合物名稱	CAS 編號	化合物名稱	CAS 編號
1,1,1,2-Tetrachloroethane	630-20-6	Alachlor	15972-60-8
1,1,1-Trichloroethane	71-55-6	Alachlor ethanesulfonic acid (ESA)	142363-53-9
1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	Alachlor oxanilic acid (OA)	171262-17-2
1,1-Dichloroethane	75-34-3	alpha-Hexachlorocyclohexane	319-84-6
1,1-Dichloroethylene	75-35-4	Aniline	62-53-3
1,2,3-Trichloropropane	96-18-4	Bensulide	741-58-2
1,2,4-Trichlorobenzene	120-82-1	Benzene	71-43-2
1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP)	96-12-8	Benzo(a)pyrene (PAHs)	50-32-8
1,2-Dichloroethane	107-06-2	Benzyl chloride	100-44-7
1,2-Dichloropropane	78-87-5	Butylated hydroxyanisole	25013-16-5
1,3-Dinitrobenzene	99-65-0	Carbon tetrachloride	56-23-5
1,4-Dioxane	123-91-1	Chlordane	57-74-9
1-Butanol	71-36-3	Chlorobenzene	108-90-7
2,4,5-TP (Silvex)	93-72-1	cis-1,2-Dichloroethylene	156-59-2
2-Methoxyethanol	109-86-4	Clethodim	99129-21-2
2-Propen-1-ol	107-18-6	Clofentezine	74115-24-5
4,4'-Methylenedianiline	101-77-9	Clomazone	81777-89-1
Acetaldehyde	75-07-0	Coumaphos	56-72-4
Acetamide	60-35-5	Cumene hydroperoxide	80-15-9
Acetochlor	34256-82-1	Cyanamide	420-04-2
Acetochlor ethanesulfonic acid (ESA)	187022-11-3	Cyromazine	66215-27-8
Acetochlor oxanilic acid(OA)	194992-44-4	Dalapon	75-99-0
Acrolein	107-02-8	Denatonium saccharide	90823-38-4
Acrylamide	79-06-1	Di(2-ethylhexyl) adipate	103-23-1
Dichloromethane	75-09-2	Ethylene thiourea	96-45-7
Dicrotophos	141-66-2	Ethylurethane	51-79-6
Dimethipin	55290-64-7	Etofenprox	80844-07-1

續表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似
環境荷爾蒙名單

化合物名稱	CAS 編號	化合物名稱	CAS 編號
Dinoseb	88-85-7	Fenamiphos	22224-92-6
Diuron	330-54-1	Fenarimol	60168-88-9
Endothall	145-73-3	Fenoxaprop-P-ethyl	71283-80-2
Endrin	72-20-8	Fenoxycarb	72490-01-8
Epichlorohydrin	106-89-8	Flumetsulam	98967-40-9
Erythromycin	114-07-8	Fomesafen sodium	108731-70-0
Ethylbenzene	100-41-4	Fosetyl-Al (Alette)	39148-24-8
Ethylene dibromide	106-93-4	Glufosinate ammonium	77182-82-2
Ethylene glycol	107-21-1	HCFC-22	75-45-6
Heptachlor	76-44-8	o-Dichlorobenzene	95-50-1
Heptachlor epoxide	1024-57-3	o-Toluidine	95-53-4
Hexachlorobenzene	118-74-1	Oxirane, methyl-	75-56-9
Hexachlorocyclopentadiene	77-47-4	Oxydemeton-methyl	301-12-2
Hexane	110-54-3	Oxyfluorfen	42874-03-3
Hexythiazox	78587-05-0	Paclobutrazol	76738-62-0
Hydrazine	302-01-2	p-Dichlorobenzene	106-46-7
Isoxaben	82558-50-7	Pentachlorophenol	87-86-5
Lactofen	77501-63-4	Perchlorate	14797-73-0
Lindane	58-89-9	Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS)	1763-23-1
Methanol	67-56-1	Perfluorooctanoic acid (PFOA)	335-67-1
Methoxychlor	72-43-5	Picloram	1918-02-1
Methyl tert-butyl ether	1634-04-4	Polychlorinated biphenyls	1336-36-3
Metolachlor ethanesulfonic acid (ESA)	171118-09-5	Profenofos	41198-08-7
Metolachlor oxanilic acid (OA)	152019-73-3	Propetamphos	31218-83-4
Molinate	2212-67-1	Propionic acid	79-09-4
Nitrobenzene	98-95-3	Pyridate	55512-33-9
Nitroglycerin	55-63-0	Quinclorac	84087-01-4
N-Methyl-2-pyrrolidone	872-50-4	n-Propylbenzene	103-65-1
N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	62-75-9	Quinoline	91-22-5
n-Propylbenzene	103-65-1	Quizalofop-P-ethyl	100646-51-3
RDX	121-82-4	Toxaphene	8001-35-2
sec-Butylbenzene	135-98-8	trans-1,2-Dichloroethylene	156-60-5

續表 3-5、美國 2010 年 11 月 17 日第二階段第一次篩選清單 134 種化學物質疑似環境荷爾蒙名單

化合物名稱	CAS 編號	化合物名稱	CAS 編號
Sodium tetrathiocarbonate	7345-69-9	Trichloroethylene	79-01-6
Styrene	100-42-5	Triethylamine	121-44-8
Sulfosate	81591-81-3	Triflumizole	68694-11-1
Temephos	3383-96-8	Trinexapac-ethyl	95266-40-3
Terbufos	13071-79-9	Triphenyltin hydroxide (TPTH)	76-87-9
Terbufos sulfone	56070-16-7	Vinclozolin	50471-44-8
Tetrachloroethylene	127-18-4	Xylenes (total)	1330-20-7
Thiophanate-methyl	23564-05-8	Ziram	137-30-4
Toluene diisocyanate	26471-62-5		

3-4 高通量篩選工具

近代化學的進步，產業界可以利用比較少的實驗步驟，在短時間內合成眾多新穎的化合物，並應用在新的產品上，提供新的產品功效。而新產品在環境及人體健康議題上，往往帶來污染效應的討論。在此背景下，高通量篩選工具在環境毒物的篩選應用，孕育而生。高通量篩選工具可在短時間內對大量樣品完成篩選，經過發展，高通量篩選工具包括微量毒理實驗模型、樣品庫系統管理、機器人化的實驗操作系統、高靈敏度的細胞檢測系統以及數據處理資料庫，這一連串單元的運作，提供高通量篩選工具能執行搜索大量環境毒物物質。本研究計畫應用細胞報導基因法技術為高靈敏度的細胞檢測系統核心，偵測四種土壤中的環境荷爾蒙效應，分別為綜合細胞毒性分析(Cytotoxicity ATP bioassay)、致癌毒性分析(P53 bioassay)、芳香族碳氫化合物毒性分析(Ad-DR bioassay)、雌激素毒性分析(T47D-KBluc assay)，是提升國內具有可執行環境毒物高通量篩選的前導型計畫。

3-4-1 綜合毒性篩選平台

本計畫使用 Cytotoxicity ATP bioassay 為綜合毒性篩檢平台工具，ATP bioassay 操作步驟如下，毒性效應是指化合物對生物體結構產生破壞或者造成其功能損壞的一種性質，含毒性之化合物質可能經由皮膚、呼吸或攝入而導致生物體產生急性或慢性疾病之症狀。一般而言，毒性效應之評估藉由有效濃度(EC₅₀, effective concentration 50%)、有效劑量(ED₅₀, effective dosage 50%)、致死濃度(LC₅₀, dethal concentration 50%)或致死劑量(LD₅₀, lethal dosage 50%)來表示。應用動物實驗

(*in-vivo*)評估化合物毒性效應雖較貼近生物體真實之反應，但其觀察時間太長，對於特定區域危害鑑定與污染物毒性調查等狀況應用性較低。因此，離體實驗(*in-vitro*)評估污染物毒性效應之技術逐漸受到重視，該方法具有高再現性、快速等特性在污染物毒性鑑定上具有極高的應用價值(環保署，1994)。Microtox 生物毒性試驗方法為利用深海螢光細菌 *Vibrio fischeri* 之發光特性，藉由檢測該細菌發光強度探討毒性物質之相對毒性(Boluda et al., 2002)，該方法已成功應用於檢測重金屬(陳建龍，2011)與污染處理場加氯消毒後之毒性(Bayo et al., 2009)，且近年也開始應用此方法評估新興物質如：生物碳(Lyu et al., 2016)、烴基多氯聯苯(Hydroxylated polychlorinated biphenyls, HO-PCBs) (Bhalla et al., 2016)、化學品對活性污泥之毒性(Cai et al., 2010)等。雖然該方法已被廣泛應用於檢測環境基質或化合物樣本之毒性效應，但細菌對於各種毒性物質反應結果與生物體仍存在差異，與動物實驗之結果相比未必存在良好的相關性。近年來許多研究開始嘗試利用生物體細胞之生物分析方法(如：MTT assay 與 ATP assay)進行毒性效應之評估，其結果應較貼近於生物體對於毒性物質之反應。ATP assay 原理為利用檢測活細胞中的 ATP (Adenosine triphosphate)被釋放後，與 luciferase 及 luciferin 作用產生冷光反應，做為檢測活細胞的指標。該方法靈敏度優於傳統的比色法與螢光法，且相關研究結果顯示 ATP assay 較 MTT assay 更適合用於評估複合混和物之毒性，且其應用於評估二級污水之毒性效應結果也優於 MTT assay(Yang et al., 2015)。故本次研究將使用 ATP assay 做為評估細胞毒性(Cytotoxicity)之高通量分析工具。

3-4-2 致癌性篩選平台

P53 bioassay 為本計畫致癌性篩選平台之工具，主要使用 p53 為腫瘤抑制蛋白(也稱為 p53 蛋白或 p53 腫瘤蛋白)，在癌細胞中最常發現 p53 表現或功能不正常(Haupt and Haupt, 2006)。p53 為一個重要的暴露指標評估暴露化合物是否對人體產生致癌性，故於 2014 年學者提出利用基因轉殖技術，將帶有 p53 基因載體轉殖入細胞株中，發展出一套快速且方便之毒性篩選工具並將其定義為 p53 CALUX (Linden et al., 2014)。雖然該方法提供了珍貴的化合物毒理學資料，但大部份的研究仍僅探討特殊病症(如：肝纖維化)與 p53 基因之反應(Liu et al., 2016)，仍缺乏複合性化合物致癌性之數據與受污染之環境樣本可能造成人體致癌風險資料。台灣目前仍沒有相關高通量污染物致癌性篩選技術與研究數據，故本研究將參照前人之研究成果，建立 p53 反應更靈敏之細胞株，發展屬於台灣本土化之高通量致癌性篩選技術並嘗試應用於測試真實環境基質樣本。

3-4-3 芳香族化合物毒性篩選平台

Ad-DR bioassay 為本計畫芳香族化合物毒性篩選工具，過去本團隊應用 Ad-DR bioassay 於台灣土壤中戴奧辛背景值調查的專案計畫中，效果顯著，且符合環保署於 2010 年 6 月公告之「土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法—冷光酵素報導基因法(NIEA S901.60B)」法規。本專案計畫在修改前處理程序-篩除 CAPE 管柱淨化後，保留土壤中所有可與芳香族碳氫化合物接受器結合之環境污染物，再使用 Ad-DR bioassay 測量，便可得出土壤中具有芳香族碳氫化合物毒性的總毒性當量值。

3-4-4 雌激素毒性篩選平台

環境中具有雌激素作用之化合物已逐漸被環保團體重視，這些化合物大多來自於工業、農業製程的產物，但並非所有的化合物均為人造產生，某些特定的化合物也可能是經由自然方式產出(如:天然植物性類雌激素(Phytoestrogens)與真菌性類雌激素(Mycoestrogens)(Soto et al., 1995)。面臨 EDCs 所造成生態挑戰，多數學者紛紛開始監測數種環境與生物基質中雌激素污染物，欲藉此了解生物體相互之間可能產生的不同暴露途徑(Reel et al., 1996; Shelby et al., 1996; Baker et al., 1999a; Baker et al., 1999b; Baker et al., 2000)。但由於監測需長期性進行且分析數目龐大，因此利用生物方式檢測雌激素方法開始逐漸被重視。

學術上生物檢測雌激素應用之環境基質相當廣泛，近年來主要使用的檢測方法包含細胞增生分析(如：E-Screen)、報導基因法(如：T47D-KBluc assay、ER-CALUX 等)。Leusch et al (2010)使用五種不同的生物檢測雌激素方法(E-Screen、ER-CALUX、T47D-KBluc assay、YES assay、MVLN)檢測數種環境檢體中 NP、BPA、E₂ 等雌激素化合物，五種生物檢測法與化學分析法均有類似之趨勢，其中 E-Screen、ER-CALUX 兩者具良好之預測性且與化學分析法相關性佳；T47D-KBluc assay 同樣具有良好的預測性，但 T47D-KBluc assay 每次實驗所分析的樣本數僅為 7 個，相較於其它快速篩檢法(如：YES-assay)每次實驗所能分析的樣本數為 14 個以上，其所能檢測的樣本數較少；YES assay 雖然可檢測大量樣本，但其靈敏度較低可適用檢測之基質較少；MVLN 方法實驗室比對性與預測性均低於其他生物分析法。由上述文獻顯示，ER-CALUX 與 E-Screen 其結果較優於其它生物檢測法，但 ER-CALUX 目前屬於商業化細胞株，若使用需負擔昂貴之專利費，為了降低成本，本計畫在雌激素活性分析項目上將採用 T47D-KBluc assay 進行檢測。

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

(四) 研究方法與過程

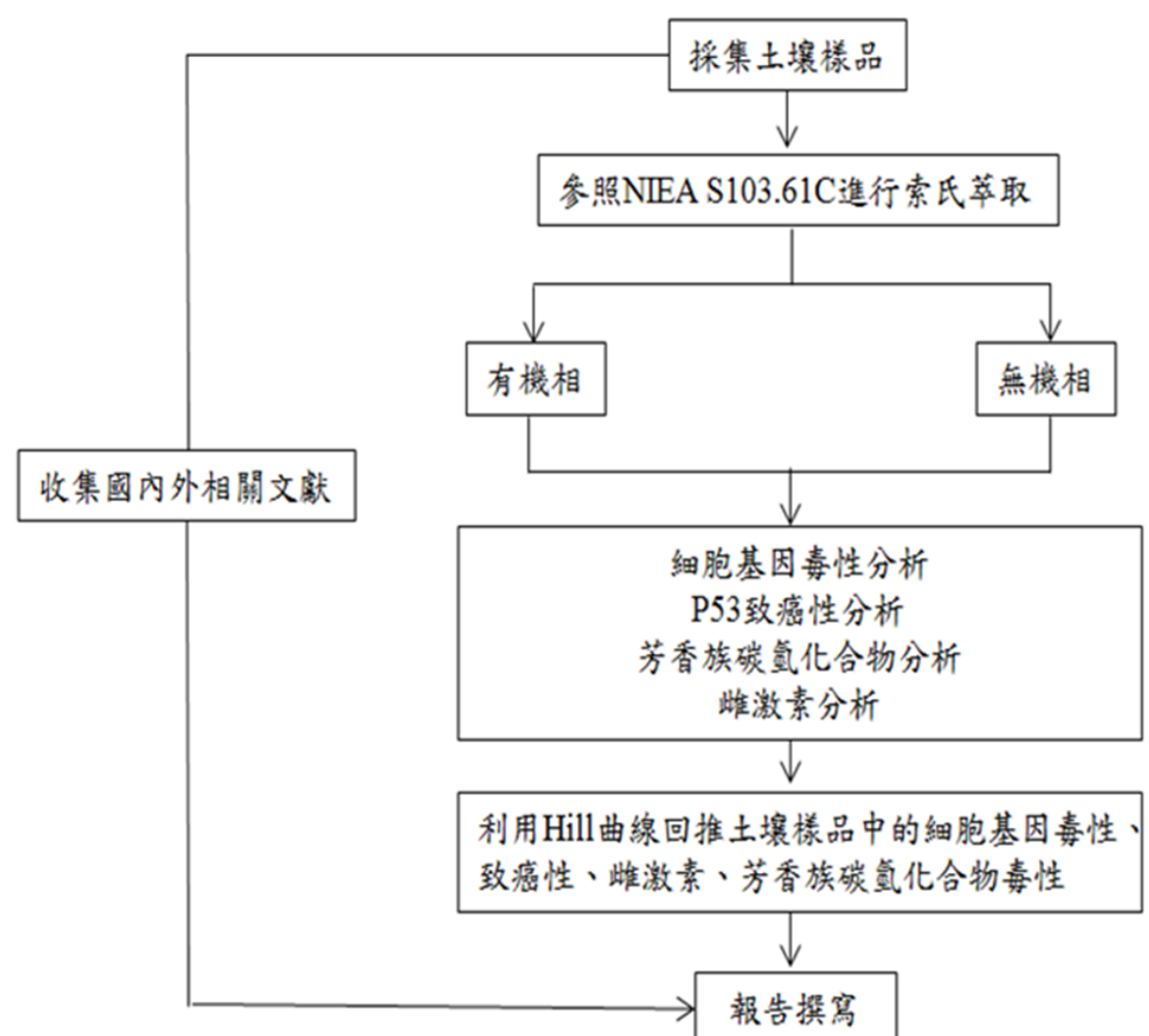


圖 4-1、實驗流程架構圖

4-1 土壤採樣

本研究採集位於高雄市某加油站(以下簡稱該場址)下方受油品污染之土壤，使用環保署公告之土壤採樣方法 NIEA S102.63B 進行樣本採集，本次計畫共採集 15 件次土壤對照組樣品與 15 件次土壤實驗組樣品，圖 4-2 為現場土壤採樣作業情形。本研究採樣深度達 7 公尺，篩測方式以每 0.5 公尺 PID/TPH Test kit 篩測，Test kit 值高者送樣分析。該場址主要污染來源為汽油類油品，污染面積幾已涵蓋本場址面積；其中土壤主要標的污染物為 TPH，表 4-1~表 4-5 為採樣點紀錄表。

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物



水泥地鑽孔



場址內土壤採樣



場址內土壤採樣

圖 4-2、現場土壤採樣作業情形

表 4-1 採樣點 S1 樣點紀錄表

採樣點 S1		PH Test kit 篩測紀錄表		
採樣深度 (cm)	PID (ppm)	FID (ppm)	TPH Test kit (mg/kg)	備註
0~50	212.5	161		
50~100	1240	2227	527	
100~150	1885	4410	611	
150~200	619.5	1079	x	
200~250	2475	6473	X	
250~300	3866	26100	1187(送樣)	選擇 TPH 最高 者，以 GC-MS 進 行分析
300~350	3868	69300	928	
350~400	1691	25500	X	
400~450	805.9	2052	416	
450~500	539.2	1374	X	
500~550	207.4	304	127	
550~600	115.4	218	X	
600~650	87.7	240	X	
650~700	80.5	308	131	

表 4-2 採樣點 S1 樣點紀錄表

採樣點 S2		PH Test kit 篩測紀錄表		
採樣深度 (cm)	PID (ppm)	FID (ppm)	TPH Test kit (mg/kg)	備註
0~50	642.5	905	X	選擇 TPH 最高 者，以 GC-MS 進 行分析
50~100	1770	2474	425	
100~150	736.5	1194	X	
150~200	604.5	1355	326	
200~250	1375	3852	X	
250~300	2287	16700	1881	
300~350	2006	14100	1740	
350~400	1754	6830	X	
400~450	2297	13500	X	
450~500	3882	16800	2250(送樣)	
500~550	288.5	787	267	
550~600	163.5	258	X	
600~650	132.5	416	X	
650~700	120.4	652	316	

表 4-3 採樣點 S3 樣點紀錄表

採樣點 S3		PH Test kit 篩測紀錄表		
採樣深度 (cm)	PID (ppm)	FID (ppm)	TPH Test kit (mg/kg)	備註
0~50	1548	7868		
50~100	2198	12800	872	
100~150	2149	24200	2250(送樣)	
150~200	1676	11800	X	
200~250	1648	16100	1146	
250~300	2738	40300	2248	
300~350	1483	7729	682	選擇 TPH 最高 者，以 GC-MS 進 行分析
350~400	397.5	1133	X	
400~450	1147	3179	X	
450~500	2587	13900	1079	
500~550	184.5	360	97	
550~600	101.5	241	X	
600~650	78.5	51.14	32	
650~700	67.4	24.30	X	

表 4-4 採樣點 S4 樣點紀錄表

採樣點 S4		PH Test kit 篩測紀錄表		
採樣深度 (cm)	PID (ppm)	FID (ppm)	TPH Test kit (mg/kg)	備註
0~50	1073	1587	X	
50~100	4595	23800	2140	
100~150	3355	34600	X	
150~200	3478	39600	22500(送樣)	
200~250	2653	23000	1787	
250~300	2691	18400	X	
300~350	2543	18100	1062	選擇 TPH 最高 者，以 GC-MS 進 行分析
350~400	3654	87100	181	
400~450	2477	26000	1996	
450~500	460.5	956	X	
500~550	141.8	758	214	
550~600	87.5	712	X	
600~650	47.2	172	X	
650~700	36.8	221	112	

表 4-5 採樣點 S5 樣點紀錄表

採樣點 S5		PH Test kit 篩測紀錄表		
採樣深度 (cm)	PID (ppm)	FID (ppm)	TPH Test kit (mg/kg)	備註
0~50	51.6	22.6		
50~100	961.5	1328	476	
100~150	784.8	1150	X	
150~200	1959	3303	832	
200~250	1154	2554	X	
250~300	2448	11700	724	
300~350	2987	73400	1320	選擇 TPH 最高 者，以 GC-MS 進 行分析
350~400	1027	2975	X	
400~450	1030	3081	641	
450~500	2188	38100	882	
500~550	452.3	957	X	
550~600	239.5	647	125	
600~650	188.5	406	X	
650~700	2270	72600	72500(送樣)	

4-2 儀器與材料

4-2-1 試劑與藥品

1. 正己烷：殘量級。
2. 甲苯：殘量級。
3. 二氯甲烷：殘量級。
4. 甲醇：殘量級。
5. 丙酮：殘量級。
6. 試劑水：不含有機物質之去離子水。
7. 硫酸：試藥級。
8. 無水硫酸鈉(Sodium sulfate, anhydrous)：粒狀，試藥級。
9. 矽膠：ICN，63-200 mesh；使用前以 180 °C 至少加熱 30 分鐘活化之後，冷卻至室溫後儲存於附螺旋蓋鐵氟龍內墊之玻璃瓶備用。
10. 氧化鋁：Merck，50-200 mesh；使用前於 180°C 活化 16 小時。
11. 酸性矽膠(Acid silica gel)：取 240 g 之矽膠於附螺旋蓋鐵氟龍內墊之玻璃瓶內後在 180°C 下活化 2 小時，加蓋冷卻後加入 88 ml 之濃硫酸充分混合，在 130

°C 下烘乾 2 小時後，於乾燥箱內冷卻備用。

12. 鹼性矽膠：取 2.64g 之 NaOH 加入 134ml 試劑水中稀釋，再加入 134 g 已活化之矽膠充分攪拌，於 130°C 下烘乾 16 小時。儲存於附鐵氟龍內襯螺帽之玻璃瓶內。
13. 氮氣(N₂)：純度 99.99% 以上
14. 精密天平：可精秤至 0.1mg。
15. 電子天平：可精秤至 10 mg。
16. 索氏萃取管：Pyrex 材質，下端規格 24/40、29/40
17. 減壓濃縮機：具控溫之功能者
18. 烘箱：可維持工作溫度 110 ± 5°C
19. 氮氣吹除裝置：附流量調整閥
20. 圓（平）底燒瓶：玻璃材質， 250 mL，24/40、500 mL，29/40。
21. 樣品瓶：50 mL。
22. 玻璃棉：以二氯甲烷淋洗並烘乾後，儲存於鐵氟龍內襯螺旋蓋之乾淨的玻璃瓶容器。
23. 沸石
24. 中性洗潔劑
25. 圓筒濾紙：購於南耘公司
26. 活性碳管柱(Dioxin Large Sample PREP Carbon Column) product # CC-60 購自 CAPE Technologies。
27. RRMI1640(RRMI1640 Medium) 購自 GIBCO 公司。
28. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 購自 GIBCO 公司。
29. MEM (Minimum Essential Medium Eagle)購自 GIBCO 公司
30. Sodium bicarbonate 購自 GIBCO 公司。
31. Recovery cell culture Freezing Medium 購自 GIBCO 公司。
32. FBS(fetal bovine serum)胎牛血清購自 GIBCO 公司。
33. P/S(penicillin/streptomycin)盤尼西林/鏈黴素購自 GIBCO 公司。
34. DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 購自 GIBCO 公司。
35. TE(Trypsin-EDTA) 購自 GIBCO 公司。
36. Reporter Lysis buffer 5× 購自 Promega 公司。
37. Luciferase Assay system Cat# E1501 購自 Promega 公司。

38. HEPES 購自友和公司。
39. Pyruvate 購自友和公司。
40. 2,3,7,8-TCDD：購自 SUPELCO 公司。
41. E₂ 雌激素標準品：購自 SUPELCO 公司。
42. T47D-KBluc 細胞：購於 ATCC 公司。
43. 細胞培養 96 孔白盤：購於伯昂公司。
44. 細胞培養用直徑 10 cm DISH 盤：購於伯昂公司。
45. 二甲亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO):購於伯昂公司。

4-2-2 儀器與設備

1. 低溫恆溫水槽 FIRSTEK (MODEL-B403H)
2. 旋轉濃縮機 EYELA N-1000
3. 電子天平 OHAUS
4. 氮氣吹掃儀 KD200
5. 無菌操作台
6. 二氧化碳培養箱 Thermo 3110
7. 經濟型離心機 CN-1040
8. 微孔板恆溫振盪器 MB100-2A
9. 高溫高壓滅菌爐(Autoclave)TOMIN TM-329
10. 冷光儀 Glomax

4-3 樣品前處理

4-3-1 索氏萃取

細胞毒性與致癌性評估可能源自於有機相與無機相污染物，故本研究將利用分次萃取之概念，評估土壤中有機相與無機相污染物之毒性效應。本次樣品萃取步驟參考環保署公佈之索氏萃取方法 NIEA N165.00C 與戴奧辛/呋喃檢測方法 NIEA S103.61C 與，使用傳統索式萃取進行。裝載樣品的圓筒濾紙首先加入 300 mL 甲苯與甲醇 1:1 (v/v)於底部連結的圓底燒瓶內，利用加熱、冷凝方式迴流索氏萃取管進行圓筒濾紙濾紙，預洗 8 小時後，移除預洗的混合液，並於同一萃尿管內再加入 300 mL 甲醇，將土壤樣本加入圓筒濾紙中，進行 24 小時萃取，結束後將留於迴流管內之甲醇以虹吸方法回流至平底燒瓶，最後以 25 mL/次甲醇清洗冷凝器

以及萃取管回流至圓底燒瓶中，即完成無機相萃取步驟。接著加入 300 mL 甲苯於底部連結的圓底燒瓶內，利用加熱、冷凝方式迴流索氏萃取管進行預洗圓筒濾紙，預洗 8 小時後，移除預洗的甲苯，並於同一萃取管內再加入 300 mL 甲苯，將土壤加入圓筒濾紙中，進行 24 小時萃取，以 25 mL/次之甲苯清洗冷凝器以及萃取管回流至圓底燒瓶中，完成有機相萃取步驟。

4-3-2 減壓濃縮

土壤樣品經過索氏萃取後，利用減壓濃縮機將圓底燒瓶內 300 mL 甲苯與甲醇容積減少至 5 mL，最後再加入約 5 mL 正己烷進行溶劑轉換，以利後續硫酸矽膠步驟流程。

4-3-3 矽膠管柱與酸性鋁管柱流程

有機相與無機相萃取步驟參照 NIEA S103.61C 與排放管道中多環芳香烴之檢測方法—氣相層析質譜法(NIEA A730.70C)，利用矽膠管柱與酸性鋁管柱進行樣本淨化程序。矽膠主要為初步淨化之功用，主要去除土壤樣品中雜質，首先取一空淨化管柱(18 × 300 mm)將玻璃綿塞置入管柱底部，加入 10 g 置於二氯甲烷之活化矽膠（矽膠重量可被做調整）。利用震盪方式使之密實，最上層需加入適量無水硫酸鈉。填充完畢後以 20 mL 甲醇(無機相)或 20 mL 甲苯(有機相)預洗管柱，再將樣品加入並以 40 mL 甲醇或甲苯樣沖提管柱，收集沖提液至吹氮瓶後，進行吹氮步驟將容積減少至 4-5 mL。接著將酸性鋁管柱取出，加入 20 mL 甲醇或 20 mL 甲苯預洗後，將沖提液全部加入酸性鋁管柱流洗，最後以總體積 15 mL 之甲醇或甲苯沖提並收集至吹氮瓶中，吹氮至近乾後加入 4-5 mL 正己烷以待二次溶劑轉換。

4-3-4 樣品溶劑轉換

將上述正己烷溶液，以氮氣吹氣至近乾，同時加入 200 μ L 毒性較低的二甲亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液，此步驟需持續進行吹氮 10 分鐘已確保正己烷完全移除，最後用封口膜(Parafilm)封住管口，放入-20℃冰箱待生物分析。詳細步驟如圖 4-3 所示。

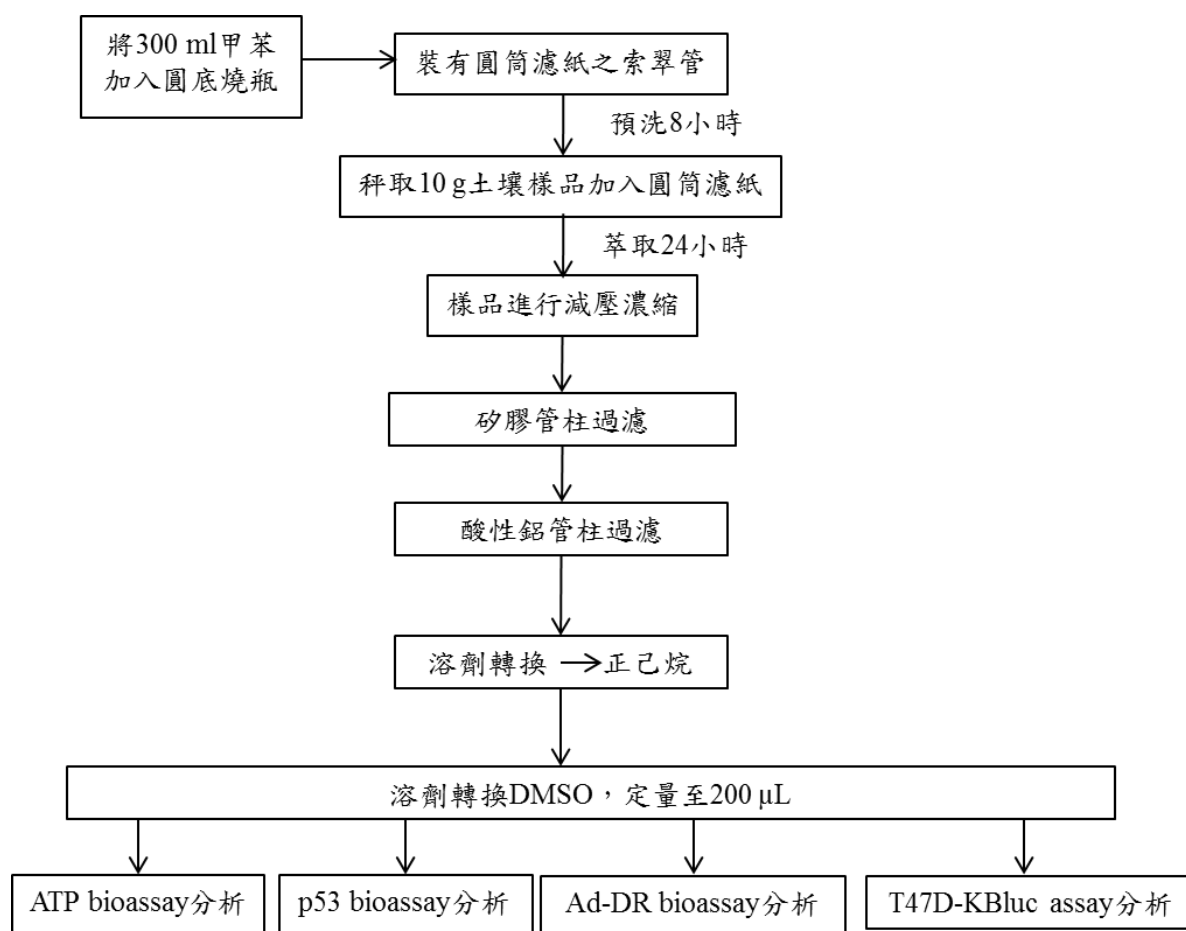


圖 4-3、土壤樣品前處理流程圖

4-4 化學分析法

本研究參考行政院環境保護署環境檢驗所公告之「土壤中總石油碳氫化合物檢測方法—氣相層析儀／火焰離子化偵測器法(NIEA S703.62B)」進行化學分析，氣相層析儀(Gas Chromatography, GC)：Agilent Technologies 7820A GC/FID，搭配 100%之二甲基矽酯管柱 DB-1HT(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.1 μ m)，適用高碳數(如柴油類或柴油以上)之油污染樣品分析。管柱：DB-1 (HT)長度 30 m $\times$ 0.32 mm 內徑，膜厚為 0.1 μ m。

4-5 生物分析法

4-5-1 綜合細胞毒性分析 Cytotoxicity ATP bioassay

細胞致死率與存活率廣泛被用於離體實驗中，可評估與確認污染物質是否對人體細胞或生物體產生毒性影響。目前傳統檢測細胞毒性方法為 MTT

assay(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，該方法雖穩定與操作簡易，但其靈敏度與再現性仍不足。為了提供更具全面毒性評估之數據，本計畫擬使用新型綜合細胞毒性評估方法(ATP assay)進行綜合毒性評估，因癌細胞的死亡會使粒線體失去生產 ATP 功能，透過細胞中葡萄糖酶轉化成 ATP 的過程(Formentini et al.,2010)，藉由存活的細胞生產之 ATP 含量高低證實此物質的毒性 (Ferri et al.,2001; Wang et al.,2001)。本計畫參照 Yang et al., 2015 之 ATP bioassay 實驗流程步驟，利用大鼠肝腫瘤細胞株(H4IIE)進行實驗，詳細原理與步驟如下所述。

4-5-1-1 ATP bioassay 原理：

ATP assay 原理為利用檢測活細胞受到物質的影響導致細胞凋亡後，存活的細胞仍會持續產生 ATP (Adenosine triphosphate)，24 小時後藉由藥劑破碎細胞將 ATP 釋放與 luciferase 及 luciferin 作用產生冷光反應，做為檢測活細胞的指標(如圖 4-4 所示)。

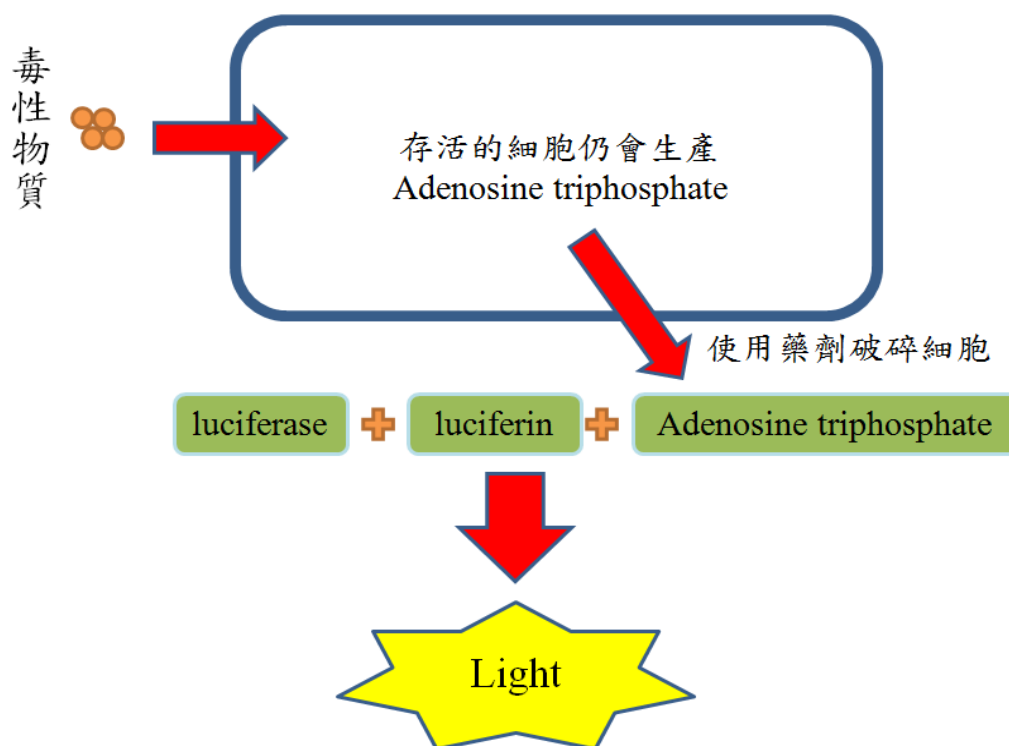


圖 4-4、ATP assay 作用原理示意圖

4-5-1-2 H4IIE 細胞培養與種殖細胞

本次研究使用細胞 H4IIE，並進行細胞繼代培養。此細胞培養需在無菌操作台進行，首先將實驗用細胞自液態氮桶取出，回溫後將 H4IIE 細胞培養至 10 cm 培養皿中，觀察其生長狀況，當細胞覆蓋盤面約八成後進行繼代培養如圖 4-5 所示。將培養皿中 MEM 抽起，加入 DPBS 溶液清洗兩次，接著加入 1.5 mL (1X Trypsin EDTA, TE) 均勻覆蓋盤面，放置 CO₂ 培養箱培養 3 分鐘，取出培養皿並拍打盤面使細胞脫離盤面，加入 6 mL MEM 充分混合均勻，取 100 μ L 加入 400 μ L Trypan blue 混和均勻後，取 100 μ L 於血球計數器計算細胞數量，再依實驗設計將 5×10^4 細胞分別加入 24 wells 白盤內，每一孔中體積為 500 μ L。最後放置 CO₂ 培養箱培養隔夜即完成，細胞種植流程如圖 4-6 顯示。

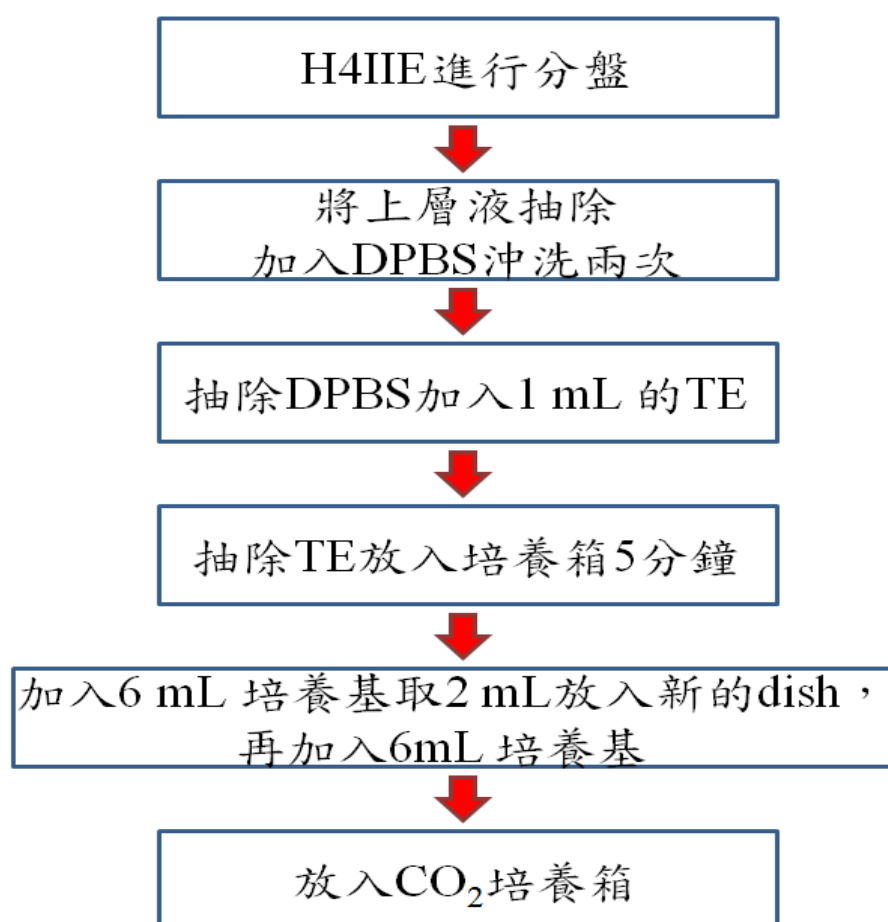


圖 4-5、細胞繼代培養步驟

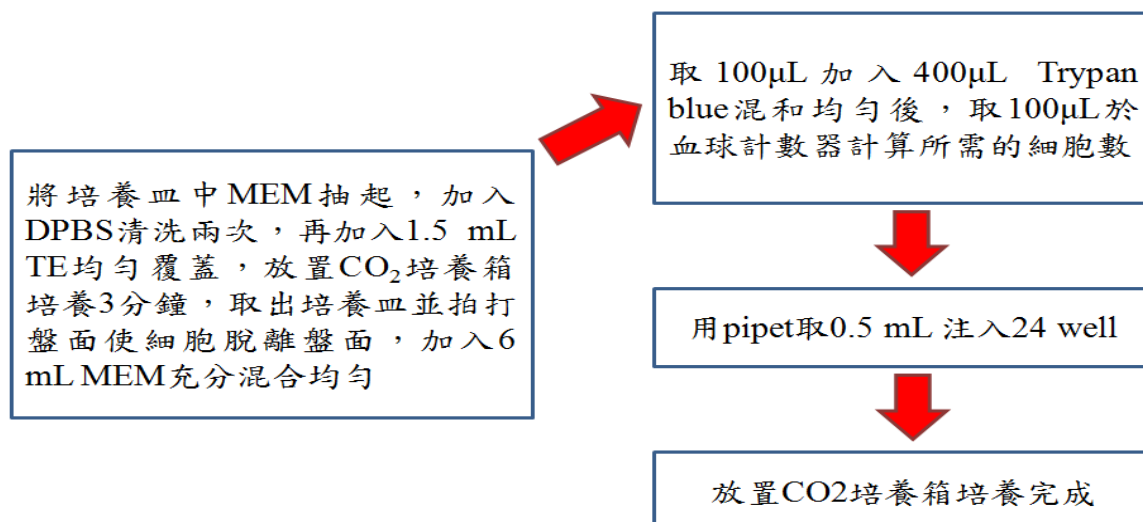


圖 4-6、H4IIE 細胞種植步驟

4-5-1-3 ATP bioassay 樣品暴露及偵測

將待測物質稀釋成 8 個不同濃度含比較組(例如：0、10、20、30、40、50、60、70%，或者連續 10 倍稀釋成 8 個濃度)，取稀釋後的化合物質以每孔體積 100μL/well 加入，另外需注意的是因 DMSO 仍會對細胞產生毒性影響，故經稀釋後 DMSO 濃度需為 1%，暴露時間為 24 小時加入 50μL/wells 藥劑放入儀器偵測，完整流程如圖 4-7 顯示。

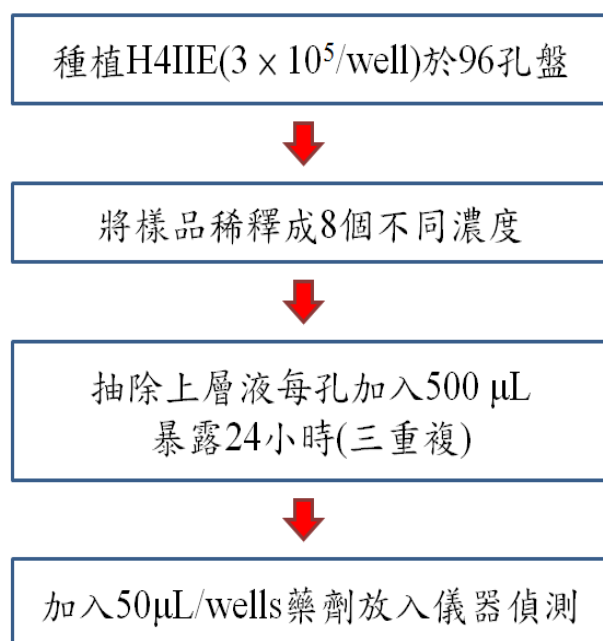


圖 4-7、ATP bioassay 分析步驟

4-5-2 致癌毒性分析 p53 bioassay

p53 之 8-OhdG(8-hydroxy-2-deoxy Guanosine)物質是生物受到 DNA 損傷而產生，其影響範圍有凋亡、代謝、衰老、分化的抑制及加速 DNA 修復、激活等條件常與癌症的病發相關，如直接性的 DNA 損傷、染色體異常、非致命性癌基因的活化、缺氧性或更多相關因素，已有文獻指出 8-OhdG 的濃度與某些癌症有正相關性(Baik et al., 1996; Farinati et al., 1998)。故檢測 8-OhdG 濃度反應將可用於判斷樣本可能產生致癌之風險，輔助評估毒性化學物質之致癌風險與非致癌風險數據。研究參照前人之研究相關成果，建立 ELISA 檢測法，發展屬於台灣土壤之高通量 DNA 損傷篩選技術並嘗試應用於測試真實環境基質樣本。詳細原理與步驟如下所述。

4-5-2-1 p53 bioassay 原理：

將 DNA 損傷而產生之 8-OhdG 於貼覆於板模下方，再添加抗體(8-OhdG Monoclonal Antibody-HRP Conjugated)與 8-OhdG 結合，接續移除廢液用 Wash buffer 清洗移除多餘的 8-OhdG 及抗體，再次添加 TMB Substrate 與抗體結合產生螢光，最後加入 Stop Solution 終止 TMB Substrate 反應，藉由偵測冷光的強度即可間接得知此物質是否含有活化性質(如圖 4-8 所示)。

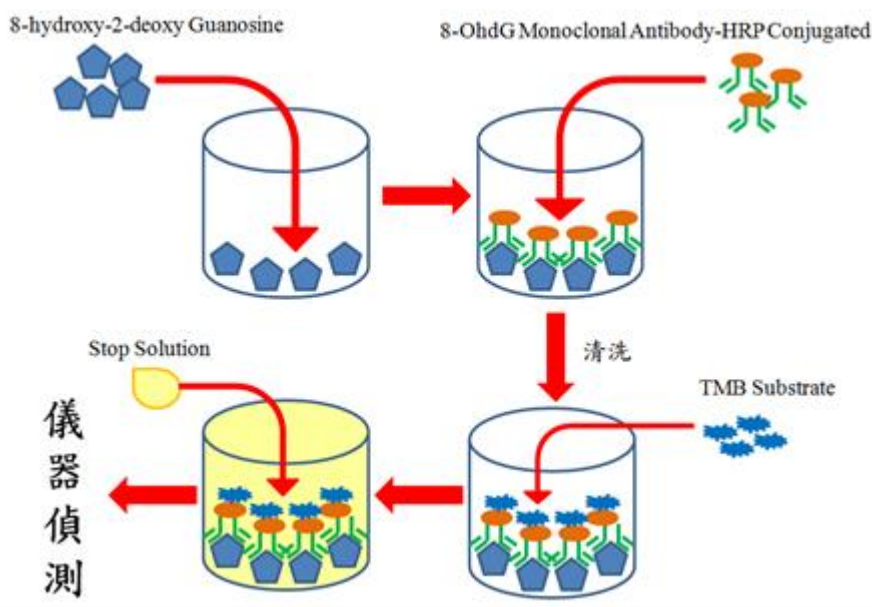


圖 4-8、8-OhdG 作用原理示意圖

4-5-2-2 HepG2 細胞培養與種殖細胞

本次研究初步使用細胞 HepG2，並進行細胞繼代培養。此細胞培養需在無菌操作台進行，首先將實驗用細胞自液態氮桶取出，回溫後將 HepG2 細胞培養至 10 cm 培養皿中，觀察其生長狀況，當細胞覆蓋盤面約八成後進行繼代培養如圖 4-9 所示。將培養皿中 DMEM 抽起，加入 DPBS 溶液清洗兩次，接著加入 1.5 mL (1X Trypsin EDTA, TE) 均勻覆蓋盤面，放置 CO₂ 培養箱培養 3 分鐘，取出培養皿並拍打盤面使細胞脫離盤面，加入 6 mL DMEM 充分混合均勻，取 100 μ L 加入 400 μ L Trypan blue 混和均勻後，取 100 μ L 於血球計數器計算細胞數量，再依實驗設計將 2×10^3 細胞分別加入 96 wells 白盤內，每一孔中體積為 100 μ L。最後放置 CO₂ 培養箱培養隔夜即完成，細胞種植流程如圖 4-10 顯示。

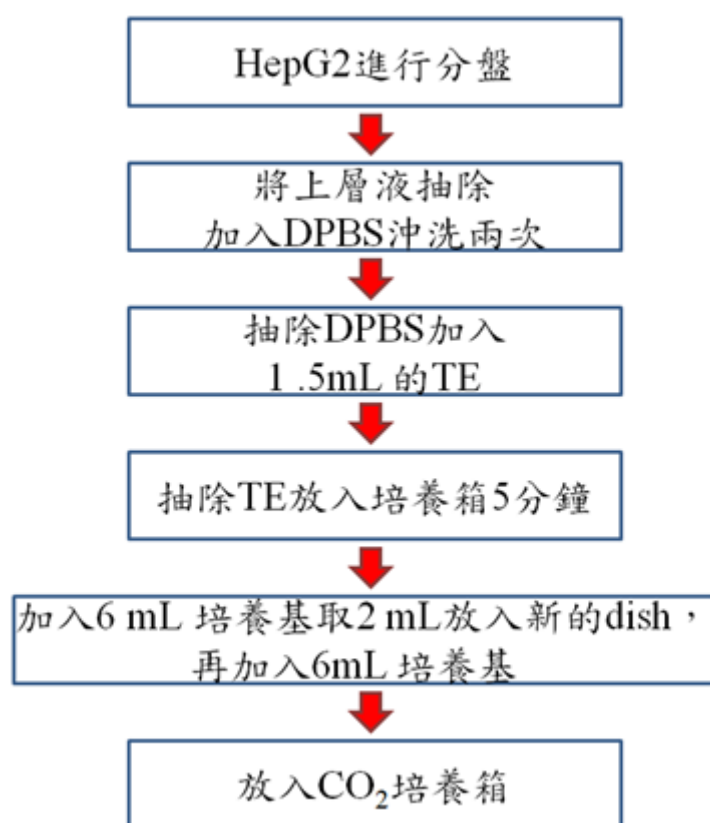


圖 4-9、HepG2 細胞繼代培養步驟

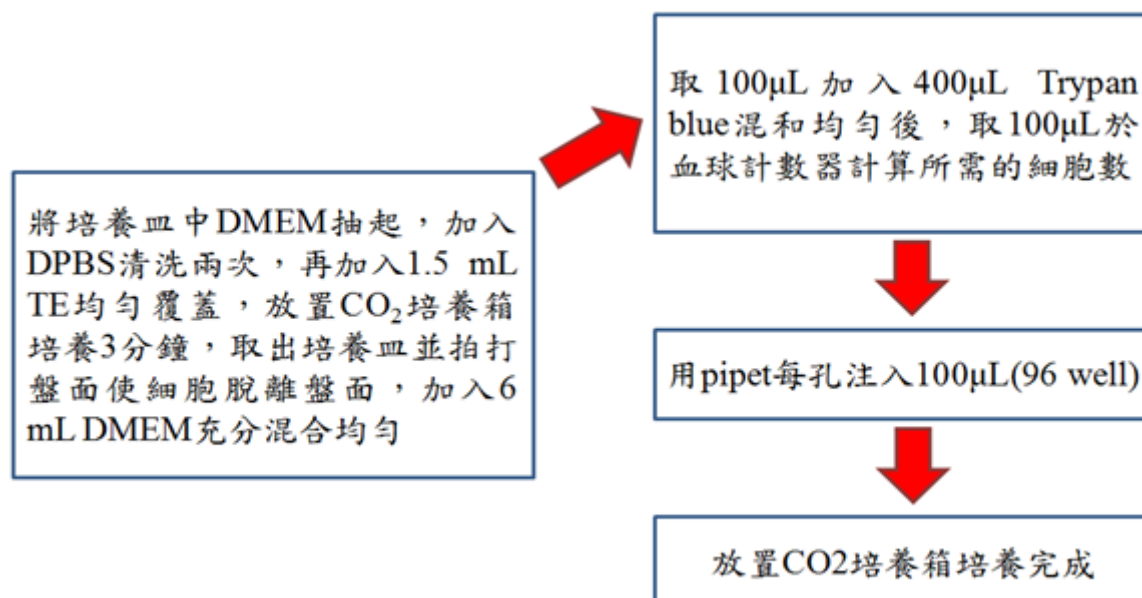


圖 4-10、HepG2 細胞種植步驟

4-5-2-3 DNA 損傷樣品暴露及偵測

將待測物質以不含胎牛血清之 DMEM 稀釋 100 倍，使 DMSO 變成 1% 濃度，避免高濃度 DMSO 會造成 DNA 損傷，以每孔體積 100 μ L/well 加入，暴露 24 小時後收取上層液。取出 10 μ L 的 3.06 μ g/mL 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine 標準品，稀釋成不同濃度之檢量線 (60 ng/mL、30 ng/mL、15 ng/mL、7.5 ng/mL、3.75 ng/mL、1.875 ng/mL 及 0.94 ng/mL)，加入 50 μ L 檢量線標準品及 50 μ L 樣品上層液於 96 孔盤，然後每孔加入 50 μ L 的 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine Antibody 反應基質，加蓋等待 1 小時 (溫度 20-25°C) 後移除廢液，取 300 μ L 的 1X Wash buffer 清洗 4 次，再每孔添加 100 μ L 的 TMB Substrate 產生螢光標記反應，蓋上第二份蓋子 (溫度 20-25°C) 避光 30 分鐘，最後取出蓋子加入 100 μ L 的 Stop Solution 停止反應並輕輕搖晃 (顏色轉成黃色)，並在反應 30 分鐘內放入儀器以 450 nm 的檢測吸光度，完整流程如圖 4-11 顯示。

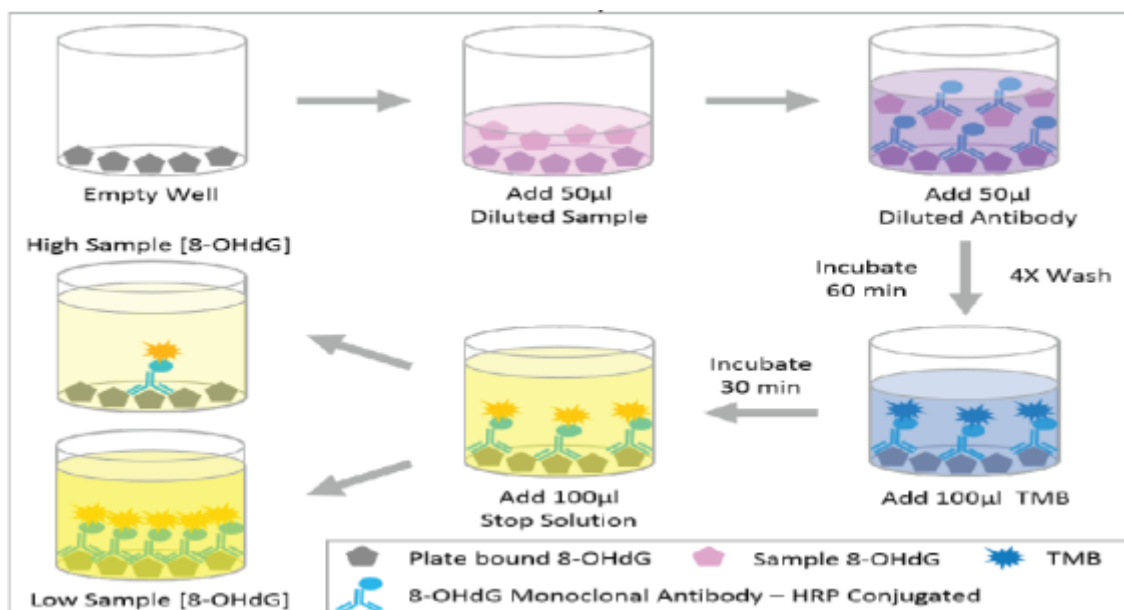


圖 4-11、ELISA 檢測法流程

4-5-3 芳香族化合物毒性篩選平台 Ad-DR bioassay

本研究之戴奧辛濃度生物法分析，使用 Ad-DRE-Luc/H4IIE(6X)細胞進行實驗，參考 Shy et al., 2015 之 Ad-DR bioassay 實驗流程步驟，以 3×10^4 cells/well 細胞數，將感染時病毒與細胞數量的比值(Multiplicity of infection, MOI)提升至 10，經過實驗測試，發現此上述參數，能有效提升方法之穩定度及準確性。

4-5-3-1 Ad-DR bioassay 生物分析法原理

將 dioxin response element (DRE) 與 luciferase 的 reporter vector (6X DRE-TATA-Luc) 穩定轉殖入腺病毒載體中(如圖 4-12 所示)，感染大鼠肝腫瘤細胞株(H4IIE)，使 H4IIE 細胞株帶有 DRE-luciferase reporter 基因，當戴奧辛或類戴奧辛物質與 AhR 結合後，經由一連串的訊息傳遞，誘發連結在戴奧辛反應單元(dioxin response element, DRE)後方的冷光基因表現，藉由偵測冷光的強度即可間接得知戴奧辛濃度(如圖 4-13 所示)。

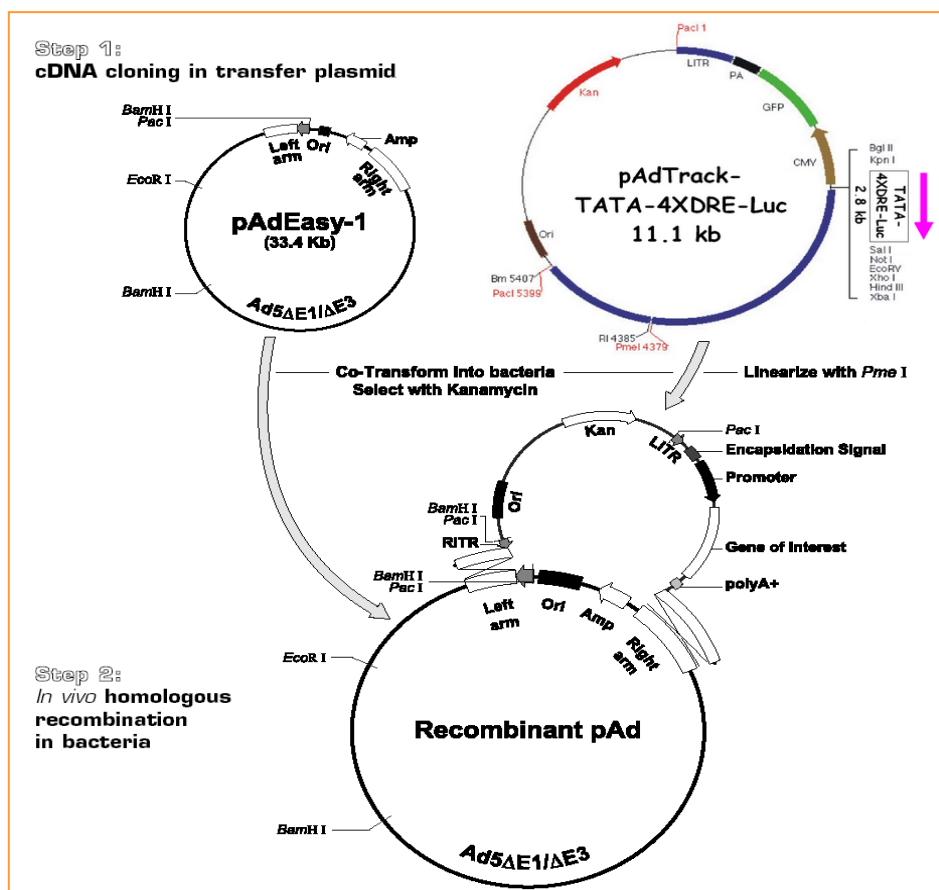


圖 4-12、轉殖 DRE-luciferase reporter 載入 Adenovirus 載體

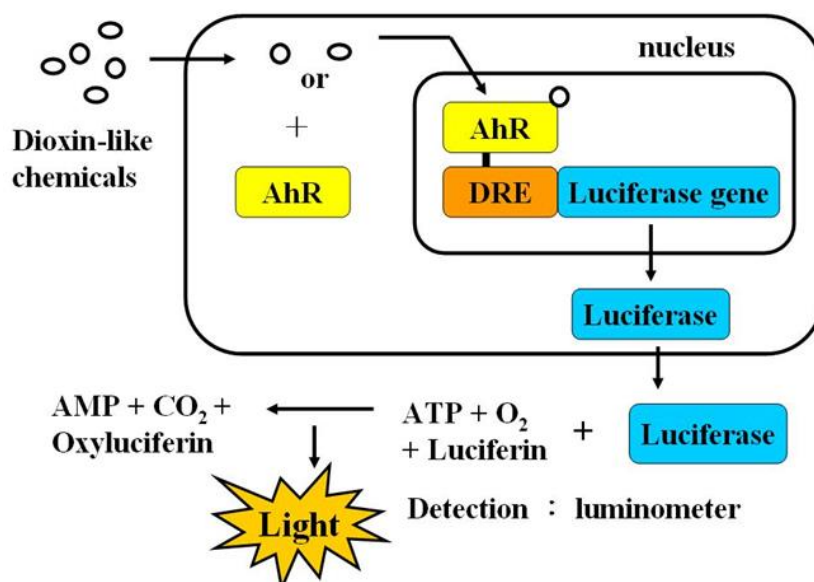


圖 4-13、Ad-DR bioassay 作用原理示意圖

4-5-3-2 H4IIE 培養基配置

將 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) 粉末加入 1000 mL 量筒中並加入去離子水 850 mL，並加入 2.2 g 的 NaHCO_3 放置電磁爐上利用磁石旋轉均勻混合一小時後，加入 100 mL 胎牛血清(FBS)以及 10 mL 盤尼西林(P/S)，最終 MEM 需含 10% FBS、1% P/S 總體積為 1 L，並將 pH 調整至 7.3。最後使用 0.22 μm 過濾器過濾後冷藏於 4°C 冰箱。詳細步驟如圖 4-14 所示。

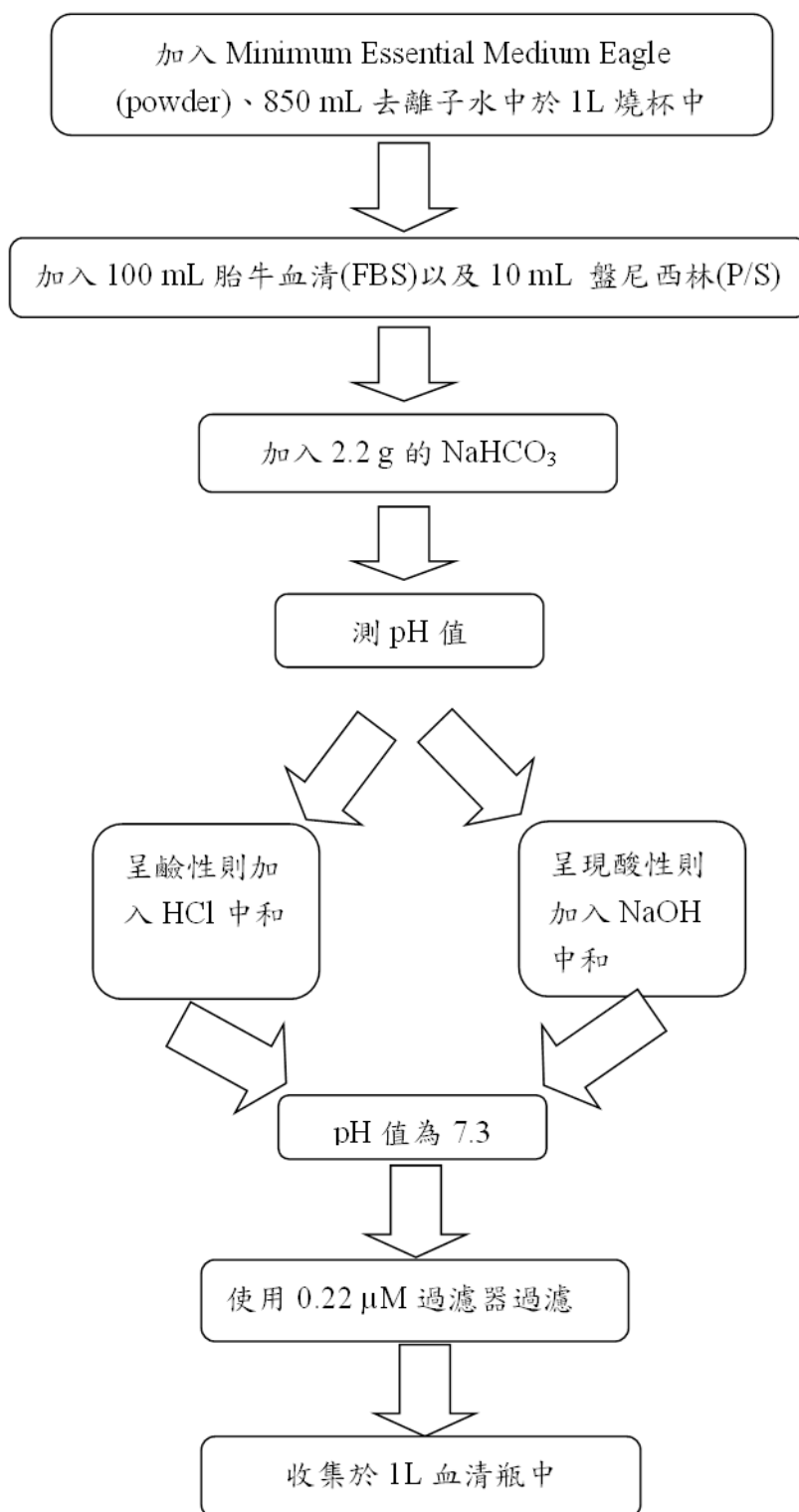


圖 4-14、MEM 培養基配置

4-5-3-3H4IIE 細胞培養與種殖細胞

本次研究使用腺病毒感染之宿主細胞為大白鼠肝腫瘤細胞株(rat-hepatoma, H4IIE)，並進行細胞繼代培養。細胞培養需在無菌操作台進行，首先將實驗用細胞自液態氮桶取出，回溫後將 H4IIE 細胞培養至 10 cm 培養皿中，觀察其生長狀況，當細胞覆蓋盤面約八成後進行繼代培養如圖 4-15 所示。將培養皿中 DMEM 抽起，加入 DPBS 溶液清洗兩次，接著加入 1.5 mL (1X Trypsin EDTA, TE) 均勻覆蓋盤面，放置 CO₂ 培養箱培養 3 分鐘，取出培養皿並拍打盤面使細胞脫離盤面，加入 7 mL MEM 充分混合均勻，取 100 μ L 加入 400 μ L Trypan blue 混和均勻後，取 100 μ L 於血球計數器計算細胞數量，再依實驗設計將 3×10^4 細胞分別加入 96 wells 白盤內，每一孔中體積為 65 μ L。最後放置 CO₂ 培養箱培養隔夜即完成，細胞培養流程如圖 4-16 顯示。

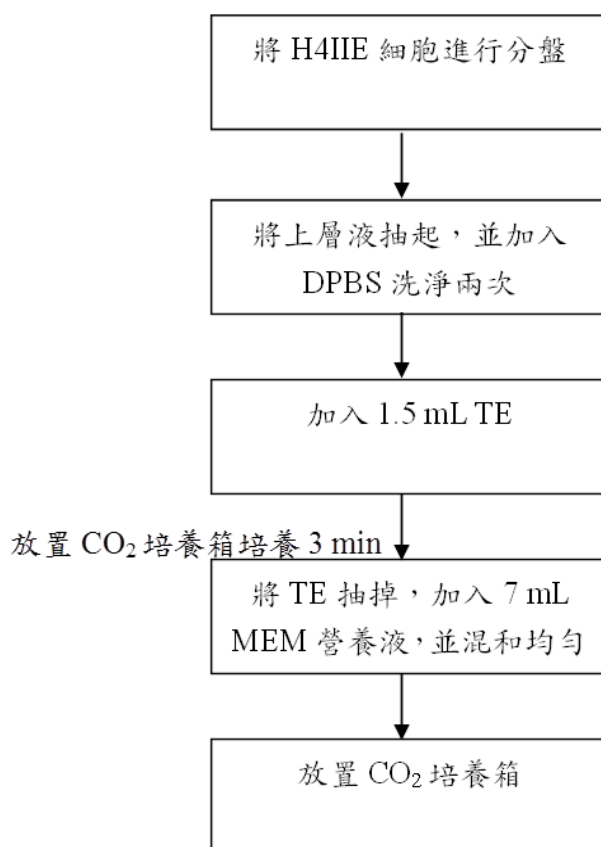


圖 4-15、細胞繼代培養步驟

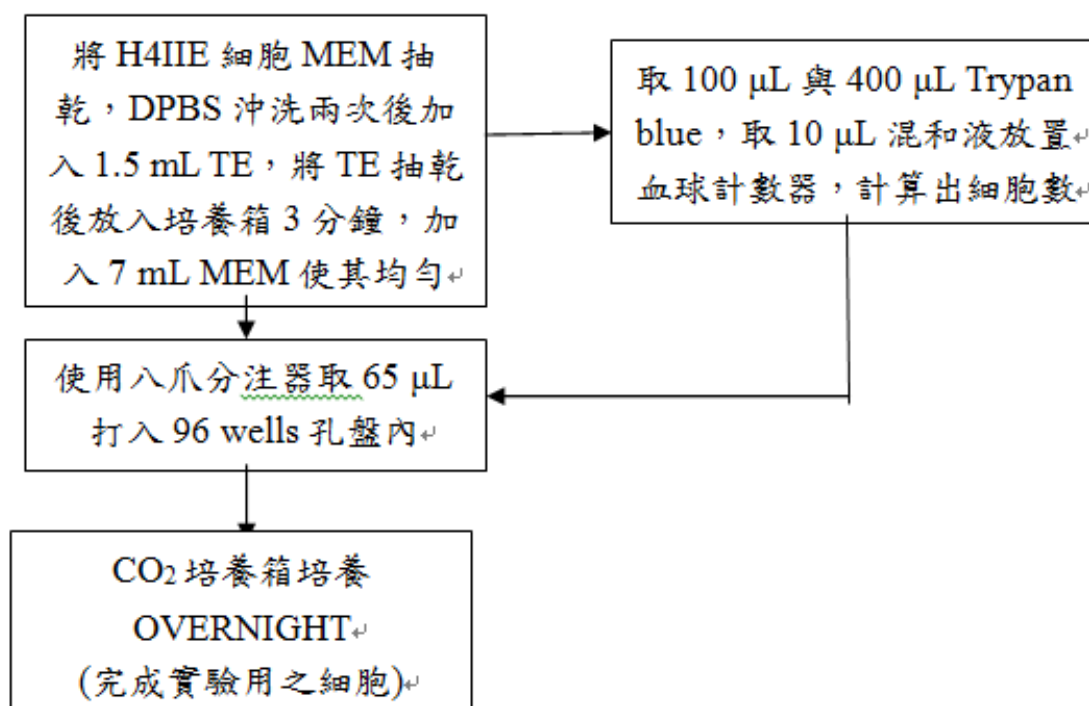


圖 4-16、H4IIE 細胞種殖步驟

4-5-3-4 腺病毒感染

將穩定轉殖入含 DRE 與 Luciferase 的 reporter vector (6X DRE-TATA-Luc)腺病毒 (Adeasy-TATA-6XDRE)溶於培養液經隔夜培養，接著取出 96 wells 白盤，將上層培養液抽離，加入(MOI=10 PFU/cell)病毒進行感染程序，腺病毒感染過程所添加之病毒濃度可視實驗需求調整，添加體積為 65 μ L，感染 24 小時。

4-5-3-5 Ad-DR bioassay 標準品及樣品暴露(檢量線)

生物分析方法由於需依靠檢量線進行公式配適藉此換算樣品濃度，因此本實驗在進行前需先依照實驗需求配製對應濃度 2,3,7,8-TCDD 之檢量線，將不同濃度之 2,3,7,8-TCDD 標準品利用連續稀釋方式配置，另外需注意的是因 DMSO 仍會對細胞產生毒性影響，故經連續稀釋後 DMSO 濃度需為 1%。本次實驗選用的 2,3,7,8-TCDD 標準品濃度分別為(0、1、2、4、12、40、120、400 pM)，將感染 24 小時後的 H4IIE 細胞取出，將上層液抽乾，將各濃度的 2,3,7,8-TCDD 標準品以及樣品加入對應的孔盤內，每一孔盤添加體積為 100 μ L 添加完成後在 CO₂ 培養箱暴露 24 小時，如圖 4-17 顯示。

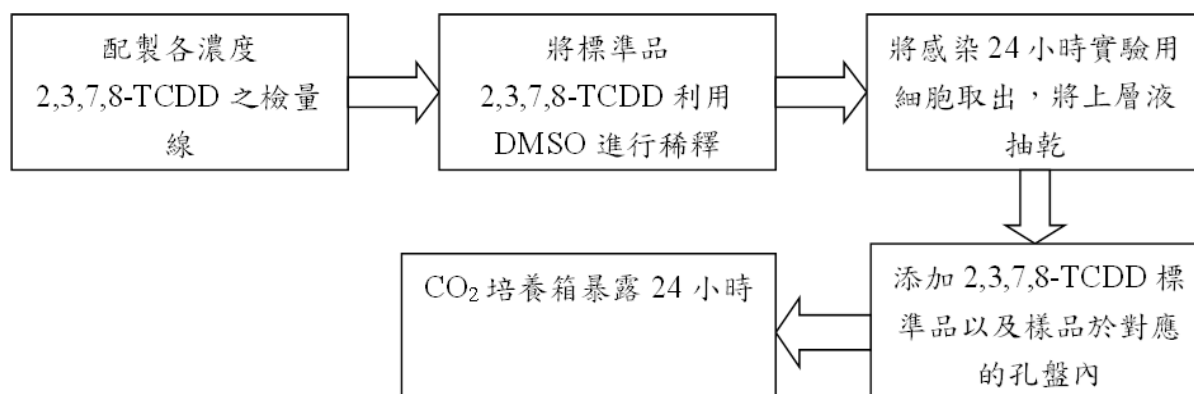


圖 4-17、2,3,7,8-TCDD 檢量線暴露

4-5-4 雌激素毒性分析 T47D-KBluc assay

本研究之類雌激素效應分析使用 T47D-KBluc 細胞進行實驗，參考 Gou et al.(2016)學者使用 T47D-KBluc assay 實驗步驟流程，以 2×10^4 cells/well 細胞數，並且實驗過程中使用無酚紅之培養基進行，此可減少 T47D-KBluc assay 實驗之干擾，能有效提升方法之穩定度及準確性。

4-5-4-1 T47D-KBluc assay 原理

T47D-KBluc 細胞株是在人類乳癌細胞株 T-47D 穩定轉染 Luciferase 的表現基因，當有雌激素或類雌激素化學物質存在下，與雌激素接受體結合產生專一性的 Luciferase 基因表現，產生之冷光強度量化雌激素活性，分析機轉如圖 4-18 所示。

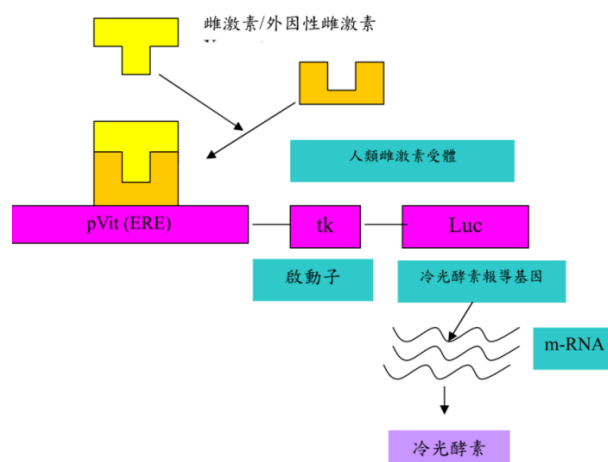


圖 4-18、T47D-KBluc assay 作用機制

4-5-4-2 T47D-KBluc 細胞之培養基配置

T47D-KBluc 細胞株使用 RPMI-1640 Medium 培養基。首先 RPMI-1640 Medium 將粉末加入 1000 mL 量筒中並加入去離子水 850 mL，並加入 2 g 的 NaHCO_3 放置電磁爐上利用磁石旋轉均勻混合一小時後，加入 100 mL 胎牛血清(FBS)以及 10 mL 盤尼西林(P/S)；最終 RPMI-1640 需含 10% FBS、1% PS、1% HEPEs(氫離子緩衝劑)及 1% Pyruvate(丙酮酸)總體積為 1 L，並將 pH 調整至 7.3，最後使用 0.22 μM 過濾器過濾後冷藏於 4°C 冰箱。詳細步驟如圖 4-19 所示。

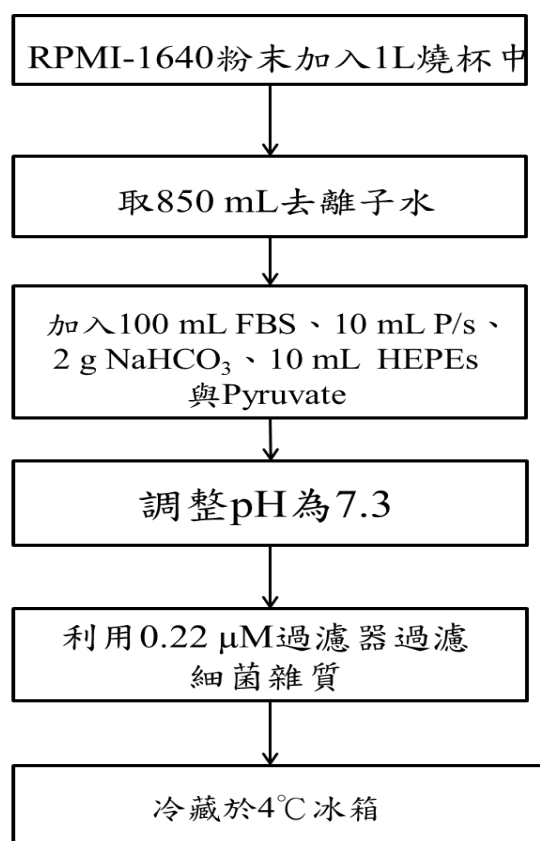


圖 4-19、RPMI1640 培養基配置

4-5-4-3 T47D-KBluc 細胞之繼代培養及種殖

本次研究雌激素效應之分析使用基因序列中加入螢火蟲發光基因之乳腺導管上皮腫瘤細胞株(T47D-KBluc)。細胞培養需在無菌操作台進行，實驗用細胞貯存於液態氮，自液態氮取出後將其回溫至 37°C 將細胞培養至 10 cm 培養皿中，觀察其生長狀況，當細胞覆蓋盤面約八成後進行繼代培養。

另外需特別注意 T47D-KBluc 生長方式為堆疊生長，且生長過程會有破碎細胞的現象，在繼代培養時需馴養該細胞，方法簡述如下：在繼代培養隔天，從培養箱取出 DISH 盤，DBPS 沖洗細胞兩次，將營養源抽離，使用 1.5 mL TE 將細胞貼

浮；再放入培養箱 3 分鐘後，使用 RPMI-1640 營養源，利用移液管使細胞均勻，隔 6 小時後再取出 DISH 盤將營養源抽離後，直接加入 7 mL 營養源。其目的為將破碎或死亡細胞利用此步驟中抽離 DISH 盤，留下較為健康且完整之細胞數，以利後續種植細胞準確性，步驟如圖 4-20。

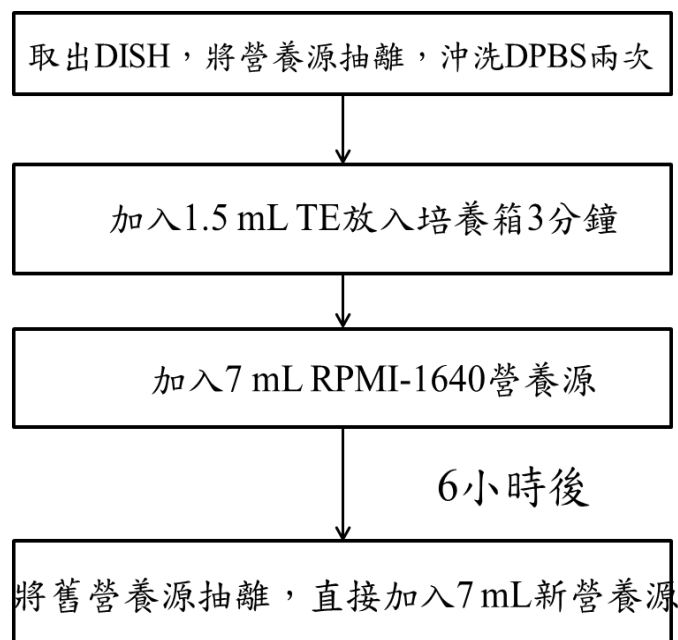


圖 4-20、T47D-KBluc 細胞馴養步驟

4-5-4-4 T47D-KBluc 細胞種植

由於含有酚紅營養源本身具有雌激素，會影響實驗數據結果，故在種植細胞前須採用無酚紅之培養基進行細胞馴養，且馴養過程中不使細胞產生堆疊現象，馴養完成後將細胞殖入 96 孔白盤，並放進入 CO₂ 培養箱培養 12 小時。

4-5-4-5 標準品及樣品暴露

將培養 12 小時後 T47D-KBluc 細胞株取出，移除 96 孔盤內的營養源，接著加入 90 μL 無酚紅之 RPMI1640，並依實驗需求配製 E₂ 檢量線。經稀釋後細胞株暴露的檢量線濃度分別為(0、0.1、1、5、10、50 pM)，DMSO 濃度為 1%，置於 35°C 培養箱中暴露 24 小時。24 小時後將孔盤內培養基移除，加入 100 μL 之 1 倍 Lysis buffer(Cat. No. E3971)以 100rpm 35°C 震盪 15 min 條件破碎細胞，隨後進行冷光讀值分析。指示劑採用短效型 luciferase assay buffer 與 luciferase substrate 粉末(Cat. No. E1501)。將上述兩藥劑回溫後混合均勻即可使用冷光儀檢測，每一孔盤加入

100 μ L 測定冷光讀值，實驗步驟如圖 4-21 所示。

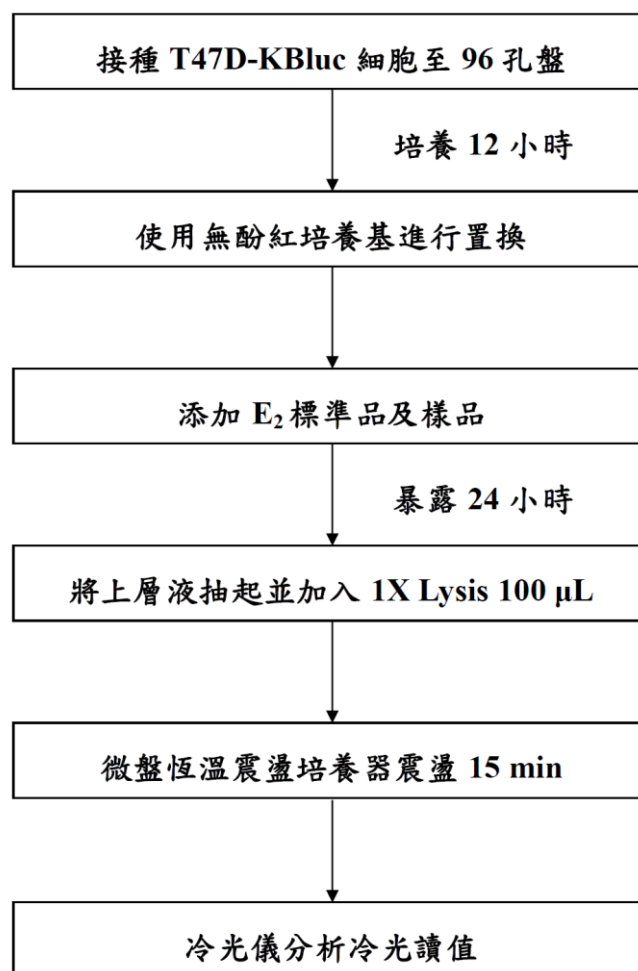


圖 4-21、T47D-KBluc assay 分析步驟

4-5-4-5 冷光值單位轉換

Ad-DR bioassay 與 T47D-KBluc assay 生物法之 96 孔盤冷光讀值均需扣除該盤之冷光背景值(空白樣品冷光平均值)後，再進行數據分析。2,3,7,8-TCDD 及 E₂ 標準品檢量線配製利用統計軟體 (Excel) 進行，將冷光讀值與標準品濃度，根據最小平方最適迴歸法則 (Least-squares best-fit)，找出最符合標準品讀值之曲線，該曲線為希爾方程式(Hill equation)，最後將檢測樣品冷光讀值(y 值)帶入方程式中，回推 x 值即為暴露培養液中類戴奧辛總毒性與總雌激素效應：

$$y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x}{a_1}\right)^{a_2}}$$

樣品經由 Hill equation 回推後得到之樣品濃度可利用下列公式將樣品濃度轉換為樣品的總毒性當量，戴奧辛及雌激素毒性單位分別表示為 ng-ADL-TEQ/kg 與 ng-ADL-EEQ/kg。

$$\text{樣品總毒性當量濃度} = \frac{x}{c} \times d \times \frac{v}{10^6} \times a \div w$$

x: 暴露培養液中類戴奧辛物質之濃度(pM)

c: 暴露培養液中 DMSO 之最終百分濃度

d: 樣品萃取液之稀釋倍數

v: 樣品萃取液之體積(μL)

a: 戴奧辛分子量為 322、雌激素分子量為 272

w: 樣品萃取克數(g)

4-6 品保品管(QA/QC)

4-6-1 化學分析法 QA/QC

1. 樣品製備及分析的品質管制：實驗室必須訂定樣品基質對於方法績效（精密度、準確度及偵測極限）的影響之書面文件的程序建立。至少應包括下述品管樣品的分析：空白樣品、添加樣品、重複樣品和查核樣品分析。
2. 依照「土壤檢測方法總則(NIEA S103)」規定，每批樣品或同批中每隔 20 個樣品，至少要做一個空白樣品分析、重複樣品分析、添加樣品分析、查核樣品分析。空白樣品分析值應小於方法偵測極限值之二倍。
3. 各實驗室依據樣品特性與實驗室需求，建立品管品保制度，應以標準參考樣品(CRM)，評估實驗室建立土壤中總石油碳氫化合物之分析能力。

4-6-2 生物分析法 QA/QC

4-6-2-1 Ad-DR bioassay

本研究之 Ad-DR bioassay 品質管制 QA/QC 係依據環檢所公告之「土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法-冷光酵素報導基因法 NIEA S901.60B」之品質管制之要求進行，如下：

1. 每 10 個樣品執行空白及品管分析 1 個。
2. 2,3,7,8-TCDD 檢量線:每一濃度至少進行三重複。
3. DMSO 試劑空白:至少進行三重複，以平均值作為該盤之冷光背景值。
4. 方法空白濃度值不得高於偵測極限 2 倍。
5. 檢量線查核樣品:應進行三重複，三重複之相對標準偏差應於 15%。查核樣品之相對誤差值宜在 $\pm 15\%$ 以內。
6. 待測樣品之稀釋度進行三重複測試，且其相對標準偏差應小於 15%。

4-6-2-2 P53 bioassay、ATP bioassay 與 T47D-KBluc assay

目前國內尚無 P53 bioassay、ATP bioassay、T47D-KBluc assay 實驗法規規範，故由實驗室自行建立相關規範，但 P53 bioassay、ATP bioassay、T47D-KBluc assay 反應讀值較小，實驗 RSD 值難以符合 15%之規範內，故調整如下：

1. 檢量線:每一濃度至少進行三重複。
2. DMSO 試劑空白:至少進行三重複，以平均值作為該盤之冷光背景值。
3. 方法空白濃度值不得高於偵測極限 2 倍。
4. 檢量線查核樣品:應進行三重複，三重複之相對標準偏差應於 30%。查核樣品之相對誤差值宜在 $\pm 30\%$ 以內。
5. 待測樣品之稀釋度進行三重複測試，且其相對標準偏差應小於 30%。

4-7 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備 註
1. 文獻收集													
2. 樣本採集 與運送													
3. 樣本前處 理													
4. 綜合細胞 毒性分析													
5. 致癌毒性 分析													
6. 芳香族碳 氫化合物毒 性分析													
7. 雌激素毒 性分析													
7. 數據整理 與分析													
8. 期中報告							※						
9. 期末報告											※		
工作進度估 計百分比（累 積數）	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%		

預定查核點	期中	1. 完成各 7 件次對照組與實驗組土壤採樣 2. 完成對照組各 7 件次土壤四種環境荷爾蒙毒性分析 3. 完成實驗組各 7 件次土壤四種環境荷爾蒙毒性分析 4. 完成期中報告
	期末	1. 完成各 8 件次對照組與實驗組土壤採樣 2. 完成對照組各 8 件次土壤四種環境荷爾蒙毒性分析 3. 完成實驗組各 8 件次土壤四種環境荷爾蒙毒性分析 4. 所有數據整理與分析 5. 完成期末報告

發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物
篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物

(五) 結果與討論

5-1 土壤樣品之化學分析

本研究共檢測 15 件次受油品污染之土壤與 15 件次背景土樣，其中受油品污染之樣本依據其地理位置與污染程度，將其定義為本研究高污染(Soil-1 至 Soil-5)、低污染(Soil-11 至 Soil-15)及輕度污染(Soil-6 至 Soil-10)之土壤樣本，如表 5-1 所示。本次化學分析檢測土壤中主要的污染物為 BTEX (苯、乙苯、二甲苯、甲苯)及總石油碳氫化合物 (TPH)，在高污染土壤樣本中發現大多數數值 BTEX 與 TPH 均超過土壤管制標準，其檢出之平均濃度依序為苯： $49.0 \pm 47.1 \text{ mg/kg}$ 、乙苯： $174 \pm 147 \text{ mg/kg}$ 、二甲苯： $527 \pm 476 \text{ mg/kg}$ 、甲苯： $218 \pm 255 \text{ mg/kg}$ 與 TPH： $11100 \pm 7520 \text{ mg/kg}$ 。其中以 Soil-2 土壤樣本受到之污染最為嚴重，苯、乙苯、二甲苯、甲苯與 TPH 濃度分別為 111、355、1270、477 與 18400 mg/kg。低污染土壤樣本相較高污染土壤樣本濃度偏低，在 TPH 濃度方面大多超過土壤管制標準，其檢出之平均濃度(Mean $\pm$ SD)依序為苯： $3.72 \pm 3.61 \text{ mg/kg}$ 、乙苯： $57.8 \pm 68.7 \text{ mg/kg}$ 、二甲苯： $271 \pm 406 \text{ mg/kg}$ 、甲苯： $27.6 \pm 24.0 \text{ mg/kg}$ 、TPH： $3550 \pm 5530 \text{ mg/kg}$ ，其中僅有 Soil-12、Soil-15 土壤樣本 TPH 濃度符合管制標準(80.7 mg/kg、574 mg/kg)，其餘均超過土壤管制標準(<1000 mg/kg)。輕度污染土壤樣本相較於高污染及低污染土壤樣本濃度明顯偏低，BTEX 與 TPH 均符合土壤管制標準，其檢出之平均濃度(Mean $\pm$ SD)依序為苯： $0.142 \pm 0.175 \text{ mg/kg}$ 、乙苯： $0.196 \pm 0.325 \text{ mg/kg}$ 、二甲苯： $0.441 \pm 0.680 \text{ mg/kg}$ 、甲苯： $0.293 \pm 0.316 \text{ mg/kg}$ 、TPH： $15.2 \pm 16.4 \text{ mg/kg}$ ，在 BTEX 與 TPH 濃度方面皆遠低於土壤管制標準。背景土壤樣本的部份濃度低於本實驗方法偵測極限(MDL)，詳如表 5-1 所示。

本研究除了檢測原訂之目標化合物外，也根據期中審查委員之建議，於本研究中額外檢測 MTBE 濃度。然而，高濃度與輕微污染之樣本均在期中報告前已完成採樣與分析，為了避免油品降解導致數據失真之問題，故僅能在後續採樣之輕度污染土壤樣本中(n=5)與背景土樣(n=15)額外檢測 MTBE 濃度，其平均濃度分別為 $0.927 \pm 1.29 \text{ mg/kg}$ 與 <MDL。

表 5-1、土壤樣品中 BTEX 與 TPH 濃度單位:mg/kg

檢測 項目	苯	乙苯	二甲苯 ^a	甲苯	TPH	MTBE
<u>高污染土壤樣本</u>						
Soil-1	<2.00	44.7	167	57.3	1290	-
Soil-2	111	355	1270	477	18400	-
Soil-3	66.6	287	493	24.6	15300	-
Soil-4	64.0	164	640	517	9540	-
Soil-5	1.23	17.0	66.4	15.9	<MDL ^b	-
Mean±SD	49.0±47.1	174±147	527±476	218±255	11100± 7520	
<u>輕度污染土壤樣本</u>						
Soil-6	0.218	0.0885	0.509	0.203	21.1	1.13
Soil-7	0.0668	0.115	0.0811	0.530	13.8	0.176
Soil-8	0.00480	0.00130	0.00460	0.00690	0.0950	0.0135
Soil-9	0.00670	0.00380	0.0117	0.0128	0.900	0.216
Soil-10	0.413	0.770	1.60	0.710	39.9	3.10
Mean±SD	0.142±0.175	0.196±0.325	0.441±0.680	0.293±0.316	15.2±16.4	0.927± 1.29
<u>低污染土壤樣本</u>						
Soil-11	<5.00	172	873	58.7	13300	-
Soil-12	0.22	1.54	<MDL ^c	<MDL ^d	80.7	-
Soil-13	9.40	66.1	11.6	<2.00	2610	-
Soil-14	<2.00	38.9	157	31.4	1210	-
Soil-15	<2.00	10.7	40.9	18.3	574	-
Mean±SD	3.72±3.61	57.8±68.7	271±406	27.6±24.0	3550± 5530	
<u>Background(n=15)</u>						
Mean±SD	0.000875± 0.000643	<MDL	0.00142± 0.000328	0.00537± 0.000521	0.00428± 0.00125	<MDL

a 二甲苯=對二甲苯+鄰二甲苯 b:MDL=54.3, c:MDL=0.140, d:MDL=0.053

5-2 ATP bioassay 方法測試評估

本研究已完成 ATP bioassay 之實驗方法的建立，利用已知對細胞具有毒性之化合物(乙醇)進行該系統數據測試。本次實驗結果顯示，將不同濃度(以培養基稀釋乙醇濃度為 10、20、30、40、50、60、70、80%)之乙醇化合物暴露於細胞株中，其細胞存活率會隨著乙醇濃度增加而減少，於乙醇濃度為 70%時對細胞致死率最高(80%)，如圖 5-1 所示。由上述的研究結果顯示，本研究所建置之 ATP bioassay 確實可用於評估毒性化合物對細胞之影響，其方法再現性良好(三重覆 RSD 值均小於 25%)，且本次研究結果與傳統細胞毒性評估方法(MTT assay)數據具有高度的關聯性，可快速判別該環境基質樣本對於細胞之毒性影響。

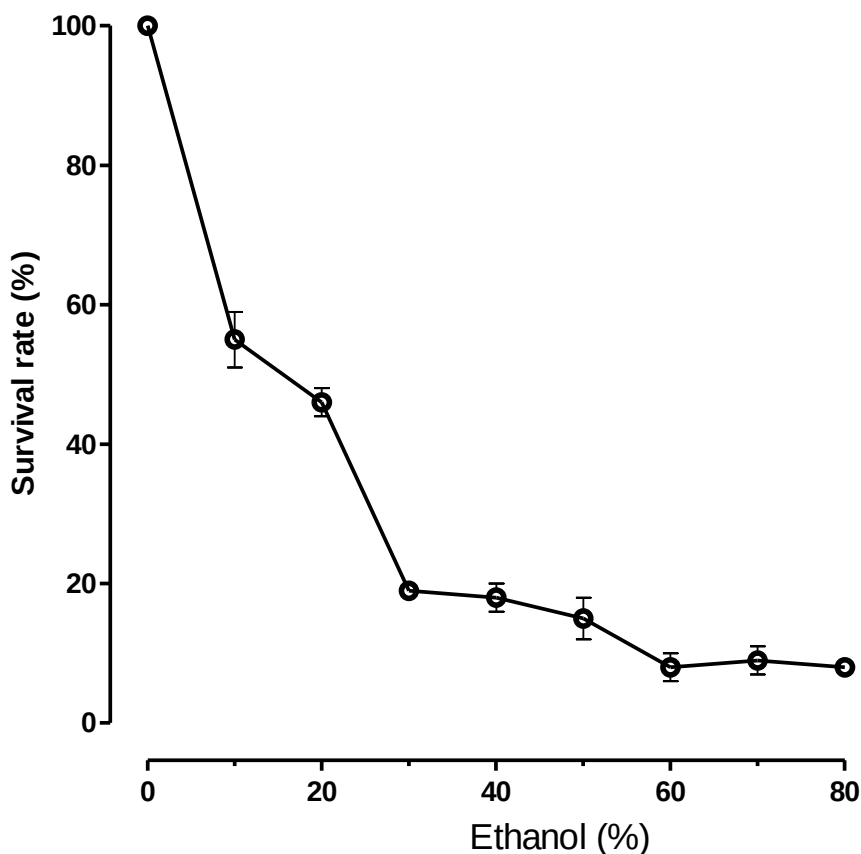


圖 5-1、ATP assay 評估乙醇毒性劑量反應圖

5-2-1 土壤中綜合細胞毒性

本研究利用 ATP bioassay 測試 36 件次土壤樣本中有機相與無機相萃取液中細胞毒性反應，其結果如表 5-2 所示。根據化學法數據將本研究樣本分為 4 個種類(污染程度較高、低污染、輕微污染與背景土樣)，其有機相平均細胞存活率分別為 83%、100%、106%與 104%；無機相平均細胞存活率則為 101%、100%、106%與 101%，上述數據顯示土壤樣本污染以有機污染物為主。進一步利用 Kruskal-Wallis 檢定探討不同污染程度之土壤其細胞存活率之差異性，污染程度較高之土壤樣本其有機相細胞毒性顯著高於其他三種土壤樣本(低污染、輕微污染與背景土樣)($p=0.027$)；四種土壤樣本中無機相細胞毒性則並無顯著之差異($p=0.387$)。將本研究細胞毒性結果與化學分析數據進行 spearman's 相關性統計檢定，有機相細胞存活率與苯($r= -0.194$)、乙苯($r= -0.165$)、二甲苯($r= -0.283$)、甲苯($r= -0.337$)

與 TPH 濃度($r = -0.097$)均呈現負相關，但並未達到顯著之程度(表 5-3)。

表 5-2、土壤樣品中細胞存活率分析

	存活率(%)		有機	無機
	有機	無機	<i>p</i> -value ^a	<i>p</i> -value ^a
<u>高污染之土樣(n=5)</u>				
Soil-1	81.0	115		
Soil-2	103	99.0		
Soil-3	82.0	79.0		
Soil-4	68.0	104		
Soil-5	81.0	109		
<u>輕微污染之土樣(n=5)</u>				
Soil-6	108	103		
Soil-7	103	103		
Soil-8	102	107	0.027*	0.387
Soil-9	103	97.0		
Soil-10	88.0	91.0		
<u>低污染之土樣(n=5)</u>				
Soil-11	105	110		
Soil-12	111	107		
Soil-13	109	107		
Soil-14	110	104		
Soil-15	99.0	103		
<u>背景土樣</u>				
Background (n=3)	104	102		

^a 使用 Kruskal-Wallis 檢定

* p -value<0.05, ** p -value<0.01, *** p -value<0.001

表 5-3 土壤樣品中細胞存活率與化學分析之相關性統計 (Spearman's rho)

	有機存活率	苯	乙苯	二甲苯	甲苯	TPH
有機存活率	1.00					
苯	r= -0.194 p= 0.487	1.00				
乙苯	r= -0.165 p= 0.557	r= 0.971** p< 0.001	1.00			
二甲苯	r= -0.283 p= 0.306	r= 0.910** p< 0.001	r= 0.936** p< 0.001	1.00		
甲苯	r= -0.337 p= 0.219	r= 0.871** p< 0.001	r= 0.882** p< 0.001	r= 0.964** p< 0.001	1.00	
TPH	r= -0.097 p= 0.731	r= 0.975** p< 0.001	r= 0.986** p< 0.001	r= 0.921** p< 0.001	r= 0.864** p< 0.001	1.00

*p-value<0.05, **p-value<0.01, ***p-value<0.001

5-3 致癌性篩選(P53 bioassay)

人體中 P53 機制反應 DNA 損傷與染色體異常，亦為致癌之主要因子，故可作為致癌性評估之依據。8-OHdG 普遍被視為偵測生物體 DNA 氧化傷害之反應指標，Guo et al., (2016) 研究顯示，結腸癌患者尿液中 8-OHdG 濃度高於健康之族群；在大數據的分析中也發現心血管疾病之患者其尿液中 8-OHdG 濃度顯著高於健康之族群 (Di Minno et al., 2016)，上述研究顯示 8-OHdG 適合做為癌症早期預警之生物指標(Guo et al., 2016)。故本研究將藉由檢測受污染之土壤樣本其誘發人體細胞株之 8-OHdG 反應，利用快速且便利之生物快篩技術，評估該地土壤是否對人體產生風險。

圖 5-2 為本研究利用 8-OHdG 標準品進行 P53 bioassay 之標準品測試，兩者間具有良好的劑量反應曲線 ($R^2=0.993$)，符合生物檢測法之規範(NIEA S901 60b)。本研究共檢測 36 件次受油品污染與背景土壤樣本之 8-OHdG 濃度，如附表 7-1 與圖 5-3 所示。本研究結果顯示，受油品污染與背景土壤樣本中有機相之 8-OHdG 平均濃度分別為 8.39 ± 0.588 及 4.85 ± 2.31 ng/g；無機相平均濃度則為 8.52 ± 0.554 及 4.40 ± 0.447 ng/g。使用 Mann-whitney test 檢定受污染土壤樣本與背景樣本中 8-OHdG 濃度，無論在有機相或無機相兩者均具有顯著的差異性($p=0.002$)，但其與本研究化學分析法之目標化合物並未具有顯著的相關性($p>0.05$)。本次研究所建立之 P53 bioassay 可區分土壤是否來自於受油品污染之樣本，但其定量之能力

仍需更進一步的改善。推估造成本研究回推能力受限之影響，可能來自於實驗參數樣本暴露時間過長，導致其受污染之土壤樣本所誘發之 8-OHdG 濃度均屬於過度反應之數據。

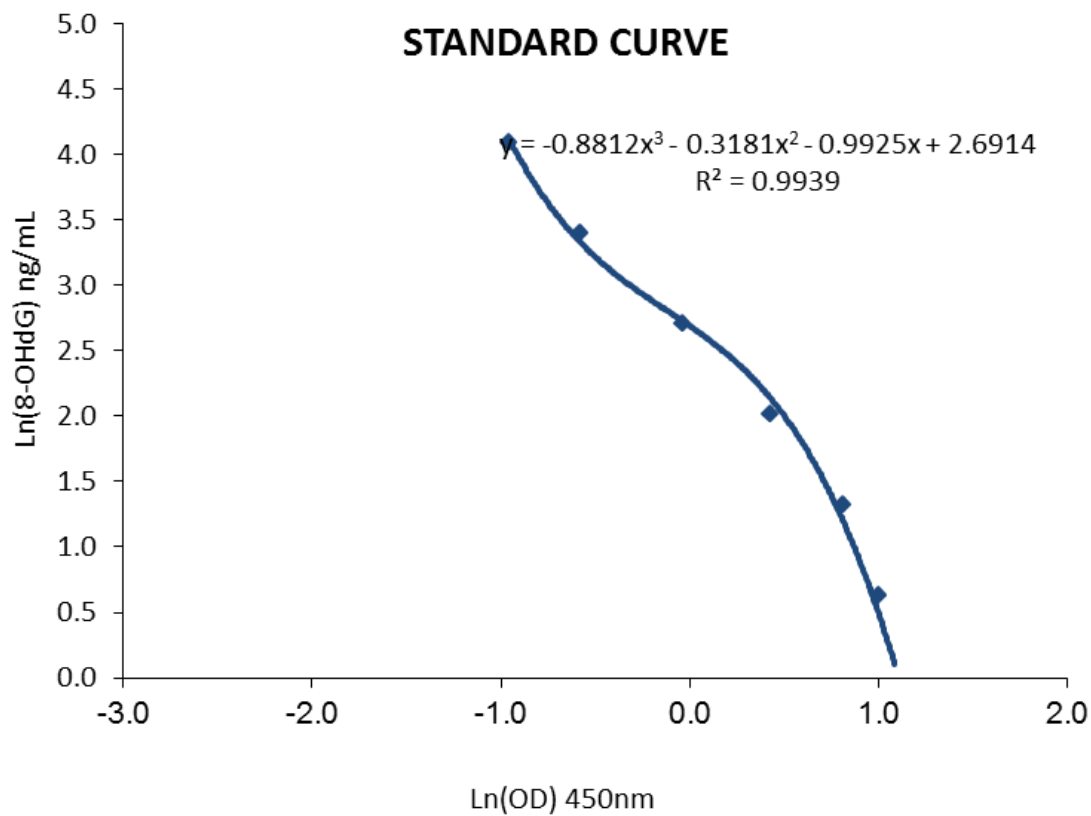


圖 5-2、P53 bioassay 測試 8-OHdG 劑量反應曲線

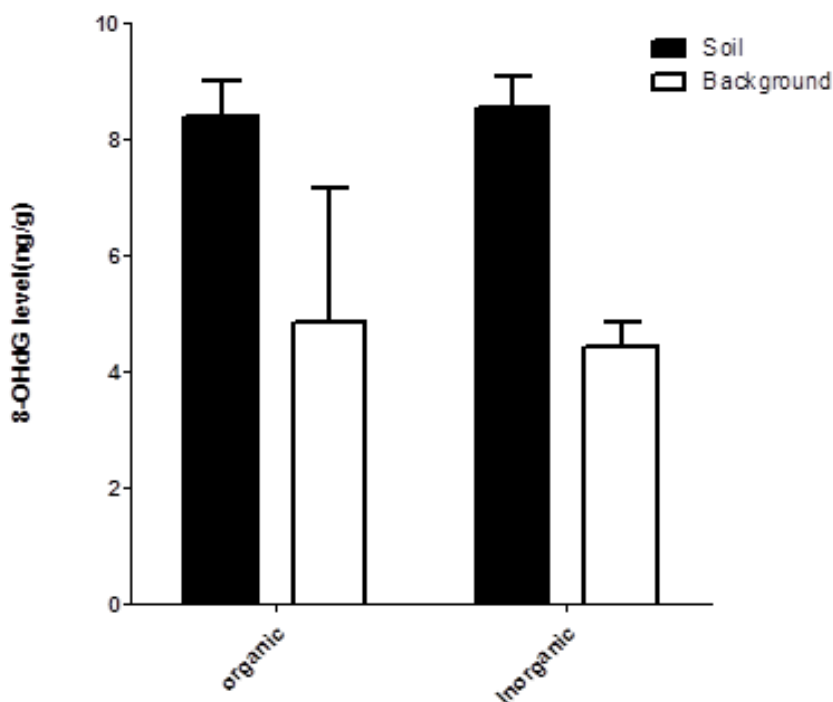


圖 5-3 受污染與背景土壤樣本中 8-OHdG 之濃度

5-4 芳香族碳氫化合物分析

5-4-1 最佳實驗參數建立

本次研究擬先建立 Ad-DR bioassay 最佳之實驗條件(探討不同病毒感染複數(MOI)),並用於後續真實樣品檢測。本次研究將比較 MOI=2 與 MOI=10 Ad-DR bioassay 檢量線、相對標準偏差(relative standard deviation, RSD)值、半效應濃度(effective Concentration 50%, EC₅₀)與 LOD 之實驗數據。表 5-4 與表 5-5 為檢量線三重複 RSD 值數據比較,本次研究所使用的 2,3,7,8-TCDD 檢量線濃度分別為 1、2、4、12、40、120 與 400 pM, MOI=2 檢量線 RSD 值為 6%-10%, MOI=10 檢量線 RSD 值為 4-7%。MOI=2 與 MOI=10 之 2,3,7,8-TCDD EC₅₀ 濃度分別為 26.6 pM 與 14.7 pM, LOD 分別為 0.369 pM 與 0.237 pM。比較上述結果,在 RSD 值、EC50 與 LOD 上 MOI=10 明顯在敏感度與穩定度優於 MOI=2,這使得 Ad-DR bioassay 的實驗操作難度下降更易符合法規規範。圖 5-4 至圖 5-5 為兩實驗參數 Ad-DR bioassay 檢量線比較圖,將 96 孔盤同時檢測兩筆檢量線數據探討兩者之檢測能力,共進行 2 批次檢量線測試。本次研究結果顯示,MOI=10 在低濃度 2,3,7,8-TCDD 檢量線之相對誘導冷光百分比略高於 MOI=2,意味著面對低濃度樣本時,MOI=10

之實驗參數具有比 MOI=2 更好的感度。後續本計畫將會使用此最佳參數(MOI=10)進行真實土壤樣本測試。

表 5-4、比較不同病毒 MOI 參數平均檢量線 RSD 值(%)

檢量線(pM)	MOI=2	MOI=10
0	6	6
1	10	5
2	8	6
4	9	6
12	7	7
40	9	4
120	9	7
400	10	6

表 5-5、比較不同病毒 MOI 參數 EC₅₀ 與 LOD

	檢量線 EC ₅₀	LOD
MOI=2	26.6	0.369
MOI=10	14.7	0.237

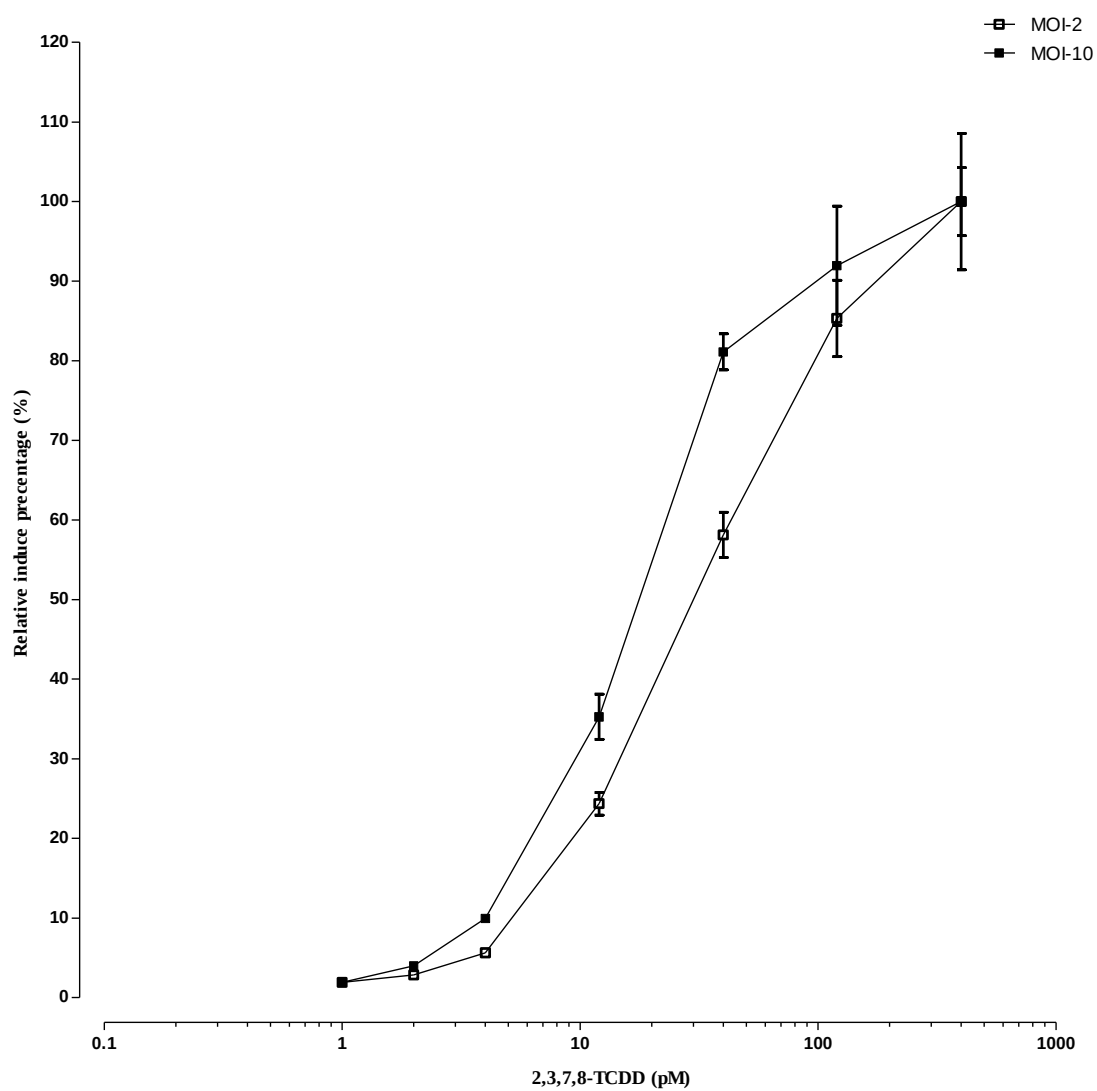


圖 5-4、比較不同病毒 MOI 參數之檢量線反應(1/2)

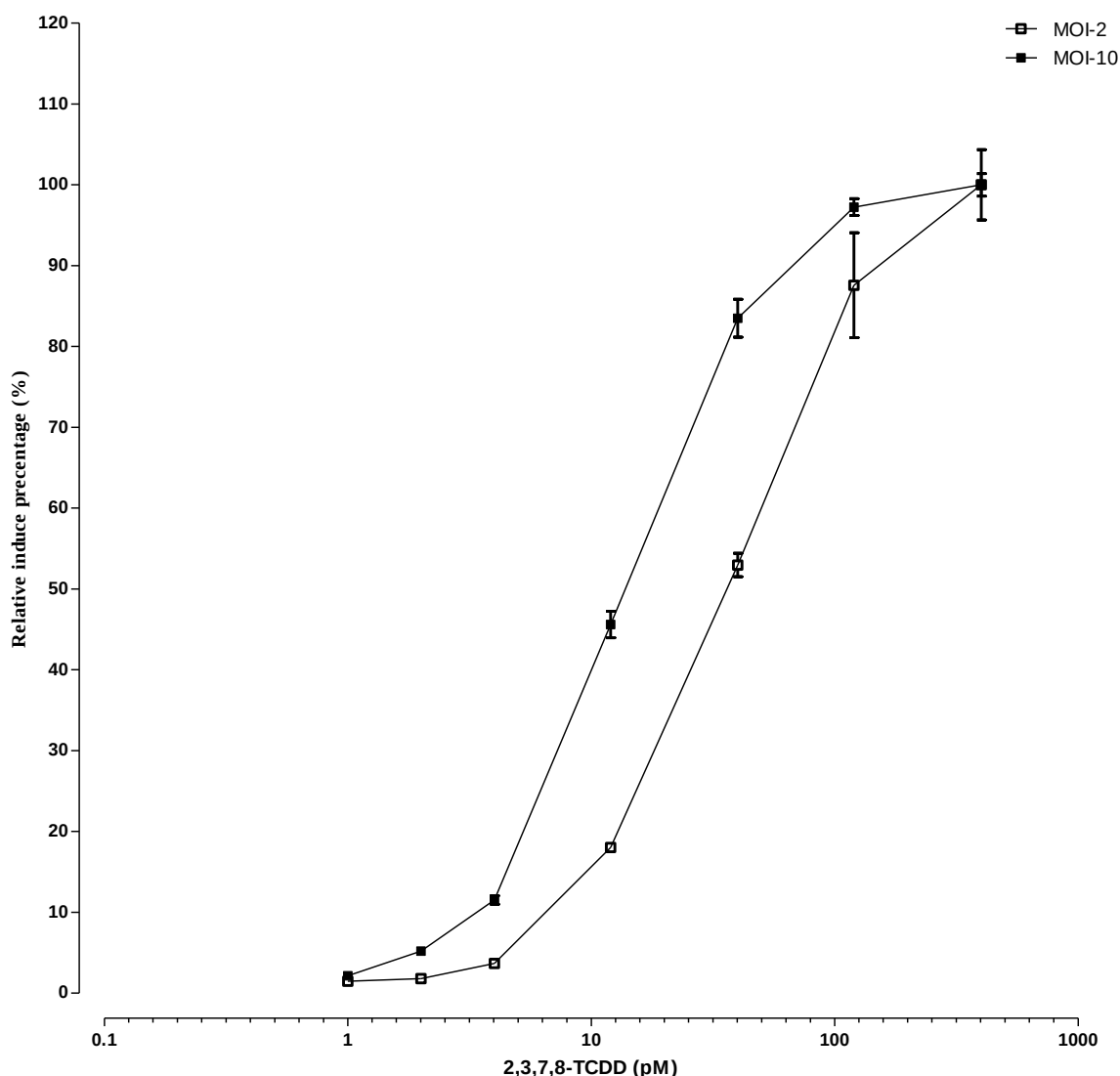


圖 5-5、比較不同病毒 MOI 參數之檢量線反應(2/2)

5-4-2 土壤中芳香族碳氫化合物濃度評估

Ad-DR bioassay 檢測技術已趨於成熟與穩定，許多的文獻均證實該方法有足夠的穩定度與敏感度可扮演戴奧辛生物快篩的角色(Shy et al., 2015; Lin et al., 2013)，上述研究亦顯示戴奧辛為一個影響土壤中芳香族碳氫化合物反應之重要因子。為了避免戴奧辛濃度影響數據之結果，故本研究除了探討受油品污染之土壤中總芳香族碳氫化合物所誘發 AhR 反應(AhR-mediated Luciferase response)，亦同時針對該樣本中戴奧辛濃度(Dioxin levels)進行分析。

本次研究分別檢測 32 件次受油品污染與背景土樣中芳香族碳氫化合物反應

及戴奧辛濃度，同時也將戴奧辛濃度作為校正因子，將 AhR-mediated Luciferase response 數據校正戴奧辛反應後所得到之 Non-Dioxin AhR Luciferase response 做為評估受油品污染土壤之參考數據，如表 5-6 所示。Soil-1 至 Soil-15 土壤樣本中戴奧辛濃度範圍為 ND~1.50 pg BEQ/g d.w.，其中 Soil-1 檢出最高之戴奧辛濃度；AhR-mediated Luciferase response 範圍為 ND~31.0 pg BEQ/g d.w.，最高反應濃度出現在 Soil-3 土壤樣本；Non-Dioxin AhR 濃度範圍為 ND~29.7 pg BEQ/g d.w.，受污染之樣本 Non-Dioxin AhR 濃度均高於背景土壤之濃度。

根據化學分析法研究數據顯示，本研究 Soil-1 至 Soil-5 為受油品污染較嚴重之土壤樣本，Soil-1 至 Soil-5 其 AhR-mediated 濃度平均值為 8.77 ± 12.6 pg BEQ/g d.w.，高於其它污染程度較低之樣本；在戴奧辛濃度方面則無明顯差異，與化學法之趨勢相似。值得注意的是，本次研究所採集之背景樣本其戴奧辛測值為 13.7 pg BEQ/g d.w.，雖高於受油品污染之土壤樣本，但與前人調查 122 個台灣東部土壤中戴奧辛濃度數據相似(Mean $\pm$ SD: 7.80 ± 5.08 pg BEQ/g d.w.)(Lin et al., 2014)。本次研究受油品污染之土壤樣本戴奧辛濃度低於背景值之原因，可能與雙重及多重疏水性有機污染物(如：PAHs、Pyrene、phenanthrene (PA)等)對於土壤產生競爭吸附效應有所關聯。根據 White et al., (1999a)與 White et al., (1999b)文獻顯示疏水性有機污染物(Pyrene)對於土壤可能具有競爭吸附之結果，該結果顯示 Pyrene 與 PA 同時存在於土壤中時，Pyrene 會競爭 PA 吸附於土壤之位置，故競爭吸附效應可能為本研究受油品污染之樣本中戴奧辛濃度偏低之可能原因。

由上述結果了解本研究 Ad-DR bioassay 所測得之 Non-Dioxin AhR 濃度與化學法趨勢相似，故將本研究化學法數據與 Non-Dioxin AhR 進一步探討兩者之關聯性將兩數據分別進行對數轉換(Log translations)，使其符合常態分佈並利用 pearson 's 進行相關性檢定，其結果如圖 5-6 所示。5 種 BTEX 與 TPH 測值與 Non-Dioxin AhR 數據呈現正相關，苯($p=0.026$)、乙苯($p=0.047$)與二甲苯($p=0.047$)三個化合物中發現顯著之正相關；在 TPH 方面則有邊緣顯著之現象($p=0.071$)。由此可證應用 Ad-DR bioassay 評估土壤是否遭受油品污染極具可行性，搭配不同之前處理方法即可快速篩檢土壤是否遭受戴奧辛或其它多環芳香烴化合物之污染。

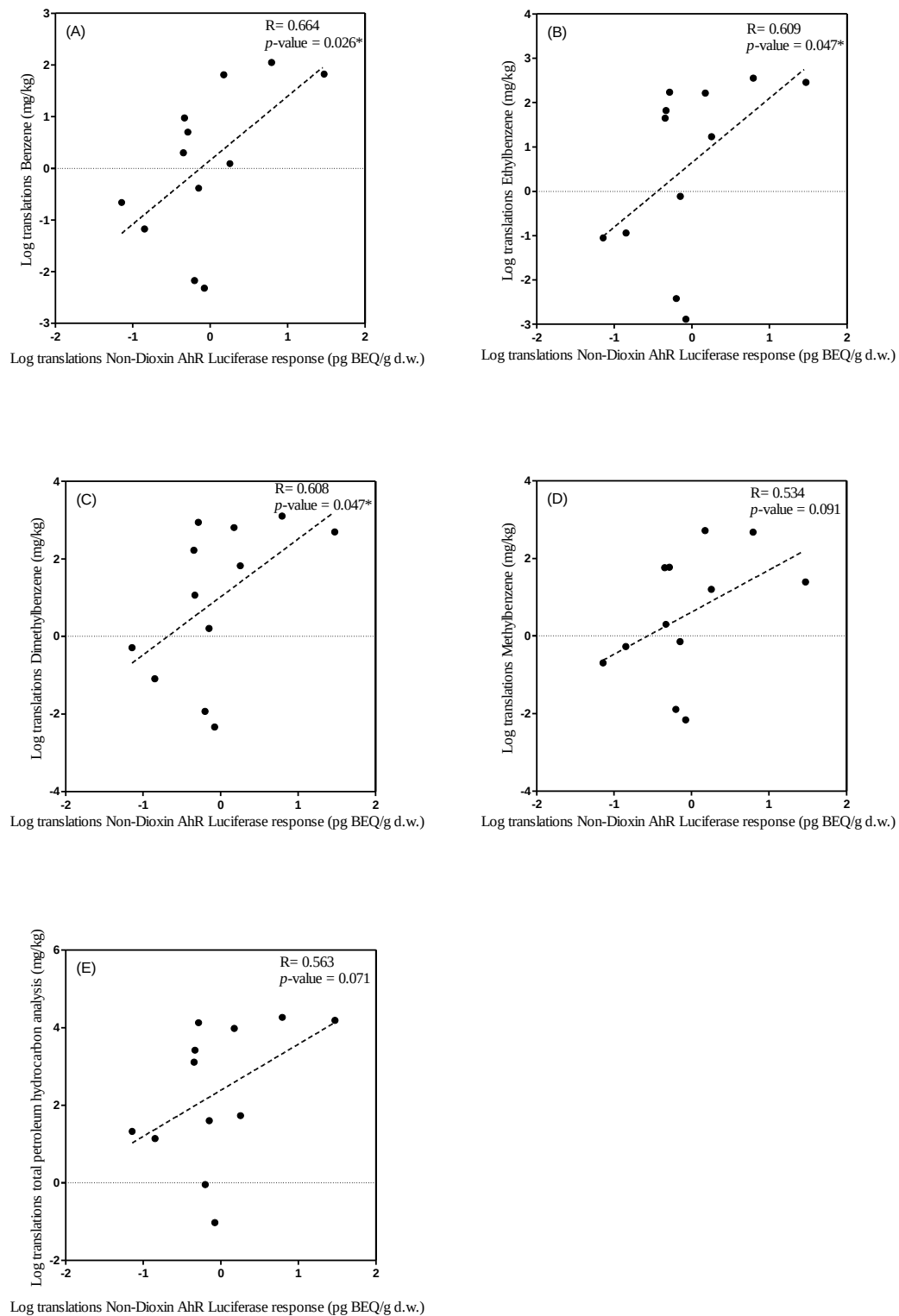


圖 5-6、化學分析法與 AhR-mediated 之相關性 (A)苯(B)乙苯 (C)二甲苯 (D)甲苯 (E) TPH

表 5-6 土壤樣本中 AhR-mediated、戴奧辛與 Non-Dioxin AhR 活性反應

	AhR-mediated Luciferase response (pg BEQ/g d.w.)	Dioxin levels (pg BEQ/g d.w.)	Non-Dioxin AhR Luciferase response ^a (pg BEQ/g d.w.)
Soil-1	1.95	1.50	0.452
Soil-2	6.78	0.561	6.22
Soil-3	31.0	1.31	29.7
Soil-4	1.86	0.361	1.50
Soil-5	2.24	0.437	1.80
Soil-6	ND	0.072	-0.072 ^b
Soil-7	0.619	0.761	-0.142
Soil-8	0.841	ND	0.841
Soil-9	1.05	0.421	0.629
Soil-10	1.29	0.579	0.711
Soil-11	ND	0.517	-0.517
Soil-12	ND	ND	ND
Soil-13	0.676	0.209	0.467
Soil-14	ND	ND	ND
Soil-15	ND	ND	ND
Background	12.4	13.7	-1.50

a Non-Dioxin AhR Luciferase response = AhR-mediated Luciferase response– Dioxin levels

b 樣本中可能存在拮抗作用(antagonistic)

5-5 雌激素毒性分析

T47D-KBluc assay 檢量線以 17β -estradiol (E_2) 配製檢量線，配適濃度為 0.1、1、2、5、10、20、50 pM，此檢量線亦符合 Hill equation 之 S 型曲線(如圖 5-7)，當 E_2 之濃度值約大於 0.1 pM 時，此曲線即有明顯上升之趨勢。T47D-kbluc bioassay 之 LOD 與 LOQ 之計算方法，LOD 取自計算空白值三重複 (DMSO, 0 E_2 /well) 的 2.5 倍標準偏差而得，單位為 RLU，再代入檢量線方程式，即可算出暴露培養溶液中 pM 濃度之檢測極限，同理可用，10 倍標準偏差可得定量極限 (limit of quantitation, LOQ)。本實驗方法的 LOD 與 LOQ，如附表 7-2 顯示。LOD 平均為 2.02 pM，LOQ 值為 16.6 pM。

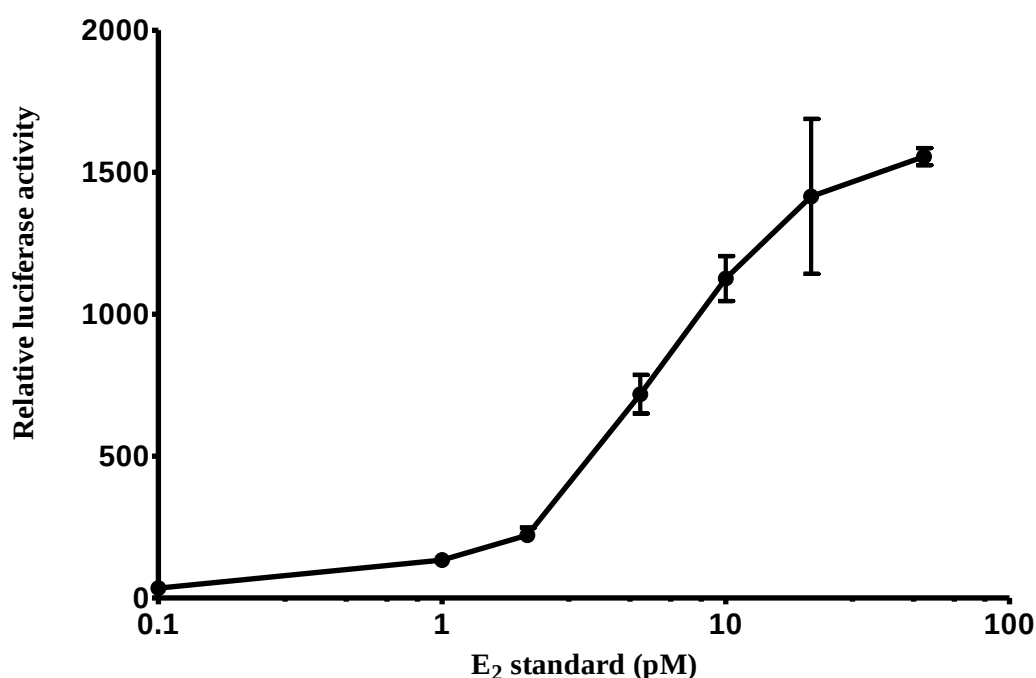


圖 5-7、T47D-KBluc assay 測試 E_2 劑量反應曲線

本研究使用 T47D-KBluc assay 檢測 36 件次受油品污染與背景土樣中總雌激素當量，並分別探討其在有機相及無機相之濃度變化，如表 5-7 與表 5-8 所示。15 件次受油品污染之土樣(Soil-1~Soil-15)有機相之雌激素濃度範圍為 <LOD-3.56 ng EEQ /kg (Mean±SD: 0.440±0.963 ng EEQ /kg)；無機相濃度則為 <LOD-0.963 ng EEQ /kg (Mean±SD: 0.089±0.250 ng EEQ /kg)，且大部分樣本均低於偵測極限，其檢出率僅為 33%；背景土壤無論有機相與無機相檢測數據均低於偵測極限。根據相關的文獻顯示，除了天然與人為合成之雌激素(E_1 、 E_2 、 E_3 、 EE_2 、DES)外，具有雌激素效應之化合物普遍為有機污染物(ter Veld et al., 2006; Oh et al., 2009; Pereira et al., 2011)，故本研究有機相所檢測之雌激素高於無機相為合理之現象。而受油品污染之土樣總雌激素濃度範圍為 <LOD-3.61 ng EEQ /kg (Mean±SD:

0.529±0.984 ng EEQ /kg)。

生物檢測法目前仍主要應用於水體檢測為主(如飲用水、地表水)(Chou et al., 2016; Gou et al., 2016)，有關土壤中雌激素濃度相關之文獻甚少，僅少數研究探討土壤中多環芳烴(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、雙酚 A (Bisphenol A, BPA)之雌激素濃度(Lam et al., 2017; Casey et al., 2017; Shen et al., 2017)。然而，土壤樣本較水體基質複雜，許多環境因素均可能會影響雌激素效應之濃度，如：土壤類型及孔隙大小亦可能會影響土壤中雌激素濃度，若土壤孔隙大會減少雌激素濃度；土壤中的礦物組成、有機碳及金屬氧化物也會影響土壤中的雌激素，其有機含量與雌激素濃度具有正相關性(D'Alessio et al., 2014)。綜合上述文獻，藉由雌激素效應評估是否受到污染仍需更進一步的討論，本研究雌激素效應可做為評估是否遭受有機化合物之污染參考，但土壤中是否存在其他顯著之雌激素化合物與其雌激素活性主要來源仍然無法解釋(Lam et al., 2017)。

表 5-7、油品污染土壤之雌激素毒性當量

樣品編號	有機相 ng EEQ /kg	無機相 ng EEQ /kg	Total(有機+無機) ng EEQ /kg
Soil-1	<LOD	<LOD	<LOD
Soil-2	<LOD	<LOD	<LOD
Soil-3	0.692	<LOD	0.692
Soil-4	0.248	0.963	1.21
Soil-5	1.61	<LOD	1.61
Soil-6	0.173	<LOD	0.173
Soil-7	0.0488	<LOD	0.0488
Soil-8	<LOD	<LOD	<LOD
Soil-9	<LOD	<LOD	<LOD
Soil-10	0.152	0.0211	0.173
Soil-11	0.112	0.243	0.355
Soil-12	3.56	0.0492	3.61
Soil-13	<LOD	0.0586	0.0586
Soil-14	<LOD	<LOD	<LOD
Soil-15	<LOD	<LOD	<LOD
mean±SD	0.440±0.963	0.089±0.250	0.529±0.984

表 5-8、背景土壤中雌激素效應濃度

樣品編號	有機		無機	
	pM	ng EEQ /kg	pM	ng EEQ /kg
Background (n=3)	<1.75	<LOD	<1.37	<LOD

5-6 毒性預報系統評估

以細胞實驗為主之高通量篩檢技術為近年來美國持續發展之目標，目前已廣泛應用於藥物毒性篩檢。本研究主要目的為建立台灣本土化之細胞高通量篩檢系統，並將其概念應用於土壤樣本毒性預報。土壤樣本污染來源甚多且種類很複雜，由於大部分毒性物質可區分為有機性與無機性，故本研究利用前處理將樣本中有機性與無機性之化合物萃取出來，在搭配 4 種高通量生物檢測法可快速判斷可能之污染物種類。圖 5-8 為本研究擬定之毒性預報系統流程圖，可優先藉由 ATP bioassay 與 P53 bioassay 判斷土壤中毒性物質為有機性或無機性。若為無機性且 P53 bioassay 及 ATP bioassay 反應強烈，則可推斷該土壤受到有害重金屬之污染；若為有機性之污染物則需進一步利用 Ad-DR bioassay 與 T47D-kbLuc assay 評估污染物之種類，藉由 Ad-DR bioassay 所測得之戴奧辛濃度與 Non-Dioxin AhR 反應可得知污染物是否為戴奧辛或芳香烴碳氫化合物(如：PAHs、BETX 與 TPH 等)；由於土壤基質複雜，無法單純藉由 T47D-kbLuc assay 所測得之雌激素效應則可了解土壤是否遭受類雌激素化合物之污染(如：雙酚 A(bisphenol A, BPA)、塑化劑(phthalate esters, PAEs)與藥品與個人防護用品(Pharmaceutical and personal care products, PPCPs)等)，若其細胞致死率高，則可能為有機鹵化物(Organohalides)之污染(如氯系、磷系殺蟲劑(Organochlorine pesticides, OCPs; Organophosphorus pesticides, OPPs)等)。以本研究為例，本次土壤樣本選定為受油品污染之場址，且經化學法確認其主要的污染物為 BTEX 與 TPH。經由 ATP bioassay、T47D-kbLuc assay、P53 bioassay 與 Ad-DR bioassay 可發現主要毒性效應為有機污染物，然而 T47D-kbLuc assay 於有機相中僅檢測出微量之雌激素效應，故排除該地污染物屬於類雌激素化合物；後續藉由 Ad-DR bioassay 檢測出微量戴奧辛濃度與較高之 Non-Dioxin AhR 反應，推斷為 PAHs、BETX 與 TPH 等芳香烴碳氫化合物之污染。本研究也循著污染物指紋鑑定之概念，建立受油品污染土樣之生物指紋圖，其結果如圖 5-9 所示，若後續應用本系統針對未知樣本測試時，可快速判別該地是否遭受油品污染之情形。除此之外，本系統亦可應用於探討整治後之土壤是否對人體仍存在健康風險之虞，若整治後之土壤其 Non-Dioxin AhR

濃度仍檢測出高濃度之反應，其結果代表該地污染整治狀況不如預期；若 Non-Dioxin AhR 濃度已明顯降低，在 ATP bioassay、T47D-kbLuc assay 與 P53 bioassay 仍檢測出毒性反應，則意謂著可能衍生二次毒性污染物之狀況。

本專案所建立之 4 種生物毒性預報系統，應用於油品污染土壤已獲得良好之成效。該系統之缺點為其均屬於冷光報導基因法，技術門檻相較於 ELISA 與 Microtox 等生物分析法高；然而，該系統相較於化學分析與其他生物毒性分析方法，仍具有便宜、快速、大量、與化學分析法相關性高等優點，亦可應用於評估該地整治之成效，可降低後續濃度確認之成本。該系統未來應用上仍需要持續的改善與探討，當面對複合性污染土壤毒性篩檢時(如：有機相污染物+無機相污染物同時存在)，需使用不同有機溶劑進行萃取，即可能會對本系統 P53 bioassay 與 ATP bioassay 產生毒性干擾，且不易判別其毒性主要來源為何種污染物所致。鑒於此，本團隊未來方向將會持續開發可確認無機相污染物之半定量生物分析法(如：金屬生物分析法)，將人體參與金屬代謝與賀爾蒙之基因反應單元(Metal-responsive element, MRE)轉殖入細胞中，並可建立一新型之金屬報導基因法(MRE bioassay)，即可確認無機相污染物毒性來源，並解決複合性污染土壤毒性篩檢之問題。

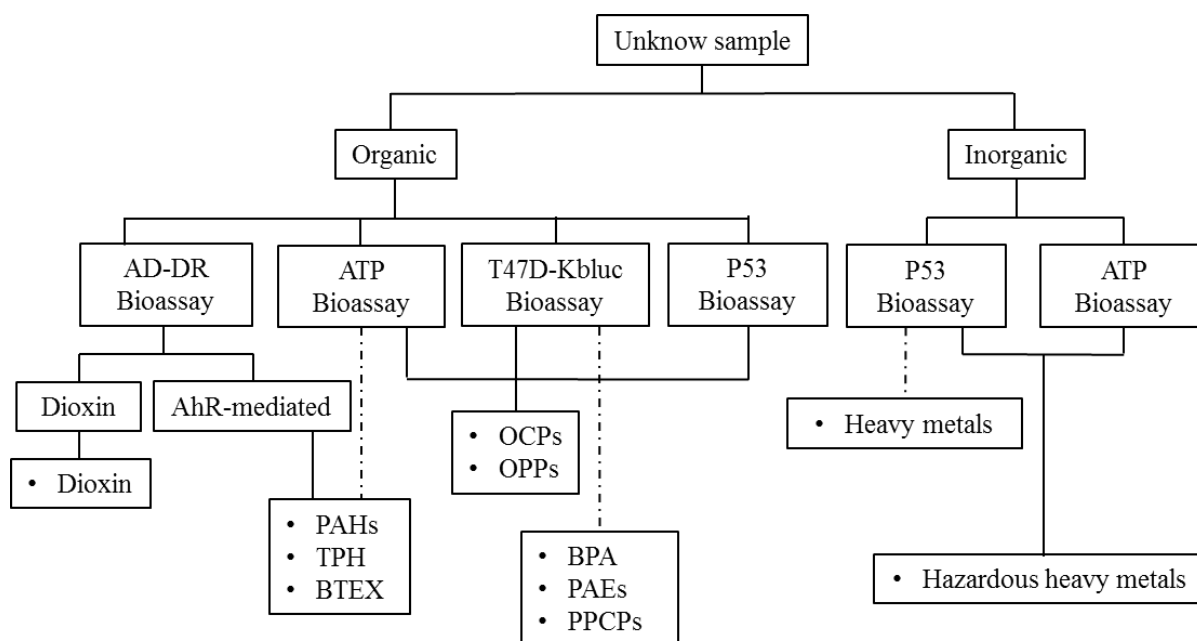


圖 5-8、高通量篩檢法毒性預報

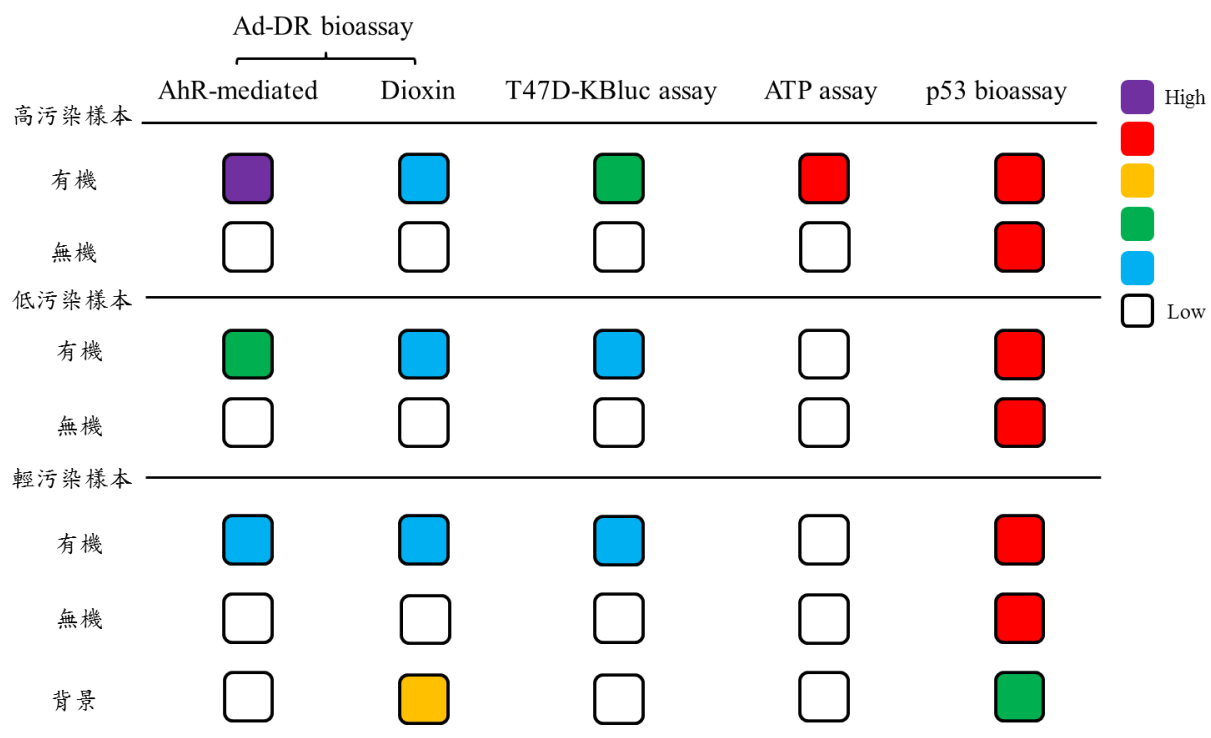


圖 5-9 油品污染土壤樣本生物分析法指紋圖

5-7 結論與建議

1. 本次計畫共使用化學分析分析15件次受污染之土壤樣本與15件次背景土壤，依據其 BTEX 及 TPH 濃度，將其分為高、低、輕微土壤，並與4種高通量篩檢工具進行比較。
2. 本研究已完成36件次 ATP bioassay 檢測，污染程度較高之土壤樣本其有機相平均細胞存活率為83%，顯著低於其他三種土壤樣本(低污染、輕微污染與背景土樣)($p=0.027$)；在無機相中細胞存活率則無顯著之差異($p=0.387$)
3. ATP bioassay 與化學分析數據進行 spearman's 相關性統計檢定，有機相細胞存活率與苯($r=-0.194$)、乙苯($r=-0.165$)、二甲苯($r=-0.283$)、甲苯($r=-0.337$)與 TPH 濃度($r=-0.097$)均呈現負相關，但並未達到顯著之程度。
4. 本研究已完成36件次 p53 bioassay 檢測，受油品污染與背景土壤樣本中有機相之8-OHdG 平均濃度分別為 8.39 ± 0.588 及 4.85 ± 2.31 ng/g；無機相平均濃度則為 8.52 ± 0.554 及 4.40 ± 0.447 ng/g，無論在有機相或無機相受污染土壤樣本中8-OHdG 濃度顯著高於背景土樣($p=0.002$)。
5. 本研究已完成32件次 Ad-DR bioassay 檢測，其戴奧辛與 Non-Dioxin AhR 濃度範圍分別為 ND~1.50 pg BEQ/g d.w.與 ND~29.7 pg BEQ/g d.w.，背景土壤戴奧辛濃度高於受污染之樣本；Non-Dioxin AhR 濃度則為受污染之樣本高於背景土壤之濃度。
6. 5種 BTEX 與 TPH 測值均與 Non-Dioxin AhR 數據呈現正相關，其中在苯($p=0.026$)、乙苯($p=0.047$)與二甲苯($p=0.047$)三個化合物中發現顯著之正相關；在 TPH 方面則有邊緣顯著之現象($p=0.071$)。
7. 本研究已完成32件次 T47D-kbLuc assay 檢測，有機相之雌激素濃度範圍為<LOD-3.56 ng EEQ /kg (Mean $\pm$ SD: 0.440 ± 0.963 ng EEQ /kg)；無機相濃度則為<LOD-0.963 ng EEQ /kg (Mean $\pm$ SD: 0.089 ± 0.250 ng EEQ /kg)，大部分樣本均低於偵測極限，其檢出率僅為33%
8. 本研究所檢測之雌激素效應評估是否受到污染仍需更進一步的討論，其主要原因為土壤樣本基質複雜，無法完全解釋雌激素活性之主要來源。
9. 本研究已建立毒性預報系統流程圖與油品污染土壤樣本之指紋辨識圖，後續應用本系統針對未知樣本測試時，可快速評估土壤遭受污染之情形。

(六) 參考文獻

- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., 2008. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment International* 34, 984-987.
- Adeniyi, A.A., Okedeyi, O.O., Yusuf, K.A., 2011. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment* 172, 561-569.
- Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., Dorn, P., 1988. Bisphenol a: Acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 19-26.
- Amiridou, D., Voutsas, D., 2011. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials* 185, 281-286.
- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., Jouannet, P., 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine* 332, 281-285.
- Baik, S., Youn, H. S., Chung, M. E., Lee, W. K., Cho, M. J., Ko, G. H., Park, C. K., Kasai, H., and Rhee, K. H., 1996. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Research* 56, 1279-1282.
- Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., Rugge, M., Di Mario, F., Bonvicini, P., and Naccarato R., 1998. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* 115, 351-356.
- Baker, Jones, Fletcher, Kitchiner, King, Lea, 1999a. Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are not oestrogenic using a trio of in vivo and in vitro assays. *Human & Experimental Toxicology* 18, 532.
- Baker, V.A., Hepburn, P.A., Kennedy, S.J., Jones, P.A., Lea, L.J., Sumpter, J.P., Ashby, J., 1999b. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food and Chemical Toxicology* 37, 13-22.
- Baker, V.A., Jones, P.A., Lea, L.J., 2000. Benzophenone sunscreen agents --

- assessment of oestrogenic activity. *Toxicology* 148, 74-74.
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E.B., Ponnampalam, A.P., Mitchell, M.D., 2010. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American journal of obstetrics and gynecology* 202, 393 e391-397.
- Bayo, J., Angosto, J.M., Gomez-Lopez, M.D., 2009. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination-dechlorination process. *Journal of hazardous materials* 172, 166-171.
- Benachour, N., Aris, A., 2009. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241, 322-328.
- Bhalla, R., Tehrani, R., Van Aken, B., 2016. Toxicity of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) using the bioluminescent assay Microtox((R)). *Ecotoxicology* 25, 1438-1444.
- Boluda, R., Quintanilla, J. F., Bonilla, J. A., Sáez, E. and Gamón, M., 2002. Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain), *Chemosphere*, 46(2), 355–369.
- Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Bernert, J.T., Ye, X., Silva, M.J., Barr, D.B., Sathyanarayana, S., Lanphear, B.P., 2011. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 119, 131-137.
- Bredhult, C., Sahlin, L., Olovsson, M., 2009. Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to Bisphenol A. *Reproductive Toxicology* 28, 18-25.
- Brouwers, M.M., Besselink, H., Bretveld, R.W., Anzion, R., Scheepers, P.T.J., Brouwer, A., Roeleveld, N., 2011. Estrogenic and androgenic activities in total plasma measured with reporter-gene bioassays: Relevant exposure measures for endocrine disruptors in epidemiologic studies? *Environment International* 37, 557-564.
- BUA, 1986. Di-(2-ethylhexyl) phthalat. BUA-Stoffbericht 4.

- Butt, C.M., Wang, D., Stapleton, H.M., 2011. Halogenated phenolic contaminants inhibit the in vitro activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124, 339-347.
- Cai, B., Xie, L., Yang, D., Arcangeli, J.P., 2010. Toxicity evaluation and prediction of toxic chemicals on activated sludge system. *Journal of Hazardous Materials* 177, 414-419.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ: British Medical Journal* 305, 609-613.
- Casey, F. X. M., Shappell, N. W., Hakk, H., 2017. Halogenated 17 β -Estradiol Surrogates: Synthesis, Estrogenic Activity, and Initial Investigations of Fate in Soil/Water Systems. *J Environ Qual.* 46(4):802-810.
- Centre, E.C.I.E.a.T., 1985. An assessment of the occurrence and effects of dialkyl ortho-phthalates in the environment., Brussels.
- Chao, H.R., Tsou, T.C., Li, L.A., Tsai, F.Y., Wang, Y.F., Tsai, C.H., Chang, E.E., Miao, Z.F., Wu, C.H., Lee, W.J., 2006. Arsenic inhibits induction of cytochrome P450 1A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatoma cells. *Journal of Hazardous Materials* 137, 716-722.
- Chao, H.R., Wang, Y.F., Chen, H.T., Ko, Y.C., Chang, E.E., Huang, Y.J., Tsai, F.Y., Tsai, C.H., Wu, C.H., Tsou, T.C., 2007. Differential effect of arecoline on the endogenous dioxin-responsive cytochrome P450 1A1 and on a stably transfected dioxin-responsive element-driven reporter in human hepatoma cells. *Journal of Hazardous Materials* 149, 234-237.
- Chao, H.R., Tsou, T.C., Chen, H.T., Chang, E.E., Tsai, F.Y., Lin, D.Y., Chen, F.A., Wang, Y.F., 2009. The inhibition effect of 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin-induced aryl hydrocarbon receptor activation in human hepatoma cells with the treatment of cadmium chloride. *Journal of Hazardous Materials* 170, 351-356.
- Chao, H.R., Wang, Y.F., Lin, D.Y., Cheng, Y.T., Tsou, T.C., 2011. Fast Cleanup System Combined with a Dioxin-responsive Element-driven Luciferase Bioassay for

- Analysis of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins/furans in Sediments and Soils. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 86, 278-282.
- Chao, H.R., Wang, Y.F., Wang, Y.N., Lin, D.Y., Gou, Y.Y., Chen, C.Y., Chen, K.C., Wu, W.K., Chiang, B.A., Huang, Y.T., Hsieh, L.T., Yeh, K.J.C., Tsou, T.C., 2012. An Improved AhR Reporter Gene Assay for Analyzing Dioxins in Soil, Sediment and Fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 89, 739-743.
- Chen, T.C., Shue, M.F., Yeh, Y.L., Kao, T.J., 2010. Bisphenol A occurred in Kao-Pin River and its tributaries in Taiwan. Environmental Monitoring and Assessment 161, 135-145.
- Cheng, C.Y., Ding, W.H., 2002. Determination of nonylphenol polyethoxylates in household detergents by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 968, 143-150.
- Chiang, H.C., Chao, H.R., Li, L.A., Tsai, F.Y., Tsou, T.C., 2015. Reliable and sensitive adenovirus-based reporter system for high-throughput screening of dioxins. Environmental Technology & Innovation 4, 8-16.
- Chiang, H.C., Lee, H., Chao, H.R., Chiou, Y.H., Tsou, T.C., 2013. Pulmonary CYP2A13 levels are associated with early occurrence of lung cancer-Its implication in mutagenesis of non-small cell lung carcinoma. Cancer Epidemiology 37, 653-659.
- Chou, Y.Y., Huang, P.C., Lee, C.C., Wu, M.H., Lin, S.J., 2009. Phthalate exposure in girls during early puberty. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 22, 69-77.
- Chou, H. M., Chao, H. R., Lin, C., Chiang, P. C., Wang, G. S., Tsou, T. C., 2016. An improved estrogenic activity reporter gene assay (T47D-KBluc) for detecting estrogenic activity in wastewater and drinking water. Toxicological & Environmental Chemistry 98(3-4): 376-384.
- D'Alessio, M., Vasudevan, D., Lichwa, J., Mohanty, S. K., Ray, C., 2014. Fate and transport of selected estrogen compounds in Hawaii soils: effect of soil type and macropores. J Contam Hydrol. 166:1-10.
- Di Minno, A., Turnu, L., Porro, B., Squellerio, I., Cavalca, V., Tremoli, E., Di

- Minno, M. N., 2016. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxid Redox Signal*. 24(10): 548–555.
- Evers, N.M., van den Berg, J.H., Wang, S., Melchers, D., Houtman, R., de Haan, L.H., Ederveen, A.G., Groten, J.P., Rietjens, I.M., 2014. Cell proliferation and modulation of interaction of estrogen receptors with coregulators induced by ERalpha and ERbeta agonists. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 143, 376-385.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T., 2002. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science & Technology* 36, 1676-1680.
- Gou, Y. Y., Lin, S., Que, D. E., Tayo, L. L., Lin, D. Y., Chen, K. C., Chen, F. A., Chiang, P. C., Wang, G. S., Hsu, Y. C., Chuang, K. P., Chuang, C. Y., Tsou, T. C., Chao, H. R., 2016. Estrogenic effects in the influents and effluents of the drinking water treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research* 23(9): 8518-28.
- Guo, C., Li, X., Wang, R., Yu, J., Ye, M., Mao, L., Zhang, S., Zheng, S., 2016. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. Published online.
- Han, X.B., Lei, E.N., Lam, M.H., Wu, R.S., 2011. A whole life cycle assessment on effects of waterborne PBDEs on gene expression profile along the brain-pituitary-gonad axis and in the liver of zebrafish. *Marine Pollution Bulletin* 63, 160-165.
- Huang, P.C., Kuo, P.L., Chou, Y.Y., Lin, S.J., Lee, C.C., 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment International* 35, 14-20.
- Huang, P.C., Kuo, P.L., Guo, Y.L., Liao, P.C., Lee, C.C., 2007. Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Human Reproduction* 22, 2715-2722.
- Huang, P.C., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., 2008. Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the

- biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere* 73, 539-544.
- Huang, X., Huang, J., Zhang, L., Zhu, Y., Li, Y., 2014. A novel ER α -mediated reporter gene assay for screening estrogenic/antiestrogenic chemicals based on LLC-MK2 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods* 24, 627-632.
- IARC, 1982. Some industrial chemicals and dyestuffs. . IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans 29.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.P., Giger, W., 2010. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 834-843.
- Kayali, N., Tamayo, F.G., Polo-Díez, L.M., 2006. Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. *Talanta* 69, 1095-1099.
- Kleywegt, S., Pileggi, V., Yang, P., Hao, C., Zhao, X., Rocks, C., Thach, S., Cheung, P., Whitehead, B., 2011. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada--occurrence and treatment efficiency. *Science of the Total Environment* 409, 1481-1488.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
- Lam, M. M., Engwall, M., Denison, M. S., Larsson, M., 2017. METHYLATED PAHS AND/OR THEIR METABOLITES ARE IMPORTANT CONTRIBUTORS TO THE OVERALL ESTROGENIC ACTIVITY OF PAH-CONTAMINATED SOILS. *Environ Toxicol Chem.* (Epub ahead of print)
- Leusch, F.D., de Jager, C., Levi, Y., Lim, R., Puijker, L., Sacher, F., Tremblay, L.A., Wilson, V.S. and Chapman, H.F. (2010) Comparison of five in vitro bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. *Environmental Science & Technology* 44(10), 3853-3860.

- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., Wang, L., 2010. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International* 36, 557-562.
- Li, Z., Kroll, K.J., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Brian, J.V., Sepulveda, M.S., Orlando, E.F., Lazorchak, J.M., Kostich, M., Armstrong, B., Denslow, N.D., Watanabe, K.H., 2011. A computational model of the hypothalamic - pituitary - gonadal axis in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17alpha-ethynylestradiol and 17beta-trenbolone. *BMC Systems Biology* 5, 63.
- Lin, D. Y., Shy, C. G., Chen, F. A., Wang, Y. F., Chen, K. C., Hsieh, L. T., Tsai, F. Y., Tsou, T. C., Chao, H. R., 2013. Use of a highly sensitive recombinant hepatoma cell method to determine dioxin concentrations in samples of fish and crab from a hotspot area. *Environ Sci Process Impacts* 15(6):1264-70.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W., Zhang, X., 2009. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18, 293-303.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A., 2004. Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2016-2020.
- Liu, Y., Yang, P., Chen, N., Lin, S., Liu, M., 2016. Effects of recombinant human adenovirus-p53 on the regression of hepatic fibrosis. *International journal of molecular medicine* 38, 1093-1100.
- Lyu, H., He, Y., Tang, J., Hecker, M., Liu, Q., Jones, P.D., Codling, G., Giesy, J.P., 2016. Effect of pyrolysis temperature on potential toxicity of biochar if applied to the environment. *Environmental pollution* 218, 1-7.
- Macova, M., Toze, S., Hodgers, L., Mueller, J.F., Bartkow, M., Escher, B.I., 2011. Bioanalytical tools for the evaluation of organic micropollutants during sewage treatment, water recycling and drinking water generation. *Water research* 45, 4238-4247.
- McNally, J.G., Muller, W.G., Walker, D., Wolford, R., Hager, G.L., 2000. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287, 1262-1265.

- Morck, T.J., Sorda, G., Bechi, N., Rasmussen, B.S., Nielsen, J.B., Ietta, F., Rytting, E., Mathiesen, L., Paulesu, L., Knudsen, L.E., 2010.Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reproductive toxicology* 30, 131-137.
- Nimrod, A.C., Benson, W.H., 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology* 26, 335-364.
- Ogunfowokan, A., Torto, N., Adenuga, A., Okoh, E., 2006. Survey of Levels of Phthalate Ester Plasticizers in a Sewage Lagoon Effluent and a Receiving Stream. *Environmental Monitoring and Assessment* 118, 457-480.
- Oh, S.M., Kim, H.R., Park, H.K., Choi, K., Ryu, J., Shin, H.S., Park, J.S., Lee, J.S., Chung, K.H. (2009) Identification of estrogen-like effects and biologically active compounds in river water using bioassays and chemical analysis. *Science of The Total Environment* 407(21), 5787-5794.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 1996.Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 104, 298-305.
- Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2011. Fish thyroidal and stress responses in contamination monitoring--an integrated biomarker approach. *Ecotoxicology and environmental safety* 74, 1265-1270.
- Otaka, H., Yasuhara, A., Morita, M., 2003.Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Analytical Sciences* 19, 1663-1666.
- Pereira, R.O., Postigo, C., de Alda, M.L., Daniel, L.A., Barceló, D., 2011. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere* 82, 789-799.
- Porte, C., Biosca, X., Pastor, D., Solé, M., Albaigés, J., 2000.The Aegean Sea Oil Spill. 2. Temporal Study of the Hydrocarbons Accumulation in Bivalves. *Environmental Science & Technology* 34, 5067-5075.
- Reel, J.R., Lamb, I.J., Neal, B.H., 1996.Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundamental and Applied*

Toxicology 34, 288-305.

- Roda, A., Mirasoli, M., Michelini, E., Magliulo, M., Simoni, P., Guardigli, M., Curini, R., Sergi, M., Marino, A., 2006. Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban waste water treatment plants. *Analytical and bioanalytical chemistry* 385, 742-752.
- Schiliro, T., Gorrasi, I., Longo, A., Coluccia, S., Gilli, G., 2011. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127, 139-146.
- Schiliro, T., Porfido, A., Longo, A., Coluccia, S., Gilli, G., 2013. The E-screen test and the MELN gene-reporter assay used for determination of estrogenic activity in fruits and vegetables in relation to pesticide residues. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 62, 82-90.
- Shao, B., Han, H., Hu, J., Zhao, J., Wu, G., Xue, Y., Ma, Y., Zhang, S., 2005. Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 530, 245-252.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K., Davis, V.L., 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environmental Health Perspectives* 104, 1296-1300.
- Shen, J., Wang, X. Z., Zhang, Z., Sui, Y. M., Wu, H. L., Feng, J. M., Tong, X. N., Zhang, Z. Y., 2017. Adsorption and degradation of ¹⁴C-bisphenol A in a soil trench. *Sci Total Environ.* 31;607-608:676-682.
- Shue, M.F., Chen, F.A., Chen, T.C., 2010. Total estrogenic activity and nonylphenol concentration in the Donggang River, Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment* 168, 91-101.
- Shy, C. G., Chao, H. R., Lin, D. Y., Gou, Y. Y., Chuang, C. Y., Chuang, K. P., Chen, C. C., Hsiao, Y. C., Chen, F. A., 2016. An AhR-Luciferase Adenovirus Infection System for Rapid Screening of Dioxins in Soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 96(2):192-6.

- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl 7, 113-122.
- Sue Haupt, Haupt, Y., 2006. Importance of p53 for cancer onset and therapy.
- Sun, H., Shen, O.X., Wang, X.R., Zhou, L., Zhen, S.Q., Chen, X.D., 2009. Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 23, 950-954.
- ter Veld, M.G., Schouten, B., Louisse, J., van Es, D.S., van der Saag, P.T., Rietjens, I.M. and Murk, A.J. 2006 Estrogenic potency of food-packaging-associated plasticizers and antioxidants as detected in ERalpha and ERbeta reporter gene cell lines. *J Agric Food Chem* 54(12), 4407-4416.
- van der Linden, S.C., von Bergh, A.R., van Vught-Lussenburg, B.M., Jonker, L.R., Teunis, M., Krul, C.A., van der Burg, B., 2014. Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 760, 23-32.
- Vanparys, C., Depiereux, S., Nadzialek, S., Robbens, J., Blust, R., Kestemont, P., De Coen, W., 2010. Performance of the flow cytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. *The Science of the total environment* 408, 4451-4460.
- Wagner, M., Oehlmann, J., 2011. Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127, 128-135.
- Wehmas, L.C., Cavallin, J.E., Durhan, E.J., Kahl, M.D., Martinovic, D., Mayasich, J., Tuominen, T., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., 2011. Screening complex effluents for estrogenic activity with the T47D-KBluc cell bioassay: assay optimization and comparison with in vivo responses in fish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 30, 439-445.
- WHO, 1992. Diethylhexyl phthalate. Geneva.

- White, J. C., M. Hunter, J. J. Pignatello, and M. Alexander (1999a) Increase in bioavailability of aged phenanthrene in soils by competitive displacement with pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1728-1732
- White, J. C., M. Alexander, and J. J. Pignatello (1999b) Enhancing the bioavailability of organic compounds sequestered in soil and aquifer solids. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 182-187
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Gray, L.E., Jr., 2004. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 81, 69-77.
- Wu, C.Y., Wu, S.L., Lin, S.J., Chu, C.M., 2011. Changes in hormone therapy prescriptions among middle-aged women in Taiwan: implications for health needs at menopause. *Women's health issues : official publication of the Jacobs Institute of Women's Health* 21, 153-159.
- Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., Wang, X.R., 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216, 197-203.
- Yang, Y., Lu, Y., Wu, Q.Y., Hu, H.Y., Chen, Y.H., Liu, W.L., 2015. Evidence of ATP assay as an appropriate alternative of MTT assay for cytotoxicity of secondary effluents from WWTPs. *Ecotoxicology and environmental safety* 122, 490-496.
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O., 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42, 415-418.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28, 215-226.
- Ying, G.G., 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* 32, 417-431.
- Zacharewski, 1997. In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. *Environmental Science & Technology* 31, 613-623.
- Zhao, B., Baston, D.S., Khan, E., Sorrentino, C., Denison, M.S., 2010. Enhancing the response of CALUX and CAFLUX cell bioassays for quantitative detection of

- dioxin-like compounds. *Science China. Chemistry* 53, 1010-1016.
- Zhou, J., Cai, Z.H., Xing, K.Z., 2011. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Environmental pollution* 159, 1114-1122.
- 行政院環保署, 1994. 生物毒性篩選試驗研究.
- 行政院環保署, 2002. 毒性化學物質環境流布暴露調查分析.
- 行政院環保署, 2004. 毒性化學物質環境流布調查分析.
- 行政院環保署, 2005. 河川及海洋水質維持改善與斯德哥爾摩公約計畫毒性化學物質環境流布調查.
- 行政院環保署, 2006. 毒性化學物質環境流布背景調查計畫.
- 行政院環保署, 2007. 毒性化學物質環境流布背景調查計畫.
- 張碧芬、袁紹英, 1998. 鄰苯二甲酸酯類(Phthalate Esters)環境荷爾蒙對生物的影響. 環境檢驗雙月刊.
- 陳文德, 2002. 國內環境荷爾蒙管理現況. 第二屆環境荷爾蒙及持久性有機物污染研討會.
- 陳建龍, 2011. 利用 Microtox® 法評估複合重金屬之毒性.
- 許美芳、陳庭堅、陳福安, 2003. 環境荷爾蒙調查研究.
- 康世芳、蔣本基、張怡怡、張簡國平、李家偉, 2010. 飲用水水源及水質標準中列管污染物篩選與監測計畫 (3/3) 中國塑料產業鍊網, 2011. 全球塑料增塑劑總產量為 590 萬噸/年 (4 月 1 日)
- 趙浩然、張簡國平、鄒粹軍、陳福安、陳冠中、林志忠, 2012. 自來水中環境荷爾蒙調查研究.
- 環保署, 2005. 多氯聯苯等 161 列管編號毒性化學物質使用用途限制等運作管理事項修正草案.

附錄 1

附表 7-1、受污染與背景土壤樣本中 8-OHdG 濃度(ng/mL)

	RSD(%)	8-OHdG (ng/ml)		RSD(%)	8-OHdG (ng/ml)
	<u>有機</u>			<u>無機</u>	
Soil-1	3.40	8.79	Soil-1	1.54	8.28
Soil-2	4.55	7.90	Soil-2	4.36	7.83
Soil-3	5.32	8.20	Soil-3	2.02	8.57
Soil-4	1.31	8.06	Soil-4	4.04	8.43
Soil-5	4.05	8.96	Soil-5	2.53	9.39
Soil-6	12.0	8.12	Soil-6	2.86	8.84
Soil-7	12.0	8.86	Soil-7	13.6	8.72
Soil-8	7.38	8.21	Soil-8	3.08	8.14
Soil-9	5.40	7.28	Soil-9	7.54	8.01
Soil-10	4.33	7.57	Soil-10	0.46	9.81
Soil-11	6.90	9.44	Soil-11	0.87	8.78
Soil-12	2.00	8.40	Soil-12	6.71	8.25
Soil-13	8.96	8.81	Soil-13	6.88	8.06
Soil-14	4.03	9.03	Soil-14	2.39	8.81
Soil-15	6.56	8.15	Soil-15	11.9	7.93
Background (N=3)		6.85			6.21

附表 7-2、T47D-kbLuc assay 土壤樣本偵測極限(LOD)與定量極限(LOQ)

樣品編號	Mean			
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
白盤-1	1.37	49.3		
白盤-2	2.68	52.0		
白盤-3	4.13	17.7		
白盤-4	2.60	12.6		
白盤-5	1.75	5.43	2.02	16.6
白盤-6	3.82	7.24		
白盤-7	0.334	0.824		
白盤-8	0.109	2.11		
白盤-9	0.737	2.43		

附錄 2

本計畫預計投稿期刊

**International Journal of
Environmental Research**

**Editorial
Manager**

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Role: **Author** Username: kyle

Submissions Waiting for Approval by Author kai-Tse Hsiao, M.D.

If no Actions appear for your submission, please wait a few minutes for your PDF to be built. The Actions appear automatically when your PDF is available.

The 'Edit Submission' link allows you to fix or alter your submission. Please use Edit Submission to make changes to the meta-data and to remove and upload new files that make up your submission.

The 'Remove Submission' link removes your submission from the system. Please use this ONLY if you would like to permanently remove this submission from the system.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links		Validation of the High-throughput Methods for Screening AhR-mediated levels in Taiwanese Soil Sample	27 Nov 2017	27 Nov 2017	Needs Approval

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

106 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

國際期刊投稿說明

專案序號		專案類型	■研究專案	□模場試驗
專案主持人	趙浩然	專案主題	□整治 □預防 ■其他	
專案名稱	發展毒性監測及預報平台-使用高通量生物篩選工具預測土壤中環境荷爾蒙污染物			
投稿期刊	International journal of environmental research			
投稿題目	Validation of the High-throughput Methods for Screening AhR-mediated levels in Taiwanese Soil Sample			
作者	How-Ran Chao, Rachelle Anne D. Arcega, Lemmuel L. Tayo, Yan-You Gou, Kai-Tse Hsiao			
本年度專案內容摘要說明		投稿內容摘要說明		
本研究規劃以高通量篩選工具 (High-throughput screening assays, HTS assays) 篩選土壤中的環境化學藥品與其他新且未知的化學物質對細胞的交互作用，預測環化藥品與未知的化學物質對人體健康可能造成的毒性效應，進而提高政府權責機關篩檢這些新且未知的化學物質，是否對內分泌系統造成危害的能力。因此，本研究目的為建立高通量篩選工具 (HTS assays)，包含致癌性篩選平台 (p53 bioassay)、綜合毒性篩選平台 (ATP biosassay)、芳香族化合物毒性篩選平台 (Ad-DR bioassay) 及雌激素毒性篩選平台 (T47D-KBluc assay)，可分析土樣品中環境化學品之毒性，並進一步進行風險評估。		Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) are diverse groups of anthropogenic halogenated aromatic hydrocarbons that have been shown to adsorb and bioaccumulate in several environmental matrices including soil, which is a potential route for human exposure and thus issuing a health risk. In this study, soil samples from Taoyuan (northern Taiwan), Changhua (central Taiwan), and Kaoshiung (southern Taiwan) were analyzed for PCDD/Fs and dl-PCBs levels using adenovirus-dioxin responsive (Ad-DR) bioassay and were compared and correlated with the traditional high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) method. Among the three regions tested, the mean dioxin levels obtained from Kaoshiung city (90.0 ± 149 pg BEQ/g sample for Ad-DR bioassay, 41.6 ± 80.4 pg BEQ/g sample for HRGC/HRMS) is the highest. Among the		

	different sources of PCDD/Fs and dl-PCBs pollution,illegal abandoned fields (23.8±31.2 pg BEQ/g sample for HRGC/HRMS) and industrial wastes (60.6±57.1 pg BEQ/g sample for Ad-DR bioassay) have the highest levels of dioxin tested. Dioxin levels from Taoyuan city (R=0.561) and Kaoshiung city (R=0.944) is not significantly different from the two screening methods conducted while dioxin levels from the Changhua county (R=0.406) has a significant difference detected by the Ad-DR bioassay as compared to HRGC/HRMS. The mean dioxin levels obtained using the Ad-DR bioassay is significantly higher than the HRGC/HRMS method which indicates that Ad-DR bioassay has a higher sensitivity and selectivity to dioxin and dioxin-like compounds than the traditional HRGC/HRMS.
與本專案相關性說明	
本次投稿論文內容為驗證高通量篩選工具應用於土壤樣本之可行性，並評估其與化學分析法之關聯性。本篇論文所使用之 Ad-DR bioassay 為本專案所開發之高通量篩選工具，透過 HRGC/HRMS 驗證該數據之可行性。本篇結果顯示 Ad-DR bioassay 為一個高敏感且方便之技術，與化學分析之結果具有良好之關聯性，可做為評估現地土壤污染狀況與健康風險之工具。	
本署審核	
☐ 與本專案內容相符，符合結案標準。 ☐ 與本專案內容不符，未達結案標準。 備註： （由本署填寫）	