

內分泌干擾物質(環境荷爾蒙)生物檢測方法

許多人造的工業化學物質及農藥可能干擾人類及野生生物體內分泌正常功能進而影響其生長、發育、行為及生殖。雖然農藥及工業化學物質，在上市前已做過大部分的毒性測試，如對老鼠或兔子的半致死濃度(LD50)、對兔子皮膚接觸毒性、對兔子眼睛毒性等等，但是傳統的毒性測試不易檢測出物質對生物內分泌系統的影響。故美國國會促其環保署增訂內分泌測試方法，以利評估其對人類或生態的影響。

具有內分泌系統的生物很多，包括哺乳類、非哺乳類(如兩棲、爬蟲類及魚類)及無脊椎動物(軟體動物如蝸牛、節肢動物如龍蝦、昆蟲及其他種類)。內分泌系統包括內分泌腺體及其所產生的荷爾蒙，可以調節生物的生長、發育、行為及生殖。內分泌腺包括腦下垂體、甲狀腺、副腎腺、卵巢及睪丸；荷爾蒙為內分泌腺體所分泌的生物化學物質，經血液運輸至身體各部位，藉以調控標的器官或組織的生理功能。在五十多種已知的脊椎動物荷爾蒙中，雌性激素、雄性激素、甲狀腺素，對生長、發育、行為及生殖等生理機能扮演重要角色。

干擾這個複雜的系統可經由許多不同途徑。如有些化學物質會模擬天然的荷爾蒙，"愚弄"身體對此"假"刺激於不當的時機做過多的反應；另外有些化學物質可能阻礙組織或器官的荷爾蒙接受器與正常荷爾蒙鍵結；甚至有些化學物質直接與內分泌腺體作用，抑制或刺激產生荷爾蒙。

這些干擾內分泌系統的化學物質是否會由環境進入人類或野生生物體內造成致癌或腫瘤、生殖、免疫及神經系統影響，科學界中仍未有最終的結論。目前已知懷孕婦女服用人造動情素DES (diethylstilbestrol)安胎而造成其生產的女兒長大後罹患中性細胞陰道癌(clear-cell cancer of the vagina)比未服用之對照組女性高；與男性荷爾蒙失調相關的男童尿道下裂病患，近年來也逐漸增加。美國國家防癌機構(National Cancer Institute)所支持的流行病監督及最終結果(Surveillance Epidemiology and End Results)報告指出於1973年至1991年男性癌症患者增加31%，女性則為14%。其中對荷爾蒙作用敏感的組織如乳癌及攝護腺癌等較一般組織所罹患的癌症所增加速度為高。但是仍有一些反證指出母乳、脂肪組織或血漿中的多氯聯苯、有機氯含量與癌症罹患率並不相關。

這突顯出研究上的困擾。學者建議研究內分泌干擾物質對生物的影響，第一需考慮的是，在生物生活史中，不同的時期對化學物質的敏感度不同，如DES對懷孕婦女前三個月影響最顯著。第二為暴露的時間與時機，評估時不僅要考慮檢測頻度，對於暴露的期程與時機均需考慮，如常需對發育期暴露作評估。第三須考慮的是不僅對干擾物質作直接影響的檢測，其間接作用亦須評估，因為干擾物質可能直接影響標的器官或組織，但內分泌系統是具有回饋機制(feed back)，當受影響的器官或組織提供不正常的訊息回饋至內分泌系統間接造成生殖、神經甚至是免疫系統錯亂與毒害，引發第二次的傷害將更難完整有系統的評估。在這些紛紛出爐的研究報告中，仍須注意不要過度轉譯其結果，因為許多試驗常以遠高於環境現存的劑量進行試驗，並在短期之內完成結果之評估。用此高劑量結果來推估低劑量時生物可能的反應，而未考慮劑量的高低與作用期程長短造成對生物危害的風險可能不是呈線性相關，因此用高劑量短期作用的結果可能與低劑量長期作用的結果會造成不同的結論。再則，使用的評估方式未標準化、各實驗室所提的結果均是基礎研究，其再現性、準確性、重覆性等品管要求也要求不一。

美國環保署成立內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)，欲針對環境中可能干擾內分泌系統的化學物質，建立一完善的評估模式。這個委員會於1998年8月報告中提出分級或分層方式篩選及測試具內分泌干擾物質，其步驟包括剛開始的分類(Initial Sorting)、優先順位的設定(Priority Setting)、第一階段篩選(Tier One Screening)及第二階段篩選(Tier Two Screening)。內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會一開始目標設定為化學物質對雌性激素、雄性激素及甲狀腺素的影響，因為此三種荷爾蒙掌控主要的生殖、發育及生長等生理作用，爾後對此三種荷爾蒙研究所累積的資料，再推估其他荷爾蒙可能受到的影響，到那時候，美國環保署將再評估擴大研究範圍至其他荷爾蒙。首先進行分類工作；美國目前使用近87000種化學物質，其中包括900種為農藥成份中的主成分(pesticide active ingredients)，2500種為農藥的其它常明白告知的成份，75500種為工業化學物質，8000種為化妝品、食品添加及營養補充劑。內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會將其分為四類(如圖一)，作為執行篩選程序：

(一)第一類包括一些無機酸或鹼、氨基酸、醣類及一些平均分子量(number average molecular weight, NAMW)高於1000的聚合物等，這些物質似乎不能表現出荷爾蒙活性故不須進行篩選，平均分子量高於1000的聚合物很難通過細胞膜更別提有任何生物作用或內分泌干擾影響，所以對此類物質先持保留(Hold)態度。

(二)第二類化學物質則包括一些未具充份資料顯示其對內分泌干擾的潛力，這些物質將經過優先順位設定後進行第一階段篩選。若有篩選出具有干擾內分泌系統的“潛力”，則進入第二階段測試試驗，若無則歸類至第一類“保留”。

(三)第三類物質則有充份資料顯示，可免去第一階段篩選過程，逕行進入第二階段測試評估；或已經過第一階段篩選，其結果疑似對內分泌系統具干擾作用的化學物質。

(四)第四類化學物質則具有足夠的資料顯示其對內分泌系統造成影響，可以逕行提報給政府及決策單位評估其危害程度。美國環保署估算第三或四類化學物質各不超出1000種。

優先順位的設定主要是針對上述第二類化學物質，因為第二類化學物質就有62000種，所以須經優先順位設定以加速後

續篩選進行。農藥中其他其份(非主成分以外的成份)及日常用品中的化學物質，因缺乏足夠的資料，均歸類為第二類化學物質。由於此類物質太多，彼此之間的化學特性又不盡相同，美國環保署成立內分泌干擾物質優先順位設定資料庫(Endocrine Disruptor Priority Setting Data Base)，將此類化學物質依其釋放於環境中的劑量、生物體中接受器的鍵結位置、環境中發現的頻度及含量等資料加以收集整理，具類似的資料再細分為一小類，例如歸類為“食物與飲用水中的化學物質”，悠關直接對人體的影響，將先進行第一階段篩選。內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會正發展一套適合做為例行性優先順位設定的篩選檢測方法—快速前篩選(High Throughput Pre-screening, HTPS)，檢測化學物質對雌性素與雄性素接受器交互作用，所有過程除少數須前處理操作外，包括樣品秤重、溶於適當溶劑、取使當量至反應盤上、篩選及讀取篩選結果全自動化，所有流程能連續不斷進行，在檢測大量樣品時，相對下縮短每個樣品花費的時間。

但快速前篩選結果並不能取代第一階段的篩選，只是在設定哪些物質須優先進入第一篩選階段，美國環保署仍認為此檢測方法須再多加其他方法來輔助其篩選功能，如量化的結構活性關係(Quantitative Structure-Activity Relationship)，電腦模擬化學分子結構模式對生物內分泌系統的影響，這是利用模擬化學物質的結構來預測此化合物與雌性素及雄性素接受器結合的能力，通常以天然荷爾蒙鍵結親合力做相對比較，但是須注意的是此方法只做與接受器鍵結的親合力，而化學物質干擾內分泌系統還有許多不同的可能途徑。

第一階段篩選試驗工作，分為三項活體外(in vitro)及五項活體內(in vivo)試驗，因為不同生物對外來物質可能透過不同代謝途徑，所以透過不同生物篩選之。活體外試驗靈敏度高及偵測誤差低且可縮短篩選時間，但是直接以細胞株進行試驗，對於如何進入生物體內，透過其新陳代謝及轉化可能的變化，則無法深究瞭解。故經過第一階段篩選後，若無干擾作用產生，則歸類至保留類(Hold)；

反之，進入第二階段測試做更進一步測試工作。體外試驗提供快速、便宜的篩選方法，包括有

(一) 雌性激素受體鍵結效應及指標性基因測試(an estrogen receptor binding or reporter gene assay)；是以穩定或短暫之基因轉染方法(stable or transient transfection)，將一指標基因(reporter gene)，例如螢光酵素luciferase (Vit-Luc)的表現基因，殖入乳腺癌細胞(MCF-7或T47D)內，若在雌性激素或雌性激素干擾物質存在環境下，指標基因之蛋白質轉錄機制因受雌激素所調控而被活化，轉錄之蛋白質螢光酵素luciferase可加以定量；利用與人造荷爾蒙(DES)或雌性素(estradiol)測試的反應，量化此物質的雌性素活性。全部之測試時程約為2天。

(二) 雄性激素受體鍵結效應及指標性基因測試(an androgen receptor binding or reporter gene assay)，在4°C下將去勢的老鼠的生殖組織(如附睪、攝護腺等)中，分離出雄性素接受器(androgen receptor)，將其以放射性同位素標識，最後利用代謝物與雄性接受器相對鍵結親合力(relative binding affinity, RBA)來推估其雄性素活性；另一種雄性素活性篩選方法則為雄性素轉錄活化分析研發中尚未普及。

(三) 睪丸剝碎勻漿培養之類固醇增生效應(a steroidogenesis assay with minced testis)；此方法不僅可以評估哺乳類，其他如魚類、爬蟲類、鳥類及兩棲類均可。從睪丸組織中分離出萊狄氏細胞(一種間質細胞，可合成睪固酮)進行培養，物質若具干擾活性，則經由抑制P450酵素而影響固醇基因的表現。

活體內試驗則包括：

(一) 為期三天之鼠體子宮增生試驗(a rodent 3-day uterotrophic assay)；可篩選出具雌性素活性的化學物質，它是由經濟合作發展組織(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)與美國環保署共同建立，活體內之雌鼠子宮增生測試，迄今最準確之雌性激素篩檢測試法之一，它可檢測出化學物質對鼠子宮反應雌性素抑制或刺激的能力，篩選程序固定，此方法已進入實驗室之間的驗證步驟。實驗方式是以未成熟的雌幼鼠或經卵巢摘除之雌成鼠作為測試之實驗動物，待測物以口服或注射方式進入動物體內。實驗之時程為1-3天，最後一次餵飼或注射試驗後於6至24小時解剖。雌性激素效應可由測定控制組與實驗組之子宮的脂肪、乾重或濕重確認。待測化學物質，可經實驗動物體內代謝，確切評估對雌性激素合成酵素(aromatase)的影響，而對其他內分泌腺體(例如hypothalamic-pituitary axis)之作用亦可被檢測出。實驗所得之血液及其他器官，亦可作為其他活體外檢測雌性激素效應方法之檢體。

(二) 為期二十天之青春期雌鼠甲狀腺試驗(a rodent 20-day pubertal female assay with enhanced thyroid endpoints)；以剛斷奶的21天小母鼠每天口服(強餵飼)待測物質，記錄其第一次發情期、動情期週期及陰道開始開口(Vaginal opening)的年齡，最後解剖量測卵巢重量。

(三) 鼠體Hershber分析試驗(a rodent 5 to 7-day Hershberger assay)；去勢的雄老鼠其第二次性徵—攝護腺及儲精囊，成長或維持其大小，須靠用雄性素，睪固酮及dihydrotestosterone DHT。本方法以去勢的雄老鼠餵飼5-7天的睪固酮與待測物混合物，最後檢測其攝護腺及儲精囊的重量，以觀察待測物是否抑制雄性素(睪固酮)，另一組試驗則僅餵飼去勢雄老鼠待測物，最後檢測其攝護腺及儲精囊的重量，若增加或維持不變，則具雄性素活性。

(四) 青蛙成長過程期間之型態變化測試(a frog metamorphosis assay)；經暴露於待測物超過14天的幼生(蝌蚪)期非洲青蛙(African clawed frog, *Xenopus laevis*)，以電腦輔助的攝影器材，定量蝌蚪轉化為青蛙時，尾巴吸收的速度，若待測物具甲狀腺活性，加速尾巴吸收，反之，待測物抑制甲狀腺素。

(五) 魚性腺再現分析(a fish gonadal reproductive screening assay)；魚類的荷爾蒙結構、雌性素接受器形狀及功能有別於哺乳

類(如哺乳類的睪固酮testosterone，魚類則為11-ketotestosterone)，類固醇接受器與肝臟分泌的卵黃前質也僅產卵動物所特有。故須針對魚類作內分泌干擾試驗。此試驗設計用來篩選待測物雄性素與雌性素活性。觀察成熟雌魚及雄魚不正常的存活率、生殖行為、第二性徵、生殖指數(gonadosomatic index, GSI)、產卵數目、受精率、孵化率、子代存活率等。

第二階段為進階測試方法，評估內分泌干擾物質可能作用途徑及劑量反應。為達完善評估。試驗設計通常包含試驗動物生命週期的關鍵時刻及過程，也使用較廣泛劑量進行測試，並且對於劑量(進入體內的量)與暴露(實驗環境中所測試的量)作明顯區分，以提供健康風險評估參考之依據。此階段測試須耗費長期時間觀察及人力，最後均須犧牲許多研究生物的生命，才能完成測試評估。本階段試驗許包括多種生物，哺乳類及其他生物試驗以求完善評估：

哺乳類動物試驗：

哺乳類二代間生育繁殖系統毒性測試(two-generation mammalian reproductive toxicity study)；此方法透過觀察老鼠親代與子代之間，評估待測物對親代老鼠生殖功能、動情期的週期、求偶行為、受精率、懷孕至分娩，而子代哺乳、斷奶及最後能存活至成鼠且具生殖功能的影響。其他生物多代試驗

(一) 鳥類生育繁衍影響測試(鸕鶿與野鴨) (avian reproduction with bobwhite quail and mallard)；以鳥類作為觀察對象，而鸕鶿與北方野鴨為此方法常用的研究對象。由成鳥開始暴露於具待測物的環境中，經產卵、孵化、子代的出生，爾後子代繼續暴露，成長，最後又成熟產卵。在這二代之間除詳實記錄內分泌干擾活性相關資料如產卵量、破壞卵量、卵殼厚度、胚胎存活率及小鳥14天存活率外，攸關其它荷爾蒙觀察指標如重要器官(包括腦)重量、腺體重、骨骼發育、腳及翅膀長度、各器官與骨的比值、骨骼的X-光片、病理、功能測試及子代生育能力等資料均須一併記錄。

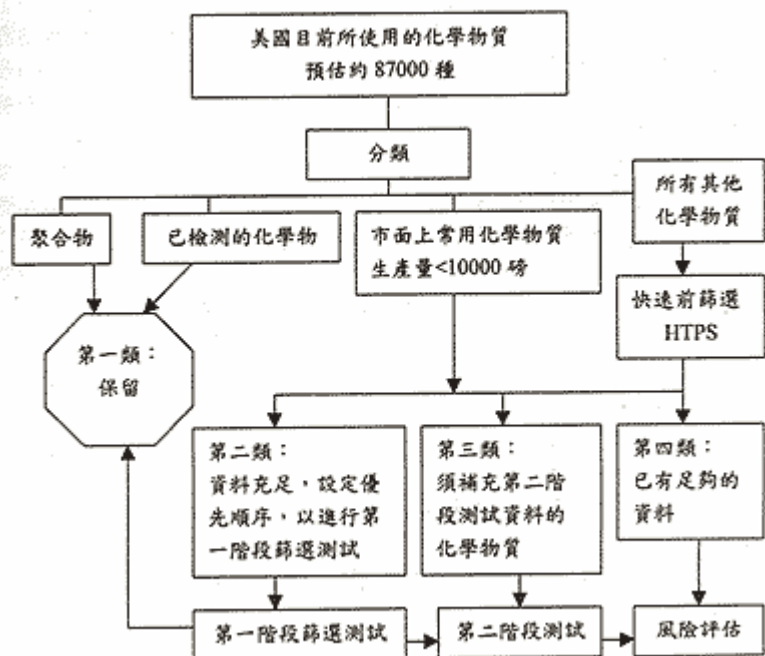
(二) 魚類生命週期測試(鱒魚) (fish life cycle, fathead minnow)；在演化過程中，魚類在脊椎動物中與哺乳類關係最遠，生殖策略上從卵生、卵胎生至胎生都有，內分泌干擾物質對不同科別的魚可能就有很大差異，還有地理因素須考慮。淡水魚-鱒魚(fathead minnow, *Pimephales promelas*)從受精、發育、成熟、生殖至子代發育須約花300天的暴露評估。至於海水魚的評估試驗有些科學家朝向以鮭魚(salmon)作試驗對象發展。鱒魚試驗一開始，須使用200個受精卵，分置於8個培養缸中進行暴露，至孵化、幼魚、成熟後，將一隻雄魚與二隻雌魚各別圈養，當受精產卵後移走成魚，完成待測物的單一濃度試驗。但此試驗除須有控制組的考量下，每一種待測物須進行五種濃度測試。

(三) 糠蝦生活史(Americamysis) (Mysid life cycle, Americamysis)；無脊椎動物(特別是節肢動物如昆蟲、蝦、蟹等)佔全球生物極大部份，相反地，卻很相當少的無脊椎動物作為例行性檢測的試驗材料。兩種比較常用來進行毒性測試的無脊椎動物，均為甲殼類；海水方面以糠蝦(Mysidacea目)，淡水則用水蚤(*Daphnia magna* or *Daphnia pulex*)，前者雌雄異體，後者生活史中以孤雌生殖為主。雖然水蚤也有有性生殖，但一般標準測試僅限孤雌生殖的水蚤進行。這兩種甲殼類雖採不同的生殖策略，但有共同的生理，如蛻殼素是主要調控生長與蛻殼機制，而體內均有類似雌性素的物質刺激產生卵黃前質。此檢測方法對無脊椎動物的生殖與生長情形(蛻殼狀況、體長)進行觀察。

(四) 兩棲類成長及生育繁衍能力的測試(amphibian development and reproduction, Xenopus)；這是透過暴露幼生期的青蛙(蝌蚪)經變態、生長、生殖的評估，目前試驗的品種及標準化程序還在評估測試。

除上述美國環保署委託內分泌干擾物質篩選及測試的方法諮詢委員會所建議的方法外，許多學者仍不斷研發其他可行方法以更快速、便捷與完善進行檢測。目前有學者認為水生生物直接暴露於污染的水域中，可做為環境發生問題的前哨站，魚體血漿中的卵黃前質(vitellogenin)可作為化學物質具雌性素活性的指標。卵黃前質為一種大分子的磷脂蛋白，為產卵脊椎動物生殖中的重要因子。成熟雌魚中雌性素刺激肝臟合成並分泌卵黃前質至血液中，促使卵巢的卵成熟。一般而言，卵黃前質只存在已成熟的雌魚中，雄魚及幼魚血漿中卵黃前質很低甚至測不到。當雄魚檢測出不正常的卵黃前質量，即代表其暴露於具雌性素活性的環境下。還有學者想兼顧活體外與活體內試驗的優點，將魚胚胎轉染具雌性接受器與發光指標基因(當雌性接受器受到雌激素鍵結，促使發光作用)，等培育出具有此特殊基因的魚，經暴露試驗，直至產生第二代魚，觀察雌性素活性可以不必透過解剖並且可以瞭解關鍵時期的影響程度。在分子生物科技日新月異下，簡便、快速、確實而可標準化的方法將指日可待。

圖一、美國環保署內分泌干擾物質篩選程序(EPA's Endocrine Disruptor Screening Program) 摘自美國內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)於2000年8月內分泌干擾物質篩選程序大會報告



環境檢驗所 助理研究員 黃王瑰

本網頁於097/06/03編輯發行，最新檢視日期：102/03/01。
 【資料內容為已確認之文件，非屬應即時更新之統計資訊】

