

計畫編號：EPA-93-E3S5-02-02

計畫名稱：環境荷爾蒙調查研究 (3/3)

(定稿本)

委託單位：行政院環境保護署 環境檢驗所

執行單位：大仁技術學院

計畫執行期間：中華民國九十三年三月 至

中華民國九十三年十二月

印製年月：中華民國九十三年十二月

行政院環境保護署 環境檢驗所編印

計畫編號：EPA-93-E3S5-02-02

行政院環境保護署 九十三年度科技專案 研究計畫

計畫名稱：環境荷爾蒙調查研究 (3/3)

(中華民國 93 年 3 月 至 93 年 12 月)

計畫執行單位：大仁技術學院

計畫主持人：陳福安

聯絡電話：08-7624002 分機 328

傳真：08-7627925

中華民國九十三年十二月

「環境荷爾蒙調查研究 (3/3)」計畫期末報告基本資料表

甲、委辦單位	行政院環保署環境檢驗所			
乙、執行單位	大仁技術學院			
丙、年 度	93	計畫編號	EPA-93-E3S5-02-02	
丁、研究性質	<input type="checkbox"/> 基礎研究	<input checked="" type="checkbox"/> 應用研究	<input type="checkbox"/> 技術發展	
戊、研究領域	環境保護			
己、計畫屬性	<input checked="" type="checkbox"/> 科技類		<input type="checkbox"/> 非科技類	
庚、全程期間	93年03月~93年12月			
辛、本期期間	93年03月~93年12月			
壬、本期經費	億 1,260 千元			
	資本支出		經常支出	
	土地建築	千元	人事費	460 千元
	儀器設備	千元	業務費	80 千元
	其 他	千元	材料費	657 千元
			其 他	63 千元
癸、摘要關鍵詞 (中英文各三則)	塑化劑、雌激素效應、MVLN 細胞 Plasticizer、Estrogenicity、MVLN cell			
參與計畫人力資料：(如僅代表簽約而未參與實際研究計畫者則免填以下資料)				
參與計畫人員姓名	工作要項或撰稿章節	現職與簡要學經歷	參與時間(人月)	聯絡電話及 e-mail 帳號
陳福安	計畫執行含實驗設計、實驗指導、數據查核、品保作業及報告撰寫	大仁技術學院藥學系副教授	10	08-7624002 ext. 328
楊友仁	實驗操作與數據整理	研究生	10	08-7624002 ext. 328
鄭素湘	資料搜尋、彙整與文書處理	研究生	10	08-7624002 ext. 328

## 摘要

本計畫以美國環保署公告方法 4425 為品管要求進行 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法之建立與標準化，其評估項目包括冷光酵素檢量線建立、檢體溶劑選擇與用量影響評估、檢體暴露時間影響評估、雌激素標準品檢量線建立、檢測感度與精密度。冷光酵素標準曲線線性方程式為  $y=2274.6x-1.6944$  (0.01 ~ 0.16 pg/ml)，相關係數 ( $r^2$ ) 達 0.9985，有很好的線性關係，精密度 RSD % 範圍 1.40 ~ 14.43 %，冷光酵素偵測極限可達 0.01 pg/ml。DMSO、Methylene chloride (MECL)、Hexane (HX)、Methanol (MEOH)、Isooctane (ISOT) 與 Acetone (ACT) 六種溶劑對 MVLN 之細胞毒性大小順序為  $HX > DMSO > ACT \approx MEOH > MECL \approx ISOT$ ，要讓 MVLN 細胞存活率低於 80 % 之溶劑濃度分別為 HX 0.5 %、DMSO 2 %、ACT 8 %、MEOH 8 %、MECL > 8 %、ISOT > 8 %。MVLN 細胞暴露於雌激素(E2)下之冷光值會隨著 E2 的濃度而上升，具濃度效應，其標準曲線均呈 Sigmoidal curve，約 1 nM 已達最大效應。MVLN 細胞暴露於雌激素 1、2、3 天之濃度-相對雌激活性圖樣與 RSD % 並無太大差異，整體實驗重覆數 3~6 次之 RSD % 範圍為 0.18 ~ 15.23 %。另 MVLN 細胞暴露於雌激素 1、2、3 天之細胞檢測感度分別為 1.59 pM、0.29 pM 及 2.54 pM。本計畫完成方法確立後進行 42 種塑化劑之雌激素活性檢測與四種塑化劑間的交互作用評估，結果發現 42 種塑化劑中有五種塑化劑 Butyl benzyl phthalate (BBP, 10  $\mu$ M)、Bis (4-methyl-2-pentyl) phthalate (BMPP, 10  $\mu$ M)、Diethoxyethyl phthalate (DEEP, 1 & 10  $\mu$ M)、Hexyl-2-ethylhexyl phthalate (HEHP, 10  $\mu$ M) 及 Monobenzyl phthalate (MBP, 10  $\mu$ M) 呈現顯著雌激素效應 ( $p < 0.01$ )。這五種的對雌激素的相對力價分別為 BBP ( $1/2.44 \times 10^6$ )、BMPP ( $1/1.42 \times 10^6$ )、DEEP ( $1/4.50 \times 10^5$ )、HEHP ( $1/3.76 \times 10^6$ ) 及 MBP ( $1/1.81 \times 10^6$ )，此結果顯示這五種塑化劑是屬弱雌激性化學物質。在交互作用方面，結果初步推論 BBP、BMPP、DEEP、HEHP 可能沒有發生物種間與對雌激素間的交互作用。

## Abstract

This plan established and standardized the MVLN estrogen specific transcription assay according to QC/QA criteria of USEPA method 4425. The evaluated items included establishment of luciferase standard curve, evaluation of solvent selection for sample and used quantity, evaluation of exposure time of sample, establishment of 17 $\beta$ -estradiol (E2) standard curve, and detection sensitivity and precision. The luciferase standard curve gave the equation of  $y = 2274.6X - 1.6944$  after linear regression (0.01 ~ 0.16 pg/ml). The correlation coefficient of the linear regression analysis achieved 0.9985. The precision and detection limit were 1.40 ~ 14.43 % (RSD) and 0.01 pg/ml, respectively. The cytotoxicity of MVLN to DMSO, methylene chloride (MECL), hexane (HX), methanol (MEOH), isooctane (ISOT) and acetone (ACT) decreased in the order of  $HX > DMSO > ACT \approx MEOH > MECL \approx ISOT$ . The solvent concentrations required to achieve 80 % viability of MVLN cell were HX 0.5 %, DMSO 2 %, ACT 8 %, MEOH 8 %, MECL > 8 % and ISOT > 8 %. The luciferase induction was increased as the concentration of E2 increased. The standard curve showed sigmoidal pattern having  $C_{max}$  at 1 nM. Exposure time of MVLN cells to E2 (1~3 days) did not affect significantly their concentration-estrogenicity plots. The precision of E2 in 3 to 6 replicates were 0.18 ~ 15.23 %. The detection limit for E2 exposure time of 1, 2 and 3 days were 1.59 pM, 0.29 pM and 2.54 pM, respectively. The method was further applied to estimate the estrogenicity of 42 plasticizers and interactions between 4 plasticizers. The results revealed that 5 plasticizers as butyl benzyl phthalate (BBP, 10  $\mu$ M), bis (4-methyl-2-pentyl) phthalate (BMPP, 10  $\mu$ M), diethoxyethyl phthalate (DEEP, 1 & 10  $\mu$ M), hexyl-2-ethylhexyl phthalate (HEHP, 10  $\mu$ M) and monobenzyl phthalate (MBP, 10  $\mu$ M) possessed significant estrogenicity ( $p < 0.01$ ). Their relative potency to E2 were BBP ( $1/2.44 \times 10^6$ ), BMPP ( $1/1.42 \times 10^6$ ), DEEP ( $1/4.50 \times 10^5$ ), HEHP ( $1/3.76 \times 10^6$ ) and MBP ( $1/1.81 \times 10^6$ ) indicating that these 5 plasticizers classed as weak estrogenic

chemicals. In case of interaction study, the results implied that BBP, BMPP, DEEP, HEHP and E2 have possibly no interaction each other.

# 目錄

## 摘要

第一章 前言	(1)
1.1、環境荷爾蒙	(1)
1.2、環境荷爾蒙分類與作用機制	(1)
1.3、環境荷爾蒙清單與國際行動	(3)
1.3.1 美國	(3)
1.3.2 日本	(9)
1.3.3 韓國	(10)
1.3.4 歐洲與歐盟組織	(10)
1.3.5 國內	(13)
1.4 環境荷爾蒙生物檢測法	(14)
1.4.1 活體外生物檢測法	(18)
1.4.2 環境賀爾蒙活體外生物檢測技術	(19)
1.4.3 環境賀爾蒙活體外生物檢測技術在環境管理上之適用性	(21)
1.5 塑化劑與鄰苯二甲酸酯類 (Phthalate Esters)	(23)
1.5.1 鄰苯二甲酸酯類	(26)
1.5.2 鄰苯二甲酸酯類的市場動向	(27)
1.5.3 鄰苯二甲酸酯類的可能暴露	(30)
1.5.4 鄰苯二甲酸酯類的生物毒性	(32)
第二章 本年度計畫目標與工作項目	(36)
2.1、本年度甄選工作之計畫目標	(36)
2.2、本年度工作項目	(36)
第三章 材料與方法	(37)
3.1 細胞株與試藥	(37)

3.2 器材 .....	( 53 )
3.3 儀器 .....	( 53 )
3.4 冷光酵素標準曲線 .....	( 54 )
3.5 雌激素標準品檢量線建立、檢體暴露時間影響評估、檢測感度與精密度建立.....	( 55 )
3.6 檢體溶劑選擇與用量影響評估 .....	( 60 )
3.7 塑化劑的雌激素活性與細胞毒性評估 .....	( 62 )
3.8 塑化劑間與對雌激素間的雌激素交互作用評估 .....	( 63 )
第四章 結果與討論 .....	( 64 )
4.1 冷光酵素標準曲線 .....	( 64 )
4.2 雌激素標準品標準曲線建立、檢體暴露時間影響評估、檢測感度與精密度建立 .....	( 66 )
4.3 檢體溶劑選擇與用量影響評估 .....	( 69 )
4.4 塑化劑的細胞毒性與雌激素活性評估 .....	( 70 )
4.5 塑化劑間與對雌激素間的雌激素交互作用評估 .....	( 119 )
第五章 文獻整理 .....	( 122 )
第六章 參考文獻 .....	( 145 )
附錄 I、ICCVAM 提出進行確效參考物種及考慮中參考物種 .....	( 163 )
附錄 II、活體外雌激素生物檢測方法公告草案- MVLN 雌激素專一性轉錄分析法 .....	( 172 )
附錄 III、期中與期末報告審查委員意見執行情形.....	( 179 )
附錄 IV、環境荷爾蒙調查研究三年結果摘要式整理.....	( 191 )
附錄 V、MVLN 雌激素專一性轉錄分析法標準作業程序(SOP).....	( 196 )
附錄 VI、US EPA Method 4425 .....	( 205 )

## 圖目錄

圖 1.1	美國EPA的內分泌擾亂篩選計畫流程圖	(4)
圖 1.2	歐聯委員會計畫階段及結果示意圖	(12)
圖 1.3	美國EPA內分泌幹擾物試驗項目與流程	(15)
圖 1.4	MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析的分析機轉	(21)
圖 3.1	MVLN 細胞型態圖	(58)
圖 3.2	MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析流程圖	(59)
圖 3.3	MVLN 細胞生長曲線圖	(60)
圖 4.1	冷光酵素高濃度標準曲線圖	(65)
圖 4.2	冷光酵素低濃度標準曲線圖	(65)
圖 4.3	MVLN 細胞於不同濃度暴露不同天數之冷光產生標準曲線圖	(67)
圖 4.4	MVLN 細胞於不同濃度暴露不同天數之相對雌激素活性標準曲線圖	(67)
圖 4.5	MVLN 細胞暴露於不同溶劑經兩天後之細胞存活率	(70)
圖 4.6	Di-n-butyl phthalate (DBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(74)
圖 4.7	Butyl benzyl phthalate (BBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(75)
圖 4.8	Dicyclohexyl phthalate (DCHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(76)
圖 4.9	Diethylhexyl phthalate (DEHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(77)
圖 4.10	Diethyl phthalate (DEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(78)
圖 4.11	Dipentyl phthalate (DPP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(79)
圖 4.12	Dihexyl phthalate (DHxP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(80)
圖 4.13	Dipropyl phthalate (DPrP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(81)
圖 4.14	Di-n-octyl phthalate (DnOP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(82)
圖 4.15	Diisononyl Phthalate (DINP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(83)
圖 4.16	Dinonyl phthalate (DNP) 的細胞毒性及雌激素活性圖	(84)

圖 4.17	、Diisodecyl phthalate (DIDP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 85 )
圖 4.18	、Diheptyl phthalate (DHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 86 )
圖 4.19	、Diisobutyl phthalate (DIBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 87 )
圖 4.20	、Diisooctyl Phthalate (DIOP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 88 )
圖 4.21	、Dimethyl phthalate (DMP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 89 )
圖 4.22	、Diisopropyl phthalate (DIPrP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 90 )
圖 4.23	、Diisoheptyl Phthalate (DIHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 91 )
圖 4.24	、Diallyl phthalate (DAP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 92 )
圖 4.25	、Dibutoxyethyl phthalate (DBEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 93 )
圖 4.26	、Diundecyl Phthalate (DUDP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 94 )
圖 4.27	、Dimethoxyethyl phthalate (DMEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖----	( 95 )
圖 4.28	、Bis(4-methyl-2pentyl) Phthalate (BMPP) 的細胞毒性及雌激素活活性 圖-----	( 96 )
圖 4.29	、Diethoxyethyl Phthalate (DEEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 97 )
圖 4.30	、Diphenyl phthalate (DPhP) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 98 )
圖 4.31	、Hexyl-2-ethylhexyl Phthalate (HEHP) 的細胞毒性及雌激素活 性圖-----	( 99 )
圖 4.32	、Di(2-ethylhexyl) phthalate( DEHA ) 的細胞毒性及雌激素活性-----	( 100 )
圖 4.33	、Diisobutyl Adipate( DIBA ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 101 )
圖 4.34	、Di-n-propyl Adipate( DPrA ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 102 )
圖 4.35	、Di-n-butyl adipate( DBA ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 103 )
圖 4.36	、Diisopropyl adipate( DIPrA ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 104 )
圖 4.37	、Diisononyl phthalate( DINA ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 105 )
圖 4.38	、Triooctyl Trimellitate( TOTM ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 106 )
圖 4.39	、Dimethyl terephthalate( DMTP ) 的細胞毒性及雌激素活性圖-----	( 107 )

- 圖 4.40 、Dimethyl Terephthalate(DMTP)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 108 )
- 圖 4.41 、Monobenzyl Phthalate(MBP)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 109 )
- 圖 4.42 、Monomethyl Terephthalate(MMTP)的細胞毒性及雌激素活性圖-- ( 110 )
- 圖 4.43 、Mono-n-hexyl Phthalate(MHxP)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 111 )
- 圖 4.44 、Mono-2-ethylhexyl Phthalate(MEHP)的細胞毒性及雌激素活性--- ( 112 )
- 圖 4.45 、Diisodecyl Adipate(DIDA)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 113 )
- 圖 4.46 、Heptylnonyl adipate(HNA)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 114 )
- 圖 4.47 、Adiponitrile(APN)的細胞毒性及雌激素活性圖----- ( 115 )
- 圖 4.48 、BBP 與 E2、BMPP、HEHP 及 DEEP 交互作用圖----- ( 120 )
- 圖 4.49 、DEEP 與 E2、BBP、HEHP 及 DEEP 交互作用圖----- ( 120 )
- 圖 4.50 、HEHP 與 E2、BBP、BMPP 及 DEEP 交互作用圖----- ( 121 )
- 圖 4.51 、BMPP 與 E2、BBP、HEHP 及 DEEP 交互作用圖----- ( 121 )

## 表目錄

表 1.1	美國伊利諾州環保署內分泌幹擾物質清單-----	(6)
表 1.2	為 2002 年全球主要地區塑化劑需求情形-----	(25)
表 1.3	常見塑化劑之特性-----	(25)
表 1.4	我國主要塑化劑生產廠商與產能表-----	(28)
表 1.5	我國主要塑化劑生產廠商與產能表-----	(29)
表 3.1	42 種塑化劑的來源與其物理化學性質-----	(38)
表 4.1	各種濃度冷光酵素之冷光值 (n=3) -----	(66)
表 4.2	MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析不同實驗重複數之精密度--	(68)
表 4.3	MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析法依不同方法標準檢定之感度差異 -----	(69)
表 4.4	四十二種種塑化劑的細胞毒性比較表-----	(116)
表 4.5	五種塑化劑的雌激素活性比較表 -----	(118)
表 5.1	一般常見塑化劑物種環境賀爾蒙毒性資料-----	(122)

## 第一章 前言

### 1.1、環境荷爾蒙

近十幾年來，隨著有些野生生物發生生殖機能及發育上的異常現象，當時臆測與環境介質中的化學物質暴露有關（Colborn et al., 1993；Vos et al., 2000），引發學者與官方單位對化學物質生態毒性的關心與重視。有些化學物質會擾亂內分泌系統之荷爾蒙分泌、合成、代謝與受體結合而造成成長、發育及生殖等產生不良影響，此類化學物質統稱內分泌擾亂物質（Endocrine Disruptors, EDs），俗稱環境荷爾蒙（Colborn et al., 1993；MOE, 1998；Sonnenschein and Soto, 1998；Menditto and Turrio-Baldassarri, 1999）。荷爾蒙是由腺體分泌內生性訊息化學物質，由血液傳輸至標的器官，藉其荷爾蒙受體結合產生其調控的生理機能，人體及其他脊椎動物已發現有超過 50 種的荷爾蒙，在生殖方面，性荷爾蒙在性發展與受孕調控上扮演重要角色。許多證據顯示我們環境確實存在一些化學物質會模擬或影響內生性荷爾蒙如雌激素與雄激素的作用，而在動物試驗亦顯示某些化學物質會產生性別發展與分化上之不良影響導致雌性化及雄性化等生殖性變異（Skakkebaek et al., 2001；Giesy et al., 2002；Fertmans et al., 2003）。環境荷爾蒙不只對動物造成影響，對人類也可能造成精蟲數降低導致受孕率降低、增加男性睪丸癌及女性的乳癌與卵巢癌之好發性等，然而、以上不良效應與特定化學物質的暴露相關性仍尚待解明（Osterlind, 1986；Carlsen et al., 1992；Baker, 2001）。基於環境荷爾蒙牽涉到人類的健康與野生生物物種的延續，於 1996 年 Colborn 所著的 *Our Stolen Future*、1997 年 Codbury 的「*The Feminization of Nature*」及自 1997 年日本關於環境荷爾蒙的書籍紛紛出版，教育民眾認識環境荷爾蒙及其不良影響，以喚起人們對環境荷爾蒙的重視，因此、環境荷爾蒙已成為國內外重要的環境議題。

### 1.2、環境類雌性激素分類與環境賀爾蒙作用機制

環境類雌性激素在化學結構上不一定需要與天然類固醇有關，涵蓋廣泛的化學結構分類，一般類雌激素環境荷爾蒙大致可分為兩類：第一類為天然化合物如植物雌激素。第二類為人造化學物質包括：1.藥物

如  $17\alpha$ -ethylestradiol、Tamoxifen。2. 添加劑如 Parabens、*t*-butylhydroxyanisol。3. 農藥如殺蟲劑的 DDT、Dieldrin、Chlordane；抗黴菌劑的 Vinclozolin、Triadimefon；除草劑的 Atrazine、Alachlor 等。4. 工業化學物質如 Alkylphenols、Phthalates、Bisphenol-A、PCBs、Dioxin、PAHs、重金屬 (Giesy et al., 2002)。

環境荷爾蒙一般作用機制包括 (1)模擬荷爾蒙與荷爾蒙受體結合，產生類荷爾蒙作用，影響內分泌平衡。(2) 阻隔及改變天然荷爾蒙與荷爾蒙受體結合，產生荷爾蒙結抗作用，影響內分泌平衡。(3)直接或間接與荷爾蒙作用而改變荷爾蒙特性 (4)影響荷爾蒙的合成。(5)影響荷爾蒙受體的製造及功能。(6)影響荷爾蒙的回饋機制，進而干擾腺體之荷爾蒙分泌。(7)影響荷爾蒙之新陳代謝、運送與分布等(Danzo, 1997；Fox, 1991；Kang et al., 2000；Baker, 2001)。

環境類雌(雄)性激素所導致之性生理異常如乳癌、攝護腺癌、卵巢癌及異常睪丸生長，一般認為透過受體之影響有關，故以受體為基礎之研究則為環境荷爾蒙探討之起點。就雌激素而言雌激素受體有兩種  $\alpha$  與  $\beta$  受體， $\alpha$  受體對乳房和子宮影響較大，與乳癌及子宮內膜癌較有關係； $\beta$  受體與皮膚潮熱、心悸、記憶衰退、頻尿、骨質流失及陰道乾燥等較有關係，植物性雌激素如大豆異黃酮主要與  $\beta$  雌激素受體結合，故能改善更年期之症狀，而與乳癌及子宮內膜癌好發性較無關。在雌(雄)激素作用上，雌(雄)激素進入細胞中與接受體結合形成非共價鍵結之雌(雄)激素-受體錯合體，此錯合物作用在 DNA 之雌(雄)激素反應序列 (Estrogen (Androgen) responsive element，ERE & ARE)，進而啓動所調控下游之基因群，產生細胞生理效應如蛋白質生成、細胞增生.....。對於外來化學物質有類雌(雄)激素或抗雌(雄)激素活性時將影響受體結合，影響下游基因之表現，進而影響生理機能。

### 1.3、環境荷爾蒙清單與國際行動

在國外所公佈的疑似環境荷爾蒙清單，以日本環境廳(JP EA，自2001年起改制為環境省JP MOE)公佈65種(原67種，扣除Styrene dimmer/trimer及n-Butylbenzene)為例也不達觀其物種不達目前市面上所使用的工/農業化學物質約有87,000種(US EPA)及日本估計每天被製造與使用化學物質種類約有六萬種的0.1%，可見環境荷爾蒙資料尚待建立。此外、環境荷爾蒙對內分泌系統的影響與作用機轉、內分泌疾病與暴露於環境污染物質的時間或劑量關係仍不明確之下，美國與日本則投入非常大的資源，致力此議題之研究。現階段國際間有關環境荷爾蒙之管理與行動說明如後。

#### 1.3.1、美國

美國1996年國會通過兩個修正法案，一個為食品品質保護法案(FQPA)；另一個為飲用水安全法案(SDWA)，前者指示USEPA成立內分泌擾亂物質篩檢諮商委員(EDSTAC)，規劃內分泌擾亂物質的篩檢規範，於1998年8月完成EDSTAC Final Report (USEPA, 1998)，成為USEPA及OECD之內分泌擾亂物質評估準繩。而後者法案則授權USEPA，以經確效(Validation)之篩檢技術檢測飲用水的環境荷爾蒙效應。

於1998年8月USEPA採納EDSTAC建議宣布進行環境荷爾蒙篩選計畫(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)，並於2000年8月向國會提出報告。EDSP在內分泌擾亂上將目標設定在化學物質對雌激素、雄激素及甲狀腺素的影響，EDSP其流程圖如圖1.1所示。EDSP朝兩個方向進行，第一是建立優先次序設定(Priority setting)方法；第二則進行第一級篩選(Tier 1 Screening)及第二級檢測(Tier 2 Testing)方法的確效(Validation)。

在優先次序設定上，US EPA將美國目前使用之近87,000種化學物質的特性、產量、釋放於環境中的劑量、環境中發現的頻率及含量、毒性資料依屬性分作四類規劃其優先次序：

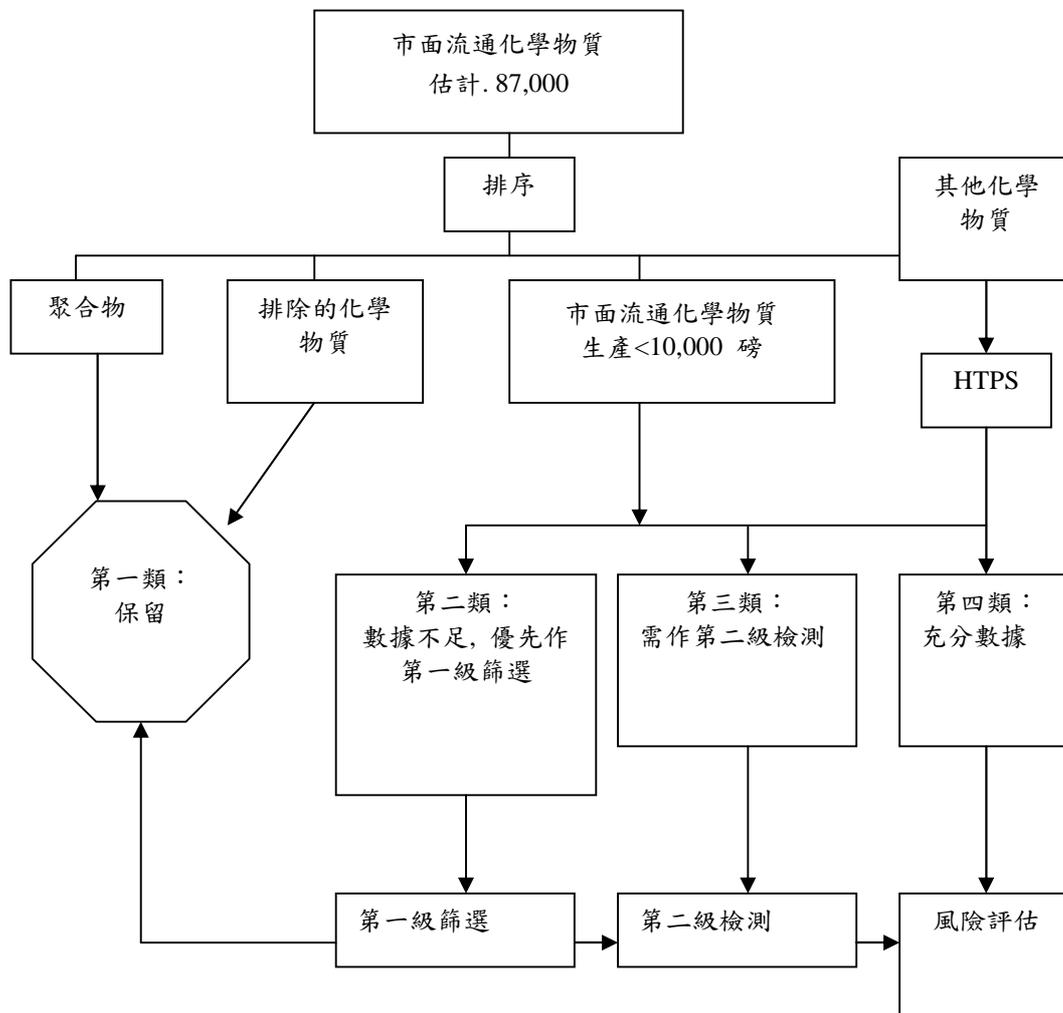


圖 1.1 美國EPA的內分泌擾亂篩選計畫流程圖 (USEPA, 2000)

1. 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，這些物質難以通過細胞膜，似乎不具荷爾蒙活性，對此類物質先持保留(Hold)態度。
2. 第二類化學物質則包括一些尚未確認具有潛在內分泌干擾的物質，這些物質將經過優先次序設定後進行第一級篩選。倘若具有『潛在性』內分泌干擾作用，則進入第二級檢測試驗，否則

歸為第一類。

3. 第三類物質屬已有充份資料顯示，具有內分泌干擾的潛在性，則免除第一級篩選過程，直接進入第二級檢測評估；或經由第一級篩選後，其結果呈現具疑似內分泌干擾作用的則歸入第三類。
4. 第四類則指已有足夠的資料確認對內分泌系統造成影響，則可逕行提報給決策單位評估其危害程度。現今美國環保署之估算，第三或四類化學物質各不超出1,000種。

第二類的化學物質約62,000種，基於彼此化學物質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次序設定資料庫 (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、環境中發現的頻率及含量等資料加以收集整理，再依屬性細分，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，將先進行第一階篩選。另外、EDSP同時發展 High Throughput Pre-Screening (HTPS) 篩選方法及 Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) 電腦模擬系統輔佐進行優先次序設定。

目前約有 50 種化學物質被評定為第四類之危險物，美國環保署 (US EPA)、疾病管制暨預防中心 (CDC)、和世界野生動物基金會 (WFF) 認定為「環境型內分泌干擾物」的清單，共有 103 種，其中 60 種為美國環保署所認定，48 種為疾病管制暨預防中心所認定，68 種為世界野生動物基金會所認定。日本環境廳懷疑為「內分泌干擾物」有 65 種。而美國伊利諾州環保署於 1996 年 10 月 (USEPA)，根據內分泌干擾物質相關之研究文獻資料，建立一份內分泌干擾物質名單，以做為其研擬內分泌干擾物質管制策略之參考。依不同內分泌干擾之相關證據及資料，分成三類，分別為已知物質、可能物質及疑似物質，共計有 71 種物質，清單如表 1.1 所示。

表 1.1 美國伊利諾州環保署內分泌干擾物質清單

確認物種	可能物種	疑似物種
Atrazine	Alachlor	Aldicarb
Chlordanes	Aldrin	Butyl Benzyl Phthalate
Chlordecone	Amitrole	Tert-Butylhydroxyanisole
DDD	Benomy	p-sec-Butylphenol
DDE	Bisphenol A	p-tert- Butylphenol
DDT	Cadmium	Carbaryl
1,2-Dibromo-3-Chloropropane	2,4,-D Di(2-Ethylhexyl) Phthalate	2,4-Dichlorophenol
Dicofol	Endrin	Dicyclohexyl Phthalate
Dieldrin	Heptachlor	Di(2-Ethylhexyl)Adipate
Diethylstilbestrol(DES)	Heptachlor Epoxide	Di-n-butyl Phthalate
Dioxins(2,3,7,8-)	Hexachlorobenzene	Di-n-hexyl Phthalate
Endosulfans	p-Hexachlorocyclohexane	Di-n-penpyl Phthalate
Furans(2,3,7,8-)	Lead	Di-n-propyl Phthalate
Lindane	Mancozeb	Esfenvalerate
Methoxychlor	Maneb	Fenvalerate
p-Nonylphenol	Mercury	Malathion
PCBs	Methyl Parathion	Methomyl
Toxaphene	Meiram	Metribuzin
Tributyl Tin	Mirex	Nitrofen
	p-Octylphenol	Octachlorostyrene
	Parathion	PAHS
	Oentachloro phenol	p-iso-Pentylphenol
	Polybrominated Biphenyls(PBBs)	p-tert-Pentylphenol
	Styrene	Permethrin
	2,4,5-T Trifluralin	Ziram

	Vinclozolin	
	Zineb	

註：陰影處表聯合國環境規劃署(UNEP)稱之為持久性有機污染物者(共 12 種)

資料來源：ILLINOIS EPA ENDOCRINE DISRUPTORS STRATEGY,

<http://www.nihs.go.jp/hse/envIRON/illiepatable.htm>, July 1997

在進行第一級篩選(Tier 1 Screening)及第二級檢測(Tier 2 Testing)方法的確效(Validation)上，第一級篩選是要篩選具有潛在與內分泌系統有作用的化學物質。第二級檢測則要確認其內分泌擾亂效應。基於目前尚無已確效(Validated)過的篩測方法來檢測化學物質的內分泌擾亂效應以反映對人類與野生動物健康影響，因此，第一級篩選與第二級檢測方法則需要經過確效與標準化後方能作例行檢測，並進行風險評估，方能考量最佳的管制方案。環境荷爾蒙篩檢方法的確效工作由 Interagency Coordinating Committee for Validation of Alternative Methods (ICCVAM, 1997 年成立) 規劃進行。於 1999 年 ICCVAM 成立 Endocrine Disruptor Working Group (EDWG)幫助 USEPA 進行確效工作。另於 2001 年 USEPA 亦成立 Endocrine Disruptor Methods Validation Subcommittee (EDMVS)負責提供檢測技術並嚴謹檢定方法的每一確效步驟，並於 2002 年 EDMVS 向國會提出報告。最近 Endocrine Disruptor Methods Validation Advisory Committee (EDMVAV)接手 EDMVS 的功能繼續提供 USEPA 在確效程序與技術上的建議。

USEPA採用 ICCVAM 發展的確效程序包含五步驟：

1. Method development。
2. Prevalidation。
3. Validation on multiple laboratories。
4. Scientific peer review。
5. Regulatory acceptance and implementation。

USEPA目前正在進行確效程序的14種方法中，以第一級篩選方法為主共有9種，另第二級檢測方法有5種。其中Uterotrophic assay、Enhanced rat 28-day subacute assay (Enhanced TG 407)及Hershberger assay之確效已分由經濟合作暨發展組織(OECD)進行，現階段OECD致力於發展新測試準繩與修正現有測試準繩，前兩者方法OECD目前已完成確效所需試驗，而後者方法幾近完成 (Gelbke et al., 2004)。在EDSP規劃的第一級篩選體外試驗中雌(雄)激素受體結合及轉錄活化分析被列為環境荷爾蒙檢測與優先確效之要項，目前在預確效程序階段。

於2000年4月ICCVAM應USEPA要求要評估雌(雄)激素受體結合及轉錄活化分析的確效現況，NTP National Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) 即彙整上述兩項分析方法之相關資料，將其背景回顧文件 (Background Review Documents, BRDs, 2002) 提供ICCVAM作確效現況評估。ICCVAM 經回顧文件中的14種雌激素受體結合體外分析 (共635種不同化學物質)、95種雌激素轉錄活化體外分析 (73種Mammalian reporter gene assays、9種Mammalian proliferation assays及13種Yeast strain gene assays；共698種不同化學物質)、11種雄激素受體結合體外分析 (共109種不同化學物質)、17種雄激素轉錄活化體外分析 (15種Mammalian reporter gene assays、1種Mammalian proliferation assays及1種Yeast strain gene assays；共147種不同化學物質)，已於2003年5月完成其評估報告。在評估報告中提出作為方法確效的物種數共有80種，考慮參考物種共有46種如附錄一：

1. 雌激素受體結合體外分析：33種化學物質。
2. 雌激素轉錄活化體外分析：31種作作用劑確效；21種作結抗劑確效。
3. 雄激素受體結合體外分析：31種化學物質。
4. 雄激素轉錄活化體外分析：28種作作用劑確效；25種作結抗劑確效。

### 1.3.2、日本

1997 年 3 月，環境省設置”外因性內分泌擾亂物質研究群組”(Exogenous Endocrine Disrupting Chemical Task Force) 如：未來環境創造型基礎研究推進群；1997 年 7 月，環境省率先公布具環境荷爾蒙疑似物質七十種(67 種有機化合物及 3 種重金屬)。1998 年 5 月，環境省發表”環境內分泌擾亂物質的因應策略”(Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors, SPEED'98) (MOE, 1998)，在環境荷爾蒙研究上以 SPEED'98 為準繩進行，其工作概念圖與 EDSP 類似。自 1998 年 12 月舉辦「第一屆國際內分泌擾亂物質研討會」起至 2004 年已為第七屆，將 12 月 15 日-17 日於名古屋市舉行，可見日本對環境荷爾蒙議題之重視(內海, 1998a,b；1999；2000)。從 1997 年開始，由日本環境省主導結合各大學相關學者成立未來環境創造型基礎研究推進群，將內分泌擾亂(環境荷爾蒙)列入重點評估。因化學物質種類繁多，日本則以生物分析法 (Bioassay) 取代費時、不經濟的生物活體材料，進行化學污染物質的毒性評估及管理，開啓以生物分析法管理化學物質的新紀元 (內海, 1999；Utsumi, 1994,1999)。從 1997 年開始，該研究群每年挑選數十至數百種化學污染物質，以開發的生物分析檢測法，進行內分泌擾亂(環境荷爾蒙)評估，1998 年 10 月未來環境創造型基礎研究推進群，舉辦「POPs、EDCs 及 Bioassays 研討會」(內海, 1998a)。此外為求整體性，除環境荷爾蒙效應外，亦以生物分析法進行細胞毒性、免疫毒性、生態毒性及遺傳毒性等項目，作化學物質內分泌擾亂效應之全面評估與整合，並於 2000 年 12 月之「化學物質對生物及環境負荷之評估與管理-以生物分析法管理化學物質之新挑戰-研討會」中發表，完整的成果與技術經驗，提供為日本環境廳在環境管理及立法上之依據 (內海, 2000)。2001 年 3 月由日本國立環境研究所規劃完成環境荷爾蒙研究大樓及設施，用於整合、推廣環境荷爾蒙相關議題之研究工作。值得注意的是環境省自 2000 年開始分別進行一些優先物種的風險評估，物種如下：

◎2000年12種化學物質：

Tributyltin、Octylphenol、Nonylphenol、Di-n-butylphthalate、  
Octachlorostyrene、Benzophenone、Di-cyclohexylphthalate、  
Di-2-ethylphthalate、Diethylphthalate、Butylbenzylphthalate、  
Di-2-ethylhexyladipate、Triphenyltin。

◎2001年8種化學物質：

Pentachlorophenol、Amitrole、Bisphenol A、2,4-Dichlorophenol、  
4-Nitrotoluene、Dipentylphthalate、Diethylphthalate、  
Dipropylphthalate。

◎2002年8種化學物質：

Hexachlorobenzene、Hexachlorocyclohexane、Chlordane、  
Oxychlordane、Trans-nonachlor、DDT、DDE、DDD。

◎2003年8種化學物質：

Aldrin、Endrin、Dieldrin、Heptachlor、Mirex、Kelthane  
(Dicofol)、Malathion、Permethrin。

其中日本環境省在上述化學物質的風險評估上，雌激素與雄激素體外生物檢測亦列為工作要項。

### 1.3.3、韓國

韓國在 1999 起建立 EDs 的中、長期研究計畫包括：篩選測試方法、暴露效應、風險評估管理並進行環境介質(土壤、空氣、水體)的 EDs(農藥、塑化劑、Dioxins、PAH 等一百多種)的污染程度。

### 1.3.4、歐洲與歐聯組織

最新發表之年度報告為：歐洲有關環境荷爾蒙(內分泌干擾物質)2001年研習會報告(Europea Workshop on Endocrine Disrupters 18-20 Jun 2001, Aronsborg, Sweden Workshop Report)，主要範疇分成四部份，分別為國際合作與資訊交流、研究與發展(R&D)、試驗方法與策略之發展及預警系統之建立。

歐聯組織對持久性有機物（POPs）提出 PBT 評估準則，P：持久性，指長效性、遠程性；B：生物累積性，可能影響重要生物功能；T：毒性包括已確認或尚未清楚之生物效應（eg. EDs）。依 PBT 參數決定 EDs 優先關切評估清單，如圖 1.2 所示。

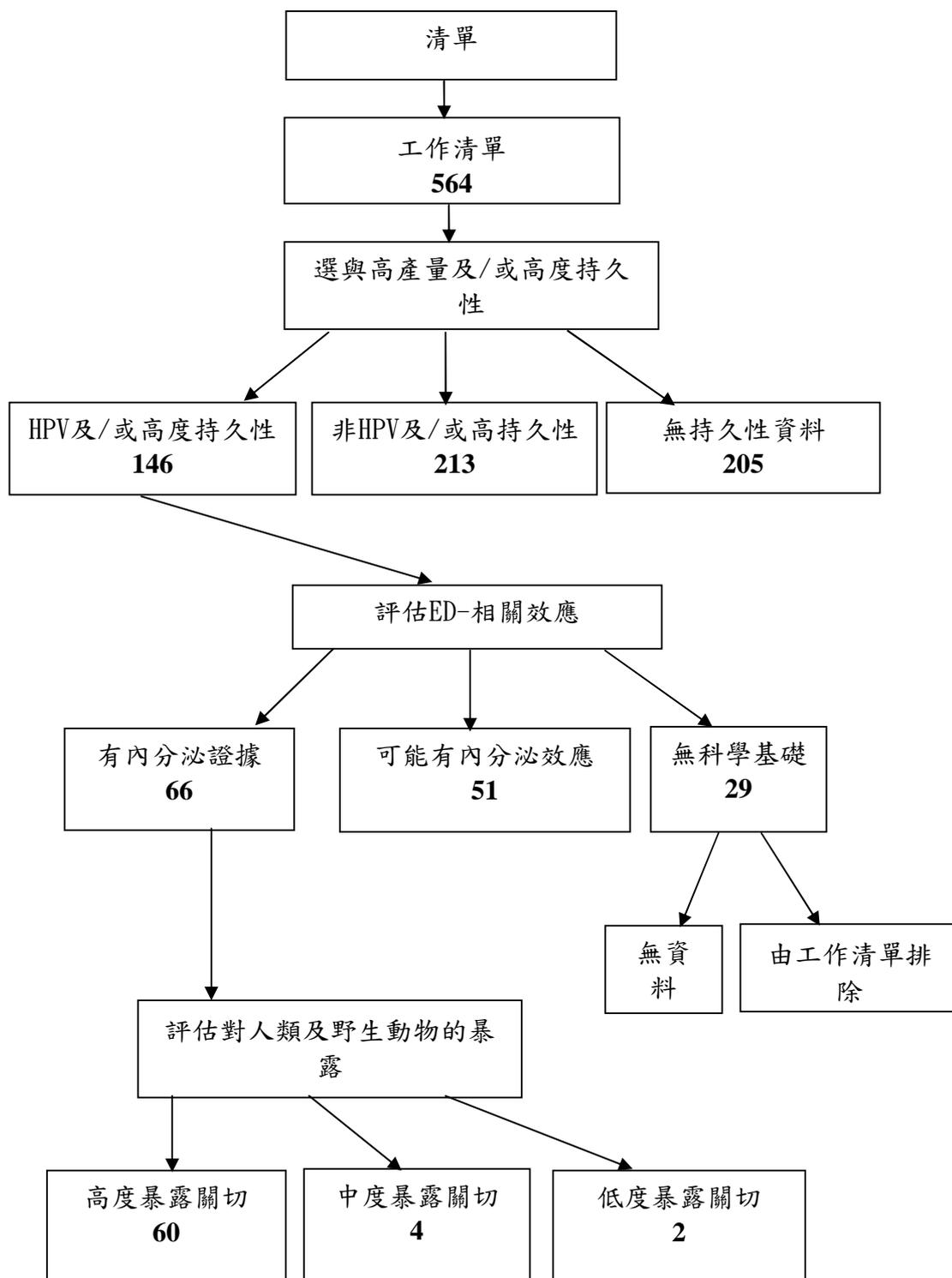


圖1.2 歐聯委員會計畫階段及結果示意圖 (EU, 2001)

EHS News是有關OECD共同會議溝通管道的時事通訊，約每隔8個月出刊一次。其目的在於提供有關EHS計畫活動與主要事件的最新資訊，內容涵蓋十一項議題，包括試驗準則、內分泌干擾素、化學物質分類與標記系統之一致化、風險評估、新的化學物質、既存的化學物質、風險管理、污染物釋放與傳輸之註冊(PRTRS)、農藥、化學災害、生物科技及新問世食品與飼料之安全等。

### 1.3.5 國內

對於國內關於環境荷爾蒙之相關重要會議及工作如下：

- 1999/9 : 環保署成立「環境荷爾蒙研究工作小組」。
- 2000/1 : 環境荷爾蒙研討會。
- 2000/3 : 第一屆環境荷爾蒙與持久性有污染物研討會
- 2000/1 : 八十九年中日環境荷爾蒙研會
- 2000/12 : 微生物與環境荷爾蒙研討會
- 2001/9 起: 環境保護分生策略前瞻論壇
- 2002/12/6: 第二屆環境荷爾蒙與持久性有污染物研討會
- 2004/11/12: 第三屆環境荷爾蒙與持久性有污染物研討會

我國對於 PTS、POPs、環境荷爾蒙之因應對策，行政院環境保護署這兩三年來亦積極投入此議題，經多方諮詢與資料彙整，現階段已公告列管 252 種毒性化學物質中有 21 種具有疑似環境荷爾蒙，並督促業者依「毒性化學物質管理法」妥善運作，其中 DDT、多氯聯苯(Polychlorinated biphenyls)、六氯苯(Hexachlorobenzene)、五氯酚(Pentachlorophenol)、蟲必死(Hexachlorocyclohexane)、可氯丹(Chlordane)、阿特靈(Aldrin)、安特靈(Endrin)、地特靈(Dieldrin)、飛佈達(Heptachlor)、護谷(Nitrofen)、毒殺芬(Toxaphene)、二溴氯丙烷(1,2-Dibromo-3-chloropropane)等十四種，已禁止製造、輸入、販賣及使用；金屬鎘(Cadmium)、汞(Mercury)、氧化三丁錫(Tributyltin oxide)、氫氧化三苯錫(Triphenyltin hydroxide)等四種物質則需申請許可證或登記備查通過後，始得運作；鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di-(2-ethylhexyl)phthalate]、2,4-二氯酚(2,4-Dichlorophenol)、鄰苯二甲酸二丁酯(Di-n-butyl phthalate)等三種物

質則須定期申報運作紀錄及釋放量紀錄。至於其他化學物質，環保署正密切注意中，如能確定其相關危害性，即將「篩選毒性化學物質作業原則」予以列入「候選名單」，依法篩選、列管，足見公部門對環境荷爾蒙議題之重視（陳，2001；陳，2002）。

#### 1.4 環境荷爾蒙生物檢測法

在 1998 年 8 月美國 EDSTAC 公佈之 EDSTAC Final Report (US EPA, 1998)中則將 In-vitro test 列為環境荷爾蒙檢測之第一級篩選要項，隨後美國環保署（U.S.EPA）及經濟合作開發組織（OECD）亦一併採用之，環境荷爾蒙化合物第一級篩選評估試驗檢測工作包括三項活體外及五項活體內試驗之生物檢測法：（圖 1.3）

內分泌干擾篩選及試驗諮詢委員會 (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC))

EDSTAC 促使環保署注意,

- 1) 建立一觀念架構以規劃工作進度,
- 2) 依現有資訊及高效率篩檢法建立一優先政策
- 3) 十一項活體內及活體外篩選方式
- 4) 四種多世代活體研究的試驗方式
- 5) 公告成果於 EDSTAC 推薦委員會

高效預篩分析(HTPS assay)

雌、雄激素、甲狀腺素接受者結合力和轉錄作用活性

第一級篩選

活體外

1. 雌激素受體 (ER) 結合力和轉錄作用活性分析;
2. 雄激素受體 (AR) 結合力和轉錄作用活性分析;
3. 睪丸剝碎培養之類固醇生成分析

活體內試驗

1. 鼠類實驗動物之 3 日子宮激性分析試驗
2. 性成熟雌性鼠類實驗動物之 20 日甲狀腺分析試驗;
3. 鼠類實驗動物之 5-7 日 Hershberger 分析試驗(雄激素測試)
4. 青蛙變形分析試驗
5. 魚類腺再現分析試驗

第二級評估試驗

活體內試驗

1. 二代哺乳類實驗動物生殖毒性試驗
2. 家禽生殖毒性
3. 魚生活史 (鱒魚)
4. Mysid 生活史
5. 兩棲類發育與生殖試驗.

圖1.3 美國EPA內分泌干擾物試驗項目與流程 (USEPA, 1998)

### 第一級篩選試驗

#### A. 活體外試驗 (In-vitro Assay) : 與生物荷爾蒙平衡相關

- ① 雌激素受體結合情況及轉錄活化分析 (Estrogen receptor (ER) binding/transcriptional activation assay)
- ② 雄激素受體結合情況及轉錄活化分析 (Androgen receptor (AR) binding/transcriptional activation assay)
- ③ 睪丸剝碎培養之類固醇生成分析 (Steroidgenesis assay with minced testis)

可見 ER 及 AR 被列為第一階段的優先試驗分析工作

#### B. 活體內試驗 (In-vivo Assay) :

- ① 鼠類實驗動物之 3 日子宮激性分析試驗 (Rodent 3-day uterotrophic assay, subcutaneous)
- ② 性成熟雌性鼠類實驗動物之 20 日甲狀腺分析試驗 (Rodent 20-day pubertal female assay with thyroid)
- ③ 鼠類實驗動物之 5-7 日 Hershberger 分析試驗 (Rodent 5-7-day Hershberger assay)
- ④ 青蛙變形分析試驗 (Frog metamorphosis assay)
- ⑤ 魚類腺再現分析試驗 (Fish gonadal recrudescence assay)

#### C. 其他可能替代性試驗

##### a. 活體外試驗 (In-vitro Assay) :

胎盤芳香化酵素分析試驗 (Placental aromatase assay)

##### b. 活體內試驗 (In-vivo Assay) :

- ① 修正之鼠類實驗動物 3 日子宮激素分析 (Modified rodent 3-day-uterotrophic assay, intraperitoneal)
- ② 成熟雄性鼠類 14 日處理甲狀腺分析試驗 (Rodent 14-day intact adult male assay with thyroid)
- ③ 鼠類實驗動物 20 日之雄性甲狀腺及性成熟分析試驗 (Rodent 20-day thyroid/pubertal male assay)

倘若第一階段測試無結果者，無須進一步執行第二階段測試，而第二階段毒性測試，包括哺乳動物之生殖毒性及其他野生生物多代試驗，較耗時需長期觀測。

## 第二級評估試驗

哺乳類動物試驗：

- A. 二代哺乳類實驗動物生殖毒性試驗 (Two-generation mammalian reproductive toxicity study)
  - a. 簡單型測試
    - ① 替代性哺乳類生殖毒物試驗 (Alternative mammalian reproductive test)
    - ② 一代毒性測試 (One-generation test)
  - b. 其他生物多代試驗
    - ① 家禽生殖毒性 (鵪鶉與野鴨) (Avian reproductive with bobwhite quail and mallard)
    - ② 魚生活史 (鱒魚) (Fish life cycle, fathead minnow)
    - ③ 魚生活史 (鱒魚) Mysid 生活史 (Americamysis) (Mysid life cycle, Americamysis)
    - ④ 魚生活史 (鱒魚) Mysid 生活史兩棲類發育與生殖試驗 (Xenopus 蛙) (Amphibian development and reproduction, Xenopus)

#### 1.4.1 活體外生物檢測法

基於化學物質種類繁多，如開始以活體內檢測其毒性與進行風險評估，須有龐大之預算，且將花費更多時間與犧牲龐大之實驗動物。體外生物檢測法有以下之優點：1. 高靈敏度。2. 高專一性。3. 較經濟。4. 省時。5. 所需檢體少。6. 可自動化。7. 可同時分析多種檢體。8. 結果可與QSAR模式結合，以建立資料庫。9. 可適用於複雜之環境檢體如污水、空氣及農藥殘留之檢測與監測。10. 提供體內試驗劑量設計上之依據，可降低實驗動物使用量。( Behnisch et al., 2001 ; Utsumi et al., 1999 ; ICCVAM and NICEATM, 2003a,b)。

1993年數據顯示，美國從1970年至當年美國已耗十億美金於PCDD/PCDFs之樣品檢測上。約十年前，高解析氣相層析質譜法(HRGC/HRMS)已變成PCDD/PCDFs之樣品檢測之主流。同時、隨著近年來生物技術的蓬勃發展，生物檢測法(Biological detection methods, BDM)已成功地被應用於類戴奧辛的檢測上，現階段約十種以上的類戴奧辛生物檢測法，如EROD assay、PROD assay、MROD assay、AHH bioassay、Reporter gene assays (CALUX or P450HRGS)、CAFLUX、EIA、RIA、FIA、Ah-immunoassays (Ah-IA)、AhR binding assay (GRAB assay)、Recombinant yeast bioassay、cell proliferation assay (Keratinocytes) 等，以上方法且具有相當高之敏感度，不只可定量類戴奧辛，更可反映其毒性意義與機轉，其中Reporter gene assays 與Immunoassays 已被美國EPA各被列為官方方法 EPA Method 4425 及 EPA Method 4025 (Behnisch et al., 2001)。此外、美國EPA更提出進行時環境風險評估，需以生物分析法檢測其環境檢體之毒性 (Toxicity Identification Evaluation, TIE)、再進行減毒評估 (Toxicity Reduction Evaluation、TRE) 以確保其安全性，故利用生物檢測技術檢測毒性化學物質及受污染環境介質之潛在生物毒性在儼然已成為國外環境管理上之趨勢 (Behnisch et al., 2001 ; Utsumi et al., 1999 ; Dewhurst et al., 2002)。

#### 1.4.2 環境荷爾蒙活體外生物檢測技術

##### ※雌（雄）激素體外生物檢測法

在雌（雄）激素活性分析項目上一般可歸類三類檢測方法，以下作簡單介紹：

◎ 第一類為受體結合分析（Receptor binding assay）：

利用以受體（來自組織或重組蛋白質）與非放射性物質及放射性荷爾蒙間的競爭為基礎來分析化學物質之受體結合能力。然這類方法無法區別化學物質的作用與結抗作用。目前ICCVAM建議在環境荷爾蒙體外生物檢測上不優先採用以動物組織為受體來源，並且不使用放射線物質（NTP NICEATM, 2004）。

◎ 第二類為細胞增生分析（Cell proliferation assay）：

利用雌（雄）激素陽性細胞株（雌激素陽性細胞株如MCF-7或T47D；雄激素陽性細胞株如LNCaP或DU-145）當有雌（雄）激素或類雌（雄）激素化學物質存在下，會與雌（雄）激素接受體結合產生雌（雄）激素受體調控之細胞增生，以測其雌（雄）激素活性。人類乳癌細胞株 MCF-7 增生分析法又稱 E-Screen（Soto et al., 1995），是EDSTAC 可接受之檢測方法。目前雌（雄）激素所造成之細胞增生真正機轉仍不明瞭。此外、增生效應亦可能因其他因子如生長因子之存在下而受到干擾，可能造成偽陽性，故其專一性較受質疑(Zacgharewski, 1997)，儘管如此，目前以此法所發表之文章為最多。因此ICCVAM不考慮進行後續之確效工作以利未來之環境荷爾蒙檢測。

◎ 第三類為報導基因分析（Reporter gene assay）：

此類方法是利用細胞株或酵母菌作基因轉染（Gene transfection），受測化學物質與受體結合後會誘發下游之報導基因表現產生酵素如Luciferase（Luc）、Chloramphenicol Acetyltransferase（CAT）、 $\beta$ -galactosidase（ $\beta$ -Gal），藉定量酵素反映其受體結合活性，前兩者常用於細胞株，後者常用於酵母菌。

在報導基因分析所用的細胞株有人類細胞株如乳癌細胞MCF-7、T47D、MDA-MB-231、ZR-75；卵巢癌細胞BG-1、CHO-K1；子宮頸癌細胞Hela；肝癌細胞HepG2；子宮內膜癌細胞HEC-1；前列腺癌細胞PC-3等及動物細胞株如猴腎細胞CV1、猴腎細胞COS-1、中國倉鼠卵巢細胞 CHO、鼠類子宮平滑肌瘤細胞ELT-3等。在基因轉染上又分短暫與穩定轉染兩種，前者於分析時需再次作基因轉染，後者不用，然前者因新轉染一般認為有較佳的敏感度。有些細胞株有一些代謝能力如HepG2，較無法直接反映受測物質為原態或代謝物之活性，在判定作用與結抗作用上要考慮此點。另有些細胞株如HepG2、Hela、CHO因有GR（Glucocorticoid receptor），故會表現較高的GR活性，會影響AR活性判定，ICCVAM較不建議使用此類細胞株。

另酵母菌雌（雄）激素報導基因分析（YES & YAS）因酵母菌屬真菌類其代謝情況與人類不同，且具細胞壁較無法反映化學物質穿透人類細胞膜之情形，因此這方法EDSTAC不建議使用，而ICCVAM也不考慮進行後續之確效工作以利未來之環境荷爾蒙檢測。

以下介紹本計畫所採用的雌激素報導基因分析方法：人類乳癌細胞株 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法（MVLN estrogen specific transcription assay；Pons et al., 1990）。

MVLN細胞株是在人類乳癌細胞株MCF-7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1.4所示。此方法是EDSTAC 建議使用之方法。

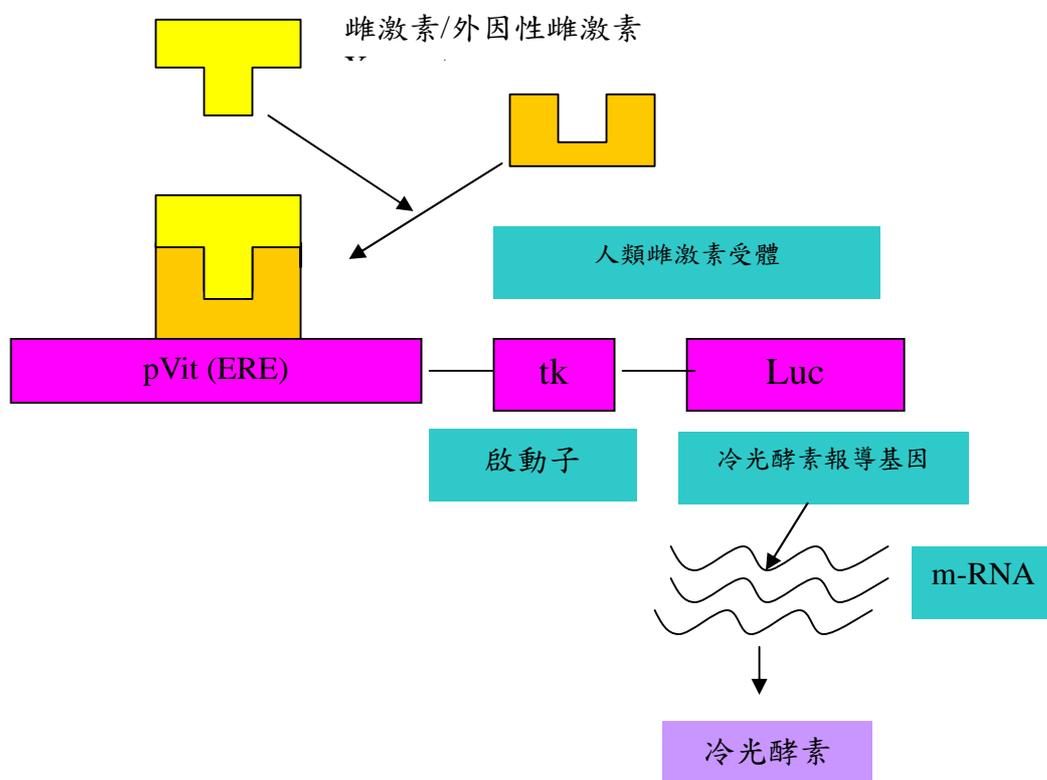


圖1.4 MVLN雌激素受體結合專一性轉錄分析的分析機轉

### 1.4.3 環境荷爾蒙活體外生物檢測技術在環境管理上之適用性

#### 1. 環境介質之安全性評估

國內在水質與空污檢測上以化學性為主，環境檢體內含物有時相當複雜，利用化學方法有時無法檢出所有內含物，更無法得知其多種化學物質間與受體的交互作用，若借助生物檢測技術則能提供此方面之資訊，將直接反映介質如水、空氣之安全性，建立先期預警系統 (Early warning system) (Behnisch et al., 2001; Oh et al., 2000; Körner et al., 1999, 2000)。

2. 作為早期之預篩檢方法

基於化學物質種類繁多，如開始以活體內檢測其毒性與進行風險評估，政府將編列龐大之預算，且將花費更多時間與犧牲龐大之實驗動物。面對繁多之化學物質與環境檢體，利用生物分析法進行大量預篩選（highthroughput pre-screening assays，HTPS assay）將可提升效率及節省成本。美國EPA擬定於2003年完成環境荷爾蒙生物檢測法確效後，即進行化學物質與飲用水篩檢。

3. 提供化學物質風險評估之基本數據：

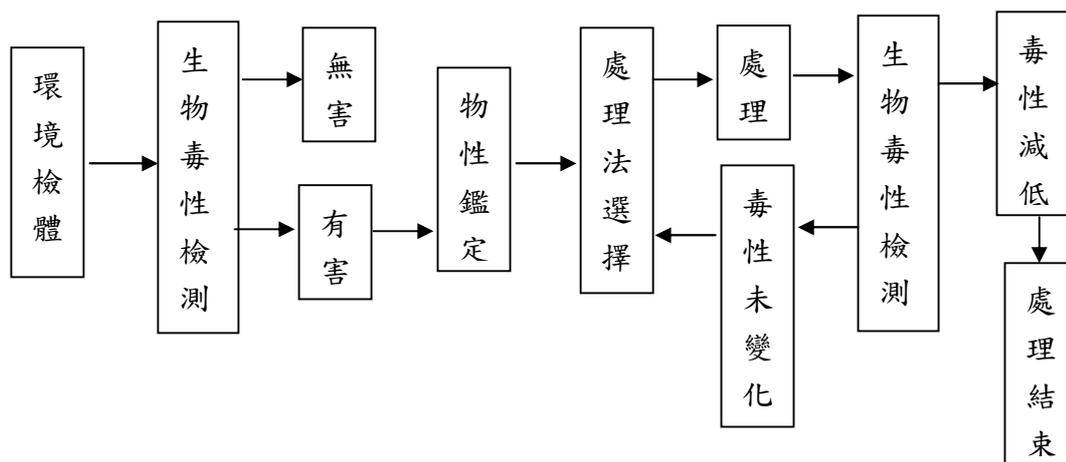
化學物質與環境檢體對於生物體之危害取決於暴露與毒性（ $Risk = Exposure \times Toxicity$ ），依美國國家科學院之定義，化學物質之風險評估包括四項工作：危害鑑定（Hazard identification）、暴露評估（Exposure assessment）、毒性劑量效應評估（Dose-response assessment）及風險特性（Risk characterization）（Younes, 1999）。除暴露評估常以化學分析法來檢測外，生物檢測法在危害鑑定、毒性劑量效應評估與危險評估上，提供化學物質風險評估之基本數據，能有效的反映出化學物質之風險與在環境中流布的安全性。

4. 提供QSAR運算之數據

面對繁多之化學物質，可利用生物檢測數據，配合化學分子組態軟體，進行預測具雌激素受體結合之化學物質。2001年日本舉辦之第四屆國際環境荷爾蒙研討會，有學者嘗試以Nishihara（2000）等以Yeast Two-hybrid 生物檢測法所篩檢517種化學物質數據為基礎，建立QSAR 模式。最近，日本經濟省、勞動衛生福利省等，已建立hER $\alpha$ -Reporter Gene Assay 並應用其數據，配合NMR建構之人類雌激素受體hER $\alpha$ 之結合部位組態，以3-D QSAR Docking 模式，預測具雌激素效應之化學物質。此法可大量預測具雌激素效應之化學物質，提升篩檢效率及節省成本。

## 5. 污水處理廠之處理效率評估

生物檢測法可有效地應用於污水處理廠各處理單元之環境荷爾蒙效應之去除效率，可確保污水處理後排放水體之安全性（Chen et al., 2004）。其概念圖如下圖所示：



### 1.5 塑化劑與鄰苯二甲酸酯類（Phthalate Esters）

塑膠起源 1868 年，之後為人們帶來方便與生活品質的提昇，與民生生活緊密結合，已成為現代人不可或缺的日常必需品。塑膠是種高分子聚合物，其基質包括聚氯乙烯（PVC）、聚乙烯（PE）、聚苯乙烯（PS）、聚丙烯（PP）等。塑膠中會添加不同種類與比例之塑化劑以因應性質及使用需要，主要增加塑膠的柔韌性、潤滑性、與可塑性。可塑劑所具備的特性有：1. 與聚合物相容性良好。2. 耐熱性優異。3. 無揮發性。4. 不滲出。5. 耐候性良好。6. 不移行。7. 耐寒性良好。8. 耐油性優異。9. 電絕緣性佳（林與陳，2003）。在 2001 年全球塑膠添家劑市場量約為 176 億公噸，其中塑化劑佔最大宗約為 100 億公噸，而整體市場值約為 146 億美元。2002 年整體市場量成長 5 % 為 105 億公噸，市場值成長 10 % 約為 160.6 億美元。至 2003 年整體市場能在成長 5%，市場值則能成長 10 %（林與陳，2002, 2003）。表 1.2 為 2002 年全球主要地區塑化劑需求情形，表中清楚顯示在塑化劑中以鄰苯二甲酸酯類為大宗。近年來由於

戴奧辛與環境荷爾蒙問題使得 PVC 使用量有減少趨勢，但因 PVC 有關產品禁用的決議尚未定論，使得鄰苯二甲酸酯類塑化劑之使用量並沒有減少趨勢。

基於塑膠中塑化劑與塑膠基質非以共價鍵結緊密結合，之故塑膠中塑化劑會因外在因素如溫度而釋出，進而造成生物體之暴露，如這塑化劑有潛在生物毒性將可能造成健康危害，尤其最近部分鄰苯二甲酸酯類被歸為疑似環境荷爾蒙，之故亦成為國內外關注的化學物種之一。

常見塑化劑有三類如鄰苯二甲酸酯類 (Phthalate esters)、己二酸酯類 (Adipate esters) 與 Trimellitates。此三種塑化劑之特性如表 1.3 所示。基於鄰苯二甲酸酯類則佔全球塑化劑產量達約 85 % 為大宗 (Amato et al., 2001)，因此以下對塑化劑之介紹將聚焦在鄰苯二甲酸酯類。

表 1.2 為 2002 年全球主要地區塑化劑需求情形 (林與陳, 2003)

單位：千公噸

國別	美國	西歐	日本
塑化劑種類			
Phthalates	700.2	1,049.0	424.3
Adipates		-	30.3
Aliphatics	94.5	33.6	-
Epoxy	55.8	-	19.8
Trimellitates	43.2	17.6	14.4
Benzoates	43.9	-	-
Phoaphoates	28.6	24.4	15.4
Polymeric	27.0	19.6	12.8
Others	26.3	18.5	1.7
Total	1,019.5		518.7

表 1.3 常見塑化劑之特性 (林與陳, 2003)

塑化劑	特性	主要產品	分子量	主要特性					保留性	
				相容性	塑性效	低溫彈	絕緣性	無揮發	無萃取	無可轉
				果	性	性	性	性	動性	
Phthalates	DOP	391	◎	○	○	○	△	×	×	
Adipates	DOA	370	△	◎	◎	×	×	×	×	
Trimellitates	TOTM	546	◎~○	△	△	◎	◎	×	○或×	

註：◎：優、○：佳、△：可、×：裂、DOP (Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, Dioctyl Phthalate (DOP))、DOA (Di(2-ethylhexyl)adipate)、TOTM (Tri(2-ethylhexyl) Trimellitate)

### 1.5.1 鄰苯二甲酸酯類 ( Phthalate information center ; phthalates website ;Amato et al., 2001 )

最早塑化劑的沿用可追碩至 1860 年以蓖麻油 (Castor oil) 添加於 Cellulose Nitrate (CN) 中，開啓塑化劑使用紀元，之後有其他塑化劑的開發，然鄰苯二甲酸酯類則是自 1930 年代末期起開始被引入塑膠工業作塑化劑，乃因當時相信鄰苯二甲酸酯類毒性較小。鄰苯二甲酸酯類具高沸點、低蒸氣壓與低水溶解度等特性之似澄清植物油化學物質，是世界上最常用的塑化劑，但該產品具有揮發性、能萃取性即可轉移性等缺點。在歐洲所生產之鄰苯二甲酸酯類中有超過 90% 是用於添加在聚氯乙烯 (PVC) 製程中以製備具有柔韌性的 PVC 塑膠產品，包括食品包裝材料、汽車用品、建築材料、化妝品、醫療塑膠用品如點滴用塑膠管與血袋等、鞋品、電纜、文具用品、玩具、家具設備、PVC 地板等。此外、鄰苯二甲酸酯類亦被使用於其他非 PVC 產品如油墨、橡膠製品及其他膠粘劑等。

鄰苯二甲酸酯類是以鄰苯二甲酸爲主架構之酯類，其酯類碳數由 C1 ~ C17，然在 PVC 常用之鄰苯二甲酸酯類碳數由 C4 ~ C13，碳數低的可用於纖維素膜，而碳數高得可用於汽車工業的合成潤滑劑。鄰苯二甲酸酯類至少有十種以上如 Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, Di-Octyl Phthalate (DOP))、Di-Isononyl Phthalate (DINP)、Dinonyl Phthalate (DNP)、Di-Isodecyl Phthalate (DIDP)、Di-n-butyl phthalate (DBP)、Dimethylphthalate (DMP)、Butyl Benzyl phthalate (BBP)、Dicyclohexyl phthalate (DCHP)、Diethyl phthalate (DEP)、Dipentyl phthalate (DPP)、Dihexyl phthalate (DHxP)、Dipropyl phthalate (DPrP)、Di-n-octyl phthalate (DnOP)、Di-isooctyl Phthalate (DIOP)、Di-Isoheptyl Phthalate (DIHP)、Di-isobutyl phthalate (DIBP)、Diisotridecyl phthalate (DTDP)、Diheptyl phthalate (DHP) 等。

日本環境廳於 1998 年所公佈 65 種疑似環境荷爾蒙中有八種鄰苯二甲酸酯類如 Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP ; DOP)、Butyl Benzyl phthalate (BBP)、Di-n-butyl phthalate (DBP)、Dicyclohexyl phthalate (DCHP)、Diethyl phthalate (DEP)、Dipentyl phthalate (DPP)、Dihexyl

phthalate (DHxP)、Dipropyl phthalate (DPrP)。並於 2000 年開始選擇 12 種化學物質於進行風險評估，其中涵蓋上述八種鄰苯二甲酸酯類。美國伊利諾州環保署所列內分泌干擾物質清單中有五種鄰苯二甲酸酯類 Dicyclohexyl phthalate (DCHP)、Di-n-butyl phthalate (DBP)、Diethyl phthalate (DHxP)、Dipentyl phthalate (DPP)、Dipropyl phthalate (DPrP)。而在國內現階段已公告列管 252 種毒性化學物質中有 21 種具有疑似環境荷爾蒙，其中 Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP；DOP) 與 Di-n-butyl phthalate (DBP) 二種物質則須定期申報運作紀錄及釋放量紀錄（陳，2001；陳，2002；Taiwan EPA）。依據張等,2004 資料日本有列管 8 種鄰苯二甲酸酯類 DEP、BBP、DBP、DPrP、DEHP、DCHP、DPhP、DHP；在美國有列管 6 種鄰苯二甲酸酯類 DMP、DEP、DPrP、DBP、DEHP、DnOP；在歐盟有列管 6 種鄰苯二甲酸酯類 BBP、DPrP、DnOP、DBP、DEHP、DIDP。然依據日本製品評價技術基盤機構(National Institute of Technology and Evaluation, NITE)化學物質管理中心的日本化學物質法規與管制資訊，日本有管制的塑化劑有 DEP、BBP、DBP、DEHP、DHP、DnOP、DIBP、DMP、DEHA。另依據 Scorecard 的化學物質法規管制資料，美國有管制的塑化劑有 DMP、DEP、BBP、DBP、DEHP、DnOP、DEHA。

## 1.5.2 鄰苯二甲酸酯類的市場動向

### 1.5.2.1 國內情況（林與陳，2002,2003）

我國可塑劑產量情況依 2002 特用化學品工業年鑑生產廠商與產能如表 1.4 所示，國內大部分可塑劑用於 PVC 製品，其餘用於壓克力、合成橡膠的增韌劑上，一般 PVC 製品約有四成爲塑化劑，其中以 Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, Dioctyl Phthalate (DOP)) 爲主要產品。目前國內可塑劑年產能約 70 餘萬噸，其中 DEHP 佔可塑劑 75-80%，爲國內主要可塑劑物種。依 2002 年資料國內 DEHP 主要生產商爲南亞、聯成、大穎、油源四家，除 DEHP 外，尙有其他次要鄰苯二甲酸酯類物種如 Di-Isononyl Phthalate (DINP)、Dinonyl Phthalate (DNP)、Di-Isodecyl Phthalate (DIDP)、Di-n-butyl phthalate (DBP) 等。目前油

源公司因經營與投資不善，以致油源公司停產塑化劑，依 2003 特用化學品工業年鑑生產廠商與產能如表 1.5 所示。

**表 1.4 我國主要塑化劑生產廠商與產能表（林與陳，2002）**

我國主要塑化劑生產廠商與產能		
生產廠商	產能(公噸/年)	說明
南亞	25 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DINP、DNP、DIDP、DBP、DOA、DINA、TOTM
聯成	13.5 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DINP、DNP、DIDP、DBP、DOA、DINA、TOTM * 大陸塑化劑年產能：15.8 萬公噸
大穎	12 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DOA、線形塑化劑
油源	14.5 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)

※Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, Dioctyl Phthalate (DOP))：國內年產能約 70 餘萬噸，佔可塑劑 75-80%，為國內主要可塑劑物種。

※其他 phthalate 為國內次要物種，如：

DINP (Di-Isononyl Phthalate)：比 DOP 有較低的可塑化效率、移行性、水萃取率、稍高之膠化溫度和電器阻抗及無毒等特性，適用於食品包裝、玩具及吹氣塑膠製品。

DHxP (Dihexyl Phthalate)：用於壁紙及鞋類。

DNP (Dinonyl Phthalate)

DIDP (Di-Isodecyl Phthalate)：因揮發性低，常用於絕緣電線電纜及汽機車合成皮產品。

DBP (Di-n-Butyl Phthalate)：用於纖維酯類及漆類。

DEHA (Di(2-ethylhexyl)adipate, DOA)

DINA (Diisononyl Adipate)

TOTM (Tri(2-ethylhexyl) Trimellitate)

表 1.5 我國主要塑化劑生產廠商與產能表(林與陳，2003)

我國主要塑化劑生產廠商與產能		
生產廠商	產能 (公噸/年)	說明
南亞	17.52 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DINP、DNP、DIDP、DBP、DOA、DINA、TOTM
聯成	14 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DINP、DNP、DIDP、DBP、DOA、DINA、TOTM * 大陸塑化劑年產能：20 萬公噸
大穎	12.2 萬	* 主力產品：DEHP (DOP)、DOA、線形塑化劑

#### 1.5.2.1 國外情況 (Amato et al., 2001 ; Phthalate information center; Phthalate website )

在 1999 年全球塑化劑產量達約一千億磅，值五千億美金，每年以 2-3 % 比例成長。全球塑化劑中鄰苯二甲酸酯類則佔 85%，且超過 90% 是用於添加在聚氯乙烯 (PVC) 製程中以製備具有柔韌性的 PVC 塑膠產品，在美國 PVC 板料使用市場用於醫療用品有 46%、食品用品 27%、其他佔 27%。在美國 PVC 膜使用市場用於醫療用品有 30%、食品用品 31%、其他佔 39%。以上清楚發現 PVC 塑膠主要用於醫療與食品用品。另在大陸目前塑化劑年總產能已超過 75 公噸，主要塑化劑鄰苯二甲酸酯類，其中以 DEHP 與 DBP 居多，在 2003 年中國大陸需求量將達 85 萬噸左右，2010 年估計達 140 萬噸。鄰苯二甲酸酯類以 DEHP 與 DINP 為最常作 PVC 之塑化劑，在西歐 DEHP 的使用比率佔所有塑化劑之 30%，且大部分用於 PVC 製品。電纜常用的鄰苯二甲酸酯類有 DEHP、DINP、DPhP、DIDP。US Cosmetic Ingredients review (CIR) 於 2000 年公佈化妝品常用的為 DEP、DMP、DBP。PVC 地板常用的鄰苯二甲酸酯類有 DEHP、DINP、BBP。

### 1.5.3 鄰苯二甲酸酯類的可能暴露

塑化劑於生產過程、販賣、掩埋、焚化、消費產品於使用中均可能釋放至環境中，進而造成生物體之暴露。以下概述暴露途徑：

#### 1.5.3.1 經口途徑

塑膠用於食品包裝之佔有率約有 20%，估計至 2005 年將達 42 % (塑膠產業概況, 2001)，基於塑膠中塑化劑與塑膠基質非以共價鍵結緊密結合，之故塑膠中塑化劑會因外在因素如溫度而釋出，藉由口途徑進入人體。在食品使用上，1996 年英國農漁食品署 (MAFF) 曾對 15 種嬰兒配方奶粉品牌中檢測鄰苯二甲酸酯類的含量，發現最高鄰苯二甲酸酯類濃度達 10.2 mg/kg，其中 BBP 最高有 0.25 mg/kg (MAFF, 1996a)。MAFF 在其他包裝食品如巧克力條與起司亦發現鄰苯二甲酸酯類約數十毫克/公斤，其中 DBP 最高濃度在植物脂肪食品有 8.4 mg/kg、巧克力蛋糕有 5.8mg/kg、香腸有 4.4mg/kg 等；DEHP 最高濃度在甜餅乾有 25 mg/kg、植物脂肪食品有 11mg/kg 等，預計成人每天可能攝入量約 0.8mg/person/day (MAFF, 1995,1996b)。因此食品相關塑膠產品確為鄰苯二甲酸酯類污染來源，之故在英國不再使用鄰苯二甲酸酯類作保鮮膜及其他會與食物接觸的塑膠產品 (MAFF, 1996a,b)，然以 Di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) 取代 (Dalgaard et al., 2003)。此外、嬰兒與孩童塑膠玩具中的塑化劑鄰苯二甲酸酯類如 HEHP & DINP 可能因孩童含咬行為而導致鄰苯二甲酸酯類的暴露，美國環保署調查結果顯示，每日攝入 DEHP 的量竟以未滿周歲嬰兒食入量 (17.8mg/Kg/ady) 比 20 歲成人食入量 (4.9 mg/Kg/ady) 高 (廖等, 2001)。美加地區已禁止 DEHP 用於玩具，另歐盟也禁止使用於三歲幼兒之口腔玩具 (張與袁, 2000)。

#### 1.5.3.2 經輸注途徑 (Amato et al., 2001)

PVC 醫療塑膠耗材如點滴用塑膠管與血袋等，以血袋為例塑化劑約佔總重 20-30 %，有相當之比重，當鄰苯二甲酸酯類釋出後會與血漿中的白蛋白 (albumin) 及脂蛋白 (Lipoprotein) 結合。血液儲存於血袋中 24 小時，塑化劑 DEHP 釋出量達 2.5 mg/L，因此鄰苯二甲酸酯類會

藉由輸血後運送全身，造成人體暴露。此外、鄰苯二甲酸酯類亦可能經點滴用塑膠管進入人體，造成人體暴露。

#### 1.5.3.3 經空氣途徑

家中鋪有 PVC 地板，其室內飛塵中有被檢測 DEHP 化學物質，顯示鄰苯二甲酸酯類會從 PVC 地板釋離進入空氣中，因此、鄰苯二甲酸酯類可經空氣吸入人體 (Oie et al., 1997)。MEHP 為 DEHP 代謝物，經動物試驗有肺部刺激性 (Doelman et al., 1990)。雖然有學者提出孩童氣喘發生率可能與 PVC 地板釋離的鄰苯二甲酸酯類有關，可能導致發生孩童氣管發展障礙 (Jaakkola et al., 1999)，但需更多之科學證據，儘管如此、以上顯示空氣亦是鄰苯二甲酸酯類進入生物體之途徑，降低飛塵量或避免使用 PVC 地板是可預防鄰苯二甲酸酯類的暴露。

#### 1.5.3.4 環境介質途徑

國內可塑劑生產量總計 70 餘萬噸，鄰苯二甲酸酯類為大宗，此類化學物質的製造、使用與廢棄各個階段，均可能散佈到環境中進而造成環境介質污染。

國外資料顯示塑化劑亦會從廢棄塑膠中釋出進而污染環境水質如地下水、河川與飲用水 (Jobling et al., 1995)。荷蘭學者發現 DEHP 存在飲用水達 3.5mg/L (ENDS, 1999)。日本環境廳於 1998 年開始針對 20 種化學物質進行全國 109 條主要河川環境檢測，其中 1998 年數據中鄰苯二甲酸酯類 DEHP 濃度為 ND-9.4  $\mu\text{g/L}$  (51.2 % 檢出率)、BBP 濃度為 ND-1.0  $\mu\text{g/L}$  (1.2 % 檢出率)、DBP 濃度為 ND-1.3  $\mu\text{g/L}$  (27.0 % 檢出率)，值得注意 DEHP 濃度是第二高僅次於 Nonylphenol 之化學物種 (Kobuke, et al., 2000)。依據美國環保署的環境監測資料顯示 DEHP 在水環境有 0.3  $\mu\text{g/L}$ 、底泥有 182  $\mu\text{g/kg}$  (US EPA, 2003)。

根據國內環保署於 1998 年對淡水河流四處 (關渡橋、台北橋、忠孝橋、中興橋) 進行底泥中鄰苯二甲酸酯化合物殘留檢測，發現有 DEP、BBP、DOP、DBP、DEHP 殘留，濃度大小依序 DEHP (5.61-90.9g/kg)、DBP (0.17-0.93g/kg)、DnOP (ND-1.04g/kg)、BBP (ND-0.16g/kg)、

DEP (ND-0.007g/kg) (環保署, 1998)。另依據張等 (2000) 對四條河川 (中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪) 底泥進行鄰苯二甲酸酯化合物殘留量調查發現有 DEHP、DBP、DCHP、BBP、DHP, 濃度大小依序 DBP (13.1-37.34 g/kg)、DEHP(trace-13.9 g/kg)、DCHP(ND-3.17g/kg)、BBP (ND-3.36g/kg)、DHP (ND-trace) (張, 2000)。以上顯示國內外水環境亦普遍受鄰苯二甲酸酯化合物污染, 值得注意的是國內環境鄰苯二甲酸酯化合物比國外高出許多, 其中以 DEHP 與 DBP 濃度最高, 以上鄰苯二甲酸酯化合物如經生物濃縮效應, 是否對生物造成影響, 有待進一步觀察與研究。

綜合以上鄰苯二甲酸酯類與生活相關, 無所不在, 可經口、空氣、輸注與環境介質水途徑造成生物體之暴露, 如這塑化劑有潛在生物毒性將可能造成生物體健康危害, 值得關切。

#### 1.5.4 鄰苯二甲酸酯類的生物毒性

##### 1.5.4.1 致癌性

談到鄰苯二甲酸酯類的生物毒性在初期首推被懷疑是一種致癌劑, DEHP 於 1982 年被發現在較高濃度 DEHP 對老鼠會增加肝癌的好發性, 之後、WHO 的國際癌症研究所 (IARC) 將之歸類為 Category 2B Carcinogen (可能對人類有致癌性), 被 US EPA 和許多國家因此將列為優先列管物 (Phthalates information center), 基於 DEHP 在動物實驗中發現的毒性證據, 因此在孩童用品之 PVC 產品則常以 DINP 取代。DEHP 其毒性機轉是會對老鼠會造成 Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 調控之肝過氧化體 (Peroxisome) 增生, 進而引發肝癌 (Lee et al., 1995; Peters et al., 1997)。人類肝臟系統與老鼠有很大差異, 所含 PPAR $\alpha$  不到 5% (Palmer et al., 1998), 對人類引發致癌性不大。歐盟毒性、生態與環境科學委員會 (CSTEE, 1998) 於 1998 年指出 DEHP 引發肝癌只與鼠類之 PPAR $\alpha$  調控之肝過氧化體增生有關, 然與人類少有關係。最後、WHO 所屬的國際癌症研究所 (IARC) 經回顧所有之前 DEHP 的研究資料, 於 2000 年二月總結 DEHP 不是潛在致癌物, 並歸類為非人類致癌物質 (IARC, 2000a)。

#### 1.5.4.2 環境荷爾蒙毒性

因環境荷爾蒙議題的白熱化及有八種鄰苯二甲酸酯類如 Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP ; DOP)、Butyl Benzyl phthalate (BBP)、Di-n-butyl phthalate (DBP)、Dicyclohexyl phthalate (DCHP)、Diethyl phthalate (DEP)、Dipentyl phthalate (DPP)、Dihexyl phthalate (DHP)、Dipropyl phthalate (DPrP) 被日本環境廳列入疑似環境荷爾蒙中，使鄰苯二甲酸酯類的環境荷爾蒙毒性研究受到重視。以下對鄰苯二甲酸酯類的環境荷爾蒙毒性概述如下：

##### 1.5.4.2.1 雌激素影響

Jobling 等 (1995) 的哺乳類雌激素體外試驗 (*In vitro* mammalian estrogen screen) 發現 butylbenzyl phthalate (BBP) 及 di-n-butylphthalate (DBP) 有雌激素活性。Butylbenzyl phthalate (BBP) 會造成乳癌細胞株 MCF-7 細胞增生 (E-screen) (Soto et al., 1995)。Harris 等 (1997) 的酵母菌雌激素體外試驗 (Yeast-based estrogen screen, YES) 發現 butyl benzyl phthalate (BBP)、dibutyl phthalate (DBP)、diisobutyl phthalate (DIBP)、diethyl phthalate (DEP)、diisononyl phthalate (DINP) 有雌激素活性，雌激素活性約為雌激素  $1 \times 10^{-6}$  至  $5 \times 10^{-7}$  倍，此外，亦提出 BBP、DBP 與雌激素似有協同作用。Nishihara 等 (2000) 發現 butyl benzyl phthalate (BBP)、Di-n-propyl phthalate (DPrP)、Di-isopropyl phthalate (DIPP) 有雌激素活性 (Yeast Two-hybrid Assay)。Legler 等 (2002) 發現 BBP 有雌激素活性 (ER-CALUX assay)。Hashimoto 等 (2003) 發現 Dibutyl phthalate (DBP)、butylbenzyl phthalate (BBP)、Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP ; DOP) 有雌激素活性 (E-Screen)。El-Mubarak and Huisinigh (2001) 發現 Dibutyl phthalate (DBP)、Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP ; DOP) 會增加雌小鼠的子宮重量，且 DEHP 大於 DBP。BBP 會抑制胰島素引發低血糖鼠之腦下垂體前葉分泌黃體生成激素 LH (Leuteinizing Hormone) 能力 (Kawaguchi et al., 2002)。

#### 1.5.4.2.2 雄激素影響

Butyl benzyl phthalate (BBP) 有抗雄激素活性作用會抑制 DHT (Dihydroxy testosterone) 作用 (Yeast screen) (Sohoni and Sumpter, 1998)。DEHP 有睪丸毒性，部分毒性來自導致睪丸鋅的排除，以致睪丸 Germ 細胞的死亡 (Amdur et al., 1991; Peter et al., 1997)。DEHP 對懷孕鼠會引起雄性分化失調 (Gray et al., 1999)。DBP 無雄激素受體結合活性，然會影響雄激素調控的雄性分化作用 (Mylchreest et al., 1999)。BBP 會導致雌鼠後代血清睪丸酮濃度降低及睪丸組織異常 (二代生殖研究) (Nagao et al., 2000)。DEHP、DBP 有抗雄激素作用，並且會造成雌鼠畸形；DEHP、BBP、DINP 會影響性別分化 (Gray et al., 2000)。DEHP & BBP 導致睪丸重量、精蟲產量與睪丸酮濃度降低 (Jobling et al., 1995、Gray et al., 1999、Moore et al., 2001)。Dibutyl phthalate (DBP) 會導致 Leydig cell 的睪丸酮缺乏與異常增生 (Mylchreest et al. 2002)。BBP 的抗雄性激素活性與其代謝產物 Monobenzyl phthalate (MBuP) 有關 (Ema et al., 2003)。DINP 會造成睪丸的減數分裂精蟲與 Sertoli cell 的減少 (Masutomi et al., 2003)。Di-n-amyolphthalate (DAP) 有抗雄激素活性 (Hershberger assay) (Yamasaki et al., 2004b)。

綜合以上鄰苯二甲酸酯類之生物毒性主要屬雌激素與抗雄激素活性。儘管鄰苯二甲酸酯類有一些動物毒性試驗證據，然至目前未發現有對人不良影響個案，乃因人與老鼠之代謝系統有差異，儘管如此，對人之影響有待進一步觀察。此外、鄰苯二甲酸酯類普遍存在我們環境中，是否對其他生物體具有潛在生物毒性有待更多資料與長期研究。基於鄰苯二甲酸酯類種類繁多，目前生物毒性資料仍侷限常用幾種鄰苯二甲酸酯化合物，其他鄰苯二甲酸酯化合物是否有有潛在生物毒性有待解明與資料建立。另值得注意的是，目前常用幾種鄰苯二甲酸酯化合物的雌激素生物毒性多以酵母菌為基礎之分析方法 (Yeast-based estrogen screen, YES) 或陽性人類乳癌細胞株 (MCF-7, E-screen) 為之，較少以雌激素專一性分析法如 MVLN 雌激素專一性分析法為之，如同前面雌激素生物分析法之介紹，YES 與 E-Screen 有感度 (細胞壁穿透一般較差，

有別於人類細胞，較難反映人類細胞生理情形)與專一性上的限制，以MVLN雌激素專一性分析法檢測鄰苯二甲酸酯化合物應較能滿足感度需求與更近似人類細胞毒性情形，此外、亦能對以YES 與 E-Screen 檢測之鄰苯二甲酸酯化合物結果作驗證。

國內在水質與空污檢測上以化學性為主，環境檢體內含物有時相當複雜，利用化學方法有時無法檢出所有內含物，更無法得知其多種化學物質間與受體的交互作用，若借助生物檢測技術則能提供此方面之資訊，因此、環保單位有需要建立環境荷爾蒙活體外生物檢測法，進行環境檢體監測以直接反映介質如水、空氣之安全性，建立先期預警系統。

## 第二章 本年度計畫目標與工作項目

### 2.1、本年度甄選工作之計畫目標：

- 一、收集國內外塑化劑使用種類及用量。
- 二、建立塑化劑對活體外(in vitro)生物體影響的資料庫。

### 2.2、本年度工作項目：

- 一、收集國內塑化劑使種類及用量並與國外相關資料比較。
- 二、以活體外(in vitro)生物檢測方式檢測三十種塑化劑，其中必須包括 Di-n-butyl phthalate、Butyl Benzyl phthalate、Dicyclohexyl phthalate、Di(2-ethylhexyl)phthalate、Diethyl phthalate、Dipentyl phthalate、Dihexyl phthalate、Dipropyl phthalate 等八種；國內常用 Di-Octyl Phthalate、Di-Isononyl Phthalate、Dinonyl Phthalate、Di-Isodecyl Phthalate 等。
- 三、至少做三組二物質交互作用對活體外生物影響的效應。
- 四、品保與品管需參仿美國環保署公告 method 4425 的方式。
- 五、依本所公告模式撰寫活體外生物檢測具類雌性荷爾蒙效應公告方法草案。

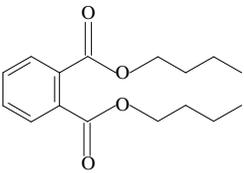
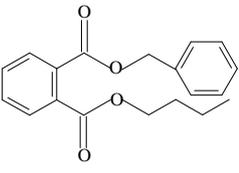
本年度計畫案配合甄選工作之計畫目標與工作內容，建立人類乳癌細胞株 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法與細胞毒性測試之標準流程 (SOP)，經標準化後進行至少三十種鄰苯二甲酸酯類塑化劑之雌激素活性檢測，與至少三組二物種間交互作用對活體外生物影響的效應評估，並收集國內外鄰苯二甲酸酯類塑化劑使用種類及用量資料，建立鄰苯二甲酸酯類之雌激素干擾效應及對人類細胞之毒性與較新之國內外塑化劑使用狀況資料庫，提供主管單位參考。

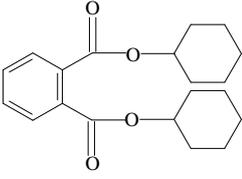
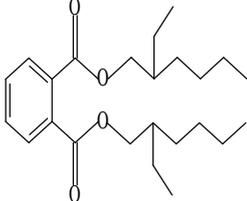
## 第三章 材料與方法

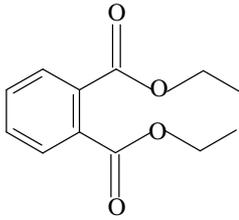
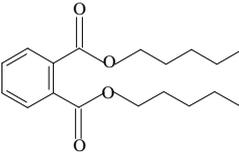
### 3.1 細胞株與試藥

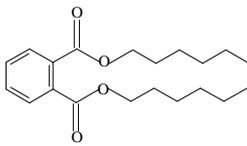
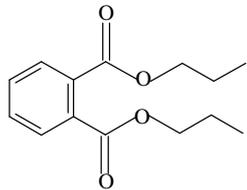
1. MVLN 細胞株：源自 Dr. M. Pons (INSERM U439, France)
2. 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum , FBS , Gibco BRL , USA)
3. DMEM 培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium , HyQ<sup>®</sup>DME/High , Hyclone , USA)
4. Trypsin-EDTA (0.5%-5.3mM , Gibco BRL , USA)
5. Dimethyl sulfoxide ( DMSO , ICN , Germany )
6. MEM sodium pyruvate solution (100mM , Gibco , USA)
7. Antibiotic-Antimycotic ( Penicillin/Streptomycin/Amphotericin , Gibco , USA )
8. HEPES ( 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid , HyQ<sup>®</sup>HEPES , 1M solution , Hyclone , USA)
9. 碳酸氫鈉 (Sodium bicarbonate , Sigma , USA )
10. Dextran ( Sigma , USA )
11. 活性炭 (Charcoal, activated , Sigma , USA )
12. 細胞溶解試劑 (Cell Culture Lysis Reagent (CCLR, 5X) , Promega , USA )
13. 冷光分析試劑 (Luciferase assay reagent , Promega , USA )
14. 冷光酵素標準品 (QuantiLum<sup>®</sup> Recombinant Luciferase Standard , Promega , USA )
15. 純水 (DDW , Mill-Q  $> 15.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ )
16. 雌激素 (17 $\beta$ -Estradiol , Sigma , USA )
17. SRB (Sulforhodamine B , Sigma , USA )
18. MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide , Sigma , USA )
19. 42 種塑化劑來源與其物化性質整理如表 3.1 所示。

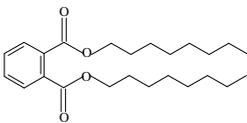
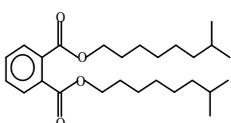
表 3.1 42 種塑化劑的來源與其物理化學性質

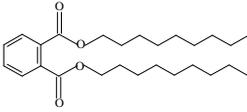
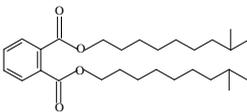
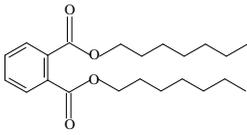
編號	名稱	化學結構	基本物化特性	廠牌	備註
1	Di-n-butyl phthalate (DBP)		<p>CAS No : 84-74-2                      分子式 : <math>C_{16}H_{22}O_4</math>                      分子量 : 278.3                      形狀 : 無色到淡黃                      油性液體，微                      酯味                      沸點 : <math>340\text{ }^{\circ}\text{C}</math>                      熔點 : <math>-35\text{ }^{\circ}\text{C}</math>                      蒸氣壓 : <math>2.7 \times 10^{-5}</math>                      mmHg (<math>25\text{ }^{\circ}\text{C}</math>)                      比重 : 1.042                      溶解度 : 11.2                      mg/L (水)，可                      溶於酒精、乙                      醚、丙酮與                      苯。                      分配係數(Log                      Kow) : 4.45</p>	TCI	
2	Butyl benzyl Phthalate (BBP)		<p>CAS No : 85-68-7                      分子式 : <math>C_{19}H_{20}O_4</math>                      分子量 : 312.4                      形狀 : 白色粉末                      沸點 : <math>370\text{ }^{\circ}\text{C}</math>                      熔點 : <math>-40.5\text{ }^{\circ}\text{C}</math>                      蒸氣壓 : <math>6 \times 10^{-7}</math>                      mmHg                      (<math>25\text{ }^{\circ}\text{C}</math>)</p>	TCI	

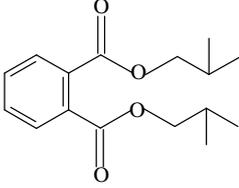
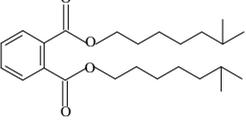
			<p>比重：1.12          溶解度：2.7 mg/L          (水)，可溶於大部分有機溶劑。          分配係數(Log Kow)：4.59</p>		
3	<p>Dicyclohexyl phthalate (DCHP)</p>		<p>CAS No：84-61-7          分子式：C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>          分子量：330.4          形狀：白色粉末          沸點：222-228 °C          熔點：66 °C          蒸氣壓：0.093 pa (115°C)          比重：1.383          溶解度：4 mg/L (24°C)，可溶於大部分有機溶劑。          分配係數(Log Kow)：6.2</p>	TCI	
4	<p>Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP，          Di-Octyl Phthalate (DOP))</p>		<p>CAS No：117-81-7          分子式：C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>          分子量：390.6          形狀：無色液體          沸點：386 °C          熔點：-47 °C          蒸氣壓：1×10<sup>-7</sup> mmHg</p>	TCI	

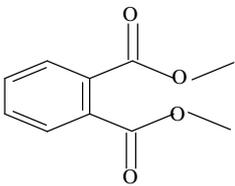
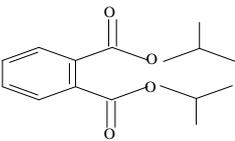
			(25°C) 比重：0.986 溶解度：3 μg/L(24°C) 分配係數(Log Kow)：7.5		
5	Diethyl phthalate (DEP)		CAS No：84-66-2 分子式：C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> 分子量：222.2 形狀：無色液體 沸點：298 °C 熔點：-40.5 °C 蒸氣壓：0.28 Pa (20°C) 比重：0.986 溶解度：1 g/L(25°C)，可 溶於大部分有 機溶劑。 分配係數(Log Kow)：2.47 (Calculated value)	TCI	
6	Dipentyl phthalate (DPP)		CAS No：131-18-0 分子式：C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> 分子量：306.4 形狀：無色液體 沸點：204-206 °C 熔點：<-55 °C 比重：1.022	TCI	

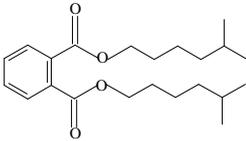
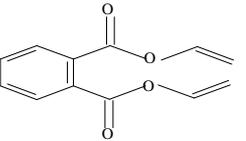
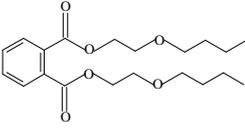
			溶解度： $0.3-2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ (20°C) 分配係數(Log Kow)：5.62		
7	Dihexyl phthalate (DHxP)		CAS No：84-75-3 分子式： $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 分子量：334.4 形狀：無色液體 沸點：350 °C 熔點：-27.4 °C 蒸氣壓： $5 \times 10^{-6}$ mmHg (25°C) 比重：1.011 溶解度：0.05 mg/L(25°C) 分配係數(Log Kow)：6.3	TCI	
8	Dipropyl phthalate (DPrP)		CAS No：113-16-8 分子式： $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 分子量：250 形狀：無色液體 沸點：317.5 °C 蒸氣壓：0.00128 pa (25°C) 比重：1.078 溶解度：108 $\mu\text{g/L}$ (20°C) 分配係數(Log	TCI	

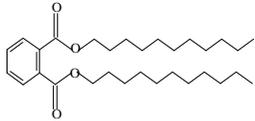
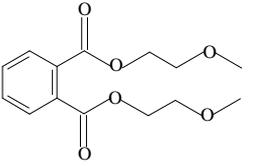
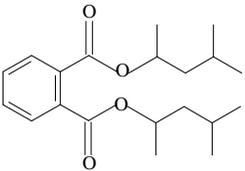
			<b>Kow) : 3.27</b> (20 °C)		
9	Di-n-octyl phthalate (DnOP)		CAS No : 117-84-0 分子式 : C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 390.5 形狀 : 無色液體 沸點 : 390 °C 熔點 : -25 °C 蒸氣壓 : 1×10 <sup>-7</sup> mmHg (25°C) 比重 : 0.978 溶解度 : 0.005 mg/L (25°C) 分配係數(Log Kow) : 5.22	TCI	
10	Diisononyl Phthalate (DINP)		CAS No : 68515-48-0 分子式 : C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 419 形狀 : 無色液體 沸點 : 370 °C 熔點 : -48 °C 蒸氣壓 : 1×10 <sup>-7</sup> mmHg (25°C) 比重 : 0.97 溶解度 : < 0.001 mg/L (25°C)	Sigma	

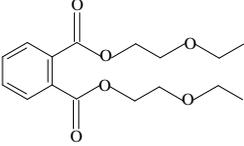
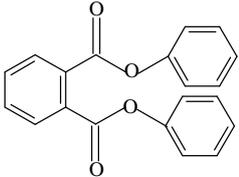
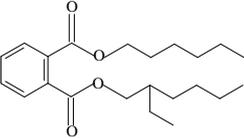
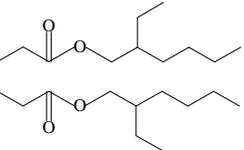
			分配係數(Log Kow) : ~9		
11	Dinonyl Phthalate (DNP)		CAS No : 84-76-4 分子式 : C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 418.6 形狀 : 無色液體 沸點 : 413 °C 蒸氣壓 : 1 mmHg (205°C) 比重 : 0.97 分配係數(Log Kow) : > 2.12	TCI	
12	Diisodecyl Phthalate (DIDP)		CAS No : 26761-40-0 分子式 : C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 447 形狀 : 無色液體 沸點 : -48 °C 熔點 : 370 °C 比重 : 0.97 溶解度 : < 0.001 mg/L(25°C) 分配係數(Log Kow) : ~10	TCI	
13	Diheptyl Phthalate (DHP)		CAS No : 3648-21-3 分子式 : C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 362.5 形狀 : 無色液體	TCI	

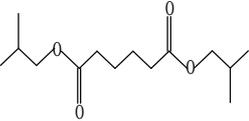
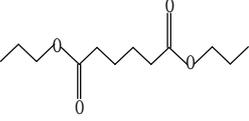
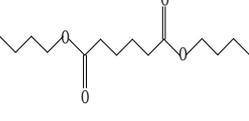
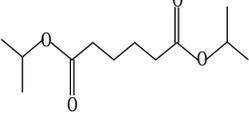
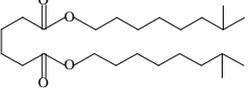
			沸點：360 °C 蒸氣壓：0.0002 kPa (20°C) 比重：0.99 溶解度：0.01% in water 分配係數(Log Kow)：7.6		
14	Diisobutyl phthalate (DIBP)		CAS No：84-69-5 分子式：C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> 分子量：278 形狀：無色液體 沸點：327 °C 熔點：-37 °C 蒸氣壓：0.01 pa (20°C) 比重：1.039 溶解度： 0.001g/100ml (20°C) 分配係數(Log Kow)：4.11	TCI	
15	Diisooctyl Phthalate (DIOP)		CAS No： 27554-26-3 分子式：C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> 分子量：390.6 形狀：無色液體 沸點：370 °C 蒸氣壓：< 10 pa (20°C)	Sigma	

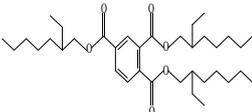
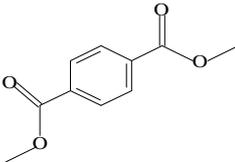
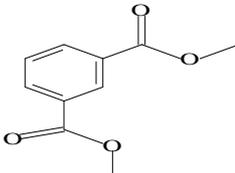
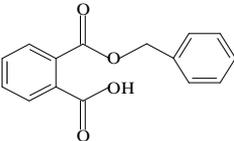
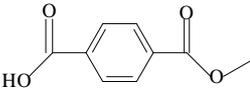
			比重：0.99 分配係數(Log Kow)：3-4		
16	Dimethyl phthalate (DMP)		CAS No：131-11-3 分子式：C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> 分子量：194.2 形狀：無色液體 沸點：283.7 °C 熔點：5.5 °C 蒸氣壓： 0.00165mmHg (25°C) 比重：1.194 溶解度：4.2 g/L(25°C) 分配係數(Log Kow)： 1.47-2.12	TCI, 純度 >99.0%	
17	Diisopropyl Phthalate (DIPrP)		CAS No：605-45-8 分子式：C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> 分子量：250.29 形狀：無色液體 溶解度：332 µg/ml(20°C) 分配係數(Log Kow)：2.83	TCI	
18			CAS No： 71888-89-6 分子式：C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> 分子量：362.5	Sigma	

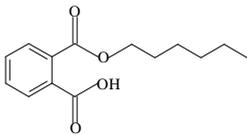
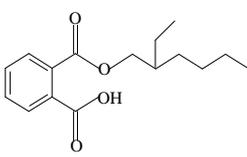
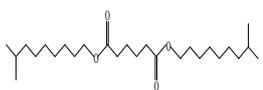
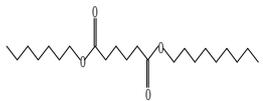
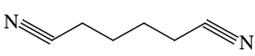
	Diisoheptyl Phthalate (DIHP)		形狀：無色液體 沸點：300 °C 蒸氣壓：0.01 kPa (20°C) 比重：0.988 溶解度：17 μg/L(25°C) 分配係數(Log Kow)：7.2		
19	Diallyl phthalate (DAP)		CAS No：131-17-9 分子式：C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> 分子量：246.3 形狀：無色液體 沸點：165-167 °C 熔點：-70 °C 蒸氣壓：310 pa (150°C) 比重：1.121 分配係數(Log Kow)3.23	TCI	
20	Dibutoxyethyl phthalate (DBEP)		CAS No：117-83-9 分子式：C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> 分子量：366.5 形狀：無色液體 沸點：270 °C 熔點：-55 °C 比重：1.06 溶解度：300mg/L	TCI	
21			CAS No： 3648-20-2	Sigma , 純	

	<p>Diundecyl phthalate (DUDP)</p>		<p>分子式：<math>C_{30}H_{50}O_4</math>                      分子量：474.7                      形狀：無色液體                      沸點：523 °C                      熔點：-9 °C                      蒸氣壓：<math>4.97 \times 10^{-9}</math>                      mmHg                      (25°C)                      比重：0.953                      溶解度：<math>4.41 \times 10^{-6}</math>                      mg/L</p>	<p>度 99 %</p>	
22	<p>Dimethoxyethyl phthalate (DMEP)</p>		<p>CAS No : 117-82-8                      分子式：<math>C_{14}H_{18}O_6</math>                      分子量：282.3                      形狀：無色液體                      沸點：340 °C                      熔點：-45 °C                      比重：1.171                      蒸氣壓：0.01                      mmHg                      (20°C)                      溶解度：8500mg/L</p>	<p>TCl, 純度 &gt;96.0%</p>	
23	<p>Bis (4-methyl-2-pentyl) phthalate (BMPP)</p>		<p>CAS No : 146-50-9                      分子式：<math>C_{20}H_{30}O_4</math>                      分子量：332                      形狀：無色液體</p>	<p>CHEM SERV, 純度 98.7%</p>	

24	Diethoxyethyl phthalate (DEEP)		CAS No : 605-54-9 分子式 : $C_{16}H_{22}O_6$ 分子量 : 310 形狀 : 無色液體	CHEM SERV, 純度 98 %
25	Diphenyl phthalate (DPhP)		CAS No : 84-62-8 分子式 : $C_{20}H_{14}O_4$ 分子量 : 390.6 形狀 : 白色粉末 熔點 : 74-76 °C	TCI
26	Hexyl-2-ethylhexyl phthalate (HEHP)		CAS No : 75673-16-4 分子式 : $C_{22}H_{34}O_4$ 分子量 : 390 形狀 : 無色液體	CHEM SERV
27	Di (2-ethylhexyl) Adipate (DEHA)		CAS No : 103-23-1 分子式 : $C_{22}H_{42}O_4$ 分子量 : 370.6 形狀 : 無色液體 沸點 : 417 °C 熔點 : -70 °C 蒸氣壓 : 2.6 mmHg (20°C) 比重 : 0.927 溶解度 : 1 mg/ml(28°C) 分配係數(Log Kow) : 8.1	TCI
28	Diisobutyl adipate (DIBA)		CAS No : 141-04-8 分子式 : $C_{14}H_{26}O_4$ 分子量 : 258.4	TCI

			形狀：無色液體 沸點：278-280 °C 熔點：-20 °C 比重：0.9534 (19°C)		
29	Di-n-propyl adipate (DPrA)		CAS No : 106-19-4 分子式 : C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 230.3 形狀：無色液體 沸點：151 °C 比重：0.979~0.983	TCI	
30	Di-n-butyl adipate (DBA)		CAS No : 105-99-7 分子式 : C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 258.3 形狀：無色液體	TCI	
31	Diisopropyl Adipate (DIPrA)		CAS No : 6938-94-9 分子式 : C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 230.3 形狀：無色液體 沸點：125~130°C (10mbar) 密度：951 kg/m <sup>3</sup> (20°C)	TCI	
32	Diisononyl Adipate (DINA)		CAS No : 33703-08-1 分子式 : C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> 分子量 : 398 形狀：無色液體	TCI	
33			CAS No : 89-04-3	TCI	

	<p>Trioctyl Trimellitate (TOTM)</p>		<p>分子式：<math>C_{33}H_{54}O_6</math>                      分子量：546.8                      形狀：無色粘稠性液體                      沸點：414 °C                      比重：0.987                      蒸氣壓：0.21 mbar (200°C)                      溶解度：&lt;0.01 in water, by weight.</p>		
34	<p>Dimethyl Terephthate (DMTP)</p>		<p>CAS No : 1539-04-4                      分子式：<math>C_{10}H_{10}O_4</math>                      分子量：194.2                      形狀：白色粉末</p>	TCl	
35	<p>Dimethyl Isophthalate (DMIP)</p>		<p>CAS No : 744-45-6                      分子式：<math>C_{10}H_{10}O_4</math>                      分子量：194.2                      形狀：白色粉末                      沸點：&gt;280 °C                      熔點：141~124 °C</p>	TCl	
36	<p>Monobenzyl Phthalate (MBP)</p>		<p>CAS No : 2528-16-7                      分子式：<math>C_{15}H_{12}O_4</math>                      分子量：256.3                      形狀：白色粉末</p>	TCl, 純度 >98.0%	
37	<p>Monomethyl Terephthate (MMTP)</p>		<p>CAS No : 1679-64-7                      分子式：<math>C_9H_8O_4</math></p>	TCl, 純度 >97.0%	

			分子量：180.2 熔點：239℃ 形狀：白色粉末		
38	Mono-n-hexyl phthalate (MHxP)		CAS No : 24539-57-9 分子式：C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> 分子量：250.3 形狀：白色粉末	TCI	
39	Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP)		CAS No : 4376-20-9 分子式：C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> 分子量：278.3 形狀：白色粉末	TCI, 純度 >90.0%	
40	Diisodecyl Adipate (DIDA)		CAS No : 27178-16-1 分子式：C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> 分子量：426.7 形狀：無色粘稠性 液體	TCI	
41	Heptylnonyl Adipate (HNA)		分子式：C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> 分子量：369 形狀：無色粘稠性 液體	TCI	
42	Adiponitrile (APN)		CAS No : 111-69-3 分子式：C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> 分子量：108.1 形狀：無色粘稠性 液體 沸點：295 °C 熔點：1 °C	TCI	

			蒸氣壓：0.3 pa (25°C) 比重：0.97 分配係數(Log Kow)：0.92		
--	--	--	--	--	--

### 3.2 器材

1. 細胞培養盤 (75 cm<sup>2</sup> Tissue culture flask , Nunc , USA )
2. 培養皿 (Tissue culture dish , Nunc , USA)
3. 15 ml 離心管 (Centrifuge tube , Nunc , USA)
4. 50 ml 離心管 (Centrifuge tube , Nunc , USA )
5. 24-well 培養盤 (Tissue culture plate , Nunc , USA )
6. 96-well 培養盤 (Tissue culture plate , 白色不透明 , Nunc , USA )
7. 96-well 培養盤 (Tissue culture plate , 透明 , Nunc , USA )
8. Millex-LG 注射過濾組 (syringe driven filter unit , 0.20 μm , Millipore , USA)
9. 加壓式過濾組 (Pressure filtration unit , 0.20 μm , Sartorius , Germany)
10. 細胞保存管 (Cryogenic vial , 2 ml , Corning , USA)
11. 細胞計數盤 (Hemocytometer , Neubauer , Germany )

### 3.3 儀器

1. 冷光分析儀 (Berthold , Germany)
2. 冷凍離心機 (BR4i, Jouan, Germany )
3. 倒立顯微鏡 (TS100, Nikon, Japan )
4. 無菌操作台 (Lian-Shen, Taiwan )
5. CO<sub>2</sub> 培養箱 ( Heraeus, Germany )
6. 高壓滅菌釜 (LS-2D, Rexall, Taiwan )
7. 超低溫冷凍櫃 (Sanyo , Japan )
8. 蠕動幫浦 (Cole-Parmer , USA )
9. 純水製造機 (DIU-3, Scienpak , Taiwan )
10. 液態氮桶 (GT35, Air Liquide, France)
11. 天平 (AG204, Mettler Toledo, Switzerland )
12. pH 計 (pH system 1001, Sentron, Netherlands)
13. 酵素免疫分析儀 (Opsys MR, ThermoLabsystems, UK)

### 3.4 冷光酵素標準曲線

1. 將冷光酵素 QuantiLum® Recombinant Luciferase Standard 以 1 X CCLR (Cell Culture Lysis Reagent)稀釋成不同濃度之冷光酵素標準品溶液。
2. 各取 25 µl 置入 96-well 培養盤內，再添加冷光酵素分析試劑 50 µl。
3. 立即以冷光分析儀(Luminometer)測定其冷光值 Relative light units (RLUs)。
4. 以 RLUs 為縱座標，為濃度橫座標作圖，回歸求得回歸方程式與回歸係數。
5. 檢測感度

① US EPA Method 4425 方法：

US EPA Method 4425 是利用人類細胞株 101L (Human CYP1A1gene promoter-luciferase reporter gene 已轉染入人類肝癌細胞株 HepG2) 之 Reporter gene assays (P450HRGS) 方法進行 Dioxin-like substances 之篩檢。

依據 US EPA Method 4425 方法：冷光酵素偵測極限以十倍背景值相對的冷光酵素濃度為之(Limit of Detection (LOD) = 10 times background)。

② DR-CALUX® (Dioxin receptor mediated CALUX® bioassay) 方法 (BD, www.biodetectionsystems.com)：

DR-CALUX® 是Dioxin 的生物分析法，H4IIE 細胞株是以大鼠之肝癌細胞轉染Luciferase的表現基因，當有Dioxin或Dioxin-like 化學物質存在下，與 AhR 接受體 (Aromatic hydrocarbon Receptor)結合產生專一性的Luciferase基因表現，產生之冷光強度來量化Dioxin 或 Dioxin-like 化學物質。(Koppen et al., 2001; Hurst, et al., 2004)

依據DR-CALUX®方法：偵測極限 (Limit of detection) 是先測試三組空白樣品得其平均值與標準偏差值，以此標準偏差

值之三倍數據經冷光酵素標準曲線所換得之冷光酵素濃度為偵測極限 (Limit of Detection, LOD)。然空白樣品標準偏差值之十倍數據經冷光酵素標準曲線所換得之冷光酵素濃度為定量極限 (Limit of Quantitation, LOQ)。

以上兩者方法均會計算，然本計畫則以 US EPA Method 4425 方法所得之檢測感度為依據。

### 3.5 雌激素標準品檢量線建立、檢體暴露時間影響評估、檢測感度與精密度建立

人類乳癌細胞株 MVLN 細胞型態如圖 3.1 所示，MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析流程圖如圖 3.2，步驟如下：

1. 人類乳癌細胞株 MVLN 之細胞培養  
將約  $5 \times 10^5$  人類乳癌 MVLN 細胞以 DMEM-10 % FBS 為培養液於  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  條件下培養 6 天。
2. 人類乳癌細胞株 MVLN 之細胞馴養
  - ①以 0.05 % Trypsin-0.53 mM EDTA 溶液脫附細胞並以 DMEM-10 % FBS 培養液洗下細胞移至 50ml 離心管。
  - ②離心 (離心力 2000 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) 後以 DMEM-10 % FBS 培養液沖散細胞。
  - ③以細胞計數盤 (Hemocytometer) 計數每毫升之細胞數。
  - ④將約  $5 \times 10^5$  人類乳癌 MVLN 細胞以 DMEM-10 % FBS 為培養液於  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  條件下培養 1 天。
  - ⑤ DMEM- 10 % FBS 培養液置換為 DMEM-10 % CD-FBS (Charcoal-Dextran treated-FBS) 培養液。
  - ⑥培養 6 天 (2 天更換培養液一次) 達 Log 期 (如圖 3.3)。
3. 細胞播種
  - ①以 0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA 溶液脫附並以 DMEM-10 % CD-FBS 培養液洗下細胞移至 50ml 離心管。

- ② 離心 (離心力 2000 rpm, 10 min, 4°C) 後將 DMEM-10 % CD-FBS 培養液置換為 DMEM-5 % CD-FBS 培養液, 並沖散細胞。
- ③ 以細胞計數盤計數每毫升之細胞數, 再將細胞播種於 96 孔培養盤 (白色不透明盤) 之孔中 (10,000/well), 於 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 條件下培養 2 天。

#### 4. 化學物質暴露

- ① 雌激素 (17β-estradiol, E2) 以 DMSO 為溶媒製備成儲備溶液 (10 mM), 經無菌之 0.2 μm 過濾膜過濾後待用。
- ② 以無菌 DMSO 為溶媒稀釋成各種濃度之檢體。
- ③ 將上步驟各種濃度之檢體分別加至 DMEM-5 % CD-FBS 培養液中, 以得含各種濃度雌激素之培養液 (DMSO 最終濃度不超過 0.5%, 避免溶媒之潛在細胞毒性)。
- ④ 將細胞培養液置換為上步驟含各種濃度雌激素之培養液, 雌激素 (1 nM) 為正控制組 (Positive control), 0.5 % DMSO 為負控制組 (Negative control)。
- ⑤ 於 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 條件下培養 1、2 及 3 天, 比較細胞暴露於雌激素 1、2 及 3 天之冷光酵素誘導結果。

#### 5. 冷光酵素基因表現活性分析

- ① 吸去培養盤孔中培養液。
- ② 以 100 μl PBS (Phosphate Buffer Saline) 清洗細胞。
- ③ 加入 25 μl 1 X CCLR 以溶解細胞。
- ④ 置入 -80 °C 結凍。
- ⑤ 隔天室溫下解凍後添加冷光酵素分析試劑 50 μl 即以冷光測定儀測定其冷光值 (RLUs)。

#### 6. 數據處理

- ① 受測試化學物質之雌激素活性以相對雌激素活性 REE % (Relative Estrogenic Effect %) 或相對轉錄活化 RTA %

(Relative Transactivation Activity %)表示：

$$\text{REE\% 或 RTA \%} = \frac{\text{受測樣品 RLU}_{\text{s}} - \text{負控制組 RLU}_{\text{s}}}{\text{正控制組 RLU}_{\text{s}} - \text{負控制組 RLU}_{\text{s}}} \times 100 \%$$

② 標準曲線與 EEQ (Estrogen Equivalent Concentration)

以雌激素濃度對 REE % 或 RTA % 作圖可得濃度-雌激素活性關係 (Concentration-Response Relationship) 圖，另將濃度取對數 (Log Conc) 對 REE % 或 RTA % 的 Probit 轉換值作圖可得標準曲線，經線性回歸後得其方程式，再轉算受測樣品之 EEQ。

③ 檢測感度

US EPA Method 4425 方法：

雌激素偵測極限以十倍背景值相對的雌激素濃度為之 (Limit of Detection (LOD) = 10 times background)。

DR-CALUX® (Dioxin receptor mediated CALUX® bioassay) 方法：

偵測極限 (Limit of detection) 是先測試三組空白樣品得其平均值與標準偏差值，以此標準偏差值之三倍數據經雌激素標準曲線所換得之雌激素濃度為偵測極限 (Limit of detection, LOD)。然空白樣品標準偏差值之十倍數據經雌激素標準曲線所換得之雌激素濃度為定量極限 (Limit of quantitation, LOQ)。以上兩者方法均可考慮採用。

以上兩者方法均會計算，然本計畫則以 US EPA Method 4425 方法所得之檢測感度為依據。

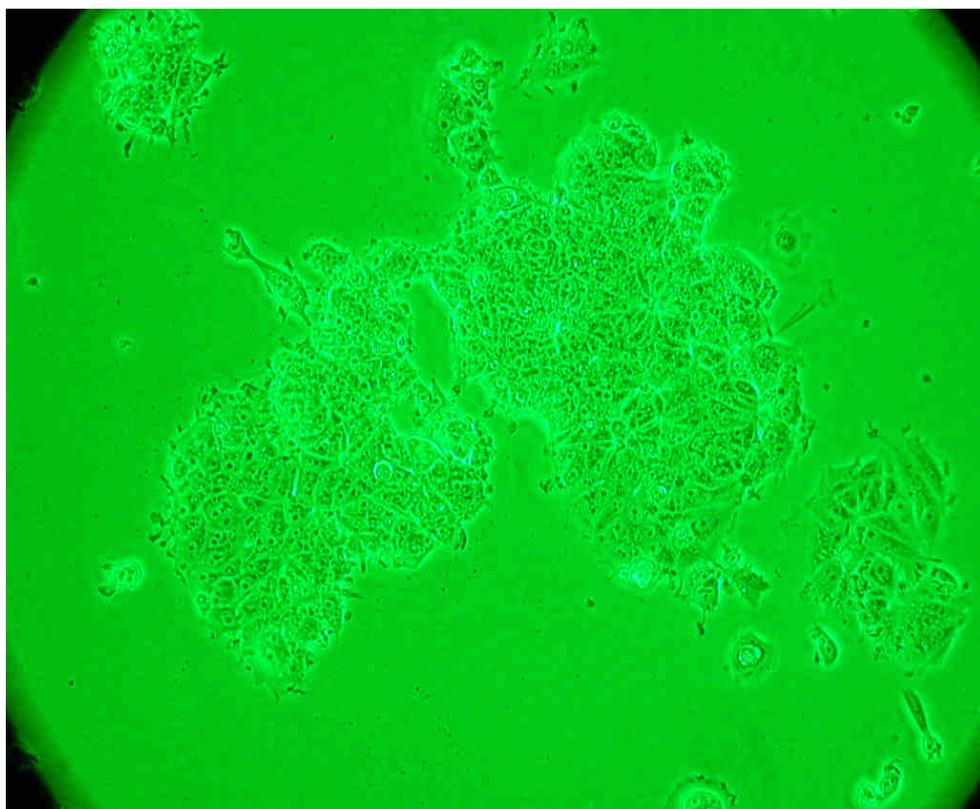


圖 3.1 MVLN 細胞型態圖（放大倍率：100 X）

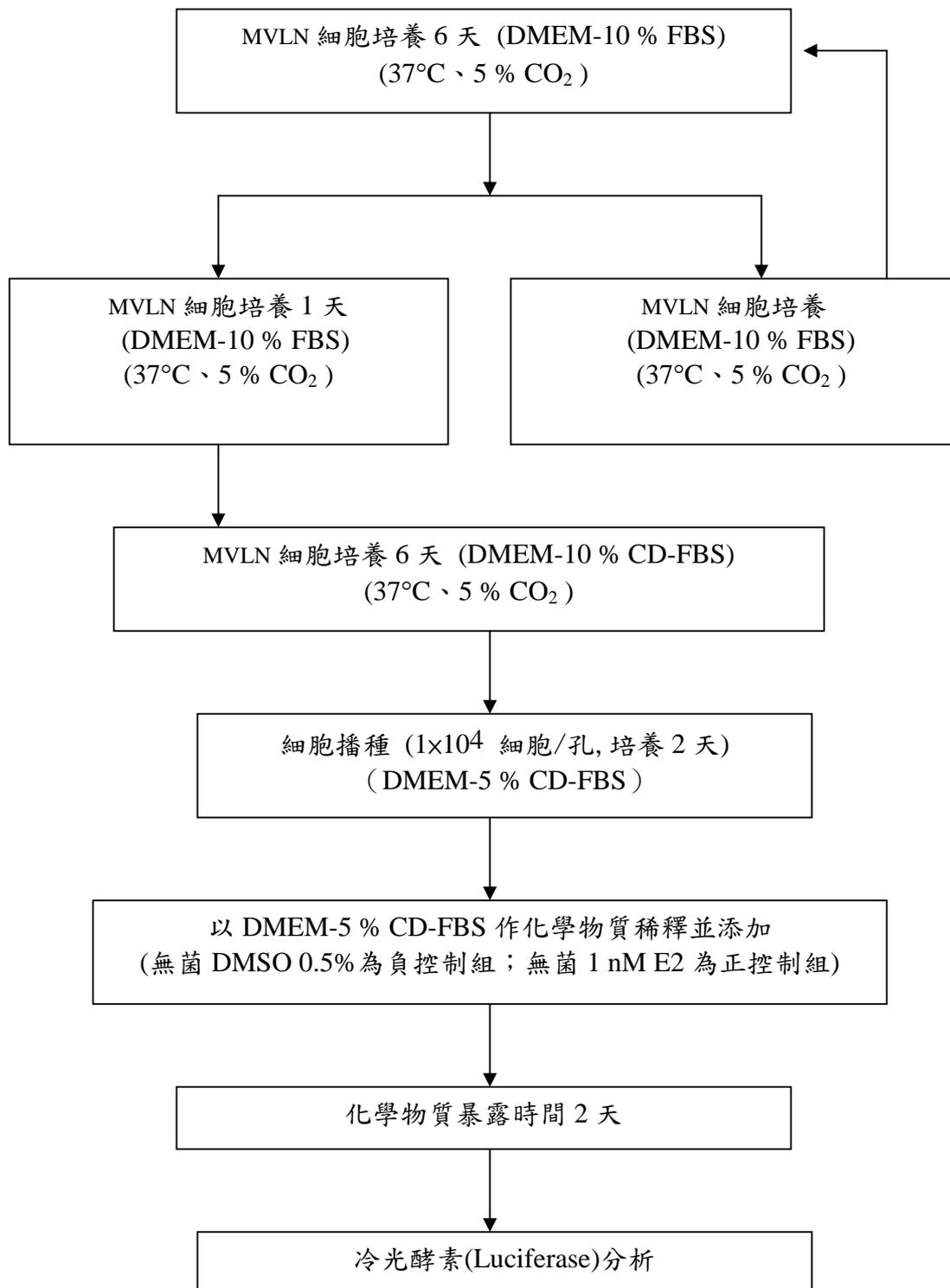


圖 3.2 MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析流程圖

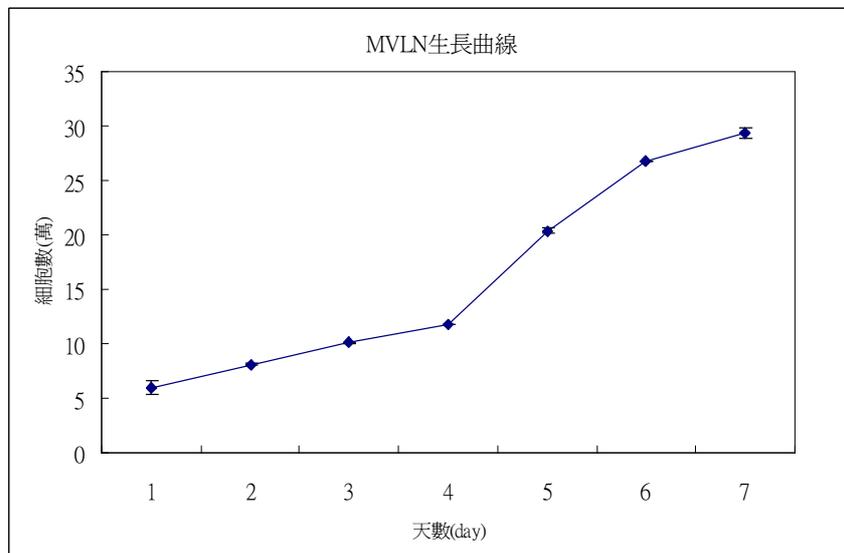


圖 3.3 MVLN 細胞生長曲線圖

### 3.6 檢體溶劑選擇與用量影響評估

本計畫測試溶劑 DMSO、Methylene chloride (MeCl)、Hexane (Hx)、Methanol (MeOH)、Isooctane (Isot) 與 Acetone (Act) 對 MVLN 細胞之細胞毒性，步驟如下：

1. 前段 3.5 之 1. 2. 3. 步驟：人類乳癌細胞株 MVLN 之細胞培養、馴養與細胞播種步驟中除以 96-well 培養盤(透明)取代 96-well 培養盤 (白色不透明) 外，其餘步驟相同。
2. 溶劑暴露
  - ① 將 DMSO、Methylene chloride (MeCl)、Hexane (Hx)、Methanol (MeOH)、Isooctane (Isot) 與 Acetone (Act) 以無菌 0.2 $\mu$ m 過濾膜 (Millex-LG 注射過濾組) 過濾後待用。
  - ② 分別加受測溶劑至 DMEM-5 % CD-FBS 培養液中，以得含各種濃度溶劑之培養液。
  - ③ 將細胞培養液置換為上步驟含各種濃度溶劑之培養液。

④ 於 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 條件下培養 2 天。

### 3. 細胞毒性分析 (SRB 細胞毒性分析)

細胞毒性實驗以 (Sulforhodamine B、SRB) 試劑染色進行 (SRB 會與活細胞蛋白質結合呈色)。MVLN 為貼附性細胞，活細胞會貼附盤底，死細胞會自然脫付，故當以 TCA 試劑固定時，只有活細胞會被固定，再經 SRB 將蛋白質染色後，所測得的是活細胞的指數。

SRB 細胞毒性分析如下：

- ① 吸去培養盤孔中培養液。
- ② 添加 100 μl 10 % TCA (Trichloroacetic acid) 試劑，4° C 靜置 60 分鐘。
- ③ 吸去 10 % TCA 試劑，以水清洗五回後風乾。
- ④ 加入 50 μl 0.4 % (w/v) SRB 之 1 % 醋酸水溶液染色。
- ⑤ 以 1 % 醋酸水溶液洗四回後風乾。
- ⑥ 添加 10 mM Tris (pH=10.5) 溶液 100 μl 後以酵素免疫分析儀 (Opsys MR, Thermo LabSystems, UK) 測定 560 nm 吸光值以測定細胞存活率。

### 4. 數值分析

$$\text{細胞存活率 \%} = \frac{\text{受測溶劑的 O.D. (560 nm)}}{\text{不含溶劑的 O.D. (560 nm)}} \times 100 \%$$

### 5. 重複數

重複數為 4。

### 3.7 塑化劑的雌激素活性與細胞毒性評估

本計畫測試的塑化劑有 42 種 (原計畫書 33 種) 如表 3.1 所示，塑化劑的雌激素活性評估步驟同 3.5 節與圖 3.2，只是受測對物質不同。在細胞毒性測試的方法上有兩種：第一為 SRB 細胞毒性分析，步驟同 3.6 節。

第二為 MTT 細胞毒性分析：步驟如下：

1. 前段 3.5 節之 1. 2. 3.4. 步驟：人類乳癌細胞株 MVLN 之細胞培養、馴養與細胞播種步驟中除以 96-well 培養盤 (透明) 取代 96-well 培養盤 (白色不透明) 外，其餘步驟相同。
2. 細胞毒性分析 (MTT 細胞毒性分析)

MTT 細胞毒性分析是以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium- bromide (MTT) 進行呈色試驗，即 MTT 經活細胞內粒腺體所含之脫氫酵素(dehydrogenase)裂解成藍色 formazan 結晶的量，來評估受測受測物對 MVLN 細胞的毒性。

- ① 暴露時間到後，吸去孔內培養液，每孔加入 50  $\mu$ l MTT (2mg/ml in DMEM-5 % CD-FBS) 溶液。
- ② 將培養盤置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 3 小時。
- ③ 吸去培養液，並於每孔內加入 100  $\mu$ l DMSO 置放 10 分鐘以溶解產生的 formazan 結晶。
- ④ 使用 ELISA reader 振盪培養盤使孔底藍色結晶充份溶解，並利用酵素免疫分析儀 (Opsys MR, Thermo Labsystems, UK) 在 560 nm 波長下讀取每孔的吸光值以測定細胞存活率。

#### 3. 數值分析

$$\text{細胞存活率}\% = \frac{\text{受測樣品的 O.D. (560 nm)}}{0.5\% \text{ DMSO 的 O.D. (560 nm)}} \times 100\%$$

4. 重複數

重複數為 4。

5. 差異檢定：

檢體與負控制組的雌激素效應差異以 Student's *t*-test 進行檢定：

\* ( $p < 0.05$ )；\*\* ( $p < 0.01$ )。

### 3.8 塑化劑間與對雌激素間的雌激素交互作用評估

本計畫交互作用評估包含兩物種間及物種各與雌激素間之交互作用。在前段雌激素評估結果發現具有顯著雌激素活性之物種有 BBP、BMPP、DEEP、HEHP 及 MBP 五種，本計畫選 BBP、BMPP、DEEP 及 HEHP 四種分別進行物種間及物種各與雌激素間之交互作用評估。其雌激素活性評估步驟同 3.5 節與圖 3.2，只是受測對物質不同。重複數為 4。

## 第四章 結果與討論

### 4.1 冷光酵素標準曲線

MVLN 細胞株是在人類乳癌細胞 MCF-7 細胞株之基因中有導入冷光酵素 (Luciferase) 的表現基因，當有雌激素或類雌激素化學物質存在下會與雌激素接受體結合，進而作用於 Estrogen Responsive Element (ERE)，以產生下游冷光酵素之基因表現，因此類雌激素物質所產生之冷光酵素可量化以得知類雌激素物質之雌激素活性。誘導產生之冷光酵素需以冷光分析儀測定，因此在品管程序上需建立冷光酵素標準曲線，以確認冷光分析儀之感度與線性 (US EPA Method 4425 之感度與線性分別為 2 pg 與  $r^2 \geq 0.9$ )。另此建立之標準曲線可提供受測檢體誘導產生之冷光酵素量化之標準。

本計畫以基因重組冷光酵素 (Recombinant Luciferase, QuantiLum®) 當標準品，此標準品乃將 *E-coli* 轉染含北美螢火蟲冷光酵素表現基因質體 (Plasmid) 進以誘導產生之冷光酵素 (61kDa)。此標準品利用以 1 X CCLR 稀釋成各種濃度後以冷光酵素檢測試劑分析，其標準曲線如圖 4.1 所示，經回歸後所得線性方程式  $y = 2059.3x - 423.28$ ，相關係數 ( $r^2$ ) 達 0.9972，因此有很好的線性關係 (0.098 ~ 25 pg/ml)，精密度 RSD % 範圍 2.95 ~ 21.68 %。依 US EPA Method 4425 每月至少以冷光酵素標準品校正冷光分析儀，其線性關係標準為  $r^2 \geq 0.9$ ，今本試驗之線性相關係數 ( $r^2$ ) 達 0.9972，因此已滿足此要求。

為檢測偵測極限，將標準品利用以 1 X CCLR 往下稀釋至更低濃度，經冷光酵素檢測試劑分析後之標準曲線與 RLU 值如圖 4.2 與表 4.1 所示。圖 4.2 經回歸後所得線性方程式  $y = 2274.6x - 1.6944$ ，相關係數 ( $r^2$ ) 達 0.9985，因此在低濃度亦有很好的線性關係 (0.01 ~ 0.16 pg/ml)，精密度 RSD % 範圍 1.40 ~ 14.43 %。另因空白組冷光值為 0，因此依 DR-CALUX® (Dioxin receptor mediated CALUX® bioassay) 方法無法求得偵測極限。然依 US EPA Method 4425 方法，可得偵測極限為 0.01 pg/ml (at least 10 times background)。依 US EPA Method 4425 之冷光酵素感度標準為 2 pg，本實驗之冷光酵素偵測極限為 0.01 pg/ml ( $2.5 \times 10^{-4}$  pg, 25  $\mu$ l/well)，感度遠低於 US EPA Method 4425 標準。

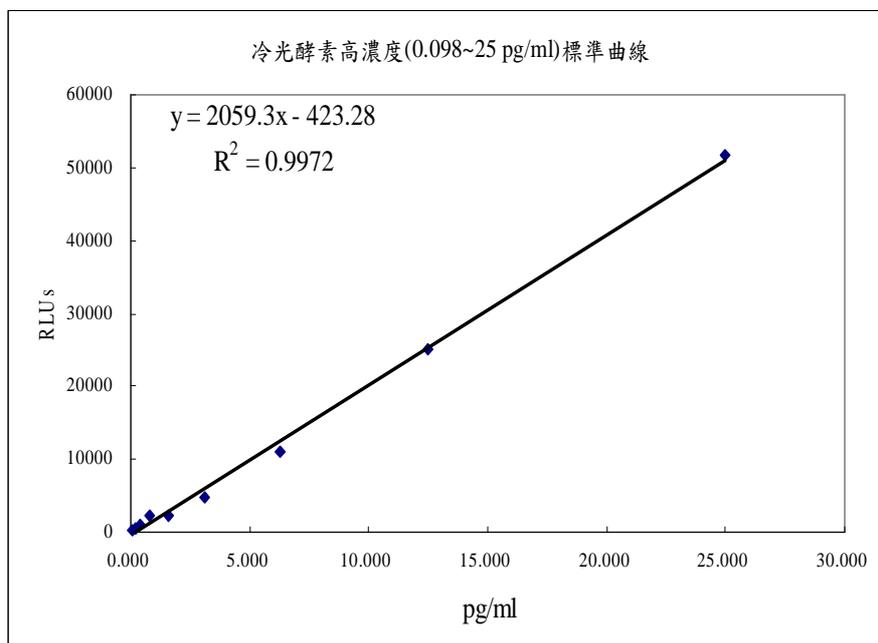


圖 4.1 冷光酵素高濃度標準曲線圖

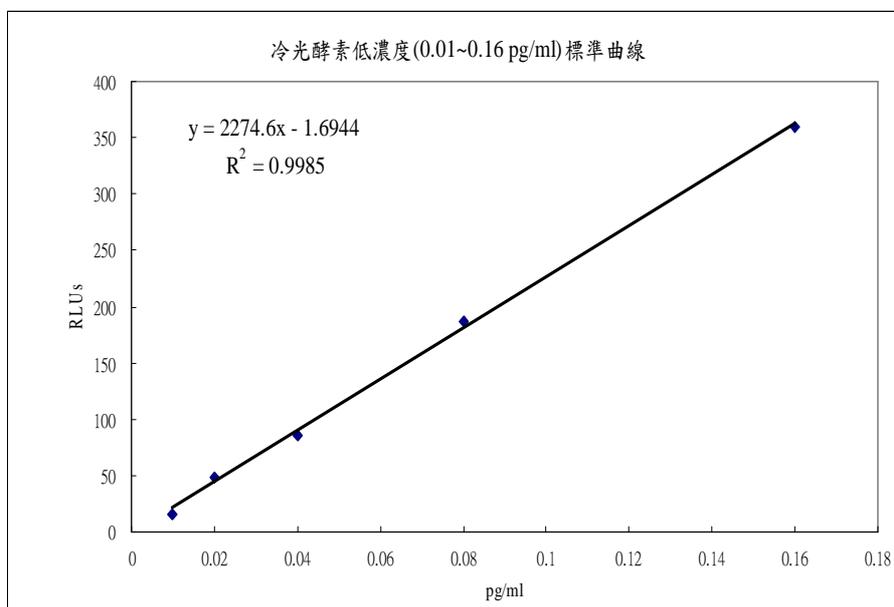


圖 4.2 冷光酵素低濃度標準曲線圖

表 4.1 各種濃度冷光酵素之冷光值 (n=3)

濃度 (pg/ml)	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	Blank (1 XCCLR)
RLUs	359 ± 5	187 ± 4	86 ± 5	48 ± 7	16 ± 2	0	0
RSD %	1.40	2.22	6.15	14.43	12.50	—	—

—：因 RLUs 為 0 故無法算出 RSD %。

#### 4.2 雌激素標準品標準曲線建立、檢體暴露時間影響評估、檢測感度與精密度建立

本實驗以雌激素 (E2) 為標準品進行 MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析法之雌激素標準品標準曲線建立、檢體暴露時間影響評估、檢測感度與精密度建立。當以 E2 之濃度(0.0001 ~100 nM, n=6)對產生之冷光值作圖可得濃度-冷光誘導效應圖如圖 4.3 所示，結果發現 MVLN 細胞產生之冷光值會隨著 E2 的濃度而上升，具濃度效應，約 1 nM 已達最大效應。此外、MVLN 細胞經暴露於 E2 下之冷光值會隨暴露天數增加而增加。當以雌激素最大效應 1nM (正控制組) 為 100 %，將 E2 濃度(0.0001 ~100 nM, n=6)對相對雌激素(1 nM E2)活性(Relative Estrogen Efficacy %，REE %) 作圖時 (圖 4.4)，E2 暴露時間 1、2、3 天發現有相似的濃度-相對雌激活性圖樣(Pattern)，其標準曲線均呈 Sigmoidal curve。在準確度(Accuracy)上，本實驗以 1 nM E2 為正控制組計算實驗組 1 nM E2 之誤差值為 8.15 (第一天)、6.87 (第二天)、8.61 (第三天)。另在品管程序上依 US EPA Method 4425 需以正控制組來管控系統穩定度，其 RSD % 標準為 ≤ 20 %，本實驗在每次檢測檢體時均有 1 nM E2 控制組來監控系統穩定度，在此次實驗之 1 nM E2 控制組的 RSD % 為 10.09 (第一天)、7.52 (第二天)、11.38(第三天)，結果顯示滿足 US EPA Method 4425 之品管標準。

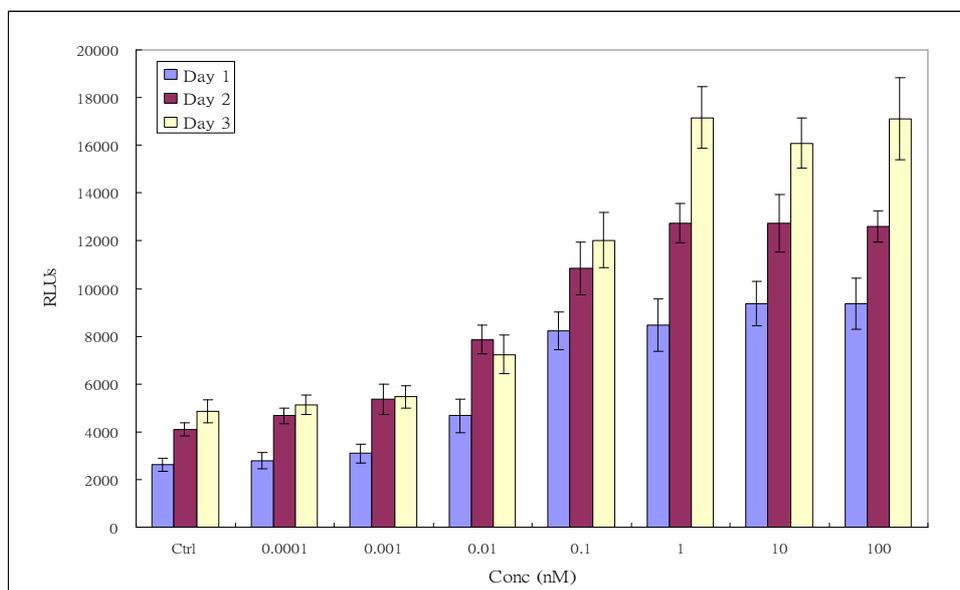


圖 4.3 MVLN 細胞於不同濃度暴露不同天數之冷光產生標準曲線圖

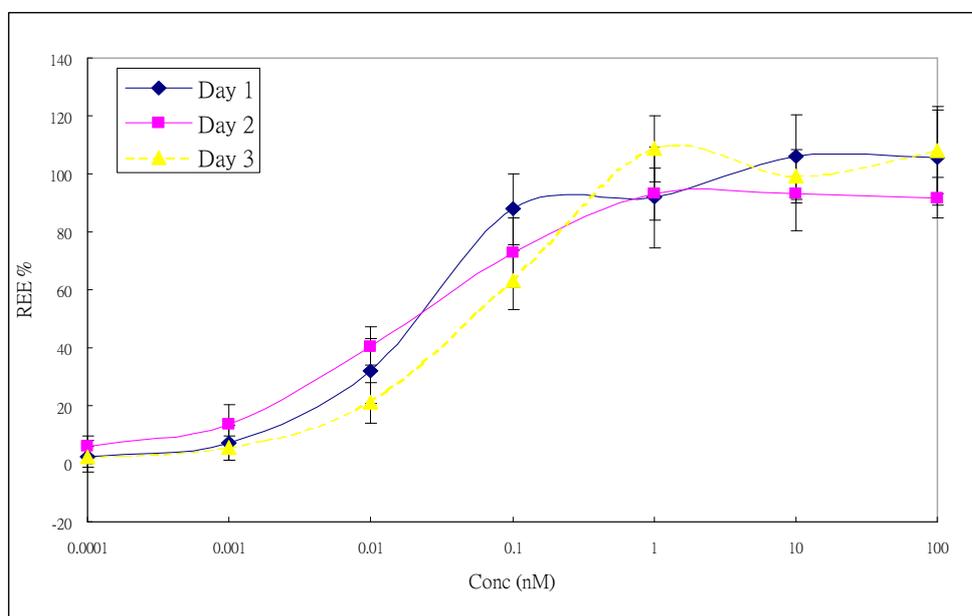


圖 4.4 MVLN 細胞於不同濃度暴露不同天數之相對雌激素活性標準曲線圖

在精密度測定上，由表 4.2 發現 MVLN 細胞暴露於雌激素 1、2、3 天所誘導冷光值之 RSD % 並無太大差異，整體實驗重覆數 3~6 次之 RSD % 範圍為 0.18 ~ 15.23 %，基於生物性分析一般之 RSD % 容許範圍為 25 %，因此此結果均小於此範圍，故 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法之實驗重覆數至少可為 3 重覆。

表 4.2、MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析不同實驗重覆數之精密度 (RSD %)。

Replicates	Day 1	Day 2	Day 3
	RSD % (0.0001 ~100 nM)		
3	3.83 ~ 12.53	2.19 ~ 14.93	5.34 ~ 13.46
4	5.46 ~ 11.79	3.94 ~ 13.20	5.60 ~ 12.20
5	2.47 ~ 8.69	0.18 ~ 12.53	0.25 ~ 11.05
6	9.55 ~ 15.23	5.16 ~ 11.89	6.56 ~ 11.16

在檢測感度測定上，MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析法分別按 US EPA Method 4425 與 DR-CALUX<sup>®</sup> 定義求得此方法之檢測感度，結果如表 4.3 所示。結果發現 MVLN 細胞暴露於雌激素 1、2、3 天所求得之檢測感度有些差異，感度 (LOD 與 LOQ) 以第 2 天結果最好，再者第 3 天，較差為第 1 天。

儘管由圖 4.3-4.4 結果發現 MVLN 細胞暴露於 E2 下之冷光值會隨暴露天數增加而增加，當轉化成相對雌激素(1 nM E2)活性(REE %)作圖時 E2 暴露天數影響濃度-相對雌激活性圖樣差異不大，但基於檢測感度結果與時間折衷考量，MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析法之細胞暴露於檢體時間可選擇 2 天暴露。

表 4.3、MVLN 雌激素受體結合專一性轉錄分析法依不同方法標準檢定之感度差異

Method	Sensitivity	Day 1	Day 2	Day 3
Method 4425	LOD	1.59 pM	0.29 pM	2.54 pM
DR-CALUX <sup>®</sup>	LOD	2.83 pM	0.23 pM	0.65 pM
DR-CALUX <sup>®</sup>	LOQ	49.68 pM	11.20 pM	31.98 pM

### 4.3 檢體溶劑選擇與用量影響評估

生物分析需用細胞進行樣品檢測，一般檢體須溶於溶劑以進行生物分析，然溶劑潛在細胞毒性則會影響檢測結果，之故檢測常用溶劑之細胞毒性可提供溶劑適當濃度選擇之依據。本計畫選擇溶劑進行細胞毒性測試與 US EPA Method 4425 一樣為 DMSO、Methylene chloride (MECL)、Hexane (HX)、Methanol (MEOH)、Isooctane (ISOT) 與 Acetone (ACT)。溶劑細胞毒性以 SRB (Sulforhodamine B) 分析法進行，MVLN 暴露於前述六種溶劑不同濃度經兩天後之細胞存活率結果如圖 4.5 所示。依 US EPA Method 4425 之細胞毒性標準細胞存活率不可低於 20%，由圖 4.5 清楚發現要讓 MVLN 細胞存活率低於 80% 之溶劑濃度分別為 HX 0.5%、DMSO 2%、ACT 8%、MEOH 8%、MECL > 8%、ISOT > 8%。因此這六種溶劑對 MVLN 之細胞毒性大小順序為 HX > DMSO > ACT ≈ MEOH > MECL ≈ ISOT。

US EPA Method 4425 對於溶劑含量標準需小於 1%，以避免潛在毒性 (Cell viability ≤ 20%)。今發現 MVLN 細胞對 HX 最敏感，在 0.5% 時細胞存活率以下降至 63.8%，與 US EPA Method 4425 建議使用量小於 1% 有出入，顯示不同細胞對溶劑的忍受度不同。DMSO 為細胞抗凍劑，基於 DMSO 為兩性溶劑能溶解的化學物質極性涵蓋較廣，所以以細胞為題材進行的生物分析中亦常以 DMSO 為樣品溶劑進行生物檢測，觀本計畫所用的 DMSO 的含量均控制在 0.5% 為之，由圖 4.5 結果 DMSO 在此濃度並不會造成顯著的細胞毒性 (MVLN 細胞在 0.5%

DMSO 下之細胞存活率為  $107.2 \% \pm 9.3 \%$  )，然以此濃度則需避免使用 HX 為溶劑。DMSO 為最常用之生物分析檢體溶劑，本計畫所用的 DMSO 濃度是滿足 US EPA Method 4425 建議使用量小於 1% 之標準。

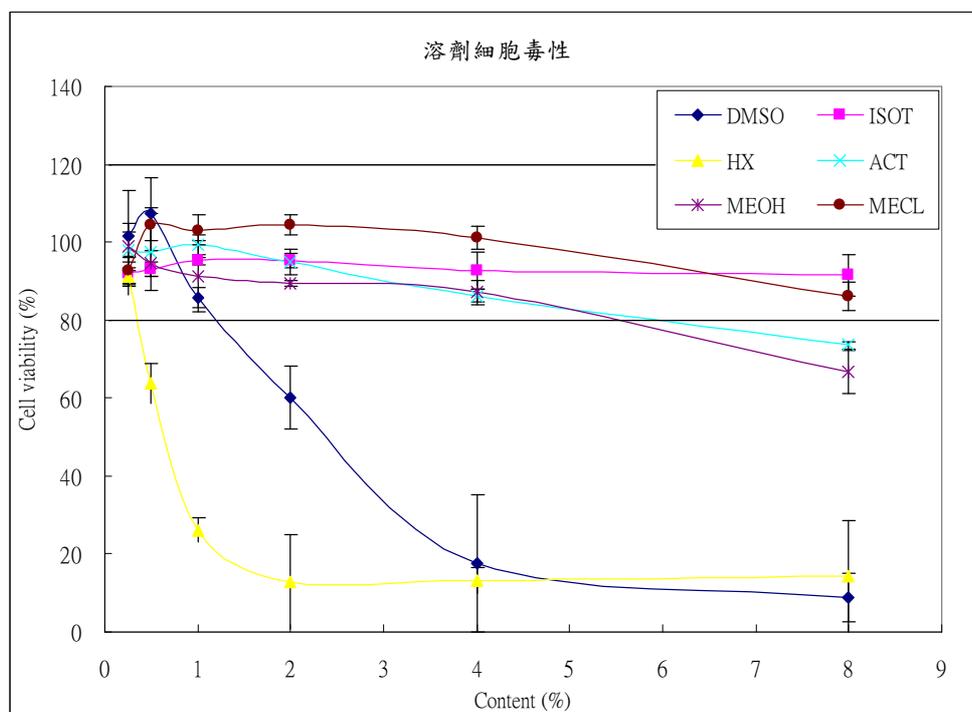


圖 4.5 MVLN 細胞暴露於不同溶劑經兩天後之細胞存活率 (SRB 分析法)

#### 4.4 塑化劑的細胞毒性與雌激素活性評估

在探討 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法關於冷光酵素標準曲線、雌激素標準品檢量線建立、檢體暴露時間影響、檢測感度與精密度建立、檢體溶劑選擇與用量影響等品管與適當條件評估後，以最佳條件繼續檢測 42 種塑化劑(計畫原預定 33 種)之雌激素活性與細胞毒性分析，結果如 4.6 ~ 4.47 所示。在細胞毒性檢測方面，分別以 SRB (計畫預定檢測方法) 與 MTT 兩種方法檢測這 42 種塑化劑的細胞毒性。SRB 細

胞毒性分析方法是以前 (Sulforhodamine B、SRB) 試劑進行活細胞染色 (SRB 會與活細胞蛋白質結合呈色), MVLN 為貼附性細胞, 活細胞會貼附盤底, 死細胞會自然脫付, 故當以 TCA 試劑固定時, 只有活細胞會被固定, 再經 SRB 染色後, 所測得的是活細胞的指數。MTT 細胞毒性分析是以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) 進行活細胞呈色試驗, 即 MTT 經活細胞內粒腺體所含之脫氫酵素(dehydrogenase)裂解成藍色 formazan 結晶的量, 來評估活細胞數。

SRB 分析方法已被美國國家癌症研究院 (National Cancer Institute) 接受的抗癌藥物細胞毒性篩檢方法, 依據文獻、MTT 與 SRB 方法在細胞毒性檢測上有相似的細胞毒性曲線結果, 目前 SRB 分析方法已廣泛應用於細胞毒性檢測上 (Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990; Perez et al., 1993; Fricker et al., 1996)。

本計畫檢測 42 種塑化劑之細胞毒性, 其濃度範圍為 0.1~10000 nM, 由圖 4.6 ~ 4.47 可清楚發現此 42 種塑化劑在此濃度範圍並沒有產生顯著之細胞毒性, 依據 Method 4425 受測檢體之細胞毒性不得低於 80%, 觀細胞毒性數據整理表(表 4.4), 均沒有低於此值, 因此可選用此濃度範圍進行後續雌激素活性評估。

本計畫以 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法檢測 42 種塑化劑在濃度範圍為 0.1~10000 nM 之雌激素活性, 其結果如圖 4.6 ~ 4.47 所示。結果顯示 BBP、BMPP、DEEP、HEHP 及 MBP 五種塑化劑分別在 10  $\mu$ M (BBP)、10  $\mu$ M (BMPP)、1 & 10  $\mu$ M (DEEP)、10  $\mu$ M (HEHP) 及 10  $\mu$ M (MBP) 濃度上有呈現顯著雌激素效應 ( $p < 0.01$ ) 外, 其餘物種在 0.1~10000 nM 濃度範圍均未發現有顯著之雌激素效應。其最大相對轉錄活化活性 (RTA % 或相對雌激素活性 REE %) 分別為 BBP (10  $\mu$ M, 46.6  $\pm$  2.9)、BMPP (10  $\mu$ M, 55.6 $\pm$ 18.1)、DEEP (10  $\mu$ M, 73.3 $\pm$ 9.5)、HEHP (10  $\mu$ M, 39.5 $\pm$ 12.5) 及 MBP (10  $\mu$ M, 51.6 $\pm$ 8.2)。經 nM EEQ 換算的結果分別為 BBP ( $4.10 \times 10^{-3}$  nM EEQ)、BMPP ( $7.04 \times 10^{-3}$  nM EEQ)、DEEP ( $2.22 \times 10^{-2}$  nM EEQ)、HEHP ( $2.66 \times 10^{-3}$  nM EEQ) 及 MBP ( $5.53 \times 10^{-3}$  nM EEQ)。比較這五種的雌激素活性 BBP ( $1/2.44 \times 10^6$ )、BMPP

( $1/1.42 \times 10^6$ )、DEEP ( $1/4.50 \times 10^5$ )、HEHP ( $1/3.76 \times 10^6$ ) 及 MBP ( $1/1.81 \times 10^6$ ) 可知這五種塑化劑應屬弱雌激性化學物質。

另依據 Soto et al (1995) 在雌激素活性判斷上，將之分為三等級：第一級相對雌基素活性  $>70\%$ ，為 Full agonistic activity。第二級相對雌基素活性  $25 \sim 70\%$ ，為 Partial agonistic activity。第三級相對雌基素活性  $<25\%$ ，為 No agonistic activity。如依據此標準則第一級(Full agonistic activity)的只有 DEEP。第二級 (Partial agonistic activity)的有 BMPP、MBP、BBP 及 HEHP。

另依 Magara et al. (2000) 標準分為四級：第一級：++ (REE %  $\geq 40\%$  & Cmax.  $\leq 5$  nM)；第二級：+ (REE %  $\geq 40\%$  & Cmax.  $> 5$  nM)；第三級： $\pm$  (REE %  $10 \sim 40\%$ )；第四級：- (REE %  $<10\%$ )。如依據此標準則第二級 (+) 的有 DEEP、BMPP、MBP 及 BBP。第三級 ( $\pm$ ) 的有 HEHP。在此 HEHP 則其雌激素活性則歸為不確定。因此所採用的標準不同則會有不同的雌激素陽性判斷結果。

本計畫以 MVLN 雌激素轉錄分析法檢測四十二種塑化劑的雌激素效應，其中發現有上述五種塑化劑具有雌激素陽性反應，其中只有 BBP 在第五章有文獻整理資料，其他四種經檢索尚未發現有相關文獻資料，乃因 BBP 為普遍常見之塑化劑，較被重視而廣被檢測，觀其他雌激素陽性物種，雖較不普遍，然仍須注意這些物種可能之使用與暴露可能性。另本計畫檢測沒活性的塑化劑，與文獻報導結果有些出入，此乃因為方法設計原理不同所導致之差異。以 DBP 為例，觀 DBP 在第五章有文獻整理資料，在 3 種受體結合分析 (RBA) 中有 2 種呈現陽性反應 (hER expressed in Sf9/ Baculovirus、ER from Immature SD Rat)，1 種呈現陰性反應 (ER from ovariectomized SD Rat)。6 種報導基因分析 (Reporter gene assay) 中有 2 種呈現陽性反應 (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc、Recombinant yeast cell、T47D-luc cell)，3 種呈現陰性反應 (Hela cell, hER plasmid、Hela cell, Rat ER plasmid、Yeast two-hybrid assay)。4 種 ER 陽性細胞增生分析中有 3 種呈現陽性反應 (ZR-75 乳癌細胞、T47 乳癌細胞、MCF-7 乳癌細胞 (E-Screen,  $10^{-4}$  M))，然亦有不同實驗室同樣以 MCF-7 乳癌細胞 (E-Screen) 分析呈現陰性反應 ( $\leq 1$  mM)。以上可發現不同方法可能會

呈現不同結果，即使是同樣方法在不同實驗室亦有出現不同結果的可能性。基於此、USEPA 才需作方法確效工作以利後續環境檢體與化學物質之檢測。

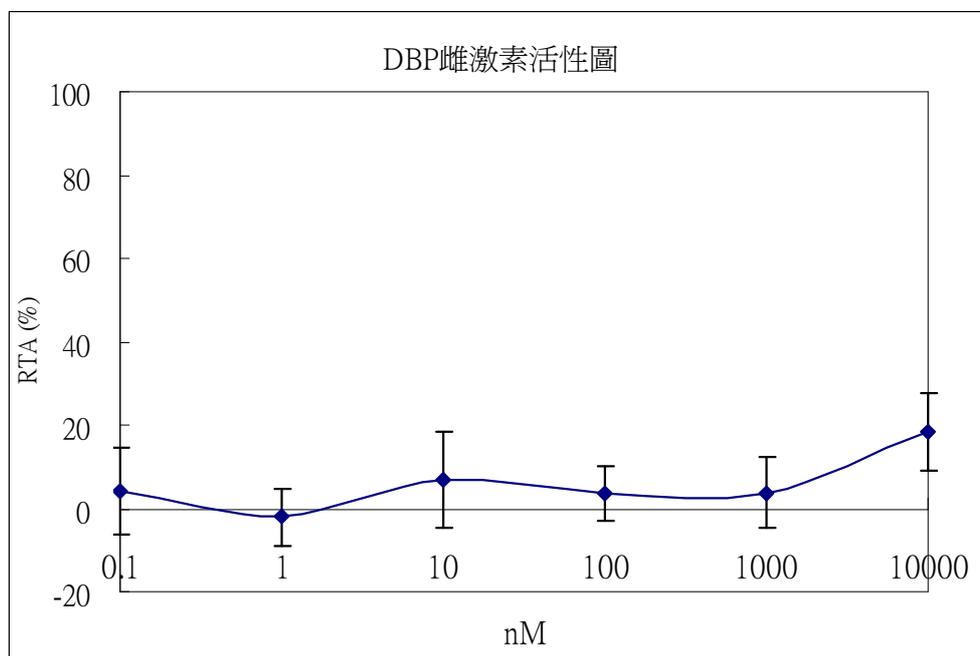
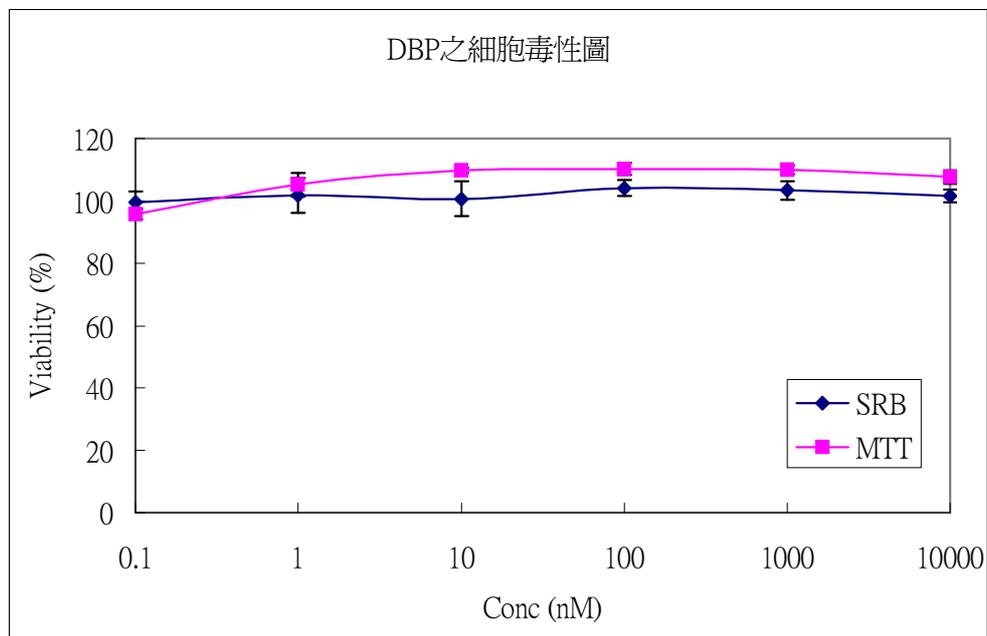
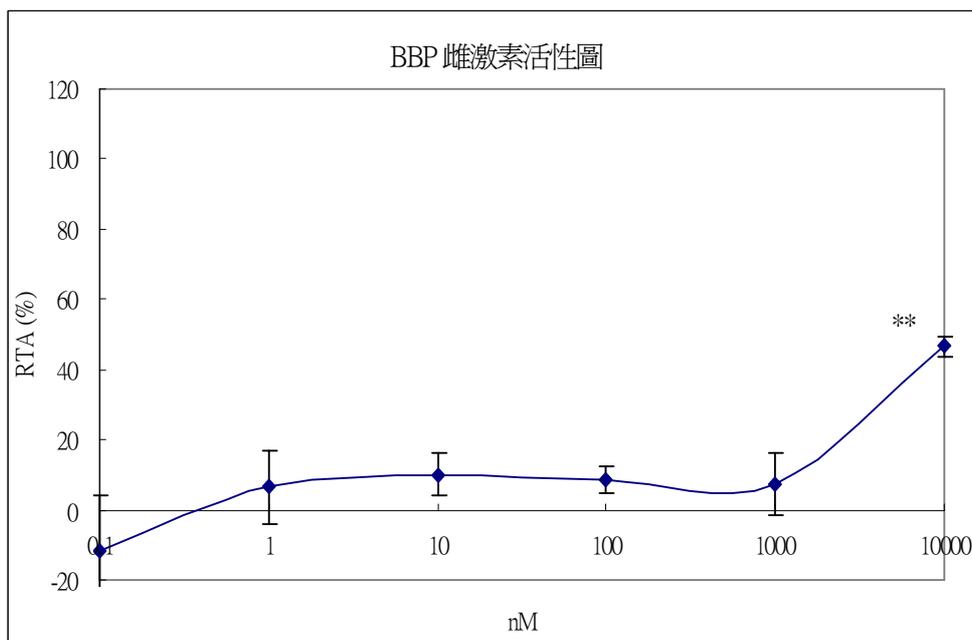
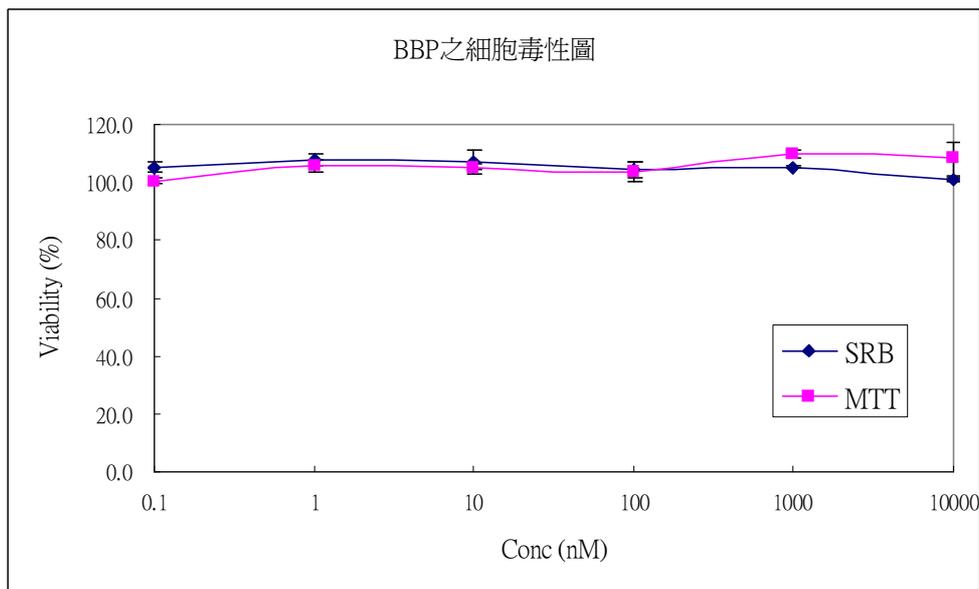


圖 4.6、Di-n-butyl phthalate (DBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)



\*\* There was a significant difference between the RTA % of the sample and the negative control according to Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ).

圖 4.7 、Butyl benzyl phthalate (BBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

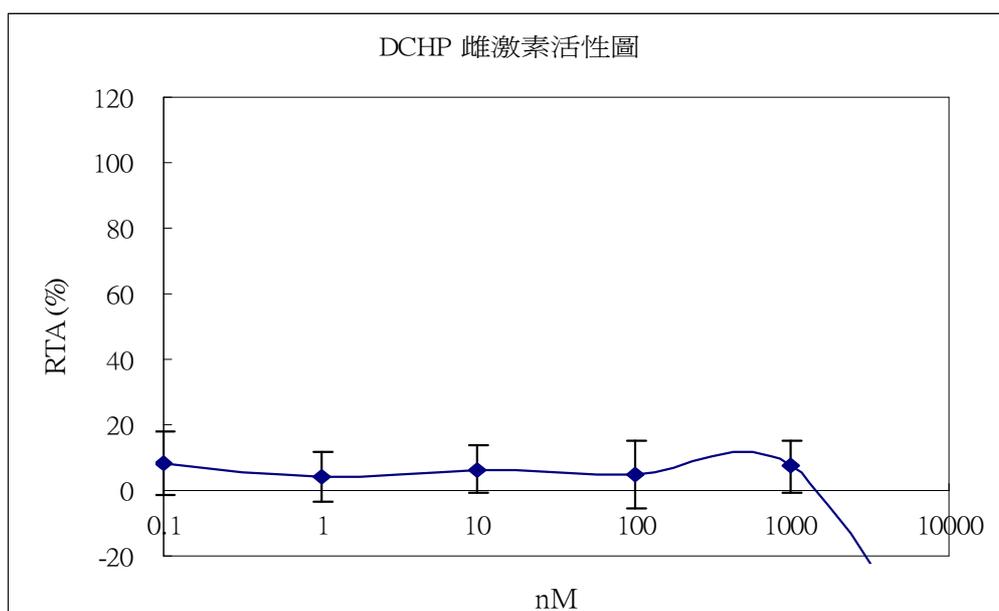
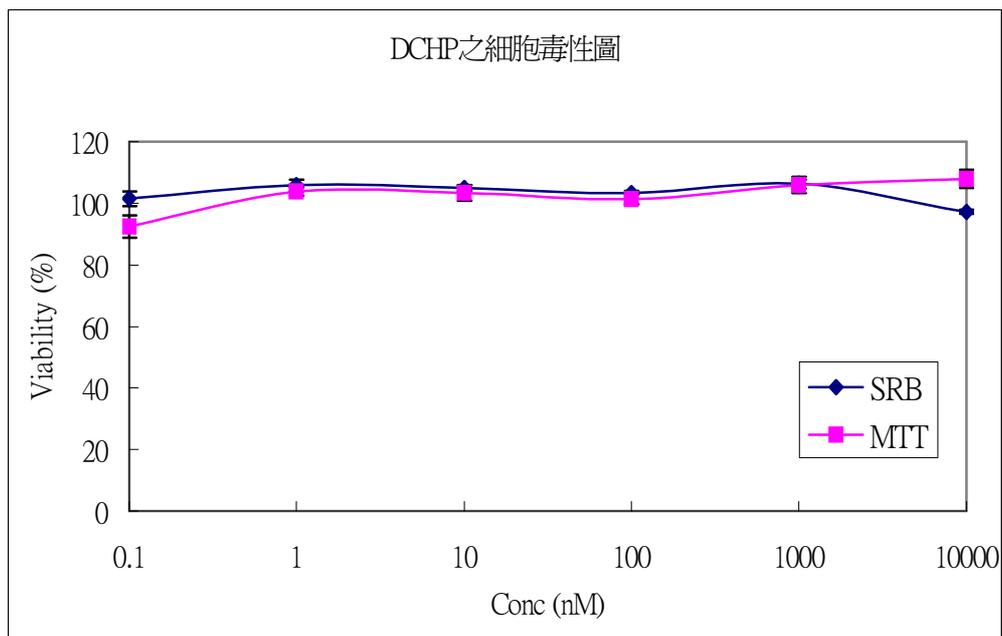


圖 4.8 、Dicyclohexyl phthalate (DCHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

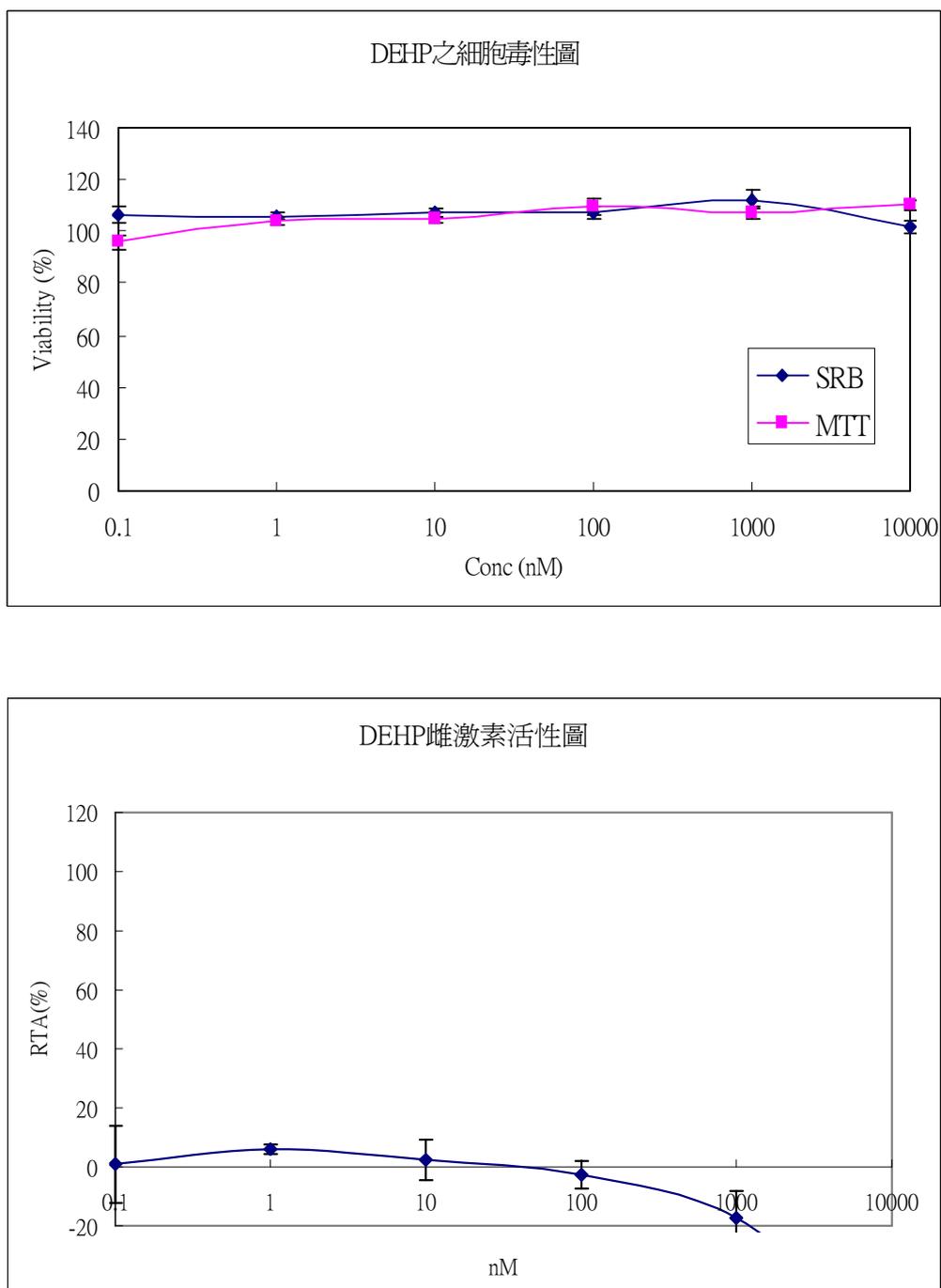


圖 4.9 、Diethylhexyl phthalate (DEHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

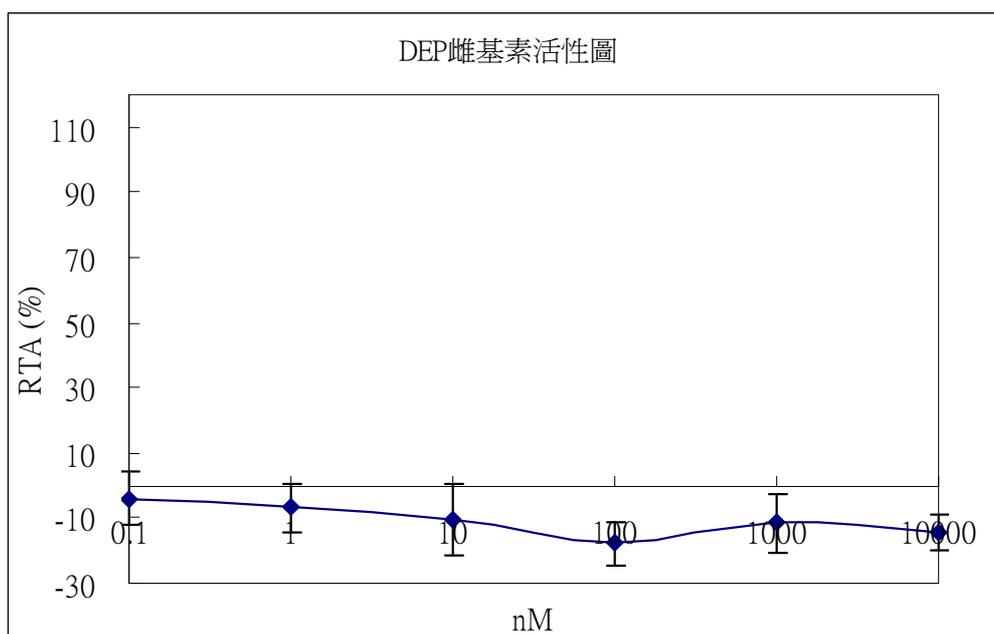
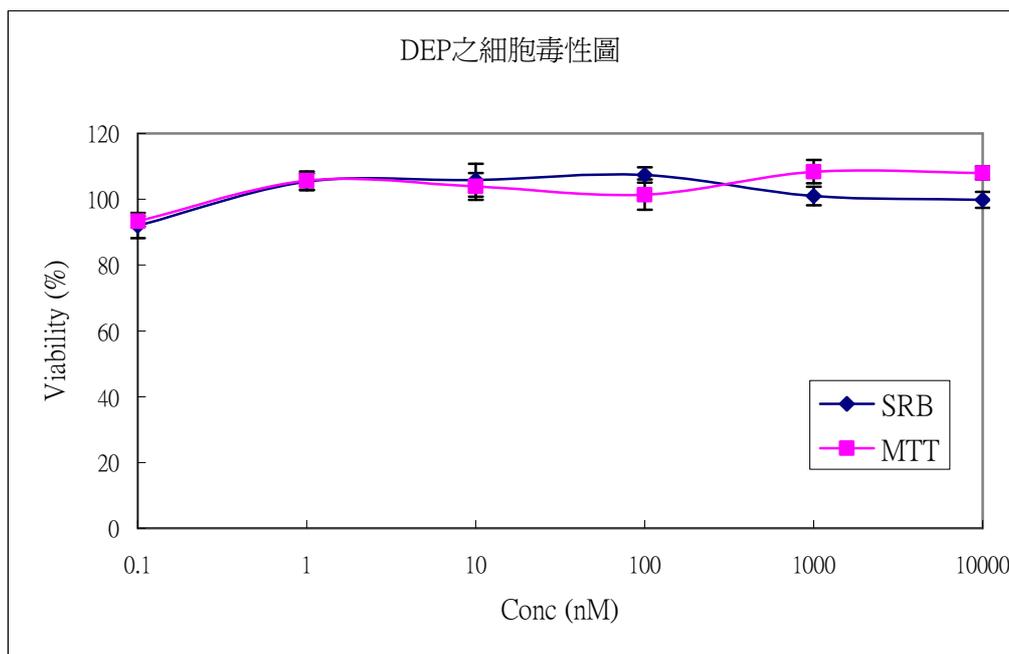


圖 4.10 、Diethyl phthalate (DEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

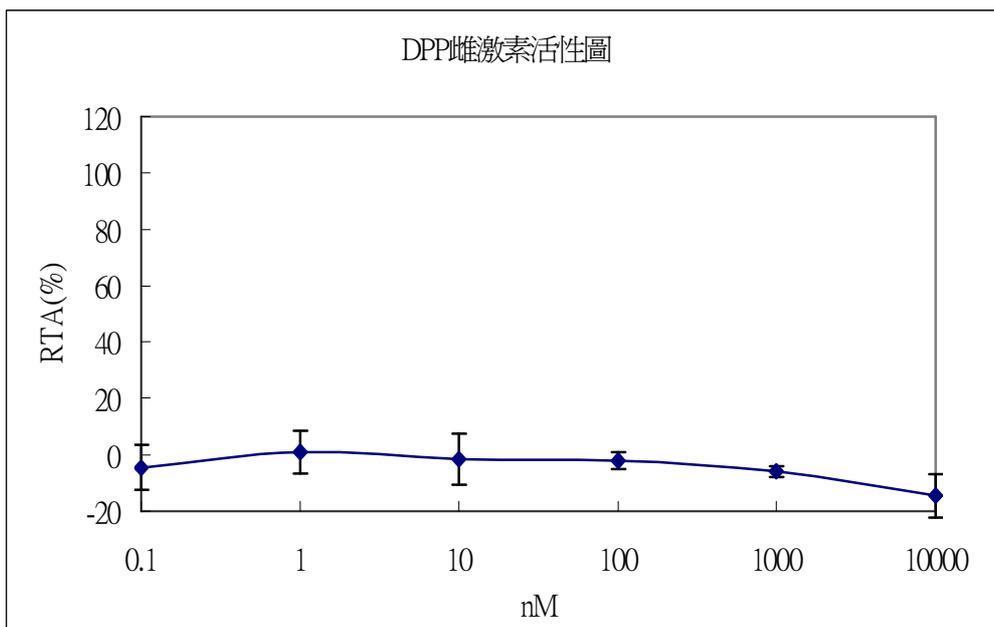
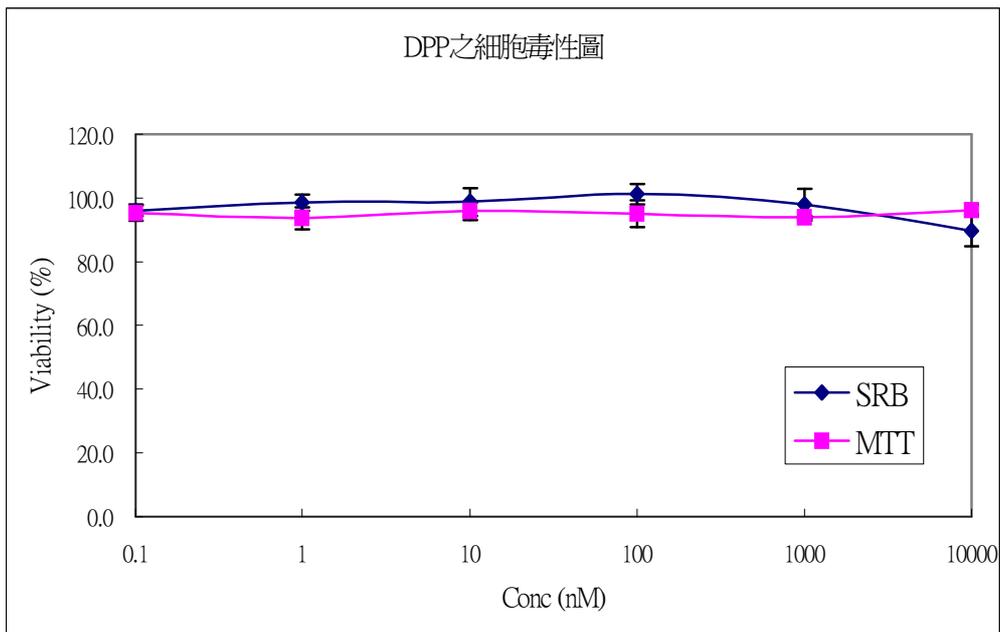


圖 4.11 、Dipentyl phthalate (DPP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

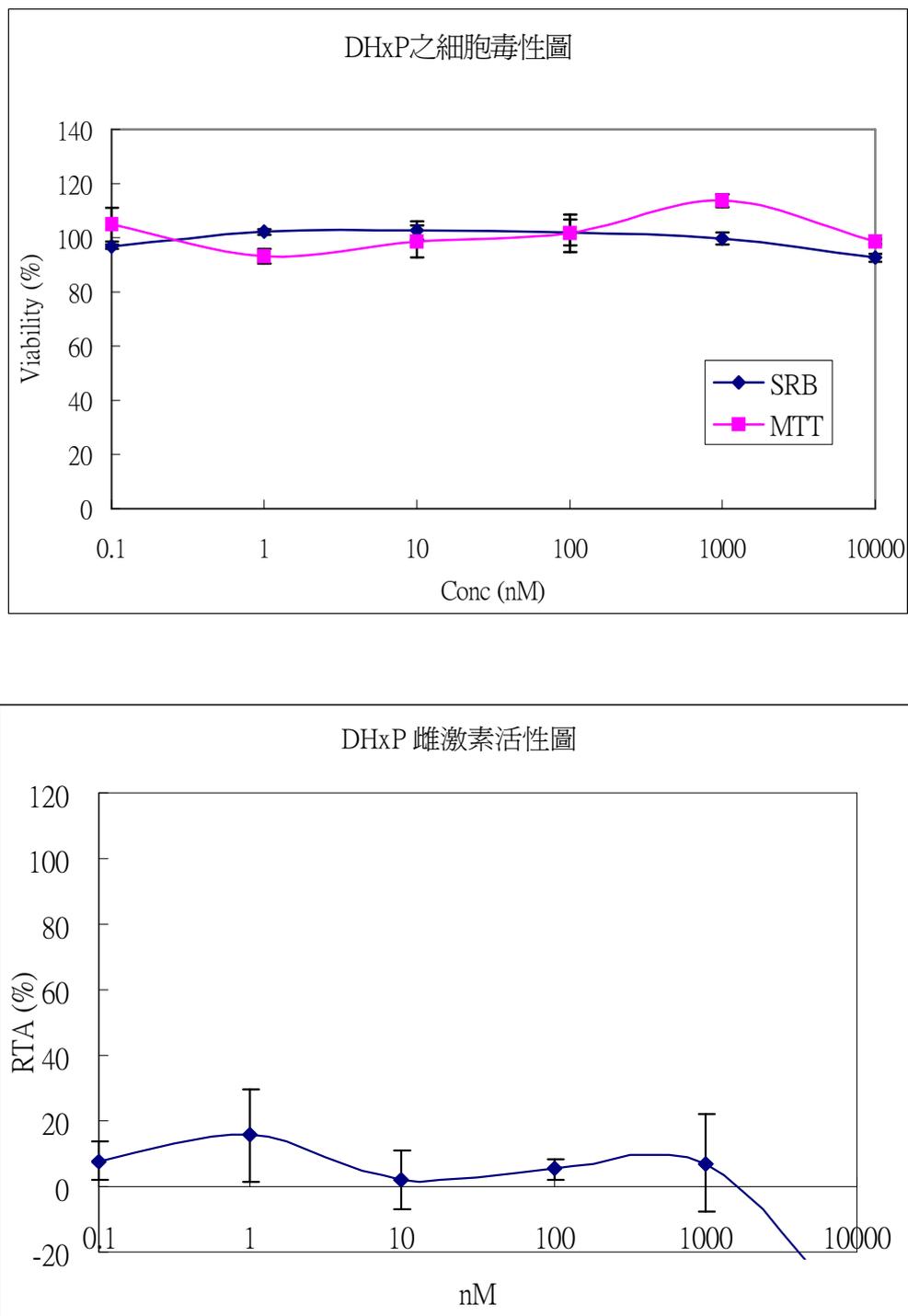


圖 4.12 、Dihexyl phthalate (DHxP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

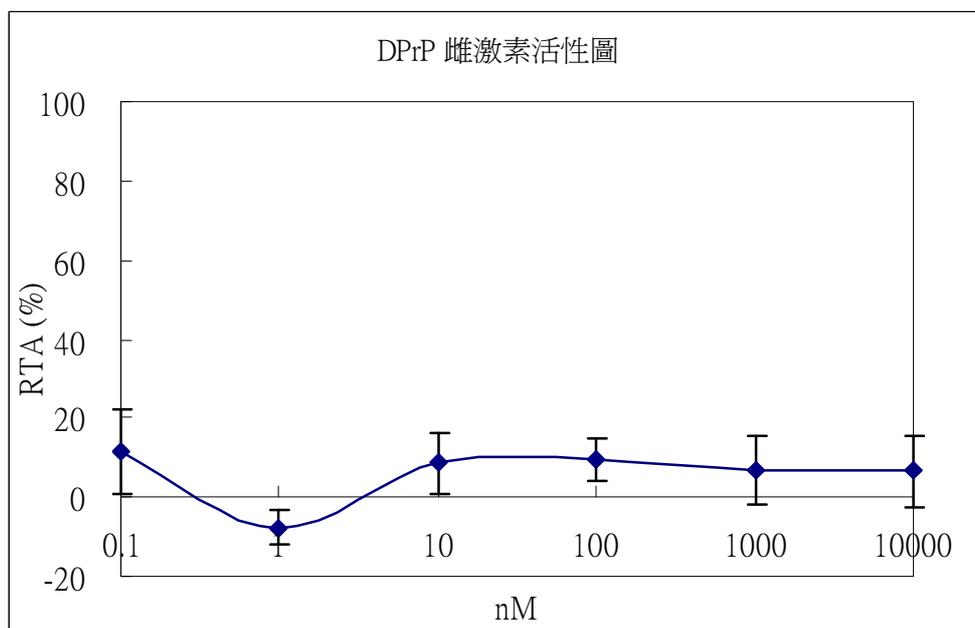
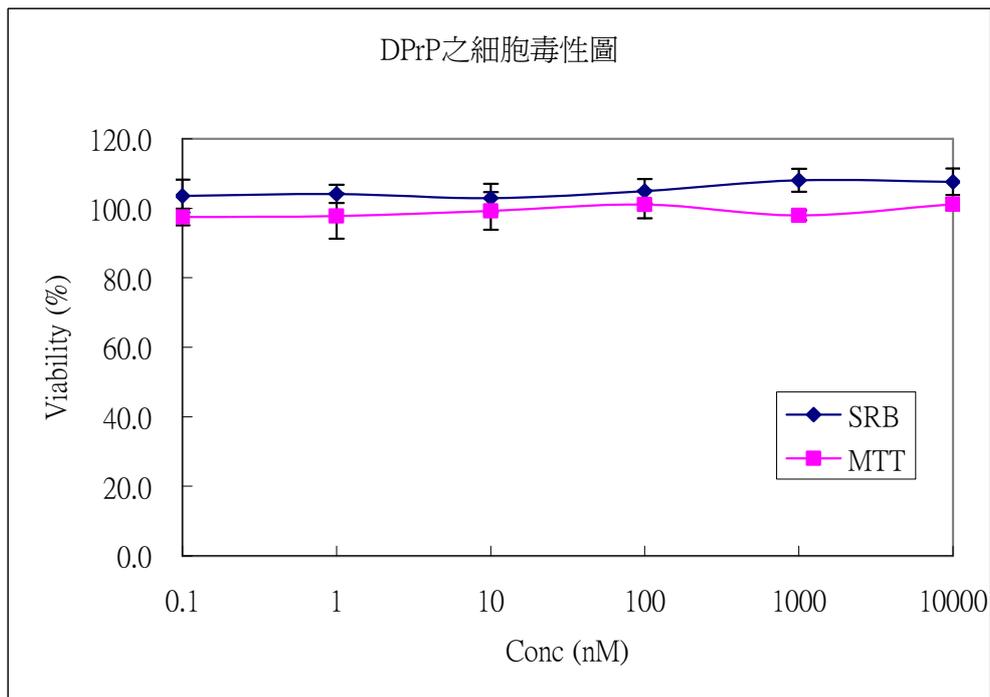


圖 4.13 、Dipropyl phthalate (DPrP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

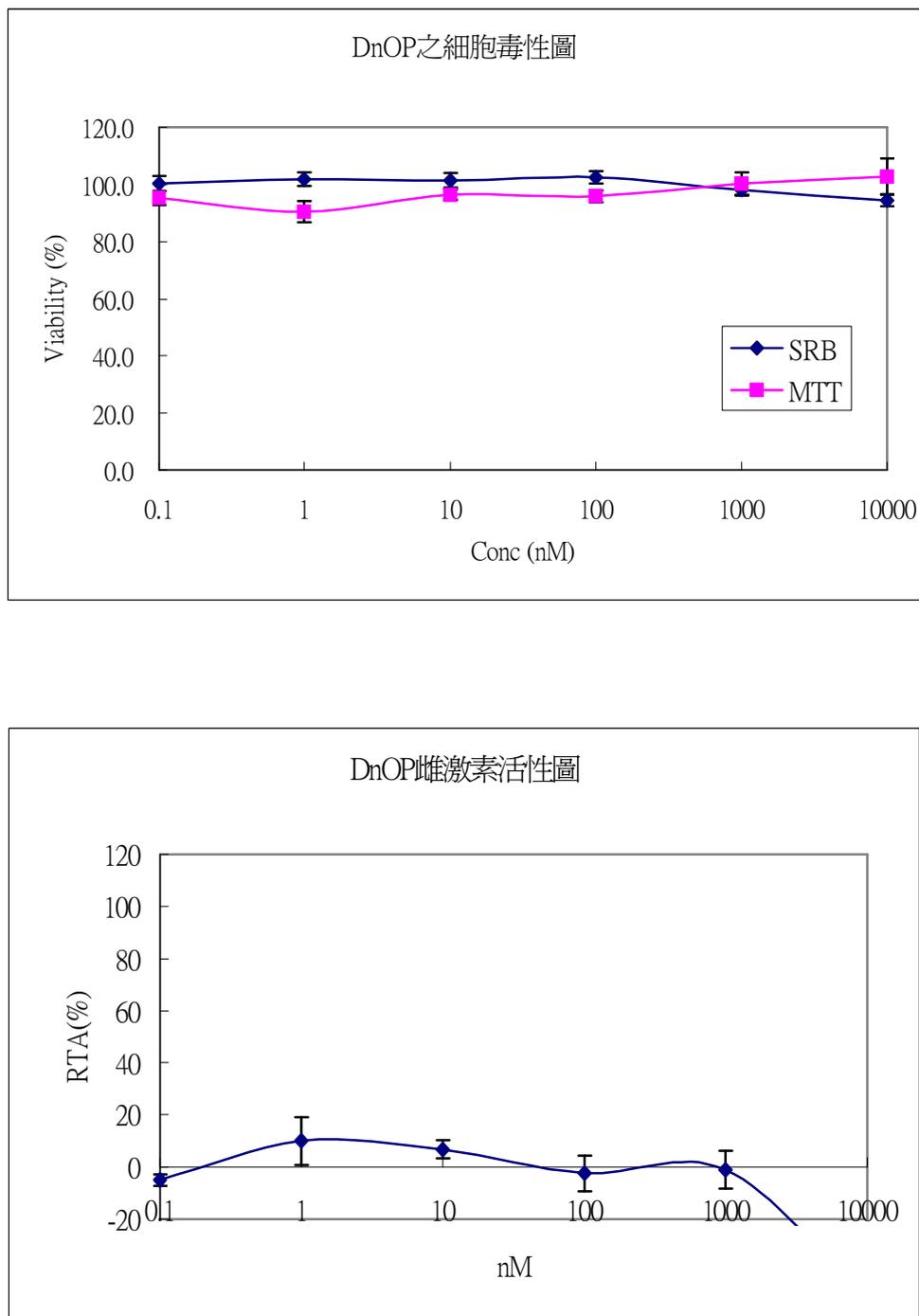


圖 4.14 、Di-n-octyl phthalate (DnOP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

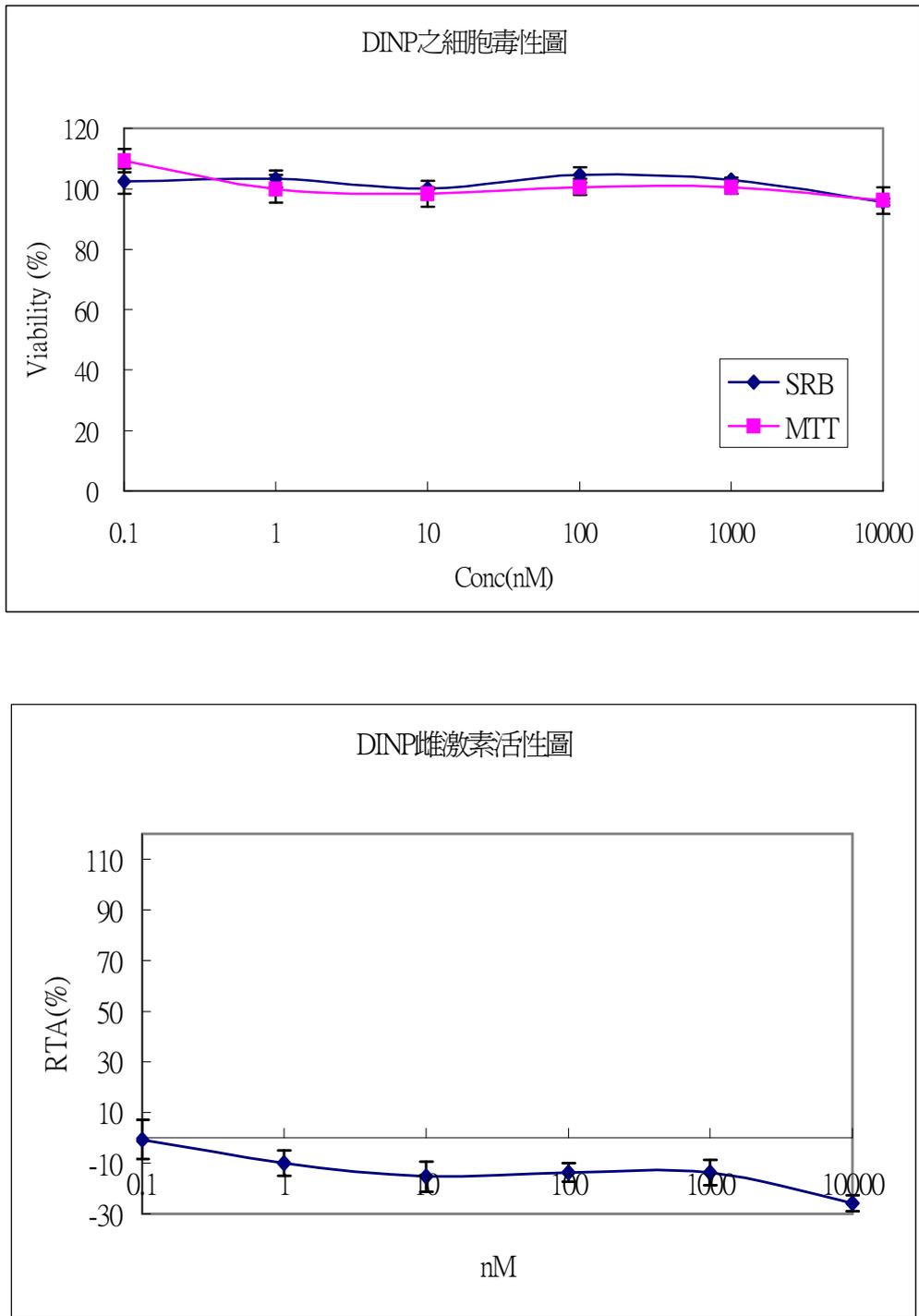


圖 4.15 、Diisononyl Phthalate (DINP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

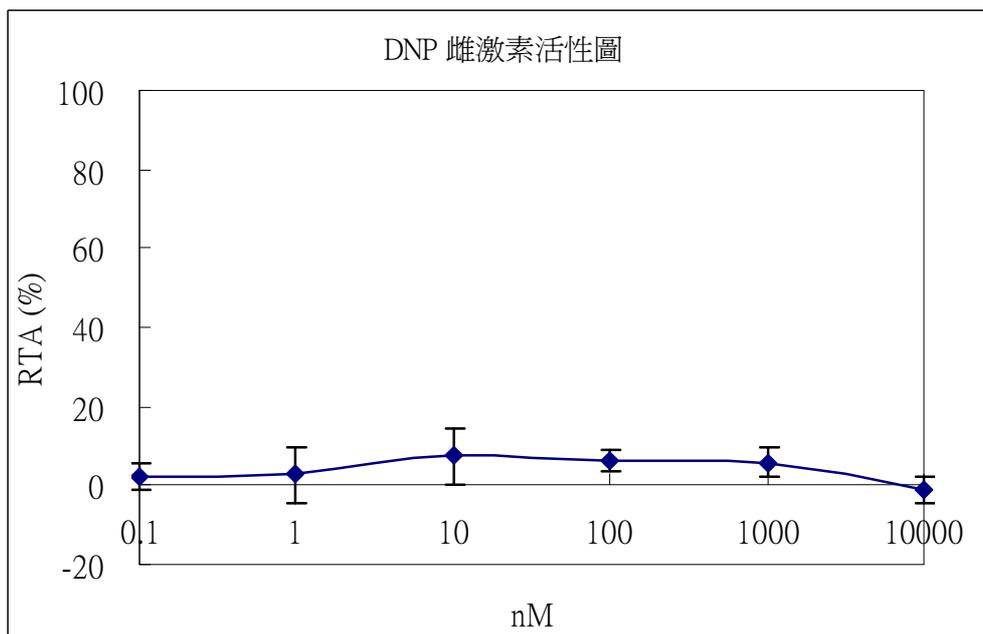
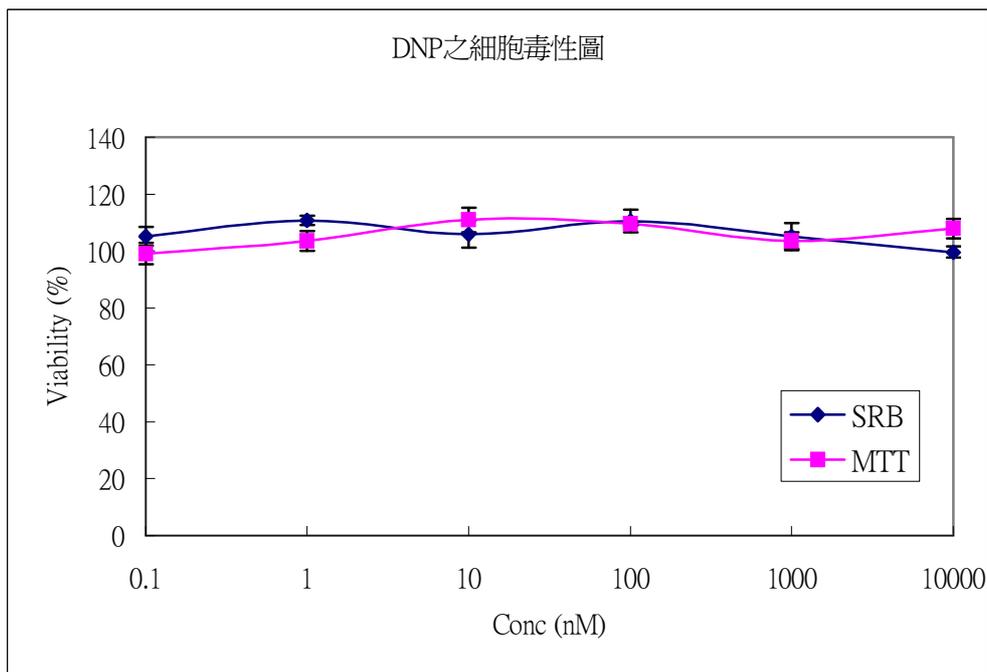


圖 4.16 、Dinonyl phthalate (DNP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

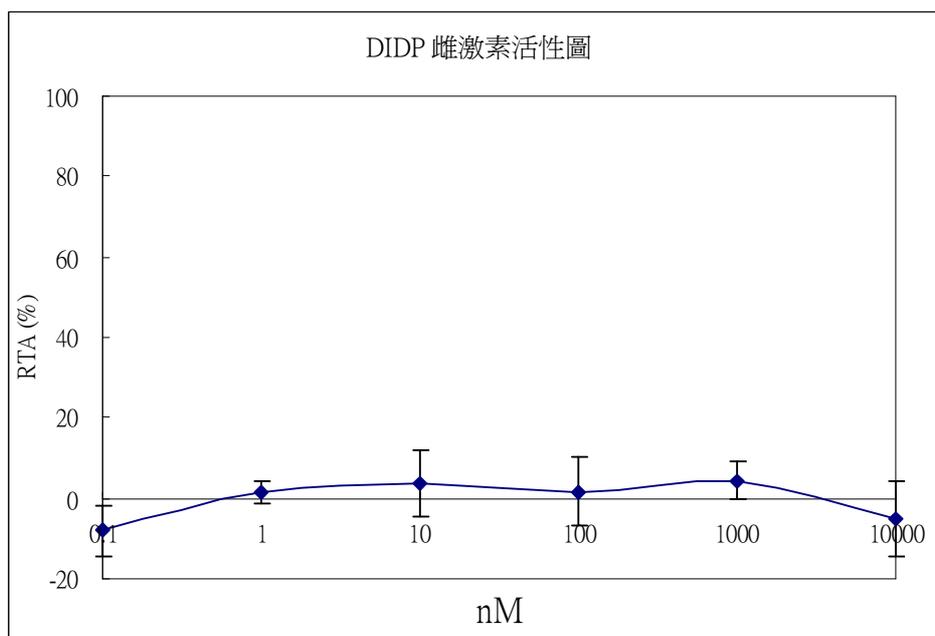
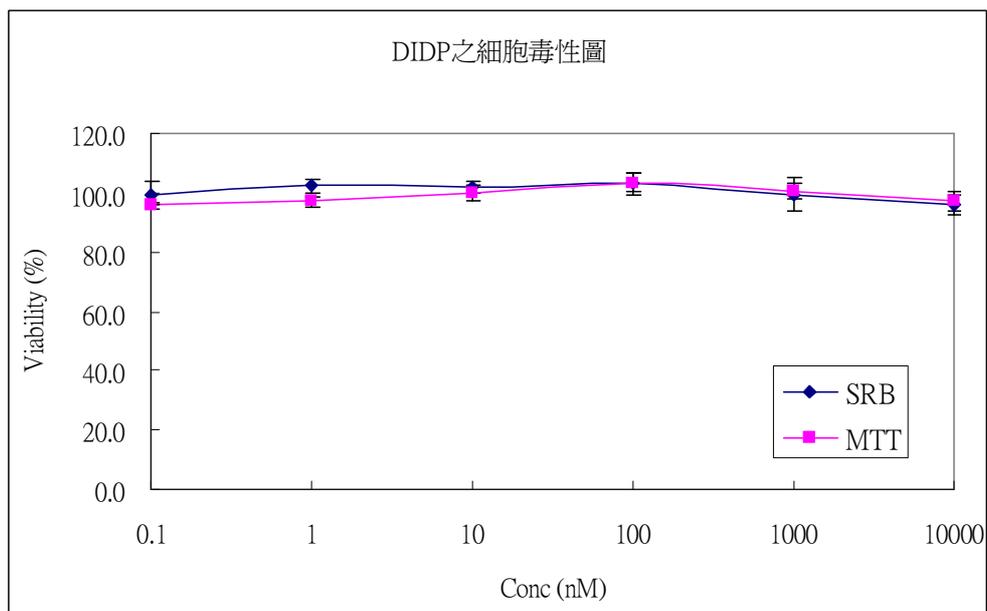


圖 4.17 、Diisodecyl phthalate (DIDP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

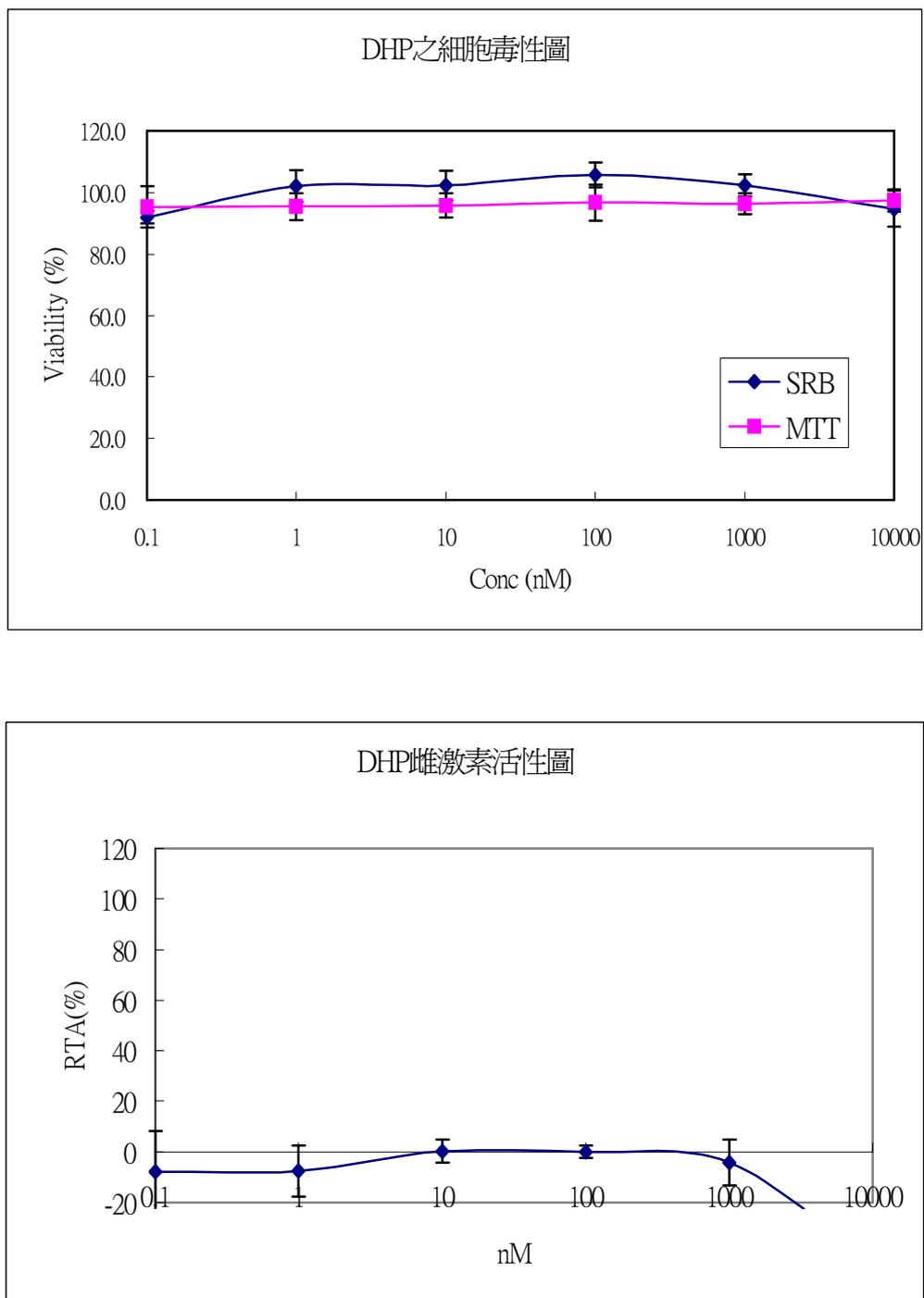


圖 4.18 、Diheptyl phthalate (DHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

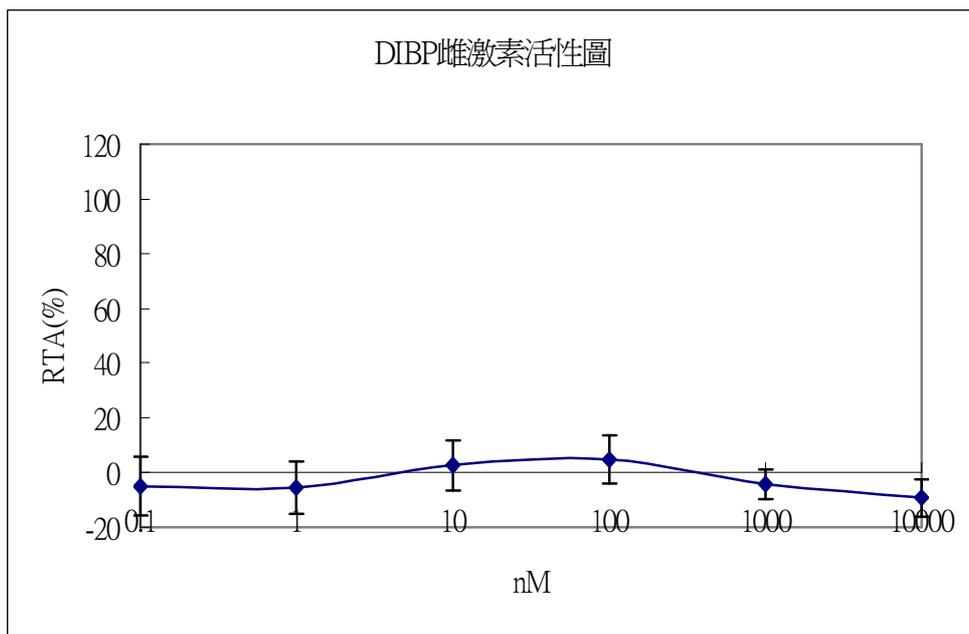
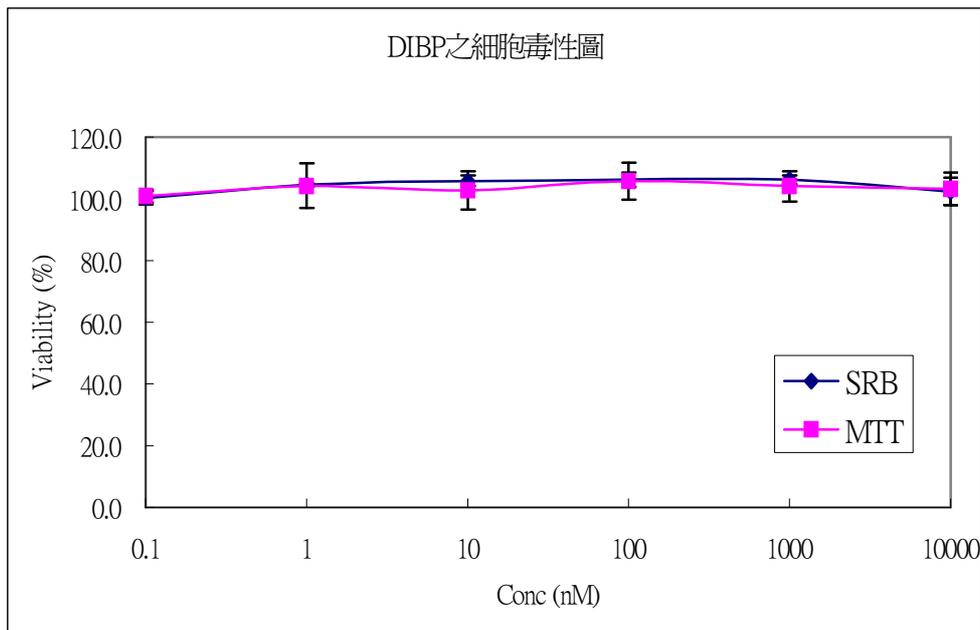


圖 4.19 、Diisobutyl phthalate (DIBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

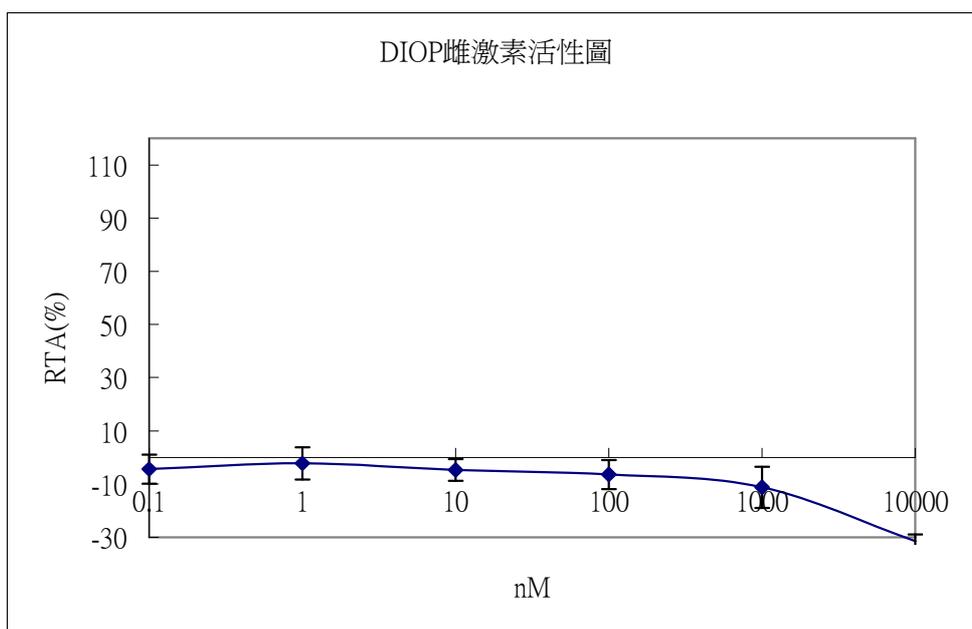
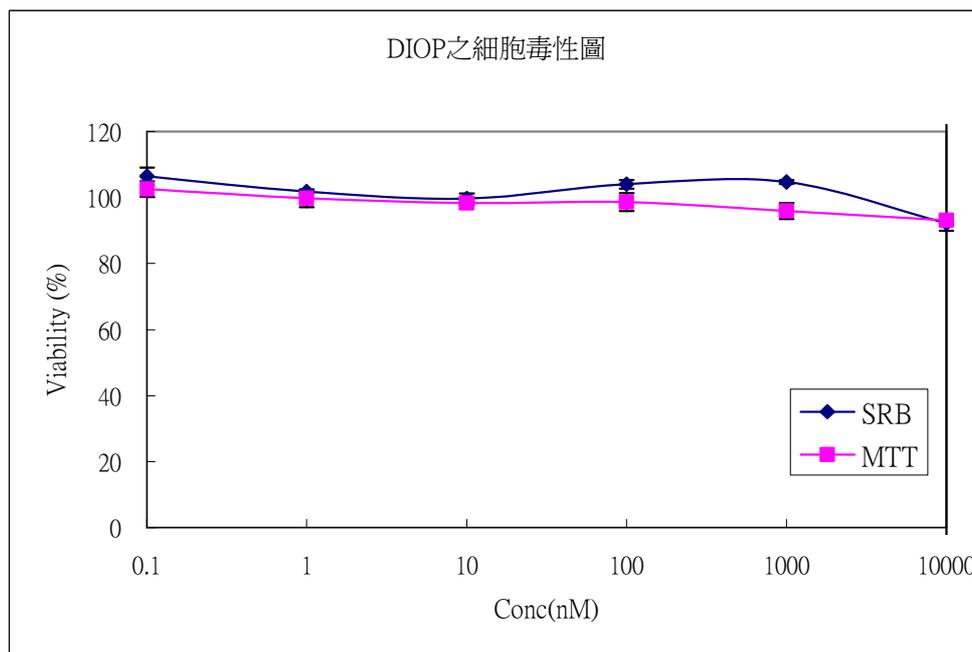


圖 4.20 、Diisooctyl Phthalate (DIOP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

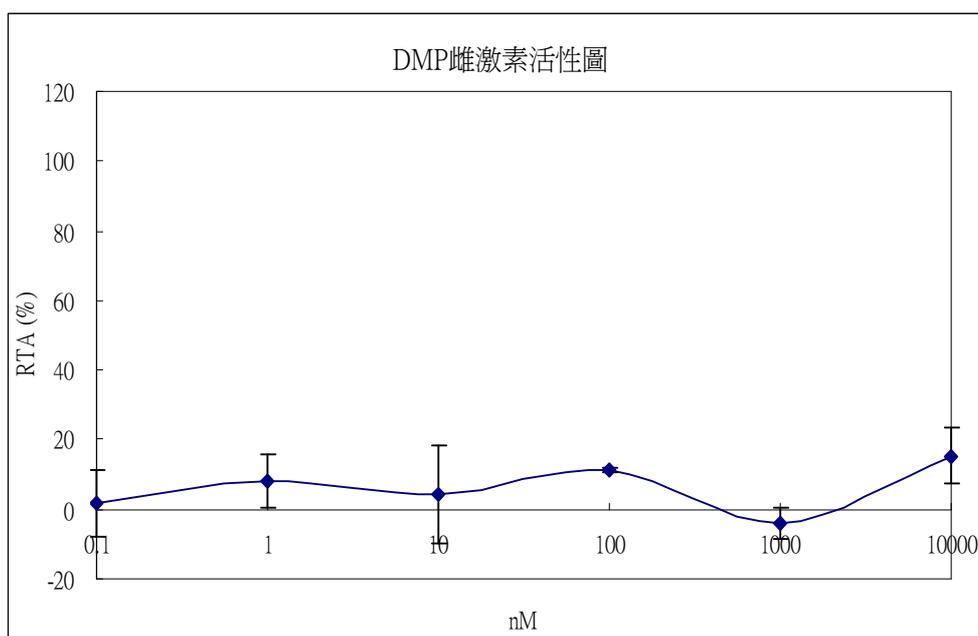
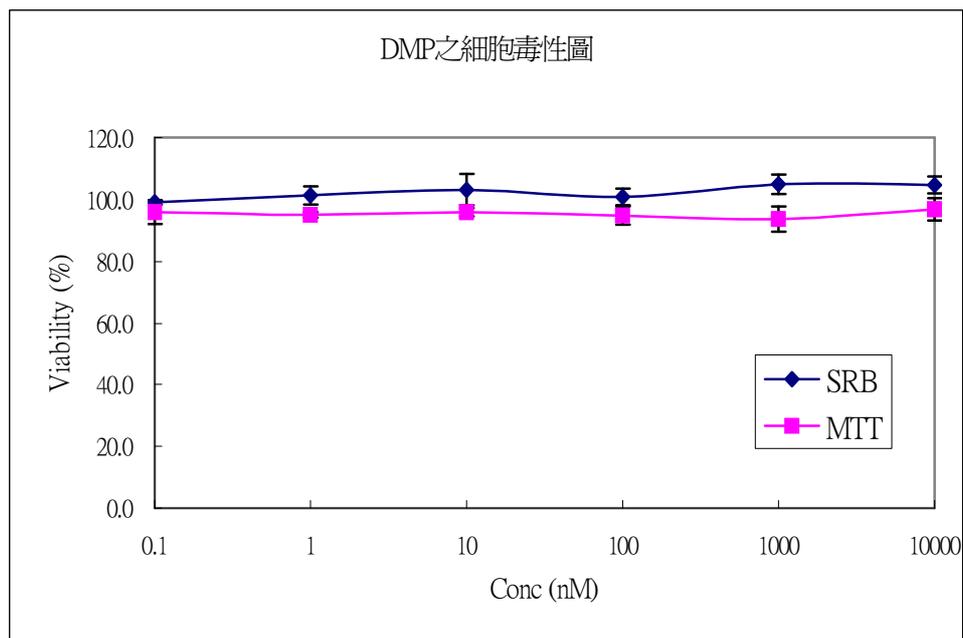


圖 4.21 、Dimethyl phthalate (DMP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

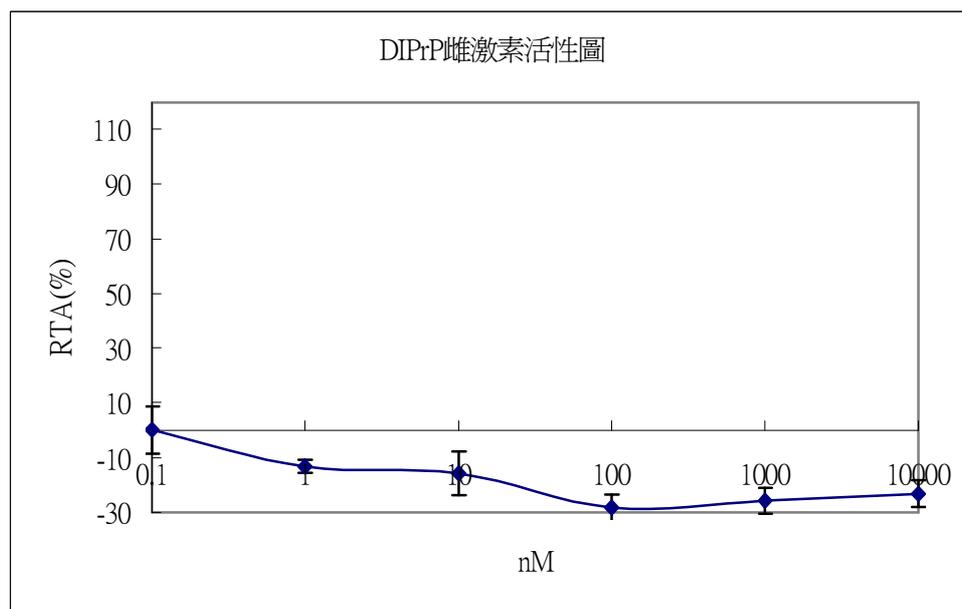
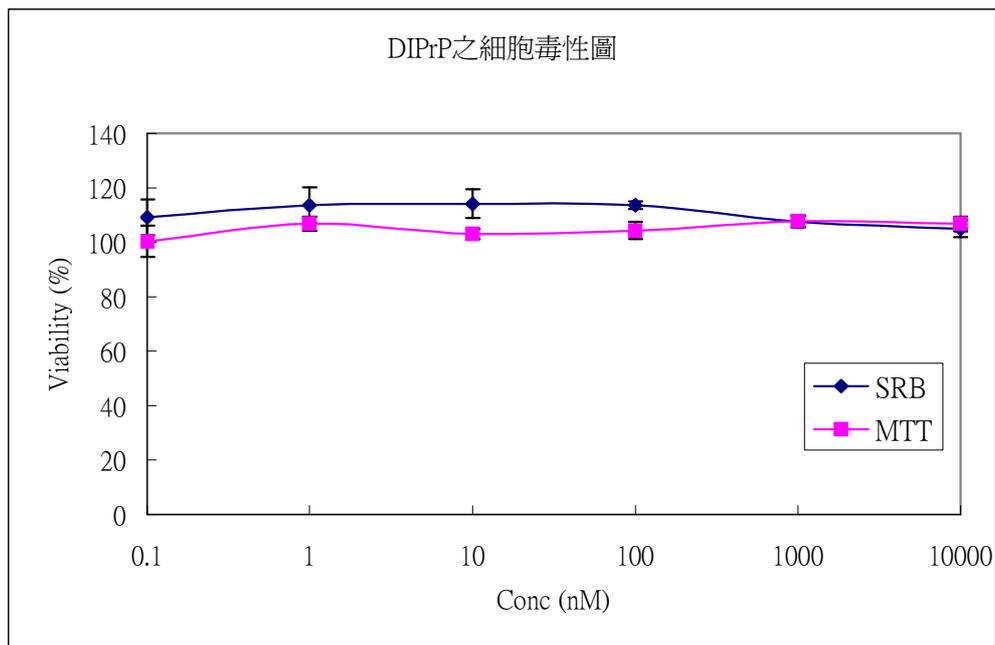


圖 4.22 、Diisopropyl phthalate (DIPrP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

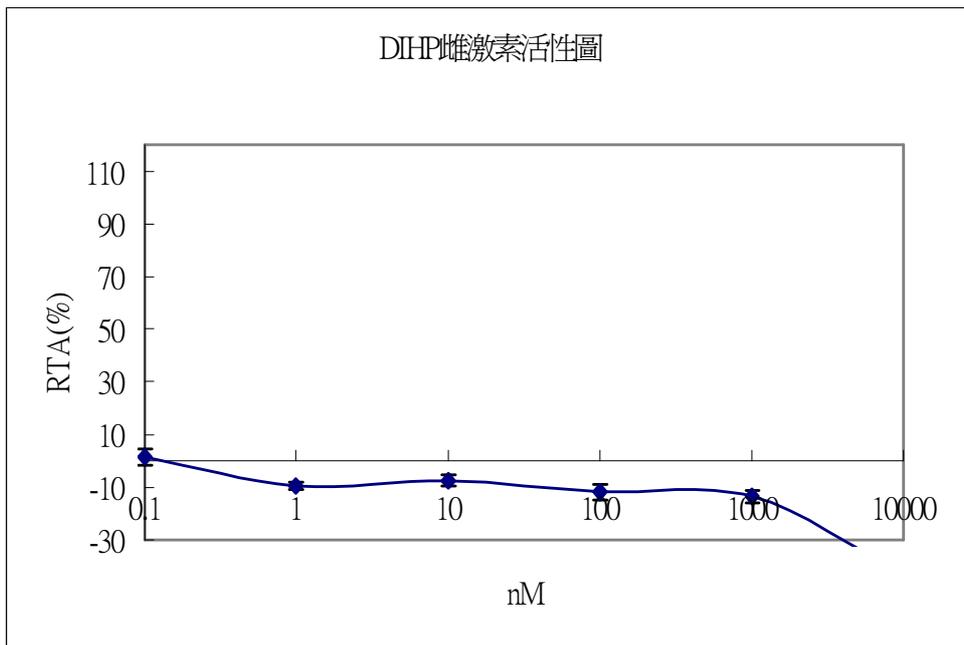
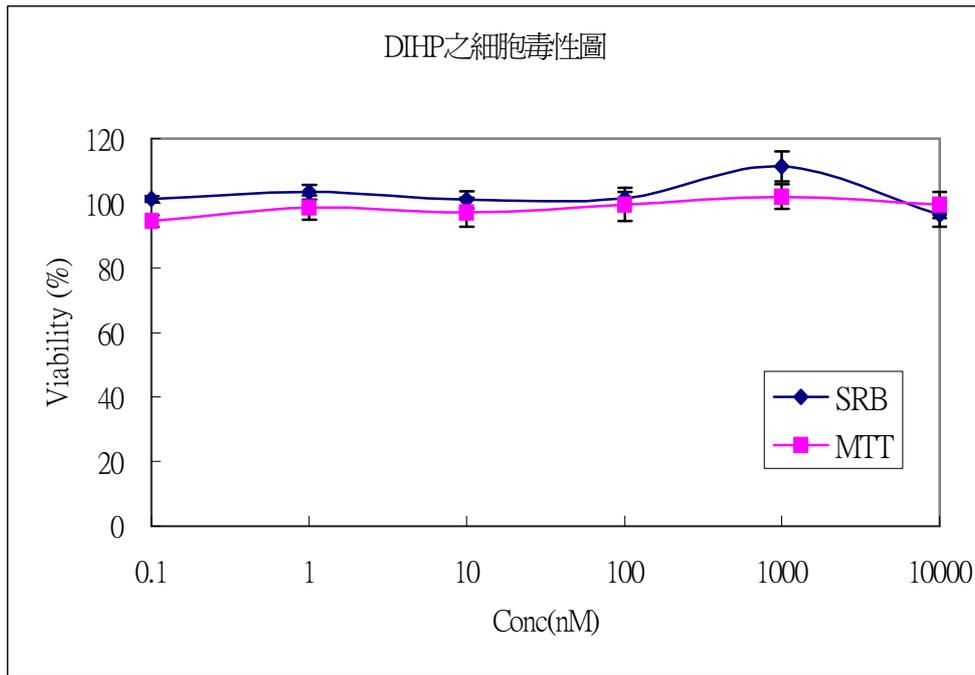


圖 4.23 、 Diisooheptyl Phthalate (DIHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

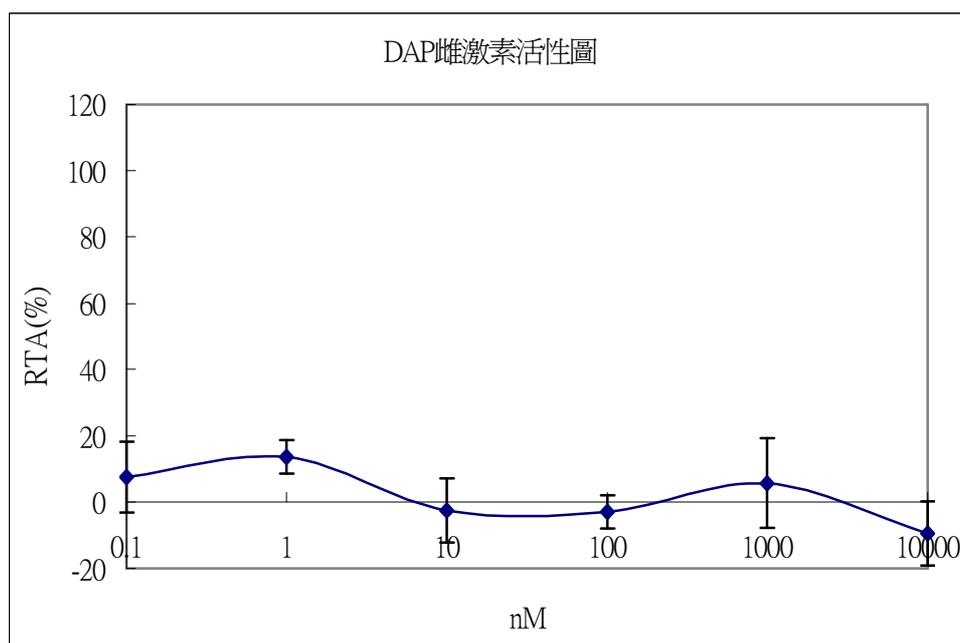
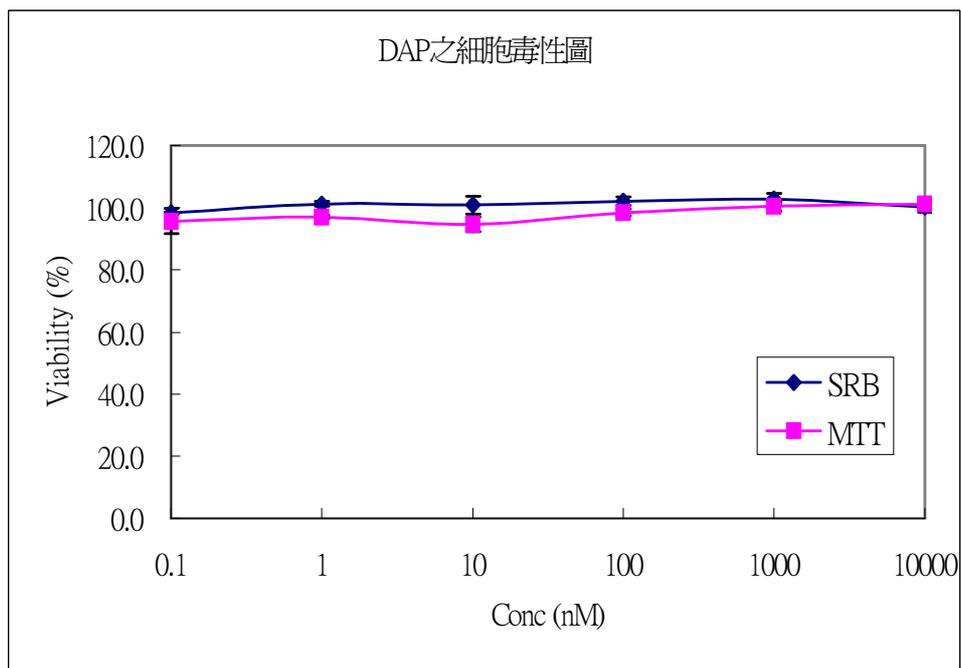


圖 4.24 、Diallyl phthalate (DAP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

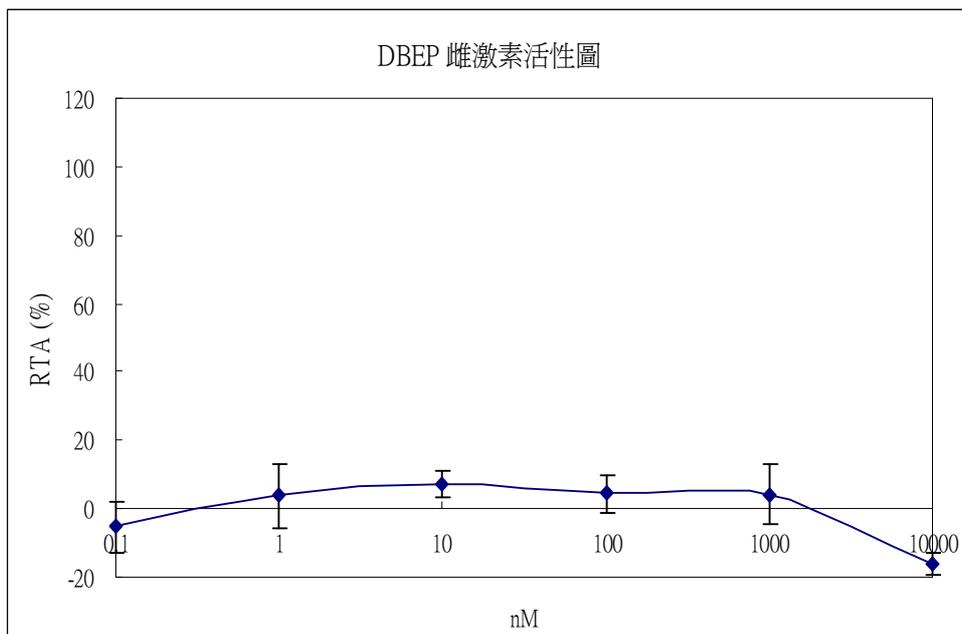
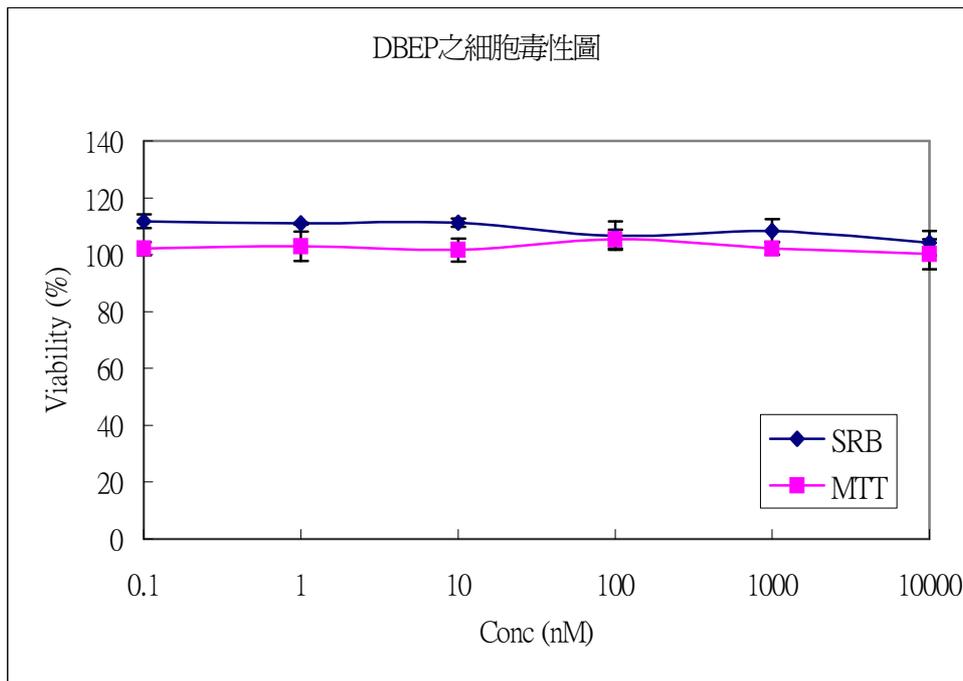


圖 4.25 、Dibutoxyethyl phthalate (DBEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

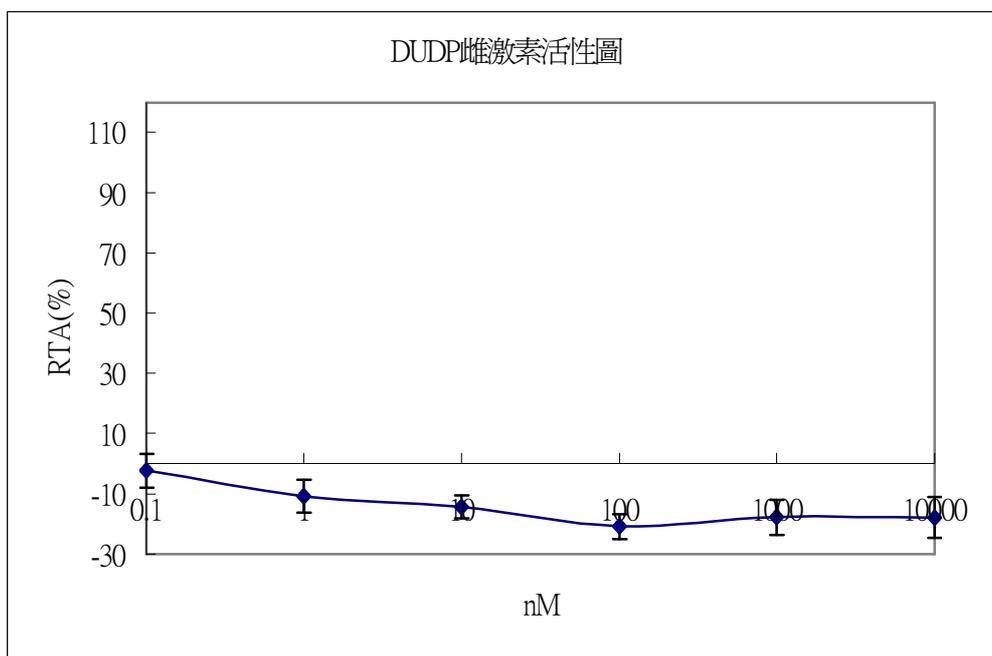
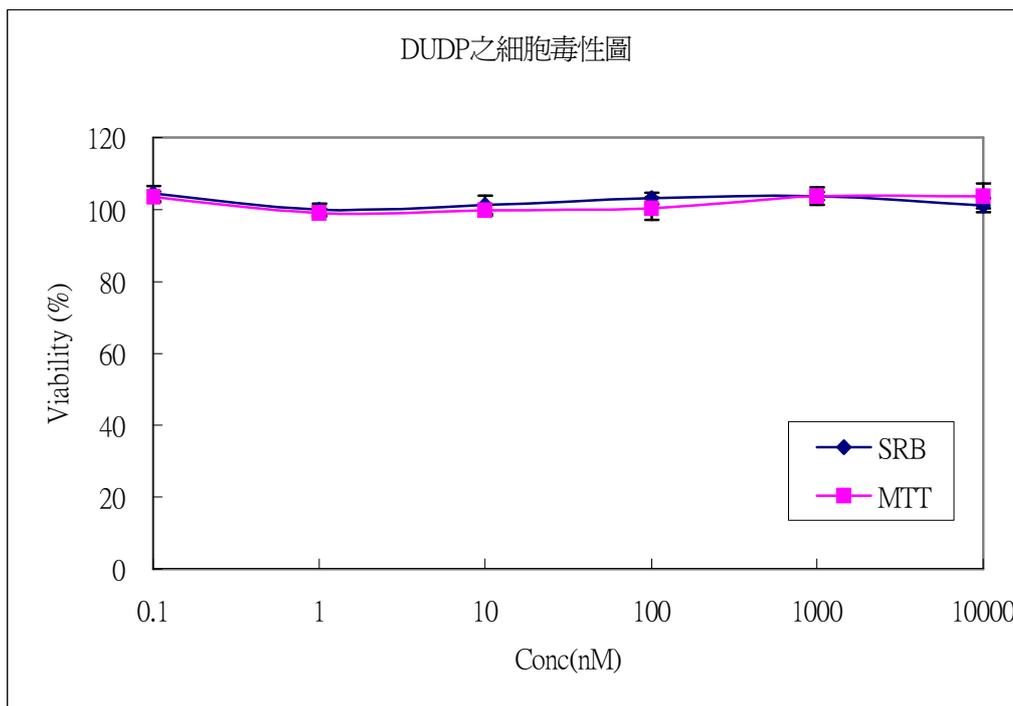


圖 4.26 、Diundecyl Phthalate (DUDP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

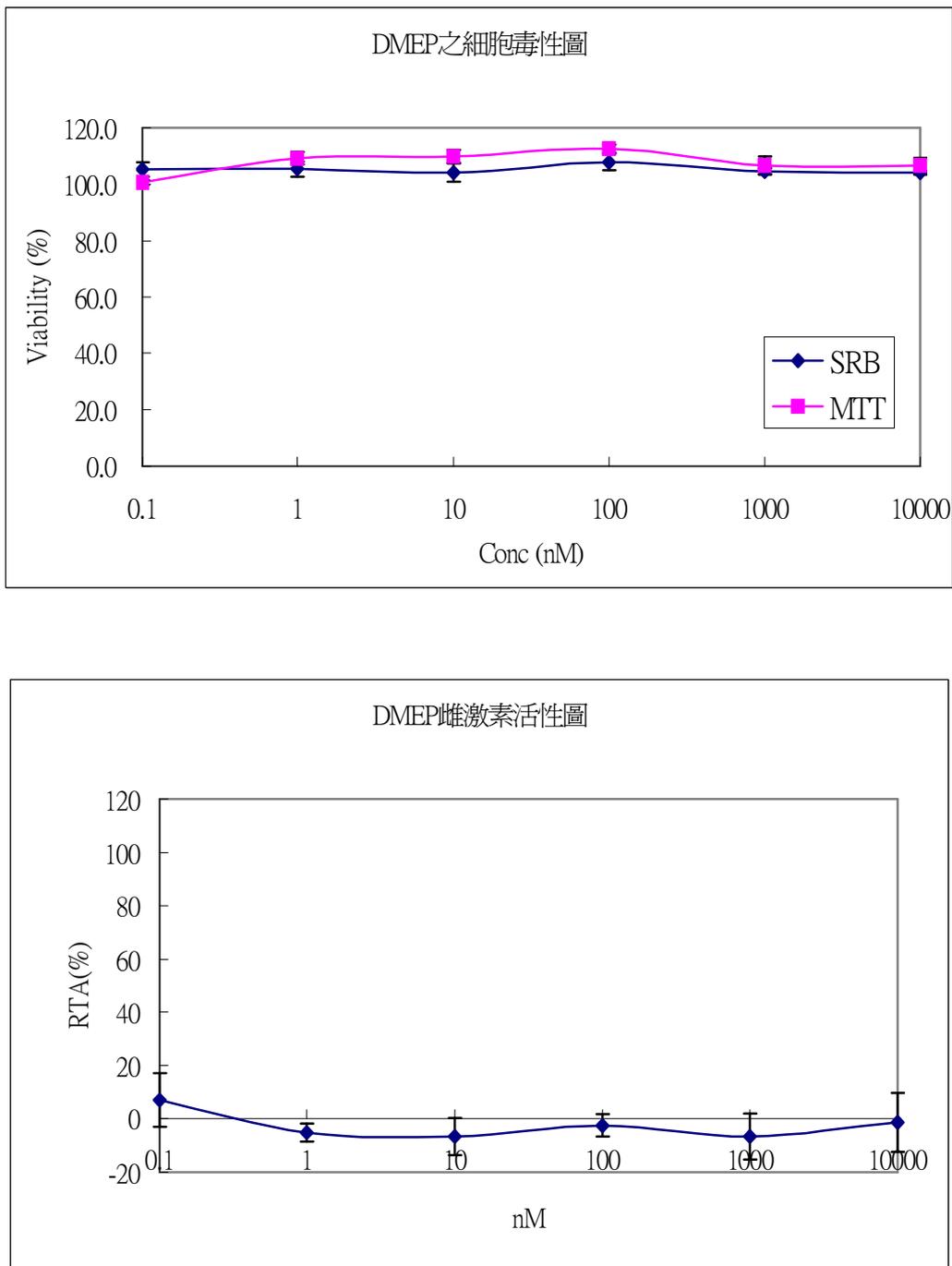
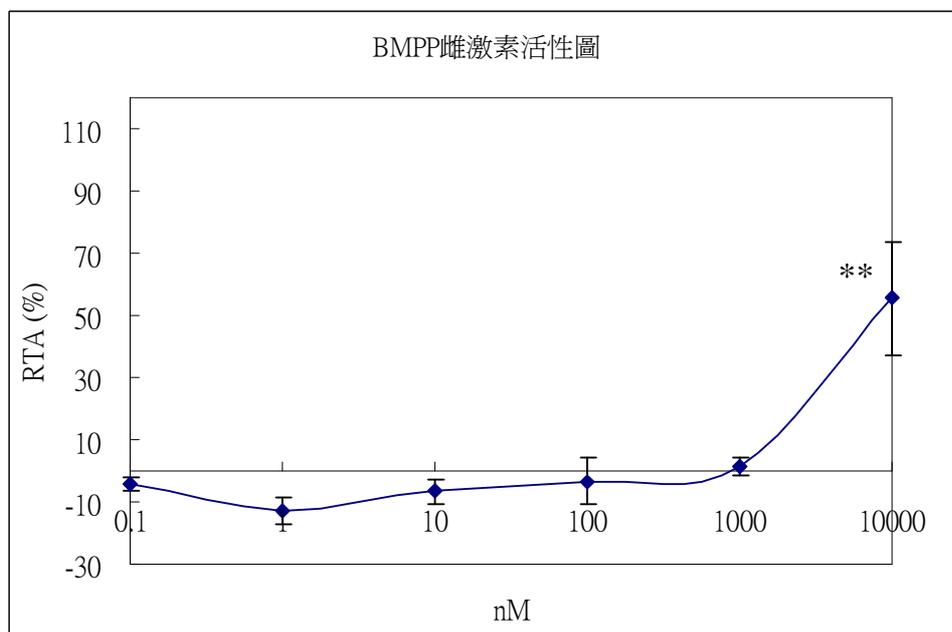
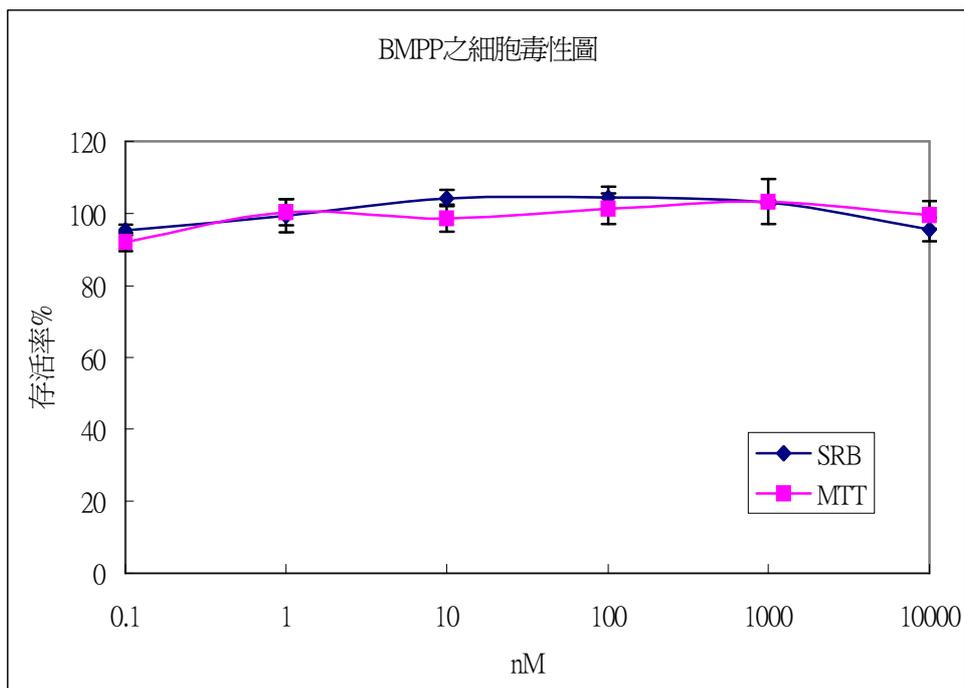
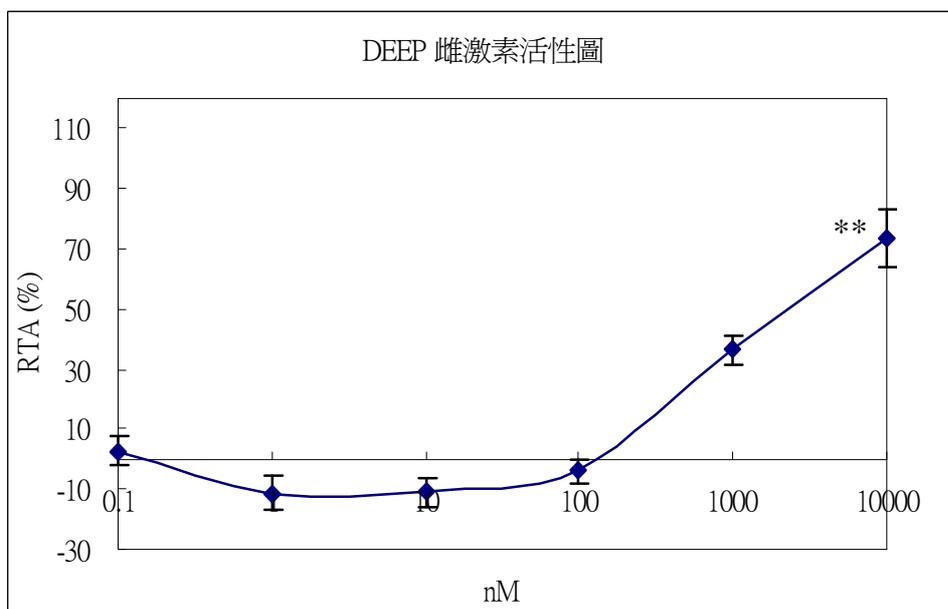
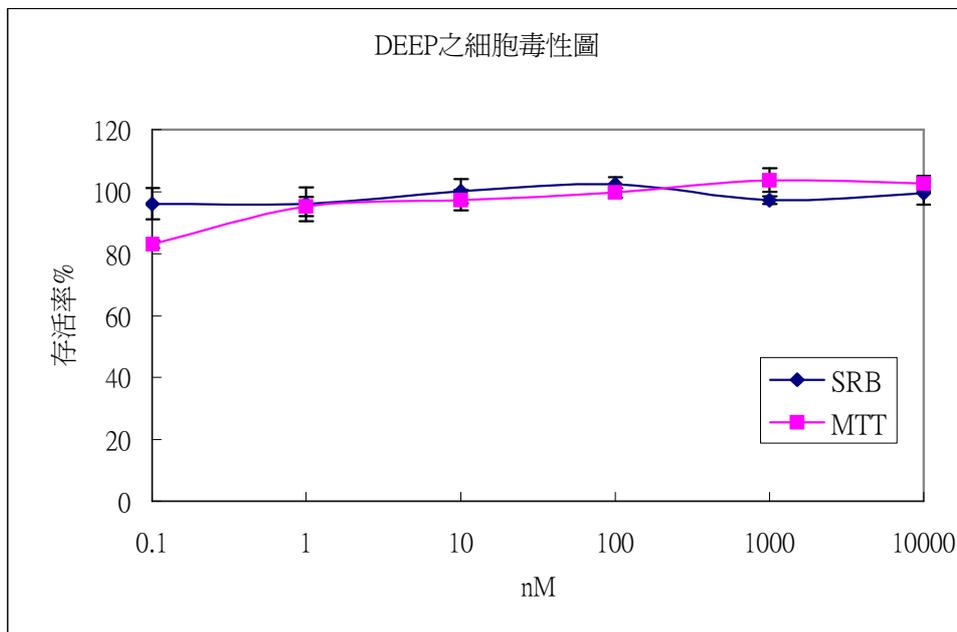


圖 4.27 、Dimethoxyethyl phthalate (DMEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)



\*\* There was a significant difference between the RTA % of the sample and the negative control according to Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ).

圖 4.28 、 Bis(4-methyl-2pentyl) Phthalate (BMPP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)



\*\* There was a significant difference between the RTA % of the sample and the negative control according to Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ).

圖 4.29 、Diethoxyethyl Phthalate (DEEP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

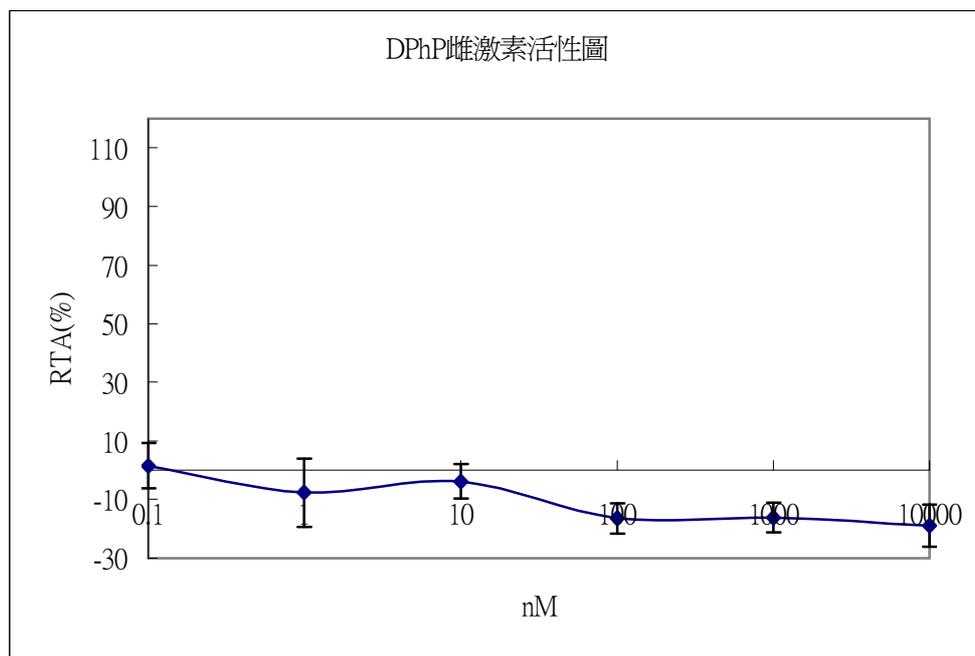
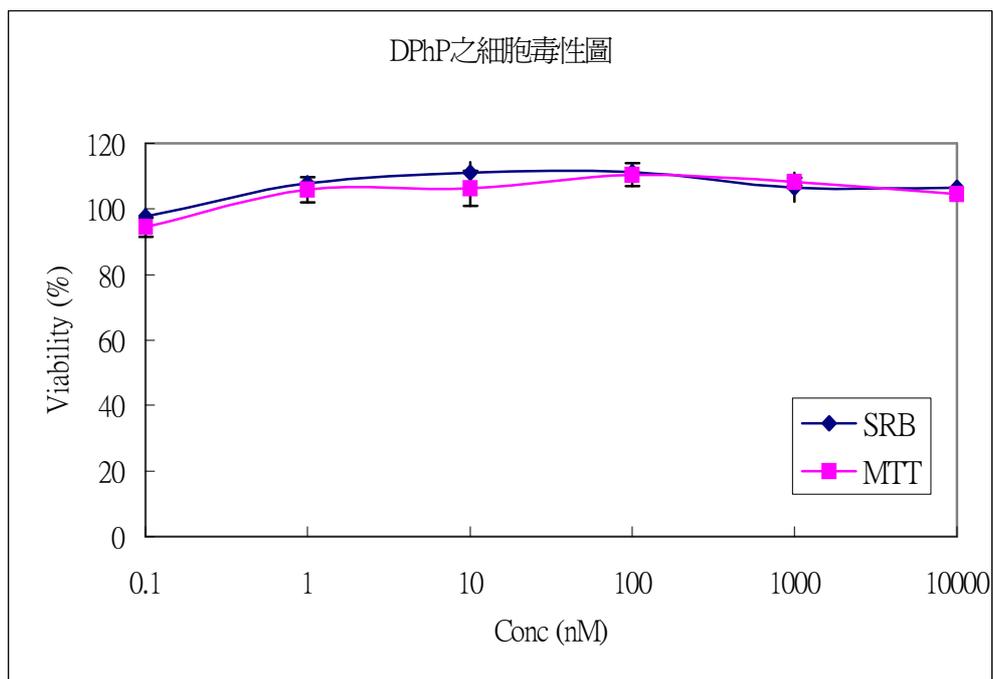
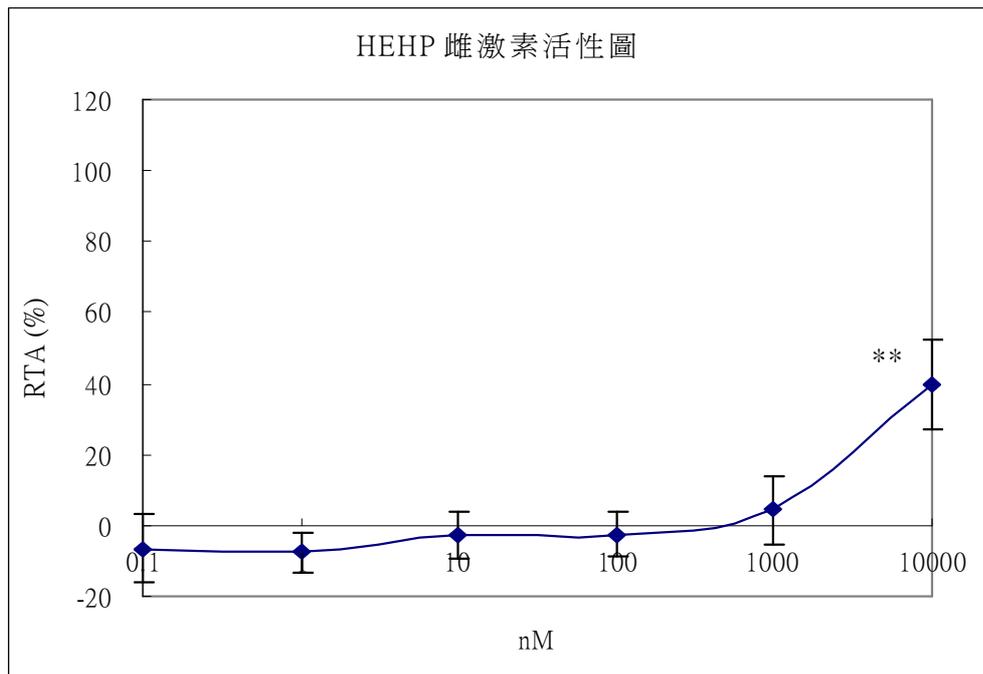
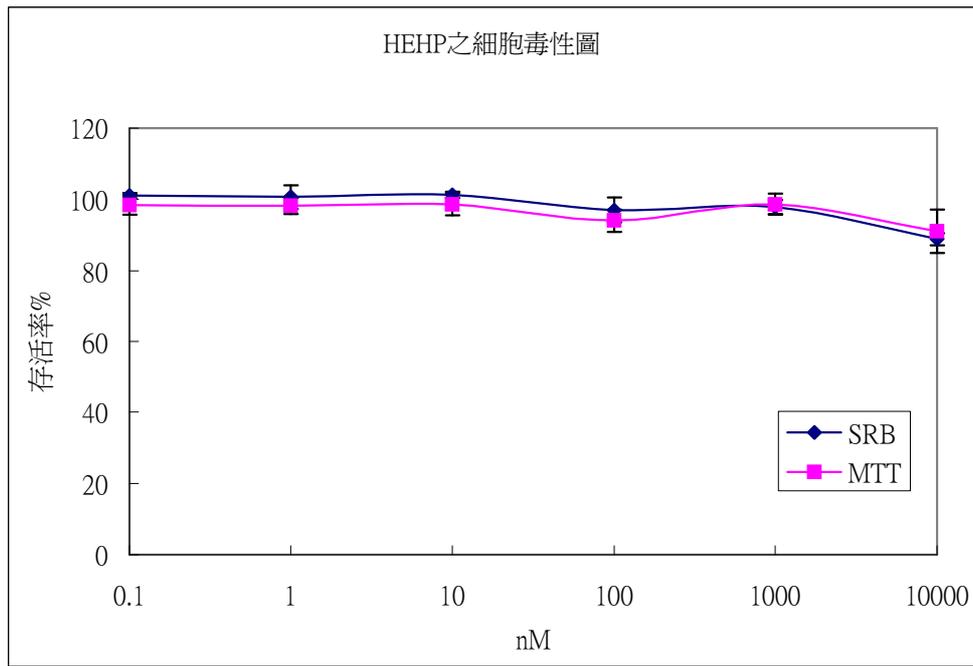


圖 4.30 、Diphenyl phthalate (DPhP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)



\*\* There was a significant difference between the RTA % of the sample and the negative control according to Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ).

圖 4.31 、Hexyl-2-ethylhexyl Phthalate (HEHP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

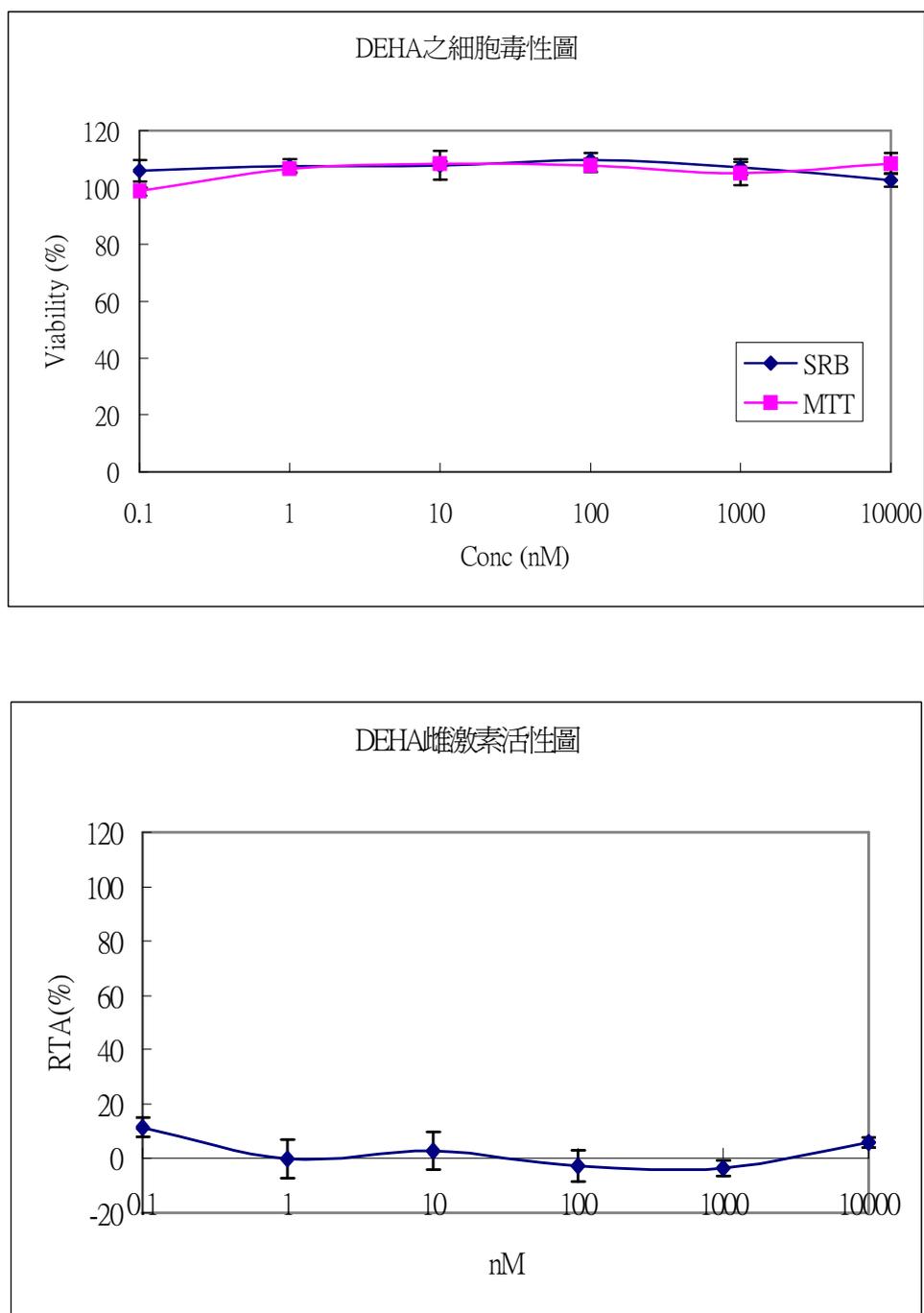


圖 4.32 、Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

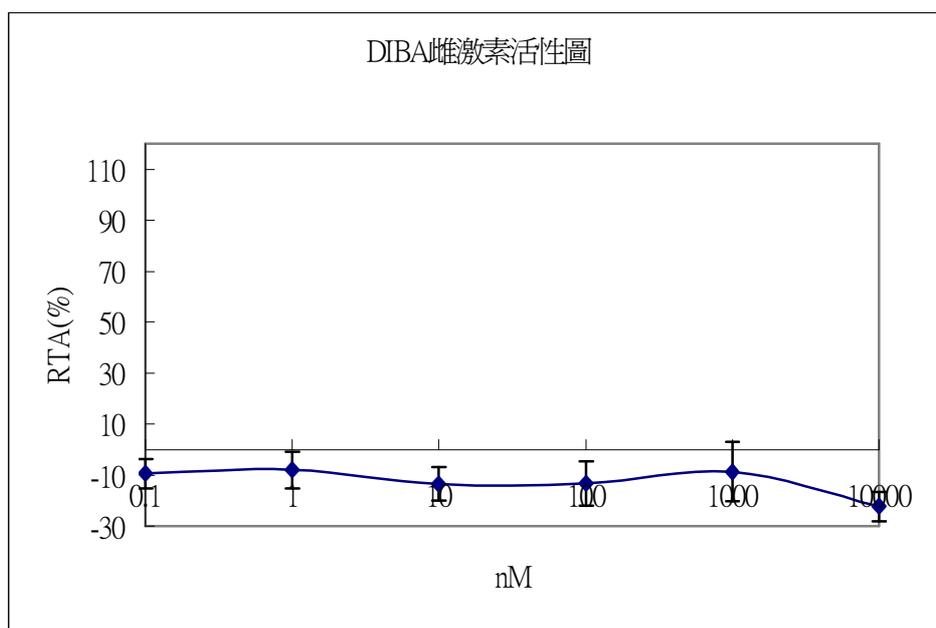
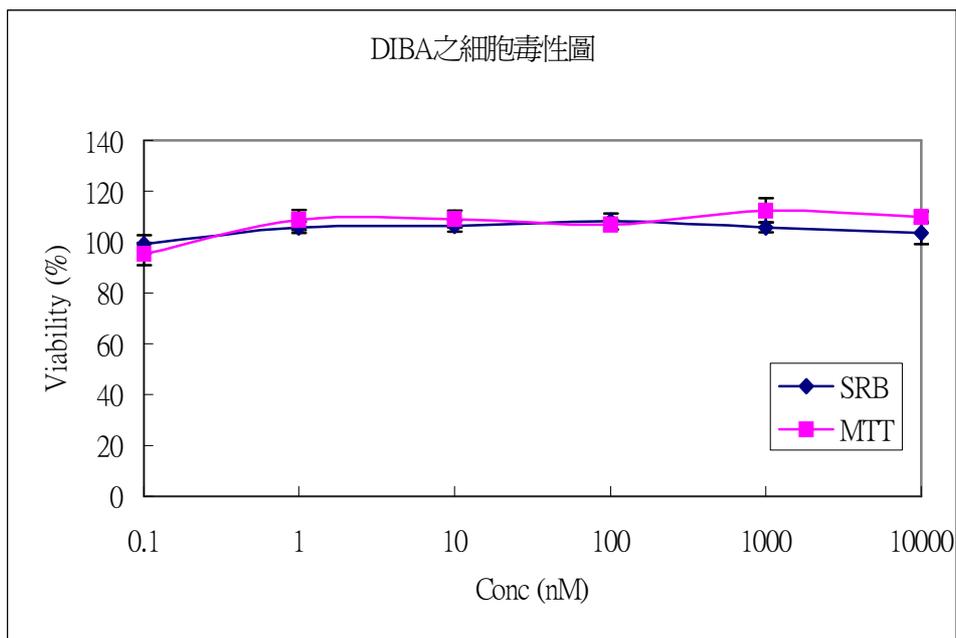


圖 4.33 、Diisobutyl Adipate (DIBA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

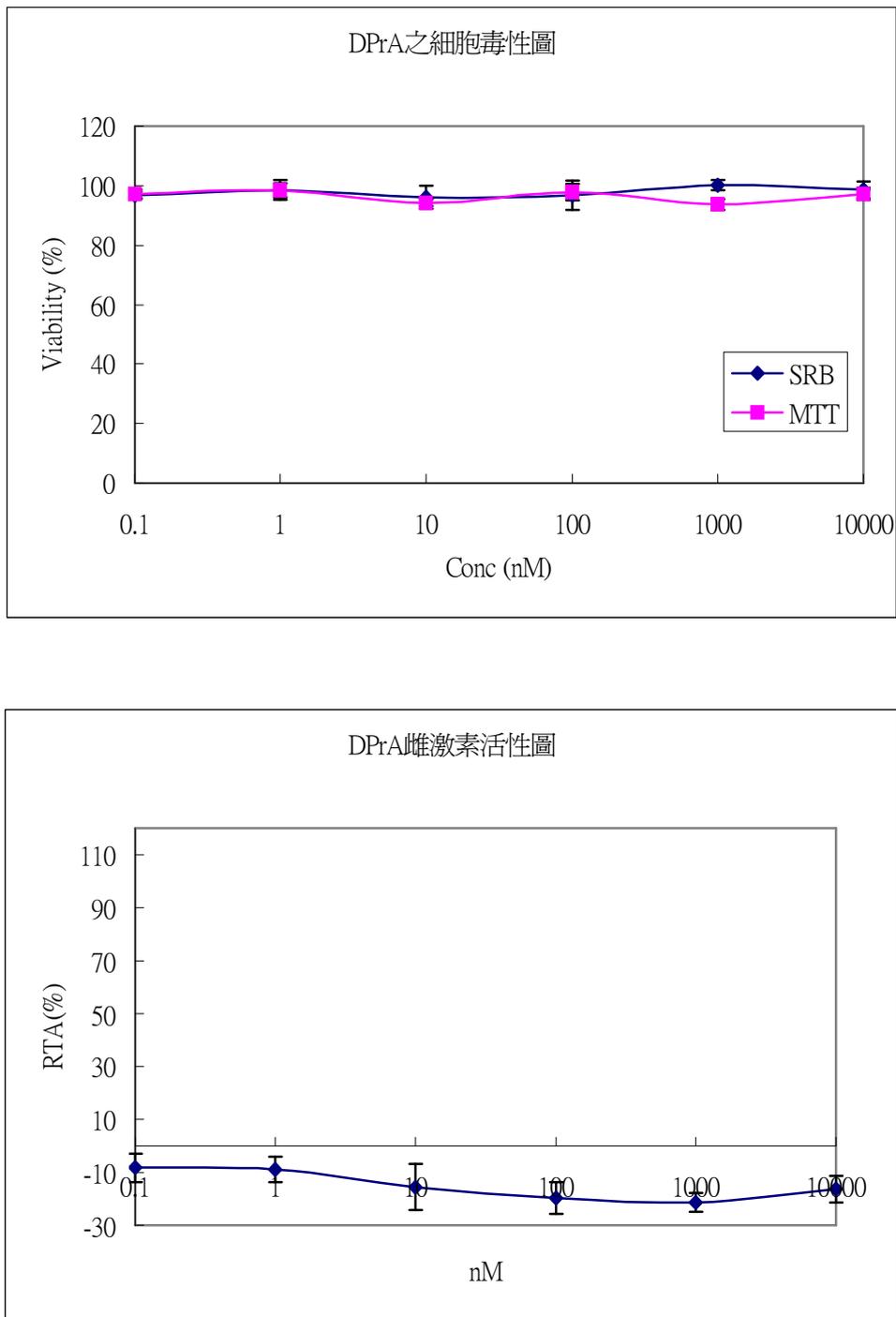


圖 4.34 、Di-n-propyl Adipate (DPrA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

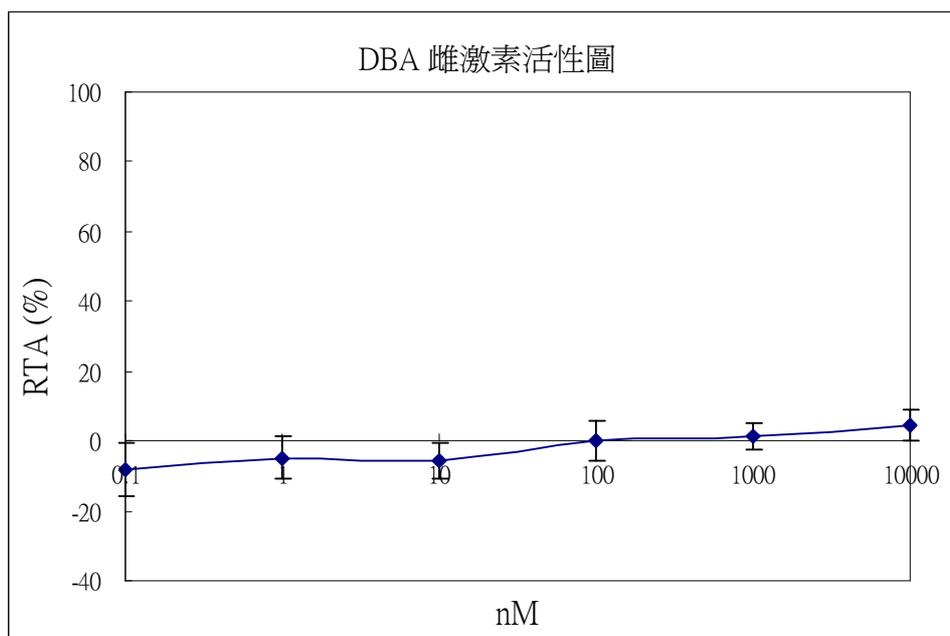
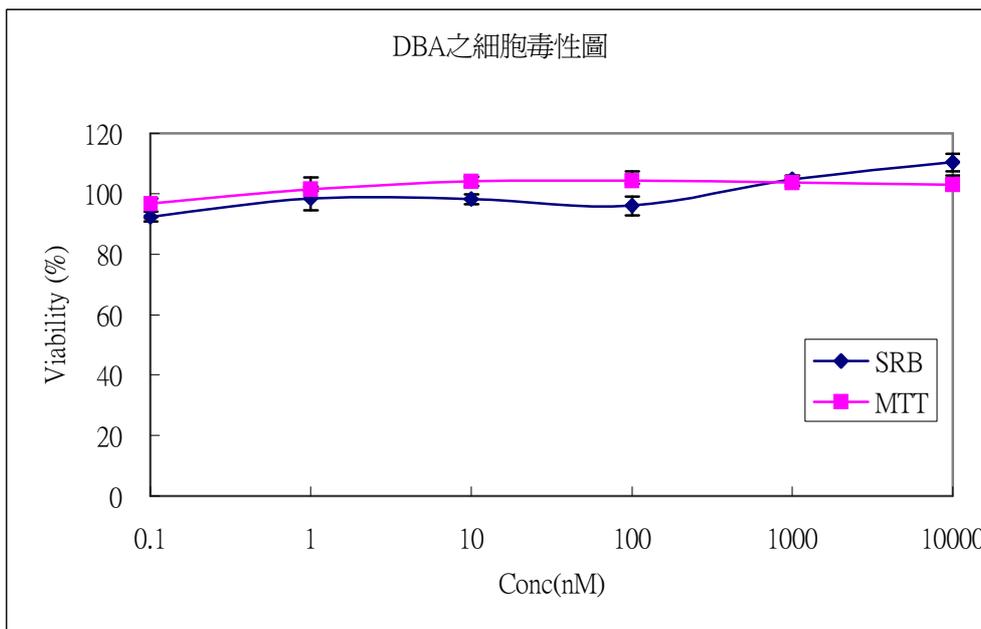


圖 4.35 、Di-n-butyl adipate (DBA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

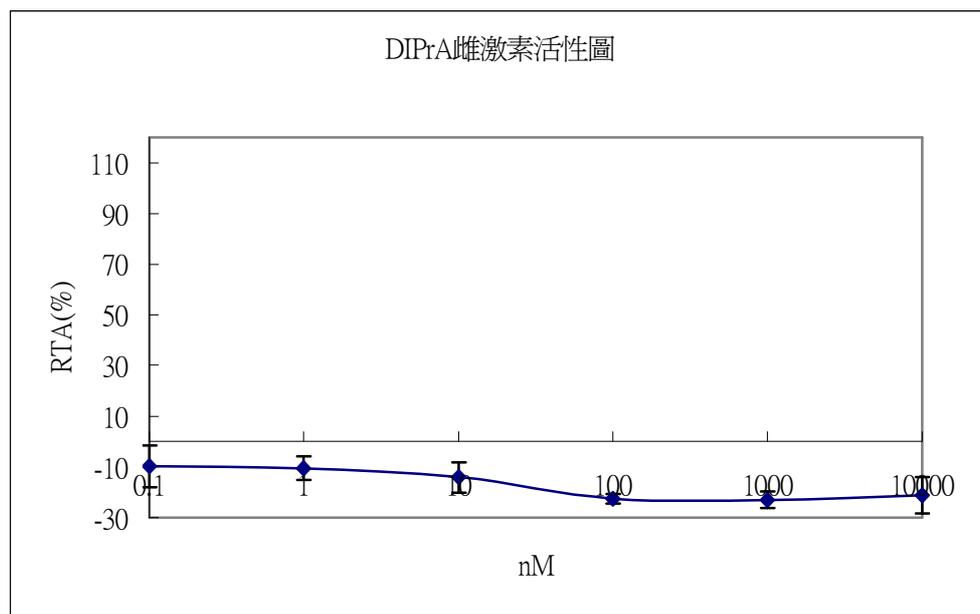
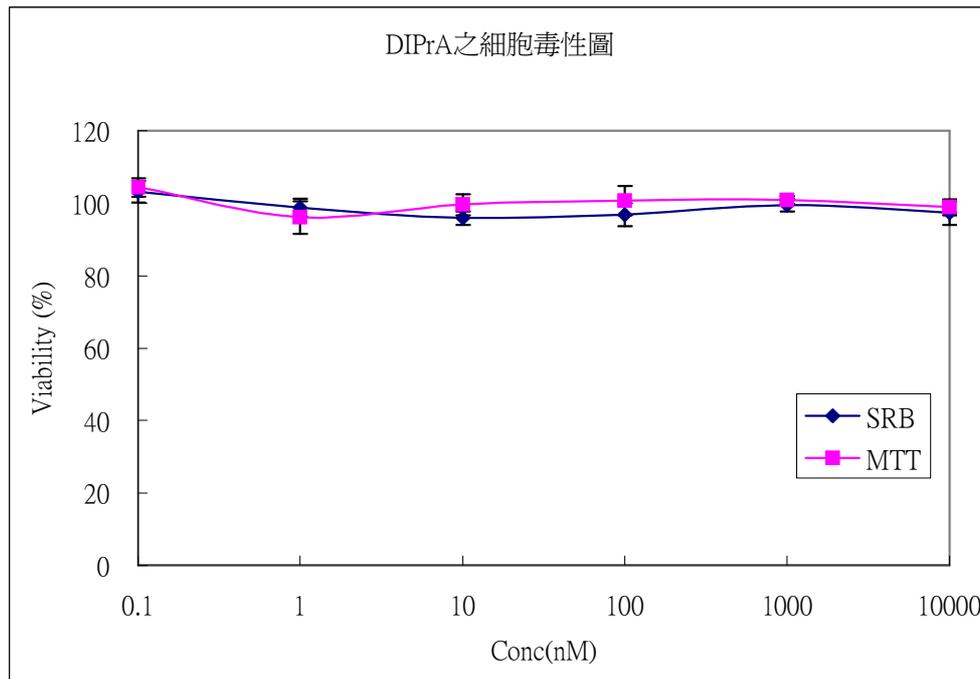


圖 4.36 、Diisopropyl adipate (DIPrA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

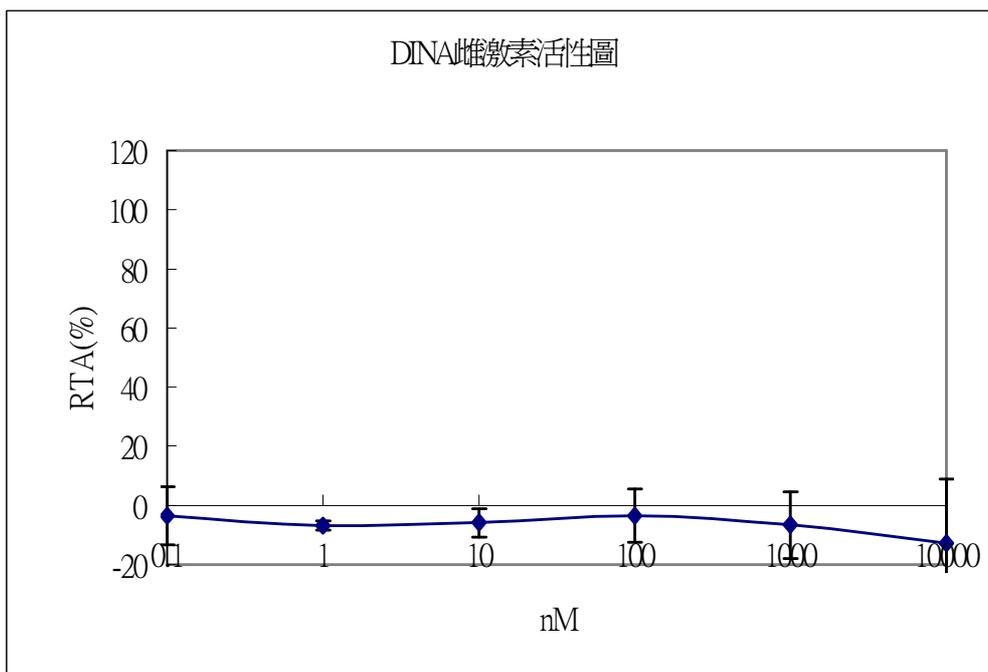
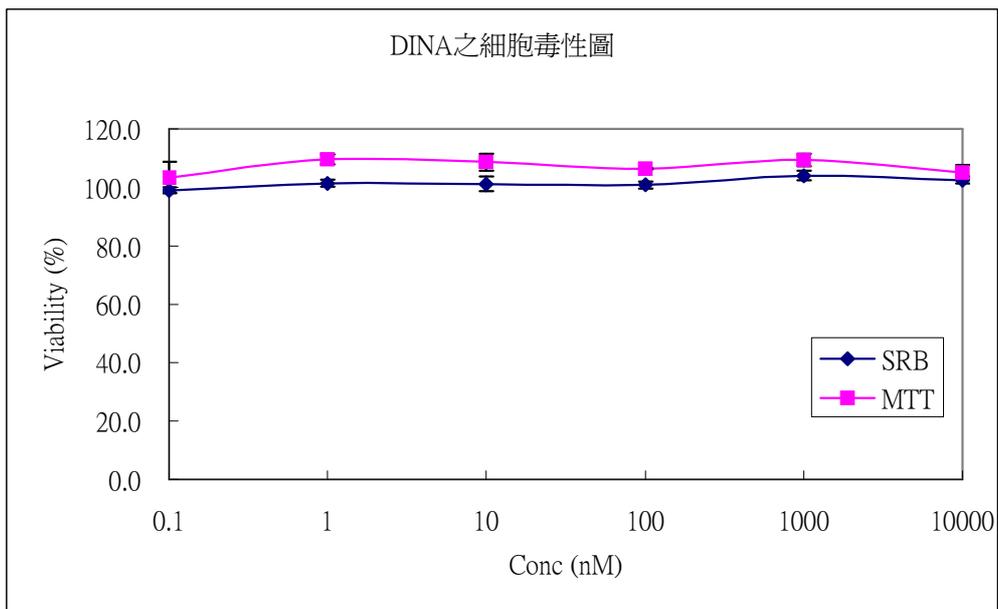


圖 4.37 、 Diisononyl phthalate (DINA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

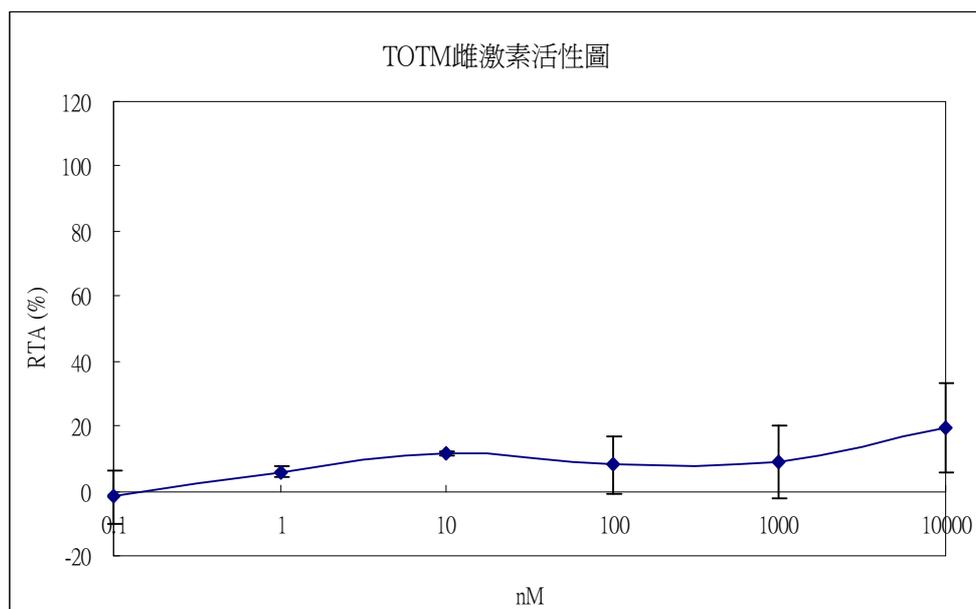
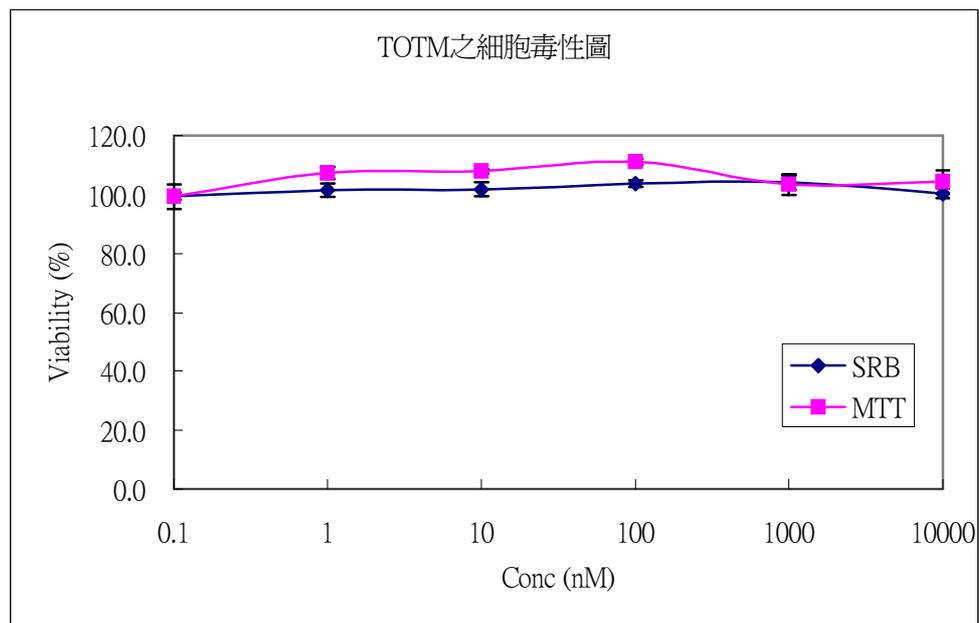


圖 4.38 、Trioctyl Trimellitate (TOTM) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

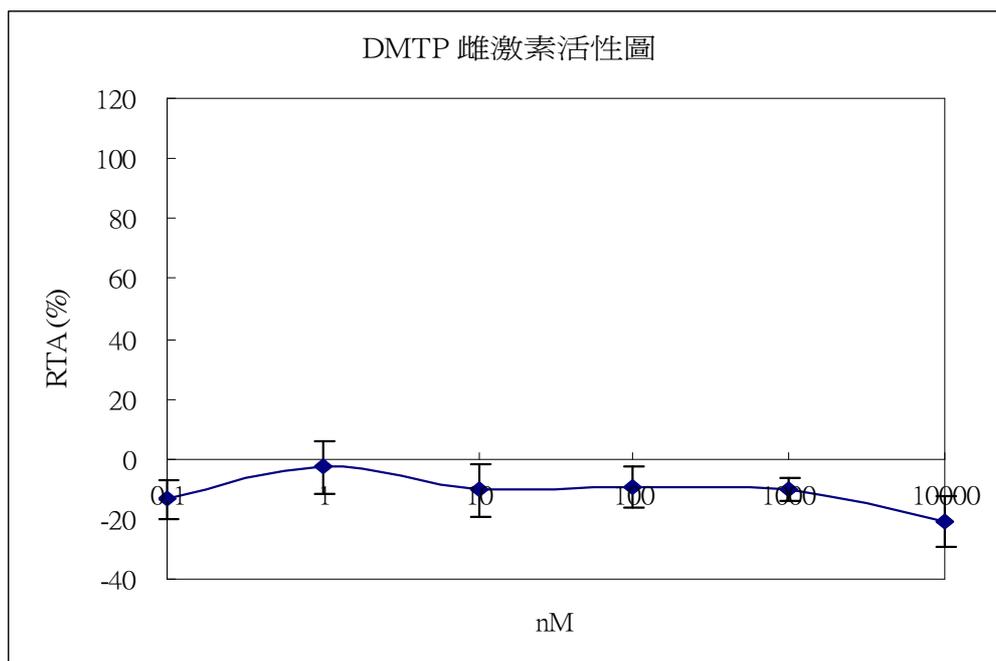
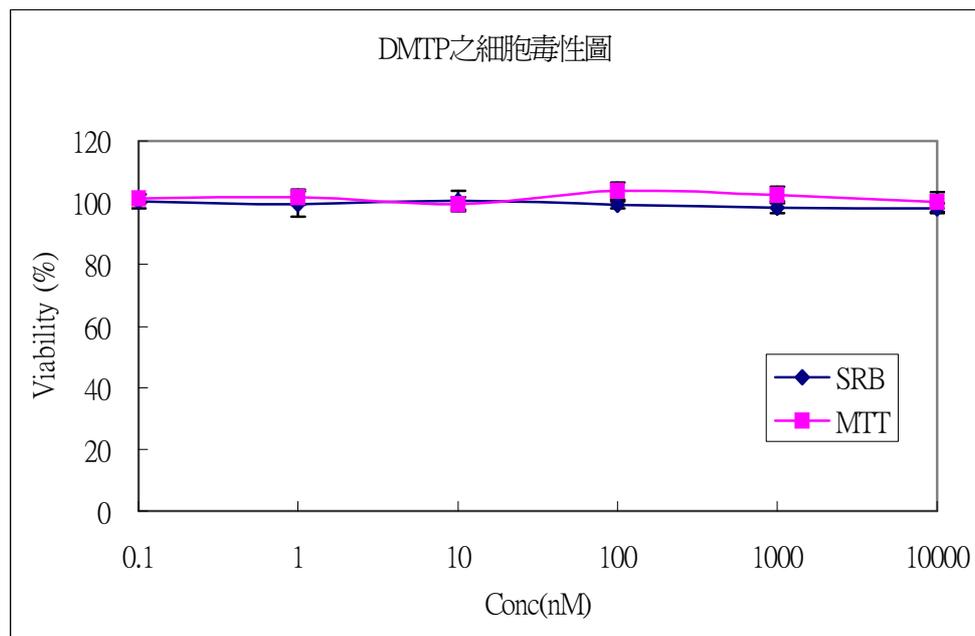


圖 4.39 、Dimethyl terephthalate (DMTP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

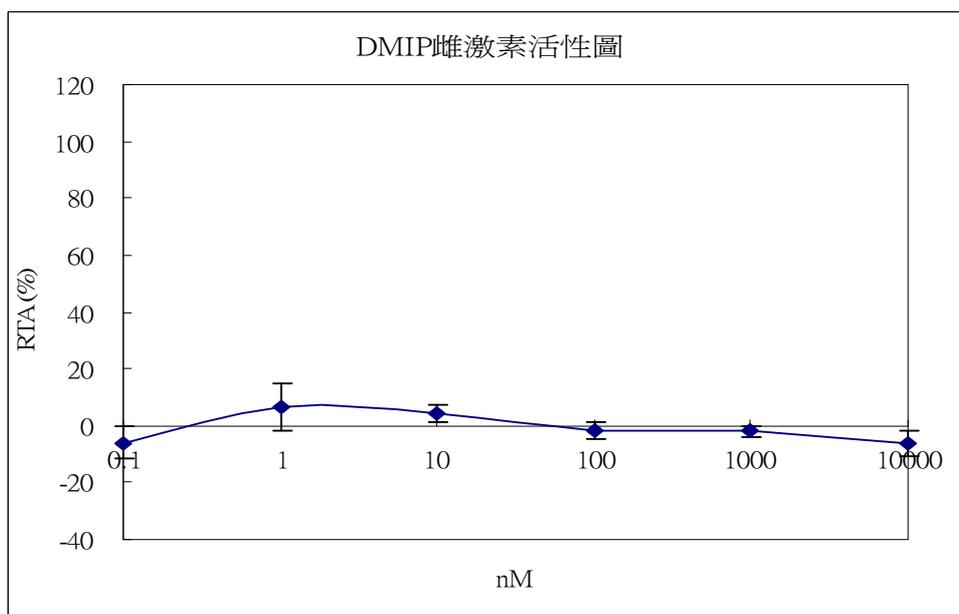
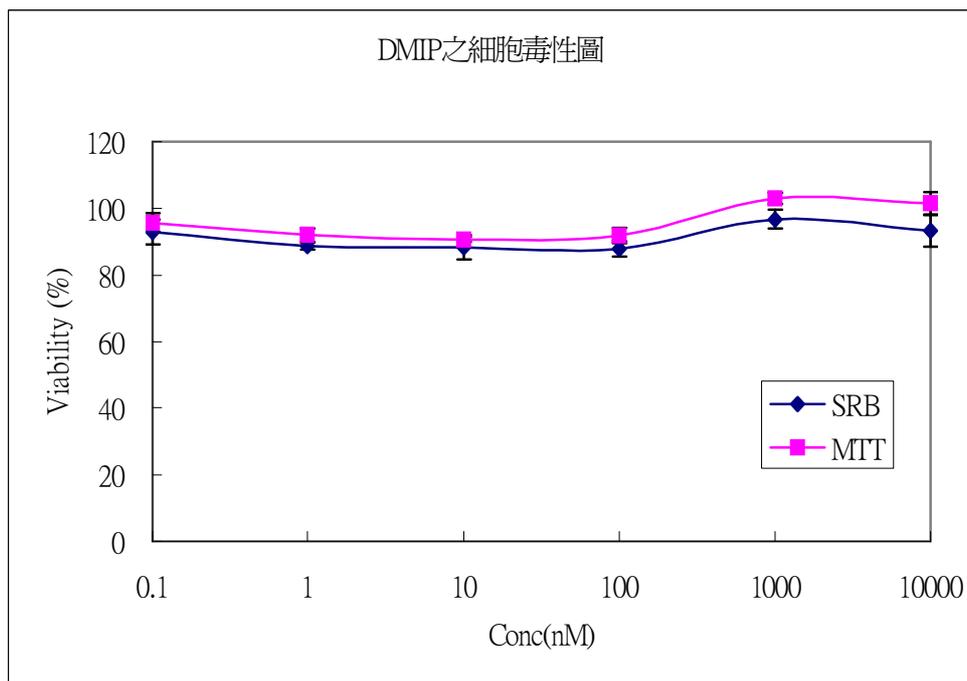
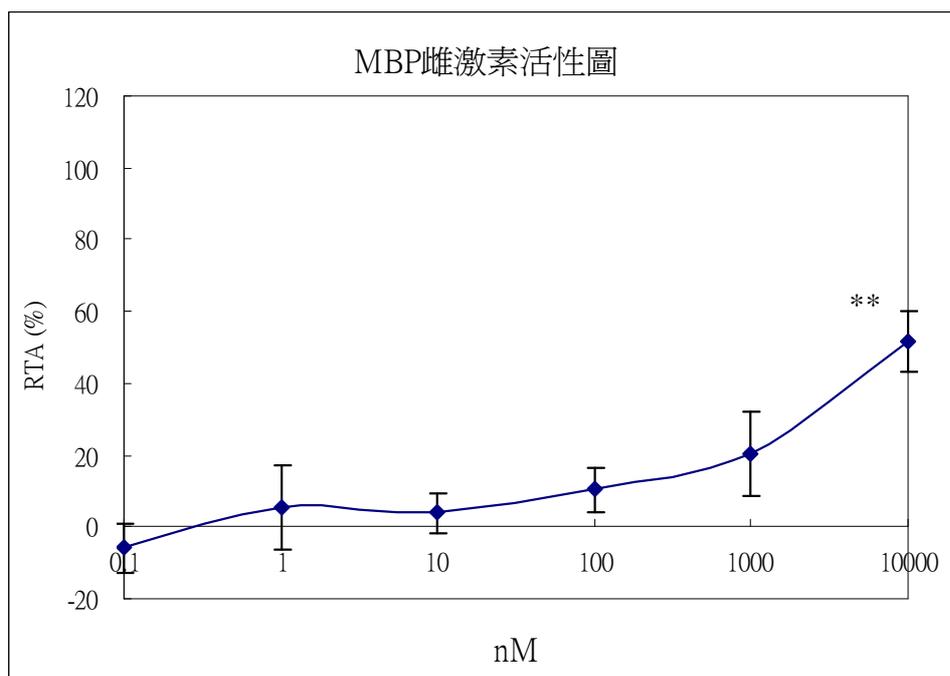
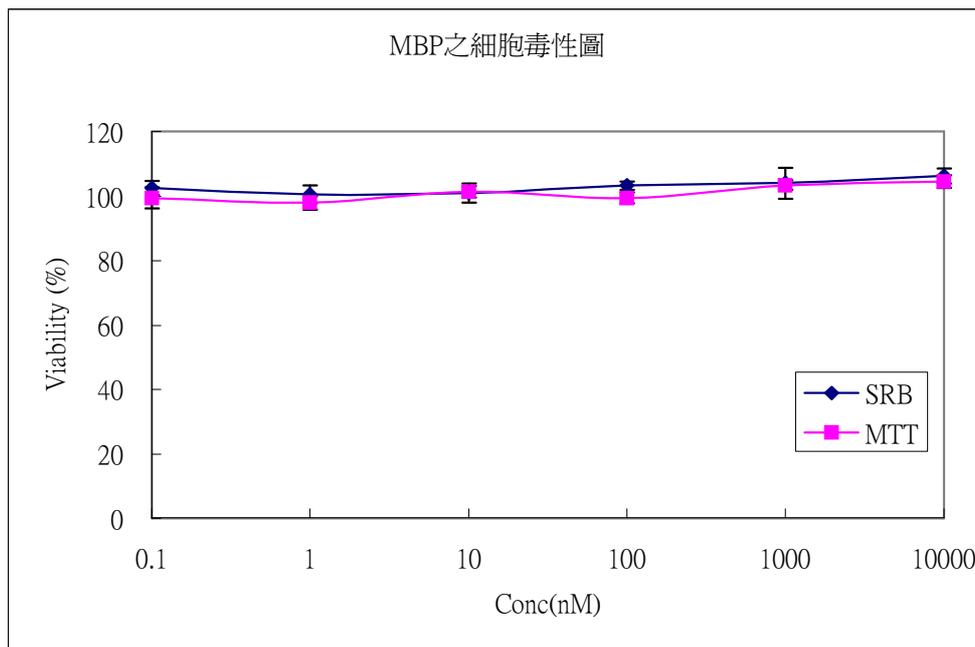


圖 4.40 、Dimethyl Isophthalate (DMIP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)



\*\* There was a significant difference between the RTA % of the sample and the negative control according to Student's *t*-test ( $p < 0.01$ ).

圖 4.41 、 Monobenzyl Phthalate (MBP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

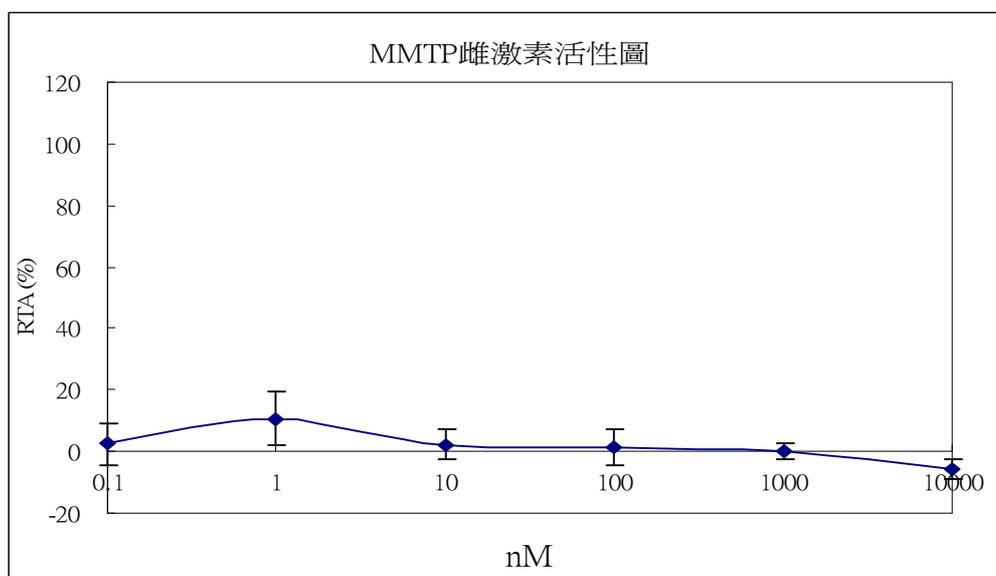
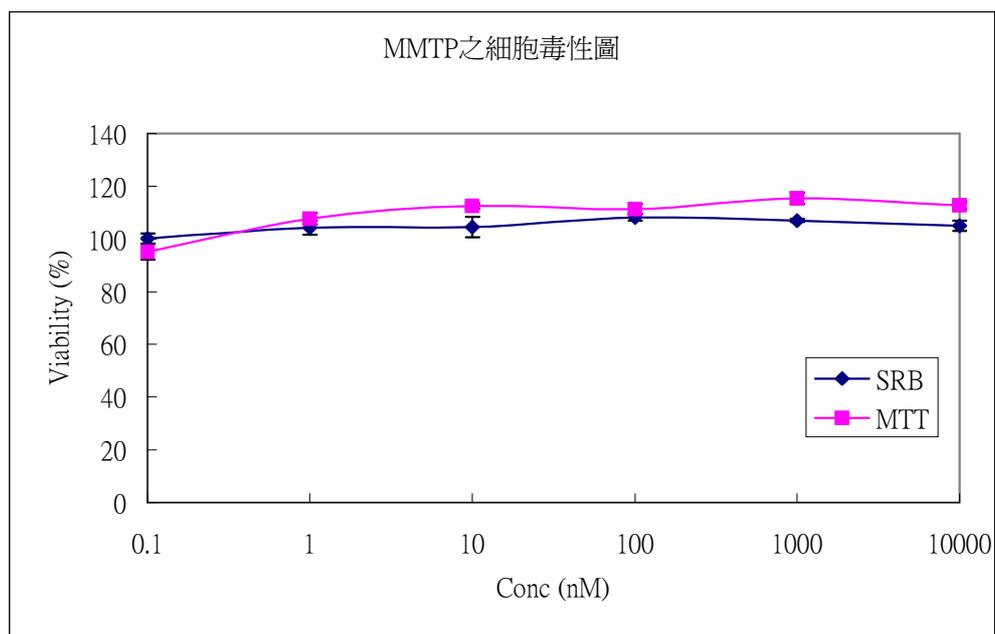


圖 4.42 、Monomethyl Terephthalate (MMTP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

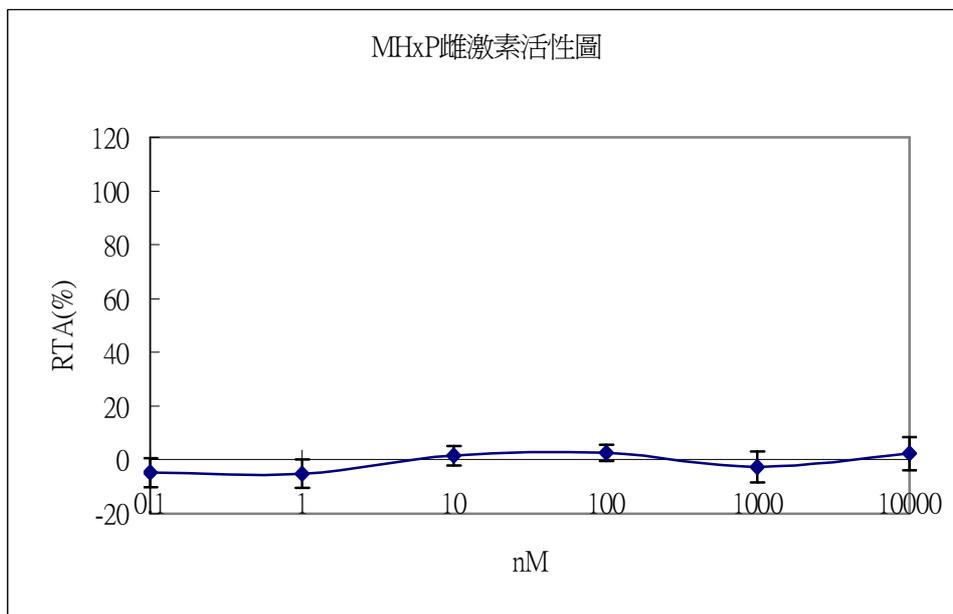
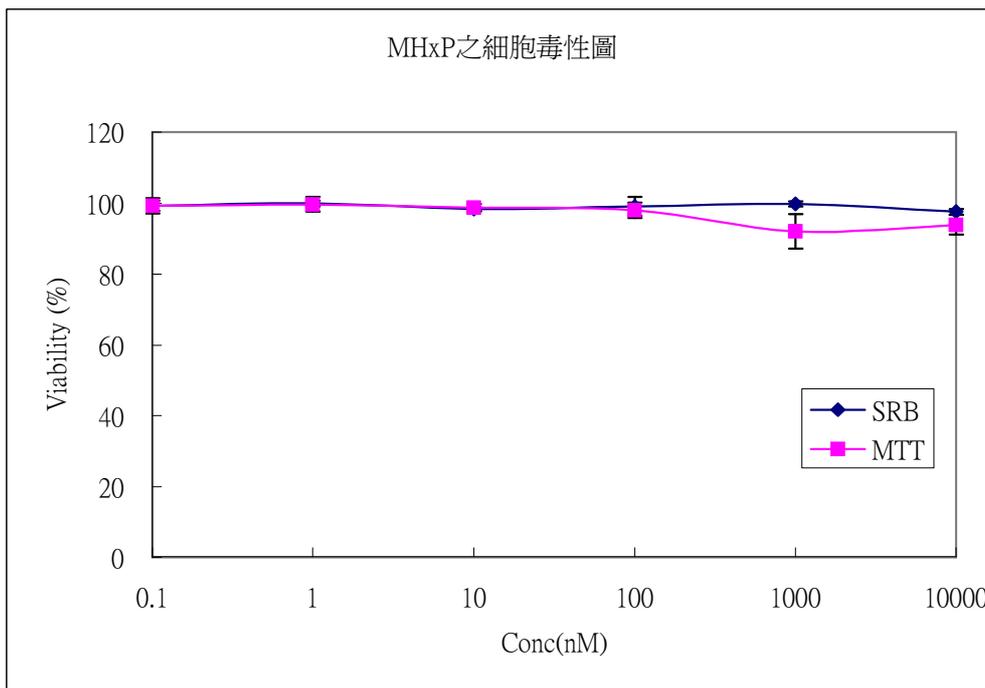


圖 4.43 、 Mono-n-hexyl Phthalate (MHxP) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

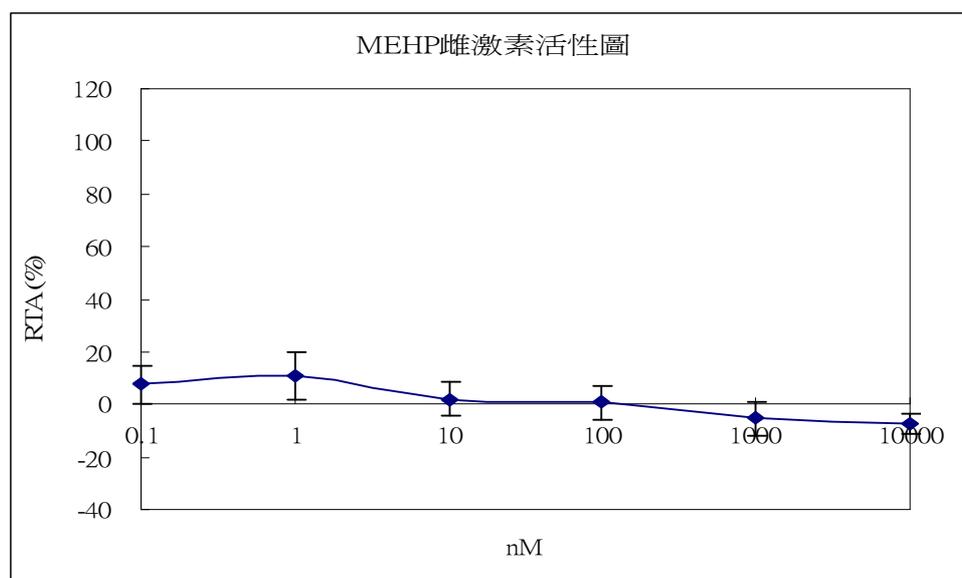
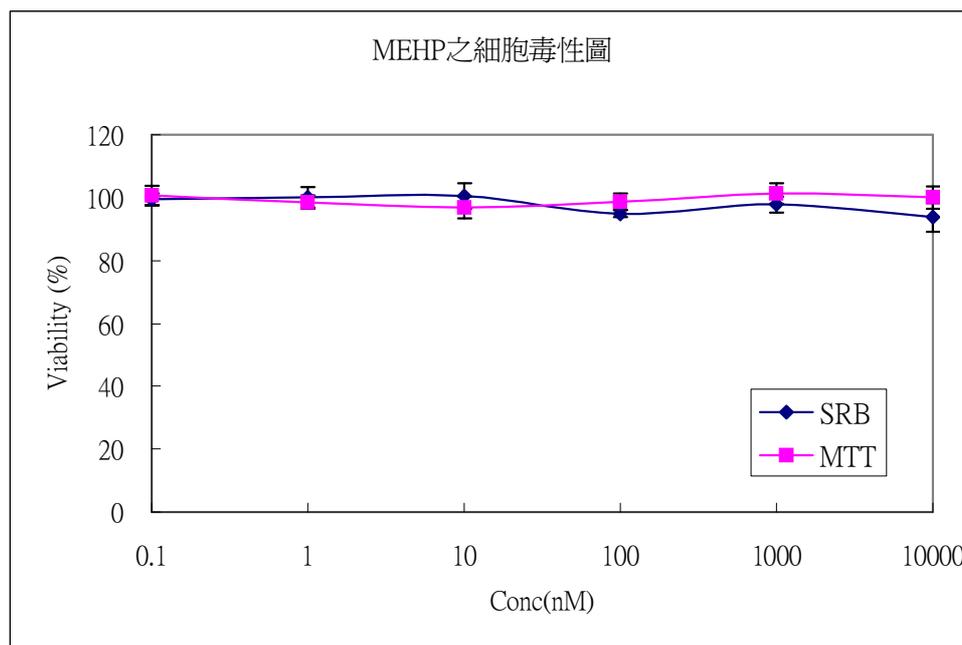


圖 4.44 、Mono-2-ethylhexyl Phthalate(MEHP)的細胞毒性及雌激素活性圖(n=4)

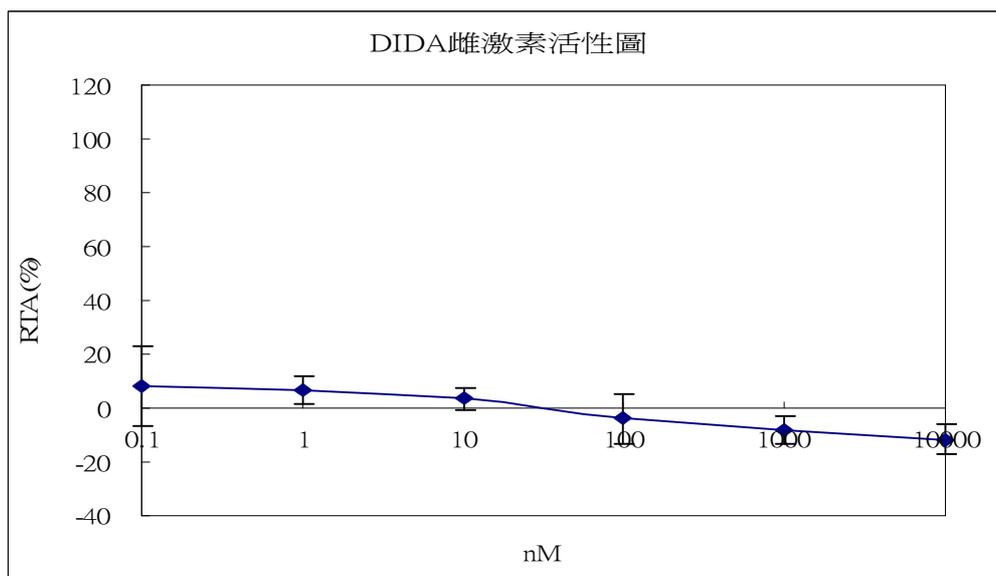
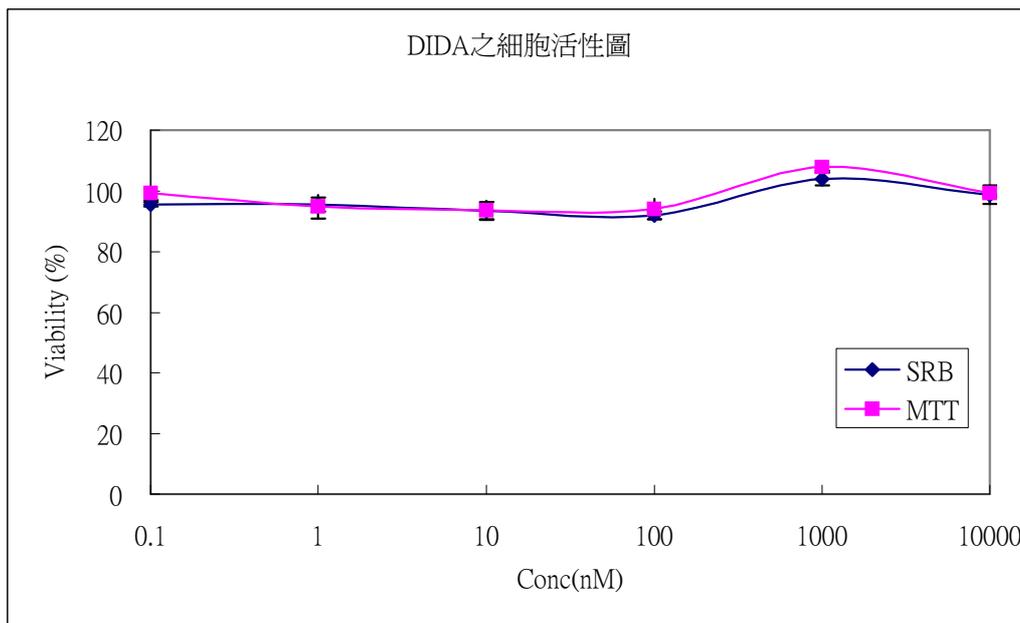


圖 4.45 、Diisodecyl Adipate (DIDA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

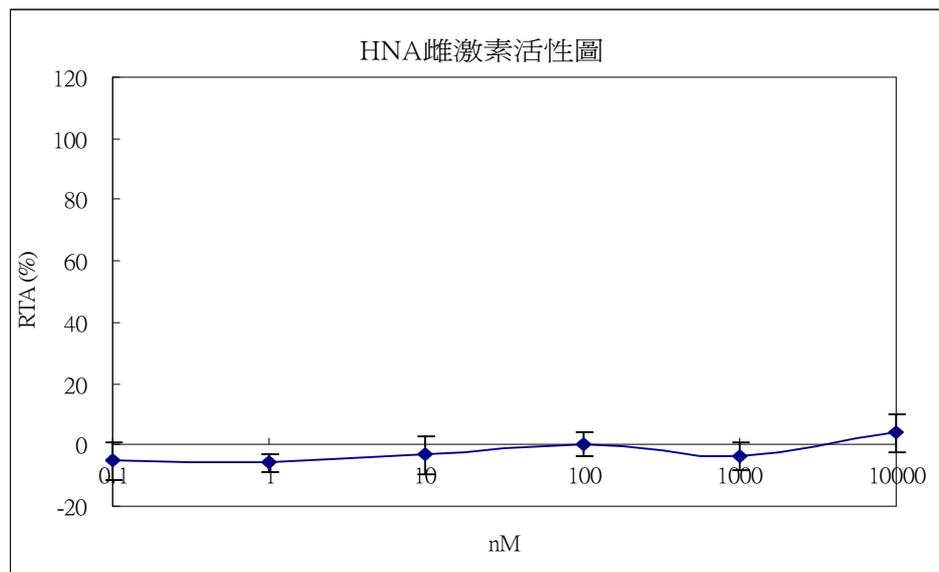
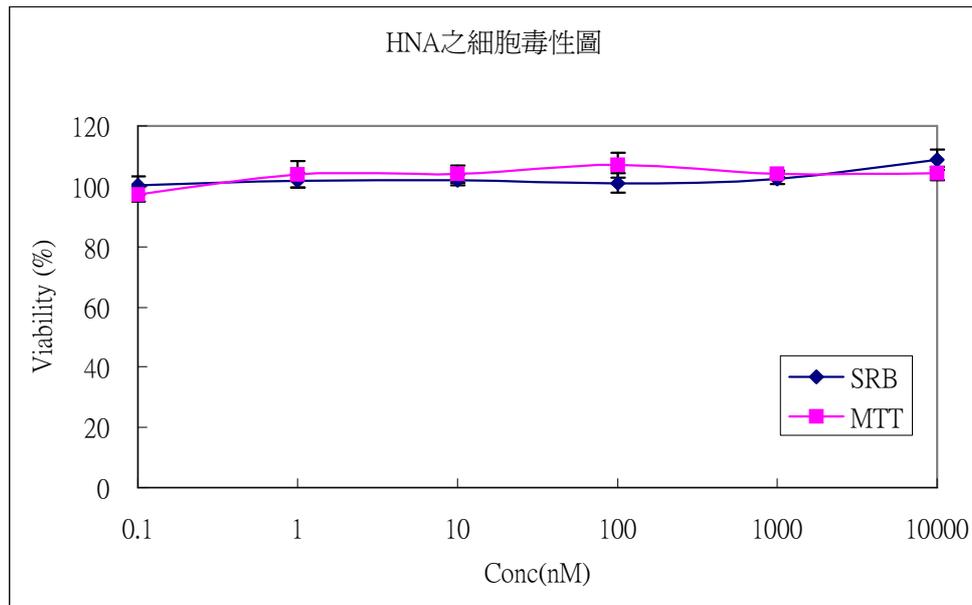


圖 4.46 、Heptylnonyl adipate (HNA) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

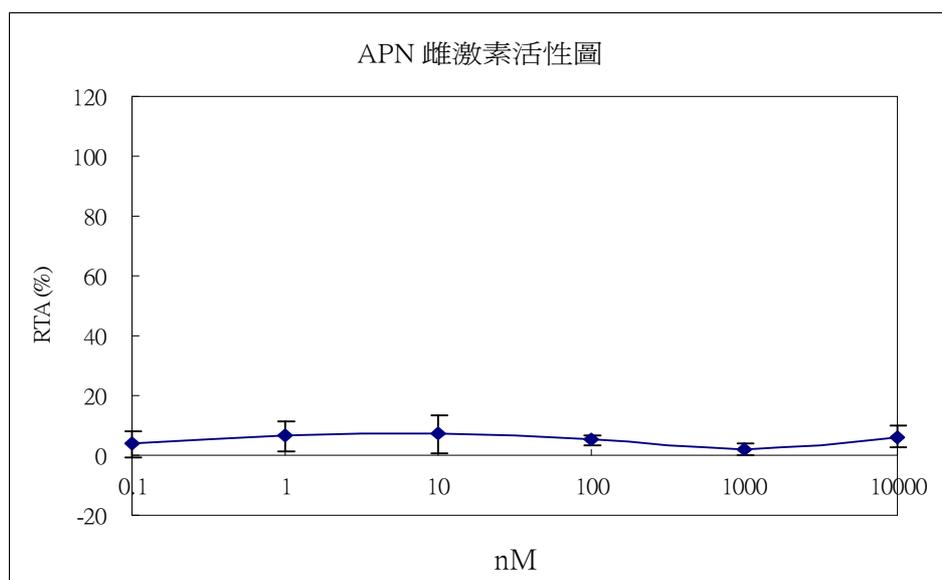
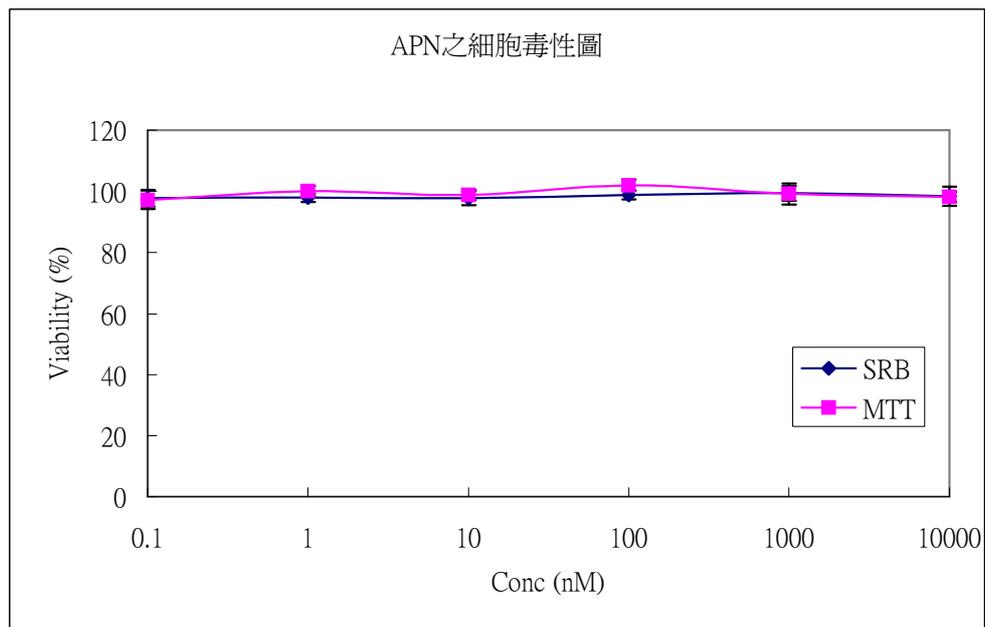


圖 4.47 、Adiponitrile (APN) 的細胞毒性及雌激素活性圖 (n=4)

表 4.4 四十二種種塑化劑的細胞毒性比較表

編號	物種	Conc 0.1~10000 nM	
		SRB assay <sup>a</sup>	MTT assay <sup>a</sup>
1	DBP	101.9±3.7	106.5±2.0
2	BBP	105±1.9	105.5±2.4
3	DCHP	103.2±1.3	102.6±2.4
4	DOP (DEHP)	106.9±2.4	105.4±2.4
5	DEP	101.9±2.8	103.4±3.1
6	DPP	97.1±3.7	95.1±2.5
7	DHxP	99.4±2.3	101.9±4.2
8	DPrP	105.2±3.7	99.1±3.6
9	DnOP	99.8±2.3	96.9±3.4
10	DINP	101.5±2.0	100.8±3.7
11	DNP	106.3±3.4	105.9±3.1
12	DIDP	100.4±3.6	99.1±2.4
13	DHP	99.8±4.2	96.2±4.7
14	DIBP	104.3±2.1	103.5±5.3
15	DIOP	101.5±1.5	98.1±19.8
16	DMP	102.4±2.9	95.4±2.8
17	DIPrP	110.6±4.1	104.9±3.0
18	DIHP	98.5±3.6	96.9±2.6
19	DAP	101.0±1.5	98.0±1.8
20	DBEP	109.0±3.0	102.5±3.7
21	DUDP	102.3±1.8	101.7±2.2
22	DMEP	105.3±2.2	107.6±2.1
23	BMPP	100.4±2.5	103.4±4.1
24	DEEP	98.5±3.6	96.9±2.6
25	DPhP	106.8±2.5	105.0±3.0

26	HEHP	97.8±2.0	100.5±3.4
27	DEHA	106.8±3.1	105.8±2.3
28	DIBA	104.8±2.9	107.0±3.4
29	DPrA	97.8±2.8	96.5±2.1
30	DBA	100.1±2.4	102.3±1.8
31	DIPrA	98.6±2.6	100.1±2.9
32	DINA	101.5±1.5	107.1±2.5
33	TOTM	101.8±2.3	105.6±2.1
34	DMTP	99.5±2.3	101.6±2.5
35	DMIP	91.4±3.1	95.8±2.2
36	MBP	102.9±2.7	101.0±2.0
37	MMTP	104.9±2.1	109.2±1.9
38	MHxP	99.0±1.2	96.9±2.6
39	MEHP	97.8±2.9	99.4±3.1
40	DIDA	96.5±2.1	98.1±2.5
41	HNA	102.8±3.0	103.5±1.8
42	APN	98.4±2.2	99.2±2.2

<sup>a</sup>數據為細胞存活率。n=4。

表 4.5 五種塑化劑的雌激素活性比較表

塑化劑物種	結構	Max. RTA (%)	EEQ <sup>a</sup> (nM)	Relative Potency to E2	Soto et al., (1995) 標準 <sup>b</sup>	Magara et al. (2000) 標準 <sup>c</sup>
BBP		46.6 ± 2.9 (10 μM)	4.10 × 10 <sup>-3</sup> ± 5.31 × 10 <sup>-5</sup> (10 μM)	1/2.44 × 10 <sup>6</sup>	Partial agonistic activity	+
BMPP		55.6 ± 18.1 (10 μM)	7.04 × 10 <sup>-3</sup> ± 5.65 × 10 <sup>-4</sup> (10 μM)	1/1.42 × 10 <sup>6</sup>	Partial agonistic activity	+
DEEP		73.3 ± 9.5 (10 μM)	2.22 × 10 <sup>-2</sup> ± 2.17 × 10 <sup>-4</sup> (10 μM)	1/4.50 × 10 <sup>5</sup>	Full agonistic activity	+
HEHP		39.5 ± 12.5 (10 μM)	2.66 × 10 <sup>-3</sup> ± 3.18 × 10 <sup>-4</sup> (10 μM)	1/3.76 × 10 <sup>6</sup>	Partial agonistic activity	±
BMP		51.6 ± 8.2 (10 μM)	5.53 × 10 <sup>-3</sup> ± 1.78 × 10 <sup>-4</sup> (10 μM)	1/1.81 × 10 <sup>6</sup>	Partial agonistic activity	+

<sup>a</sup> EEQ : 17β-Estradiol equivalent concentration (EEQ)

<sup>b</sup> 雌激素活性分為三等級：第一級相對雌激素活性 >70 %，為 Full agonistic activity。第二級相對雌激素活性 25 ~ 70 %，為 Partial agonistic activity。第三級相對雌激素活性 <25 %，為 No agonistic activity。

<sup>c</sup> ++ : REE % ≥ 40 % & Max. conc. ≤ 5 nM; + : REE % ≥ 40 %; Max. conc. > 5 nM; ± : REE % 10 ~ 40 %; - : REE % <10 %

#### 4.5 塑化劑間與對雌激素間的雌激素交互作用評估

本計畫選 BBP、BMPP、DEEP 及 HEHP 四種分別進行物種間及物種各與雌激素間之交互作用評估，在進行兩物種間交互作用實驗時，需固定一種物種濃度，改變另一種物種濃度為之。在四物種與雌激素間之交互作用實驗，雌激素濃度將選擇  $EC_{50}$  (選擇雌激素具 50 % 效應之濃度而不選擇雌激素最大效應濃度探討塑化劑與雌激素交互作用之理由乃因考量雌激素受體之結合飽和度問題，如選擇雌激素最大效應濃度當遇到有加成效應化學物質時可能無法有效顯現化學物質對雌激素之加成效應)。

這四種塑化劑的交互作用結果如圖 4.48 ~ 4.51 所示。由圖 4.48 顯示 BBP 在添加固定濃度的 E2 (0.05 nM)、BMPP (5  $\mu$ M)、DEEP (1  $\mu$ M) 及 HEHP (5  $\mu$ M) 時，由 BBP 之濃度-活性曲線圖可看出整體提升其雌激素活性的趨勢，形態並沒有太大改變。其他塑化劑 BMPP、DEEP 及 HEHP 亦有類似之結果 (圖 4.49 ~ 4.51)，因此初步推論以上四種塑化劑間可能沒有發生物種間與對雌激素間的交互作用。

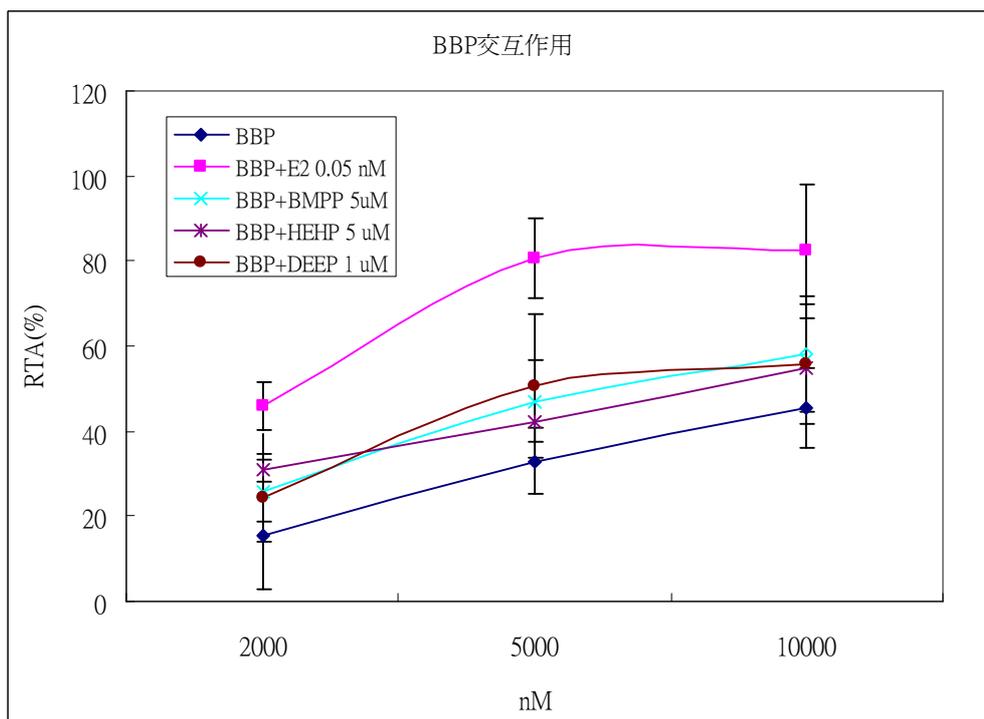


圖 4.48 、BBP 與 E2、BMPP、HEHP 及 DEEP 交互作用圖 (n=4)

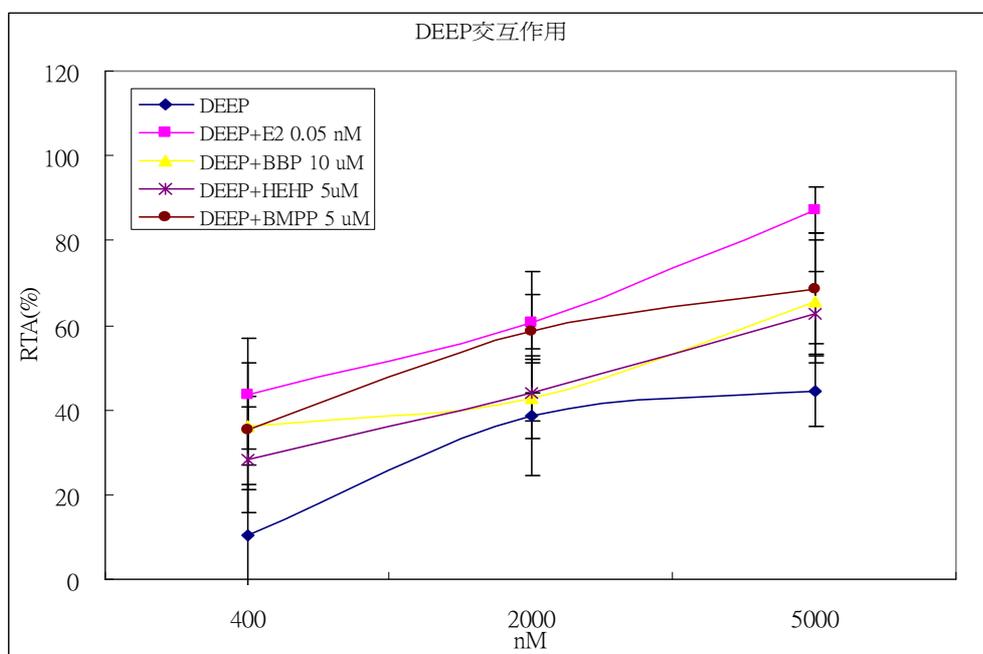


圖 4.49 、DEEP 與 E2、BBP、HEHP 及 BMPP 交互作用圖 (n=4)

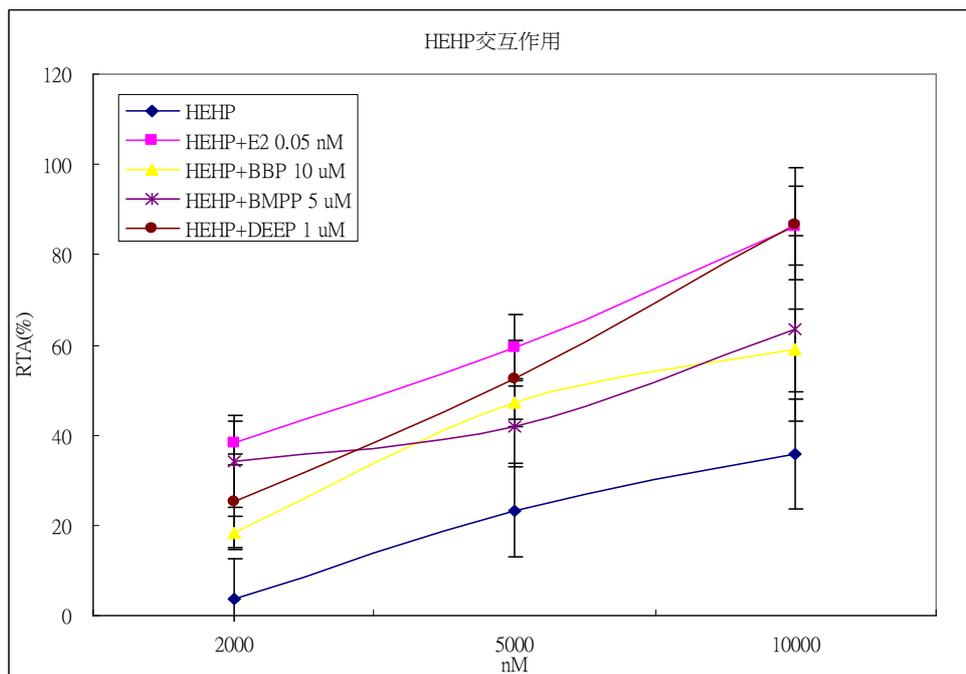


圖 4.50、HEHP 與 E2、BBP、BMPP 及 DEEP 交互作用圖 (n=4)

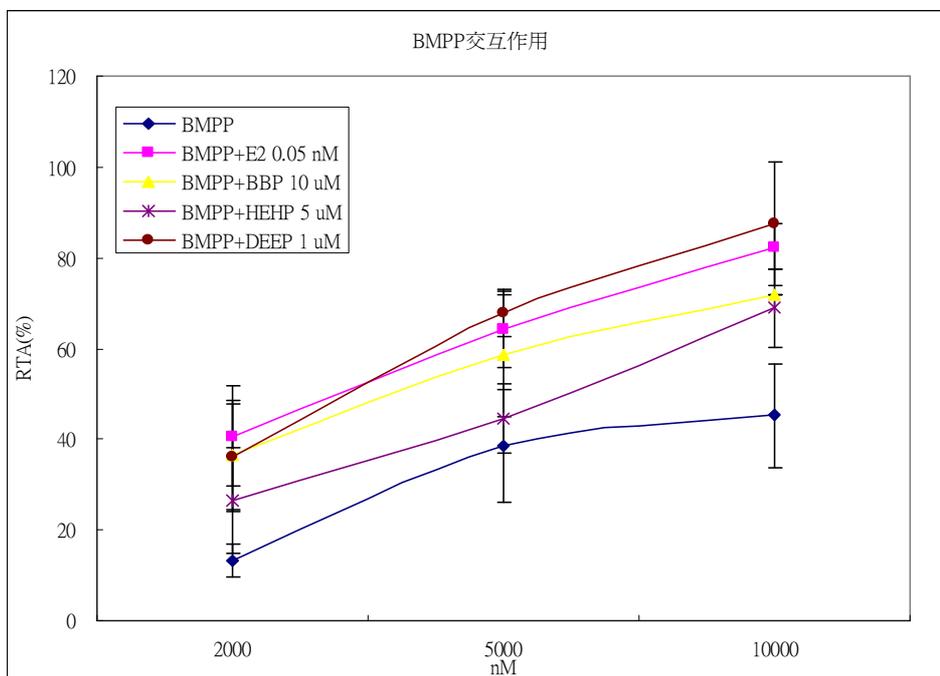


圖 4.51、BMPP 與 E2、BBP、HEHP 及 DEEP 交互作用圖 (n=4)

## 第五章 文獻整理

表 5.1 一般常見塑化劑物種環境荷爾蒙毒性資料

編號	化學名	生產與用途	急性毒性 (LD <sub>50</sub> )	環境荷爾蒙毒性				環境殘留	管制	其他	參考文獻
				雌激素 (ER)		雄激素 (AR)					
				In vitro	In vivo	In vitro	In vivo				
1	Di-n-butyl phthalate (DBP)	<p>主要當乳膠黏合劑。也當纖維素類塑膠塑化劑、化妝品及染料溶劑。目前已不使用於PVC 塑化劑。</p> <p>國內主要生產廠商為南亞與聯成。</p> <p>美國 1980 年代年生產量約為 200 萬磅，然到 1994 年之產量已超過 1700 磅。美國主要生產公司為 Eastman Chemical Company 與 Unitex Chemical Corporation。亦由其他</p>	<p>3-8 g/kg (Oral, Rat)</p> <p>3.05 g/kg (i.p., Rat)</p> <p>&gt;20 g/kg (Oral, Mouse)</p> <p>4 g/kg (i.p., Mouse)</p>	<p>RBA (hER expressed in Sf9/Baculovirus) : ER positive (1/28,000 E2)</p> <p>RBA (ER from Immature SD Rat) : ER positive (1/36,000 E2)</p> <p>RBA (ER from ovariectomized SD Rat) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Positive (37 % REE at 10<sup>-5</sup> M)</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, hER plasmid) : ER Negative (10<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-5</sup>M)</p>	<p>Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile SD Rat) : No effect (≤200 mg/kg/day)</p> <p>Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile SD Rat) : No effect (≤1000 mg/kg/day)</p> <p>Uterotrophic assay (S.C., 2days, ovariectomized SD Rat) : No effect (≤400 mg/kg/day)</p> <p>Uterotrophic assay (Oral.,</p>	<p>Reporter gene assay (CHO-AR-Luc cell, pSG5-hAR-puro) : Anti-AR Negative (0.1 nM R1881 +0.01-50 μM)</p> <p>AR binding assay : AR Positive 17 % (10<sup>-4</sup> M)</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-5</sup> M)</p> <p>Reporter gene assay (Hela</p>	<p>Hershberger assay (oral, 10 days, SD Rat) : 精液與副睪重量減少 (DBP ≤1000 mg/kg/day+TS 0.4 mg/kg/day)</p> <p>Male mouse assay (oral, 10 days) : 睪丸重減低與睪丸組織傷害 (2000 mg/kg/day)。</p> <p>在子宮期干擾雄激素作用而導致幼雄鼠的生殖系統異常。</p> <p>無雄激素受體結合活性，然會影響雄激素調控的雄</p>	<p>成人飲食攝取量約 7 μg/kg bw/day (IPCS)</p> <p>Butter (1.5 μg/g); Margarine (0.64 μg/g); white sugar (0.2 μg/g); bananas (0.12μg/g) (加拿大)</p> <p>Carcass meat (0.09 μg/g); Poultry (0.2μg/g); Egg (0.1 μg/g); Milk (0.003 μg/g) (英國)</p> <p>德國 7 個嬰兒食品之檢測濃度平均 0.33 mg/kg · 5 個母乳樣品檢測濃度平均 0.035 mg/kg</p>	<p>台灣、日本、歐盟與美國有列管。</p> <p>US EPA 管制水源不可超過 34 ppm。</p> <p>任何環境釋放超過 10 磅則必須呈報聯邦政府。</p> <p>NIOSH 訂定工作環境空氣中含 量限制為 5 mg/m<sup>3</sup>。</p> <p>日本 : Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1 (MSDS required); Industrial Safety and Health Law; Air Pollution Control Law : Marine</p>	<p>疑似環境荷爾蒙物種。</p> <p>代謝物之一 : Monobutyl phthalate</p> <p>尿中主代謝物 Monobutyl phthalate 檢測值 : 26.7 μg/L</p> <p>MRL (Minimal Risk Levels , extrapolation from animals to human) : 0.5</p>	<p>CERHR, 2000; IPCS, 1997; MAFF 1996 b; 張,2000.2004; ATSDR,1990; 環 保署, 1998; Fisher et al., 2003; Mylchreest et al., 2002; Gray et al., 2000; Parks et al., 2000; Mylchreest et al., 1998; Nakai et al., 1999; Zacharewski et al., 1998; CERL, 2001; Yamasaki et</p>

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

	<p>國家進口，總進口量</p> <p>1997 年為 358,600 磅，1998 年為 567,600 磅。</p> <p>日本生產 17631 噸 (1997); 11516 噸 (1998); 12238 噸 (1999); 8068 噸(2000); 7252 噸 (2001)。</p> <p>日本進口 1993: 59 噸; 1994: 177 噸; 1995: 64 噸; 1996: 24 噸; 1997: 163 噸。</p> <p>日本出口 1993: 2246 噸; 1994: 3461 噸; 1995: 3728 噸; 1996: 4628 噸。</p>		<p>Reporter gene assay (Hela cell, Rat ER plasmid) : ER Negative (<math>10^{-11} \sim 10^{-5}</math>M)</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Positive (35 % REE at <math>10^{-3}</math> M, <math>1/10^7</math> E2)</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : 代謝物 MBP ER Negative</p> <p>Yeast growth assay (<i>S. cerevisiae</i> PL3 strain , hER) : ER Positive (<math>10^{-5}</math> M)</p> <p>Yeast two-hybrid assay : ER Negative</p> <p>ER positive cell proliferation (ZR-75; T47 human breast cancer cell) : ER Positive (<math>10^{-5}</math> M)</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7</p>	<p>4days,</p> <p>ovariectomized SD Rat) : No effect (<math>\leq 2000</math> mg/kg/day)</p> <p>體內會代謝為無雌激素活性之代謝物 Monobutyl phthalate (MBP)，故無法呈現雌鼠的子宮重量增加。</p> <p>Uterotrophic assay (ip, 3 days, young White Albino mice, short-term, low dose) : 子宮重量顯著增加 (5.77 <math>\mu</math>M/kg/day)</p> <p>Fish screen assay (Japanese Medaka,</p>	<p>cell, hAR) : Anti-AR Negative (<math>10^{-6} \sim 10^{-5}</math> M)</p> <p>性分化作用。</p> <p>有抗雄激素作用，並且會造成雌鼠畸形，並會影響性別分化。</p> <p>會導致 Leydig cell 的單丸酮缺乏與異常增生。</p> <p>影響 FSH (Follicular Stimulating Hormone) 與在 Sertoli 細胞之 FSH 受體作用為 DBP 抗雄激素作用的機轉之一。</p> <p>導致大鼠雌性後代生殖道異常 (750 mg/kg/day)</p> <p>會降低 60-85 % 大鼠胎兒之單丸酮濃度。</p> <p>NOAEL : : 500 mg/kg/day</p>	<p>日本 3 個母乳樣品檢測濃度 0.02-0.08 mg/kg</p> <p>ND-1.3 <math>\mu</math>g/L (27.0 % 檢出率, 1998 年日本 109 條河川環境檢測)。</p> <p>ND-16 <math>\mu</math>g/L (6.4 % 檢出率, 2001 年日本 171 處河川環境檢測)。</p> <p>ND-160 <math>\mu</math>g/kg (27.1 % 檢出率, 2001 年日本 48 處底泥檢測)。</p> <p>0.17-0.93g/kg (1998 年台灣淡水河關渡橋、台北橋、忠孝橋、中興橋底泥)。</p> <p>13.1-37.34 g/kg (2000 年台灣中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪底泥)。</p>	<p>pollution Prevention Law</p> <p><b>Federal Regulatory Program</b></p> <p><b>Lists</b> : Air Contaminants (Occupational and Safety Health Act) : Hazardous Air Pollutants (Clean Air Act) : Hazardous Constituents (Resource Conservation and Recovery Act) : Hazardous Substances (Superfund) : Priority Pollutants (Clean Water Act) : Registered Pesticides (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) : Toxic Release Inventory Chemicals</p> <p>Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: freshwater; 19 micro g/L, marine; insufficient</p>	<p>mg/kg/day</p> <p>NOAEL : 357 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, Rat)</p> <p>NOAEL : 50 mg/kg/day (Development toxicity, Rat)</p>	<p>al., 2002;</p> <p>Nishihara et al., 2000; Gray et al., 1998,1999;</p> <p>2000; ; Hardin et al., 1987; Okubo et al., 2003; Gray and Gangolli, 1986; Ema et al., 2000; Harris et al., 1997; USDHHS, 2001; Taiwan EPA; CDC, 2001; 內海, 1999; Hashimoto et al., 2003; El-Mubarak and Huisingh, 2001; Roy et al., 2004; Legler et al., 2002; Gangolli, 1982</p>
--	---	--	--	--	---	--	--	---	--

				<p>(E-Screen) human breast cancer cell): ER negative (<math>\leq 10 \mu\text{M}</math>); ER negative (<math>\leq 1\text{mM}</math>) ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell): ER positive (<math>10^{-4}\text{M}</math>) ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell): Monobutyl phthalate ER Negative ER-CALUX (T47D-luc cell): ER Positive (<math>1/1.8 \times 10^{-8} \text{E2}</math>)</p>	<p>Vitellogenin): Negative (<math>\leq 822 \mu\text{g/L}</math>)</p>		<p>(rat, 睪丸重降低)。 NOAEL: 1000 mg/kg/day (rat, 懷孕率降低)。</p>	<p>台灣河川底泥 0.057-0.92 <math>\mu\text{g/g}</math>; 魚體 &lt;0.15-0.81 <math>\mu\text{g/g}</math> US EPA (2000) 檢測 363 處地下水有 1 處檢測到 DBP 其濃度為 57 <math>\mu\text{g/L}</math>; 15 處河川/水庫有 2 處檢測到 DBP 其濃度範圍為 2.5-10.7 <math>\mu\text{g/L}</math>; 253 處地表水有 9 處檢測到 DBP 其濃度為 0.2-150 <math>\mu\text{g/L}</math>。 2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 1400 ~ 16(<math>\text{ng}/\text{m}^3</math>); 戶內 5700 ~ 26 (<math>\text{ng}/\text{m}^3</math>) 2001 年日本飲食檢出率 12/81 (15%), 濃度範圍 nd~68 <math>\mu\text{g/kg}</math></p>	<p>data。 USA CWA National Recommended Water Quality Criteria: Human health for consumption of water + organism; 2700 micro g/L, Human health for consumption of organism only; 12000 micro g/L</p>		
--	--	--	--	--	--	--	--	---	--	--	--

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

									2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 10/81 (12 %), 濃度範圍 nd~170 µg/kg		
2	Butyl benzyl Phthalate ( BBP)	最大用途當 PVC 製品如建材、汽車材料、食物運輸帶等之塑化劑。 美國 FDA 未核准 BBP 用作醫療用材料。 291 噸 (全部進口, 1998, USA)。	2-20 g/kg (Oral, Rat)	RBA (ERα) : ER Positive (1/80,000 E2) RBA (ERα) : ER Positive (38 %, 10 <sup>-4</sup> M) RBA (ERβ) : ER Positive (23 %, 10 <sup>-4</sup> M) Yeast two-hybrid assay : ER Positive (REC10=5×10 <sup>-4</sup> M) Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Positive (50 % REE at 10 <sup>-3</sup> M, 1/10 <sup>6</sup> E2) Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Positive (42 % REE at 10 <sup>-5</sup> M)	Uterotrophic assay (S.C., 3days, Mouse) : No effect (≤5 mg/kg/day) Uterotrophic assay (S.C., 3days, Rat) : No effect (≤2000 mg/kg/day) Uterotrophic assay (oral, 4days, Rat) : No effect (≤2000 mg/kg/day) Uterotrophic assay (S.C., 7days, ovariectomized Rat) : ER No effect (≤2000 mg/kg/day) Uterotrophic assay (oral, Reporter gene assay	Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-4</sup> M) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Negative (IC50=3.5×10 <sup>-5</sup> M, 10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-4</sup> M) AR binding assay : AR Positive (IC50=2.1×10 <sup>-5</sup> M, 10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-4</sup> M) Reporter gene assay	Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : No effect (≤1000 mg/kg/day) Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : 精液與前列腺重量減少 (BBP ≤1000 mg/kg/day + TS 0.4 mg/kg/day) Hershberger assay (oral, 10 days, gonadectomized Rat) : AR No effect (≤2000 mg/kg/day) Hershberger assay (oral, 10 days, gonadectomized Rat) : Anti-AR No effect	主要暴露來源為食物攝取。成人暴露量約 2 µg/kg bw/day (IPCS) Yogurt (0.6 µg/g); Cheddar cheese (1.6µg/g); Butter (0.64µg/g); Cracker (0.48µg/g) (加拿大) Carcass meat (0.09 µg/g); Poultry (0.03µg/g); Egg (0.09 µg/g); Milk (0.002 µg/g) (英國) ND-1.0 µg/L (1.2 %檢出率, 1998 年日本 109 條河川環境檢測)。	日本、美國、歐盟有列管。 日本 : Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1 (MSDS required) : Marine pollution Prevention Law。 <b>Federal Regulatory Program Lists : Hazardous Constituents (Resource Conservation and Recovery Act) ; Hazardous Substances (Superfund) ; Priority Pollutants (Clean Water Act)</b>	疑似環境荷爾蒙物種。 代謝物之二 : Monobutyl phthalate 與 Monobenzyl phthalate 尿中主代謝物 Monobutyl phthalate 檢測值 : 17.4 µg/L NOAEL : 151 mg/kg/day (Repeat dose)	CERHR, 2000; MAFF 1996 a,b; IPCS, 1999; Blair et al., 2000; Nishihara et al., 2000; Coldham et al., 1997; Gray et al., 2000; Zacharewski et al., 1998; Sohoni and Sumpter, 1998; Soto et al., 1995; 1997; NTP, 1997; CERI, 2001a,b; Harris et al., 1997; Okubo et al., 2003; Hashimoto et al.,

			Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Positive (32 %REE at 10 <sup>-5</sup> M)	4days, ovariectomized Rat) : Anti-ER No effect (≤2000 mg/kg/day)	(Recombinant yeast cell) : AR Negative	(≤2000 mg/kg/day)	ND-0.1 µg/L (1.2 %檢出率, 2001 年日本 171 處河川環境檢測)。		toxicity, Rat)	2003 : CDC, 2001; Tyl et al., 2004;
			ER positive proliferation assay (MCF-7 cell, E-screen) : ER Positive (90% REE at 10 <sup>-5</sup> M, 1/100,000 E2)	Fish screen assay (Japanese Medaka, Vitellogenin) : Positive (1,045.4 µg/L)	(Recombinant yeast cell) : Anti-AR Positive (BBP 2×10 <sup>-8-5</sup> M + DHT 1.25×10 <sup>-9</sup> )	Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : Anti-AR Positive (BBP 2×10 <sup>-8-5</sup> M + DHT 1.25×10 <sup>-9</sup> )	NOAEL : 200 mg/kg bw/day (Male F344 rats, 精蟲濃度、睪丸重、前列腺重降低)	ND-32 µg/kg (14.6 %檢出率, 2001 年日本 48 處底泥檢測)。	NOAEL : 418 mg/kg/day (Development toxicity, Rat)	Hashimoto et al., 2003; Roy et al., 2004; Jobling et al., 1995; Stahlschmidt-Allner et al., 1997;
			ER positive proliferation assay (MCF-7 cell, E-screen) : ER Negative (10 <sup>-9</sup> ~ 10 <sup>-4</sup> M)		Reporter gene assay (CHO-AR-Luc cell, pSG5-hAR-puro) : Anti-AR Negative (0.1 nM R1881 + 0.01-50 µM)	Reporter gene assay (CHO-AR-Luc cell, pSG5-hAR-puro) : Anti-AR Negative (0.1 nM R1881 + 0.01-50 µM)	LOAEL : 2200 mg/kg bw/day (Male F344 rats, 精蟲濃度、睪丸重、前列腺重降低)	ND-0.16g/kg (1998 年台灣淡水河關渡橋、台北橋、忠孝橋、中興橋底泥)。		Legler et al., 2002; Harris et al., 1997; Okubo et al., 2003; Gaido et al., 1997; 2000; 張, 2000, 2004
			ER positive proliferation assay (MCF-7 cell, E-screen) : ER Negative (≤1 mM)				NOAEL : 3750 ppm (SD rats, 雄性陰肛部距離降低)	ND-3.36 g/kg (2000 年台灣中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪底泥)。		
			ER positive proliferation assay (MCF-7 cell, E-screen) : ER Positive (10 <sup>-5</sup> M)		AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR Negative (<10 <sup>-5</sup> M)	AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR Negative (<10 <sup>-5</sup> M)	NOAEL : 750 ppm (SD rats, 雄性陰肛部距離降低)	台灣河川底泥 0.05-1.10 µg/g ; 魚體 <0.37-17.4µg/g		
			ER positive cell proliferation (ZR-75 human breast cancer cell) : ER Positive (10 <sup>-5</sup> M)		AR reporter gene assay	AR reporter gene assay	NOEL : 750 ppm (SD rats, 雄性陰肛部距離降低)	2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 100 ~		

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

				ER positive proliferation assay (MCF-7 cell, E-screen) : ER Positive (10 <sup>-4</sup> ~ $\leq$ 10 <sup>-3</sup> M)  ER-CALUX (T47D-luc cell) : ER Positive (1/1.4 $\times$ 10 <sup>6</sup> E2)  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : 代謝物 BBP 有 Anti-ER Positive (>10 <sup>-4</sup> M)		(HepG2 cell, hAR) : AR  Negative (<10 <sup>-5</sup> M)		<1 (ng/ m <sup>3</sup> ) : 戶內 170 ~  <1 (ng/ m <sup>3</sup> )  2001 年日本飲食檢出率  1/81 (1%), 濃度範圍  nd~17 $\mu$ g/kg  2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率  1/81 (1%), 濃度範圍  nd~30 $\mu$ g/kg			
3	Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	作硝基纖維素、乙基纖維素、乙稀乙酯、氯化乙稀樹脂之塑化劑。  276 噸(全部進口,1998,USA)。	>3.2 g/kg (Oral, Mouse)  >3.2 g/kg (Oral, Rat)  1.6g/kg (ip, Mouse)	RBA (recombinant ER $\alpha$ ligand domain) : ER Positive (1/92,000 E2)  Yeast two-hybrid assay : ER Negative  Reporter gene assay (Hela cell, hER plasmid) : ER Negative  Reporter gene assay (Hela cell, Rat ER plasmid) : ER Negative	Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile Rat) : No effect ( $\leq$ 200 mg/kg/day)  Uterotrophic assay (oral, 7days, Ovariectomized Rat) : No effect ( $\leq$ 1000 mg/kg/day)  Fish screen assay	Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M)  Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M)	Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : No effect ( $\leq$ 1000 mg/kg/day)  導致大鼠輸精管萎縮 (2500 mg/kg/day, 7days)。	ND-3.17 g/kg (2000 年台灣中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪底泥)。  ND $\mu$ g/L (2001 年日本 171 處河川環境檢測)。  ND $\mu$ g/kg (2001 年日本 48 處底泥檢測)。	日本有列管。	疑似環境荷爾蒙物種。  代謝物之一 : Monocyclohexyl phthalate。	CERHR, 2000;  Nishihara et al., 2000; CERI, 2001a;b;  Yamasaki et al., 2002; Lake et al., 1982;  Okubo et al., 2003; 張, 2000

			> 3.2g/kg (ip, Rat)	ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) ER Positive (1/700,000 E2, 5×10 <sup>-5</sup> M) ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell): 代謝物 MCHP 有 Anti-ER Positive (>10 <sup>-4</sup> M)	(Japanese Medaka, Vitellogenin) : (10 <sup>-4</sup> M) Negative (≤ 390 µg/L)	AR binding assay : 9 % (10 <sup>-4</sup> M)		2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 100 ~ <1 (ng/ m <sup>3</sup> ); 戶內 110 ~ <1 (ng/ m <sup>3</sup> ) 2001 年日本飲食檢出率 0/81 (0 %) 2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 0/81 (0%)			
4	Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, Di-Octyl Phthalate (DOP))	當 PVC 製品如建材、汽車材料、食物包裝材料、醫療用品材料等之塑化劑。也作硝基纖維素、甲基丙烯酸、氯乙烯樹脂及氯化橡膠之塑化劑。	33.5 g/kg (Oral, Mouse) 30.6 g/kg (Oral, Rat) 14-75 g/kg (ip, Mouse)	RBA (ER from Immature SD Rat) : ER Negative RBA (ER from ovariectomized SD Rat) : ER Negative RBA (recombinant ERα ligand doman) : ER Positive (1/1,400 E2)	Uterotrophic assay (S.C., 7days, ovariectomized Rat) : No effect (≤2000 mg/kg/day) Uterotrophic assay (ip, 3 days, young White Albino mice,	Reporter gene assay (CHO-AR-Luc cell, pSG5-hAR-puro) : Anti-AR Negative (0.1 nM R1881 + 0.01-50 µM) AR binding assay : AR	Repeated-dose toxicity test : (oral, 4 Weeks, B6C3F1 mouse) : 降低睪丸重、睪丸萎縮 (25000 ppm) Repeated-dose toxicity test : (oral, 13 Weeks, F344 rat) : 降低子宮重與睪丸	成人(20-70 歲)總攝取量約 5.8 µg/kg bw /day (加拿大) ND-9.4 µg/L (51.2 % 檢出率, 1998 年日本 109 條河川環境檢測), 濃度僅次於 Nonylphenol。	台灣、日本、歐盟與美國有列管。 日本 : Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1 (MSDS required); Industrial Safety and Health Law; Air Pollution Control Law。	疑似環境荷爾蒙物種。 代謝物之一 : Mono(2-ethylhexyl)phthalate 尿中主代謝物	CERHR, 2000; IARC, 2000; EHC, 1992; Blair et al., 2000; Taiwan EPA; Hazleton, 1992a,b; Poon et al., 1997; Kobuke,

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

<p>台灣生產廠商:南亞,聯成,大類</p> <p>在美國與加拿大 DEHP 不再使用於與口接觸之玩具,但仍用於較大兒童玩具。</p> <p>為現今唯一使用於醫療用品材料。</p> <p>272,988 噸(生產 272,910 噸;進口 78 噸, 2000 年, USA)。</p> <p>依據 Aristech Chemical Co. DEHP 年產量約 2 億 6 千萬磅。</p> <p>日本 1993: 279323 噸; 1994: 291551 噸; 1995: 297681 噸;</p>	<p>30.7 g /kg (ip, Rat)</p>	<p>RBA (ER<math>\alpha</math>) : ER Positive (8%, 4.5<math>\times</math>10<sup>-7</sup> M)</p> <p>RBA (ER<math>\beta</math>) : ER Positive (3 %, 10<sup>-6</sup> M)</p> <p>Yeast two-hybrid assay : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Yeast growth assay (<i>S. cerevisiae</i> PL3 strain , hER) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Negative (10<sup>-3</sup> ~ 5<math>\times</math>10<sup>-7</sup> M)</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : 代謝物 MEHP ER Negative</p>	<p>short-term, low dose): 子宮重量顯著增加 (6.43 <math>\mu</math>M/kg/day)</p> <p>Fish screen assay (Japanese Medaka, Vitellogenin) : Negative (<math>\leq</math> 410 <math>\mu</math>g/L)</p>	<p>Positive (13 %, 10<sup>-3</sup>M)</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-5</sup> M)</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Negative (10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-5</sup> M)</p>	<p>重 (25000 ppm)</p> <p>Repeated-dose toxicity test : (oral, 13 Weeks, SD rat) : 降低睪丸重、輸精管萎縮、精蟲數降低 (5000 ppm)</p> <p>導致大鼠雄性後代生殖道異常 (750 mg/kg/day)</p> <p>會降低 60-85 % 大鼠胎兒之睪丸酮濃度。</p> <p>DEHP 及 MEHP 可能會抑制 Aromatase。</p> <p>CERHR 提出 DEHP 對生殖影響主要有抗雄激活性, 然不受雄激素受體條控。</p>	<p>ND-5.3 <math>\mu</math>g/L (23.4 % 檢出率, 2001 年日本 171 處河川環境檢測)。</p> <p>ND-4300 <math>\mu</math>g/kg (81.3 % 檢出率, 2001 年日本 48 處底泥檢測)。</p> <p>5.61-90.9g/kg (1998 年台灣淡水河關渡橋、台北橋、忠孝橋、中興橋底泥)。</p> <p>trace-13.9 g/kg (2000 年台灣中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪底泥)。</p> <p>台灣河川底泥 ND-16.4 <math>\mu</math>g/g ; 魚體 &lt;9.4-321.7<math>\mu</math>g/g</p> <p>2001 年日本 20 城市 95 個</p>	<p><b>Federal Regulatory Program Lists</b> : Air Contaminants (Occupational and Safety Health Act) ; Hazardous Air Pollutants (Clean Air Act) ; Hazardous Constituents (Resource Conservation and Recovery Act) ; Hazardous Substances (Superfund) ; Maximum Contaminant Levels (Safe Drinking Water Act) ; Priority Pollutants (Clean Water Act) ; Toxic Release Inventory Chemicals。</p> <p>USA Drinking Water Quality Standards: MCL; 0.006 mg/L, MCLG; 0 mg/L。</p> <p>Canadian Water Quality</p>	<p>Mono(2-ethylhexyl)phthalate</p> <p>檢測值 : 3.5 <math>\mu</math>g/L</p> <p>NOAEL : 37.6 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, Rat)</p> <p>NOAEL : 44 mg/kg/day (Development toxicity, Rat)</p> <p>LOAEL : 91 mg/kg/day (Development toxicity, Rat)</p>	<p>wt al., 2000; 張, 2000, 2004; 環保署, 1998; Fisher et al., 2003; Mylchreest et al., 2002; Gray et al., 2000; Parks et al., 2000; Zacharewski et al., 1998; CERI, 2001; Nishihara et al., 2001; Hashimoto et al., 2003; El-Mubarak and Huisigh, 2001; Roy et al., 2004; Legler et al., 2002; Davis et al., 1994; Harris et al., 1997; Okubo et al., 2003; Kavlock</p>
--	-----------------------------	---	--	---	---	--	--	---	---

		1996: 314760 噸; 1997: 309719 噸	Reporter gene assay (Hela cell, hER expression gene) : ER Negative  Yeast growth assay ( <i>S. cerevisiae</i> PL3 strain, hER) : ER Negative  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : ER Positive (>10 <sup>-3</sup> M)  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : ER Negative (10 <sup>-9</sup> M ~ 10 <sup>-4</sup> M)  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : Mono-2-ethylhexyl phthalate ER Negative  ER-CALUX (T47D-luc cell) : ER Negative		NOAEL : 339 mg/kg  bw/day (舉丸與副舉重降低、舉丸傷害)  LOAEL : 1060 mg/kg  bw/day (舉丸與副舉重降低、舉丸傷害)	房子檢測濃度戶外 510 ~ 40 (ng/ m <sup>3</sup> ) ; 戶內 3400 ~ 23 (ng/ m <sup>3</sup> )  2001 年日本飲食檢出率 68/81 (84 %), 濃度範圍 nd~330 µg/kg  2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 70/81 (86 %), 濃度範圍 nd~170 µg/kg  1997 年水環境總釋出量 303 磅/年 (美國)	Guidelines for the Protection of Aquatic Life: freshwater; 16 micro g/L, marine; insufficient data °  WHO Guidelines for Drinking Water Quality: 0.008mg/L °  USA CWA National Recommended Water Quality Criteria: Human health for consumption of water + organism; 1.8 micro g/L, Human health for consumption of organism only; 5.9 micro g/L °	et al., 2002; 內海, 1999
--	--	-----------------------------------	--	--	---	--	--	------------------------

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

5	Diethyl phthalate (DEP)	作醋酸纖維素、甲基丙烯酸、醋酸乙稀酯、聚苯乙稀樹脂之塑化劑。	6.178-8.6 g/kg 9.168-31.0 g/kg (Oral, Mouse) 394 噸 (生產 371 噸；進口 23 噸, 1998 年, USA)。 日本生產 1996: 700 噸。	RBA (hER expressed in Sf9/Baculovirus) : ER Negative RBA (recombinant ERα ligand domain) : ER Negative RBA (ER from ovariectomized SD Rat) : ER Negative RBA (ERα) : ER Positive (3 %, 4.5×10 <sup>-7</sup> M) RBA (ERβ) : ER Positive (3 %, 10 <sup>-4</sup> M) Yeast two-hybrid assay : ER Negative Reporter gene assay (recombinant yeast, hER gene & lac-Z reporter gene) : ER Positive (1/2,000,000 E2) Reporter gene assay (Hela cell, hER	Uterotrophic assay (S.C., 7 days, ovariectomized Rat) : No effect (≤2,000 mg/kg/day) Fish screen assay (Japanese Medaka, Vitellogenin) : No effect (≤1053.3 μg/L) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Positive (IC50=7.9×10 <sup>-5</sup> M,	Reporter gene assay (CHO-AR-Luc cell, pSG5-hAR-puro) : Anti-AR Negative (0.1 nM R1881 + 0.01-50 μM) AR binding assay : AR Positive (IC50=1.5×10 <sup>-3</sup> M, 10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-3</sup> M) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Positive (IC50=7.9×10 <sup>-5</sup> M,	Hershberger assay (oral, 10 days, SD Rat) : No effect (≤2000 mg/kg/day) Hershberger assay (oral, 10 days, SD Rat, DEP (2000 mg/kg/day)+TS 0.4 mg/kg/day (s.c.)) : No antiandrogenic effect Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : AR Negative (10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-5</sup> M) Reporter gene assay (Hela cell, hAR) : Anti-AR Positive (IC50=7.9×10 <sup>-5</sup> M,	成人攝取量約 5.8 μg/year/person ND-0.007 g/kg (1998 年台灣淡水河關渡橋、台北橋、忠孝橋、中興橋底泥)。 台灣河川底泥 ND-0.87 μg/g ; 魚體<0.1-0.24μg/g ND-0.9 μg/L (4.7 %檢出率, 2001 年日本 171 處河川環境檢測)。 ND μg/kg (2001 年日本 48 處底泥檢測)。 2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 180 ~ <15(ng/ m <sup>3</sup> ) ; 戶內 4500	日本與美國有列管。 日本 : Chemical Substances Control Law; Air Pollution Control Law ; Marine pollution Prevention Law 。 <b>Federal Regulatory Program Lists</b> : Hazardous Constituents (Resource Conservation and Recovery Act) ; Hazardous Substances (Superfund) ; Priority Pollutants (Clean Water Act) 。 USA CWA National Recommended Water Quality Criteria: Human health for consumption of water + organism; 23000 micro g/L, Human health for consumption	疑似環境荷爾蒙物種。 代謝物之一 : Monoethyl phthalate 尿中 Monoethyl phthalate 檢測值 : 176 μg/L NOAEL : ~750 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, male rat) NOAEL : 3210 mg/kg/day (Development toxicity, rat)	CERHR, 2000;環 保署, 1998; CERI, 2001a,b; Nishihara et al., 2000; Nakai et al., 1999; Blair et al., 2000; Harris et al., 1997; CDC, 2001; Roy et al., 2004; Legler et al., 2002; Gaido et al., 1997;2000; WHO, 2003; USDHHS, 1995; 內海,1999, Okubo et al., 2003 ; 張, 2000,2004
---	-------------------------	--------------------------------	--	---	---	---	--	---	--	---	---

				<p>expression gene) : ER Negative</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) : ZR-75 human breast cancer cell) : ER Negative (<math>\leq 10\mu\text{M}</math>)</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : ER Positive (7 %, 10-4 M)</p> <p>ER-CALUX (T47D-luc cell) : ER Positive (<math>1/3.2 \times 10^{-8}</math> E2)</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Positive (30 % REE at <math>10^{-3}</math> M, <math>1/5 \times 10^7</math> E2)</p>	<p><math>10^{-6} \sim 10^{-5}</math> M)</p> <p>AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR Negative (<math>&lt; 10^{-5}</math> M)</p> <p>AR reporter gene assay (HepG2 cell, hAR) : AR Negative (<math>&lt; 10^{-5}</math> M)</p>	<p><math>\sim &lt; 15</math> (ng/ m<sup>3</sup>)</p> <p>2001 年日本飲食檢出率 0/81 (0 %)</p> <p>2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 0/81 (0%)</p> <p>美國飲用水檢出濃度 0.01 ~ 4.6 ppb</p>	<p>of organism only; 120000 micro g/L</p>			
6	Dipentyl phthalate (DPP)	塑化劑	2.206 g /kg (Oral, Rat)	<p>RBA (recombinant ER ligand doman) : ER positive (0.00165 % E2)</p> <p>Yeast two-hybrid assay : ER Negative</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7</p>	<p>Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile Rat) : 無雌激素與抗雌激素活性 (<math>\leq 1000</math> mg/kg/day)</p>	<p>RBA (recombinant AR ligand doman) : AR Negative</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7</p>	<p>Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : 無雌激素 (DPP<math>\leq 1000</math> mg/kg/day)</p> <p>Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : 精液與前列</p>	<p>ND <math>\mu\text{g/L}</math> (2001 年日本 171 處河川環境檢測)。</p> <p>ND <math>\mu\text{g/kg}</math> (2001 年日本 48 處底泥檢測)。</p>	<p>疑似環境荷爾蒙物種。</p>	<p>Nishihara et al., 2000; Yamasaki et al., 2004a,b; Okubo et al., 2003; 日本環境省, 2001</p>

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

				(E-Screen) human breast cancer cell) : ER Negative (≤10 <sup>-6</sup> M)		(E-Screen) human breast cancer cell) : 代謝物 MPP 有 Anti-ER Positive (>10 <sup>-4</sup> M)	腺重量減少 (DPP1000 mg/kg/day + TS 0.2 mg/kg/day)	2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 19 ~ <5 (ng/ m <sup>3</sup> ) ; 戶內 160 ~ <5 (ng/ m <sup>3</sup> )  2001 年日本飲食檢出率 0/81 (0%)  2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 0/81 (0%)			
7	Dihexyl phthalate (DHxP)	當 PVC 製品如建材、手套、交通檔筒、玩具、鞋等之塑化劑。  <250 噸 (USA)。 未用於醫藥材料。	29.6 ml /kg (Oral, male Rat)  38.9 ml /kg (Oral,	RBA (recombinant ER ligand doman) : ER positive (0.000918 % E2)  Yeast two-hybrid assay : ER Negative  RBA (ER from Immature SD Rat) : ER	Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile Rat) : 無雌激素與抗雌激素活性 (≤1000 mg/kg/day)	RBA (recombinant AR ligand doman) : AR Negative	Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : 無雌激素與抗雄激素活性 (DHxP≤1000 mg/kg/day; DHxP ≤1000 mg/kg/day + TS 0.2 mg/kg/day)	PVC 職場暴露 143 μg/kg bw/workday  ND μg/L ( 2001 年日本 171 處河川環境檢測)。	日本有列管。	疑似環境荷爾蒙物種。  LOAEL : 1800 mg/kg/day (Repeat dose	CERHR,2000; Nishihara et al., 2000; Yamasaki et al., 2004a,b; Okubo et al., 2003; 日本環境

			female Rat	<p>Negative</p> <p>Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Yeast growth assay (S. cerevisiae PL3 strain, hER) : ER Negative</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : ER Negative (≤10μM)</p>	<p>Uterotrophic assay (S.C., 7days, ovariectomized Rat) : No effect (≤2000 mg/kg/day)</p>		<p>Reproductive LOAEL : 380 mg/kg bw/day (受孕率降低)</p>	<p>ND μg/kg (2001 年日本 48 處底泥檢測)。</p> <p>ND-trace g/kg (台灣中港溪、淡水河、客雅溪、二仁溪底泥)。</p> <p>2001 年日本 20 城市 95 個房子檢測濃度戶外 15 ~ &lt;1 (ng/ m<sup>3</sup>) ; 戶內 37 ~ &lt;1 (ng/ m<sup>3</sup>)</p> <p>2001 年日本飲食檢出率 0/81 (0%)</p> <p>2001 年日本奶粉、嬰兒食品及速食食品檢出率 0/81 (0%)</p>	<p>toxicity, Rat)</p> <p>LOAEL : 9.9 g/kg (Development toxicity, Mice)</p>	<p>省, 2001; Zacharewski et al., 1998; 張, 2000;</p>
8	Dipropyl phthalate (DPrP)	塑化劑	<p>RBA (recombinant ER ligand doman) : ER Negative</p> <p>Yeast two-hybrid assay : ER Positive</p>	<p>Uterotrophic assay (S.C., 3days, juvenile Rat) : 無雌激素與抗雌激素活性 (≤1000</p>	<p>RBA (recombinant AR ligand doman) : AR Negative</p>	<p>Hershberger assay (oral, 10 days, Rat) : 無雌激素與抗雌激素活性 (DPrP≤1000 mg/kg/day;</p>	<p>ND μg/L (2001 年日本 171 處河川環境檢測)。</p> <p>ND μg/kg (2001 年日本</p>	<p>日本、歐盟有列管。</p>	<p>疑似環境荷爾蒙物種。</p> <p>代謝物之一 : Monopropyl</p>	<p>Nishihara et al., 2000; Yamasaki et al., 2004a,b; 日本環境省, 2001; 張,</p>

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

				(REC10=1×10 <sup>-3</sup> M)  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell):  ER Negative (≤10μM)	mg/kg/day		DPrP≤1000 mg/kg/day  + TS 0.2 mg/kg/day	48 處底泥檢測)。  2001 年日本 20 城市 95 個 房子檢測濃度戶外 4.8 ~ <1 (ng/ m <sup>3</sup> ) ; 戶內 17 ~ <1 (ng/ m <sup>3</sup> )  2001 年日本飲食檢出率  0/81 (0%)  2001 年日本奶粉、嬰兒食 品及速食食品檢出率  0/81 (0%)		phthalate	2000
9	Di-n-octyl phthalate ( DnOP)	DnOP 在使用上主要作塑 化劑,其相關產品包括 包裝膜、地板磁磚、電 纜、電線及黏著劑。亦 用在化妝品與農藥製 品。  被 FDA 核准使用於食品 包裝包材添加劑。	13 g/kg (Oral, Mouse)  53.7 g/kg  (Oral, Rat)	Vitellogenin (VTG) induction in rainbow trout hepatocyte cultures:ER Negative  RBA (ER from Immature SD Rat) : ER Negative  Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative	Uterotrophic assay (S.C., 7days, ovariectomized Rat) : No effect  (≤2000 mg/kg/day)	AR reporter gene assay  (Yeast, hAR) : AR Negative(<10 <sup>-5</sup> M)  AR reporter gene assay  (HepG2 cell, hAR) : AR Negative (<10 <sup>-5</sup> M)  降低人類精蟲之活動力  (In vitro)	會導致大鼠輸精管萎縮  (Single daose, 100 mg/kg bw/ day, 90 days)  NOAEL (rat , pathological change in pancrease) : 2.078 g/kg/day。  NOAEL (mice , reeproductive) : 7,500	成人暴露量 3-30 μg/kg bw /day  ND-1.04 g/kg (台灣淡水河 關渡橋、台北橋、忠孝 橋、中興橋底泥)。  台灣河川底泥 ND-0.26 μg/g ; 魚體	美國、日本與歐盟有列管。  日本 : Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1 (MSDS required)。  <b>Federal Regulatory Program Lists</b> : Hazardous Constituents  (Resource Conservation and Recovery Act) : Hazardous	代謝物之一 : Mono-n-octyl phthalate  MRL (Minimal Risk Levels , extrapolation from animals to human) : 3	CERHR,2000; Zacharewski et al., 1998; Jobling et al., 1995; Petit et al., 1997; Harris et al., 1997 環保署, 1998; Cole et al., 1984; OME, 2002;

		10,000,000 磅/年 ( USA ) °	Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative  Yeast growth assay (S. cerevisiae PL3 strain , hER) : ER Negative  ER-CALUX (T47D-luc cell) : ER Negative  Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : Negative  Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : 代謝物 MnOP ER Negative			g/kg/day °  NOAEL ( rat ° reproductive ) : 350  g/kg/day °	<0.06-0.49µg/g  英國嬰兒配方檢出濃度  0.21-1.42 mg/kg °  依據美國化學委員會指出  DnOP 只被檢測出在少 數兒童含咬玩具, 大部分 未檢測出。  DnOP 在美國 15 處廢水中 有檢測到 3 處, 濃度在 0.1-1 µg/L  DnOP 在 1984 年 (2-4 月) 波特蘭空氣樣品與下雨 空氣樣品之濃度為 2.6-20 ng/L 及 0.06-0.94 ng/L  在美國估計有 240,609 磅被 轉移至垃圾掩埋場或處	Substances (Superfund) ;  Priority Pollutants (Clean Water Act) °	mg/kg/day °  MRL ( Minimal Risk Levels , extrapolation from animals to human ) : 0.4 mg/kg/day for intermediate-d uration oral exposure °  NOAEL : 38.8 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, Rat)  NOAEL : 9.78 mg/kg/day (Development toxicity, Mice)	TRI192, 1994; Ligoicket al., 1985 ;Zacharewsk i et al., 1998; USDHHS, 1997; Mann et al., 1985; Legler et al., 2002; Harris et al., 1997; Gaido et al., 1997;2000; Dogra et al., 1987; Fredricsson et al., 1993; 張, 2000
--	--	-----------------------------	---	--	--	---	---	--	---	---

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

								<p>理場，約有 15,302 會釋放至環境介質中。</p> <p>美國 EPA 檢測飲用水中之 DnOP &lt;0.5 ppb</p> <p>美國 EPA 檢測空氣中之 DnOP 0.06-0.94 ng/m<sup>3</sup>。</p> <p>美國 EPA 檢測河川中之 DnOP 0.024 ~ 1 ppb。</p>			
10	Diisononyl Phthalate (DINP)	<p>DINP 使用很廣泛，當 PVC 製品如建材、汽車材料、電纜、玩具、鞋等之塑化劑。</p> <p>有限制使用於食品包装材料，並沒有使用於醫療用品材料。</p> <p>國內主要生產廠商為南</p>	<p>&gt;10 g/kg (Oral, Rat)</p> <p>&gt;3 g /kg (Dermal, rabbit)</p>	<p>RBA (hER expressed in Sf9/Baculovirus) : ER Negative</p> <p>RBA (ER from Immature SD Rat uterine cytosol) : ER Negative</p> <p>RBA (recombinant hER) : ER Negative</p> <p>Yeast two-hybrid assay : ER Negative</p>	<p>Uterotrophic assay (S.C., 4days, juvenile Rat) : No effect</p> <p>(≤2000 mg/kg/day)</p>	<p>AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR Negative (&lt;10<sup>-5</sup> M)</p> <p>AR reporter gene assay (HepG2 cell, hAR) : AR Negative (&lt;10<sup>-5</sup> M)</p>	<p>導致大鼠雄性後代生殖道些許異常 (750 mg/kg/day)。</p> <p>導致 SD 大鼠減數分裂精生成細胞與 Sertoli cell 衰退 (20000 ppm)。</p> <p>Reproductive NOAEL : 665-779 mg/kg/day</p>	<p>3-12 歲 DINP 暴露量約 44 μg/kg bw /day 。</p> <p>成人暴露量約 3-30 μg/kg bw /day 。</p>	<p>代謝物之一 : Monoisononyl phthalate</p> <p>NOAEL : 88 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, Rat)</p> <p>NOAEL : 500</p>	<p>CERHR,2000; Fiala et al., 2000; Doull et al., 1998; Zacharewski et al., 1998; Jobling et al., 1995; Bolger et al., 1998; Nakai et al., 1999; Petit et al., 1997; Gray et</p>	

		亞與聯成。  數千噸 (1998 年, USA)。	<p>RBA (ER from Immature SD Rat) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative</p> <p>Yeast growth assay (<i>S. cerevisiae</i> PL3 strain, hER) : ER Negative</p> <p>Fish screen assay (VTG) : ER Negative</p> <p>Yeast based assay (Rainbow trout ER) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Negative (<math>10^{-3}</math>-<math>10^{-6}</math> M)</p> <p>ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) :</p>		(male rat) : 696-802  mg/kg/day (female rat)			mg/kg/day  (Development toxicity, Rat)	al., 2000;  Nishihara et al., 2000; Coldham et al., 1997;  Masutomi et al., 2004; Harris et al., 1997; Gaido et al., 1997;2000; Okubo et al., 2003
--	--	---------------------------------	---	--	--	--	--	--	--

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

				ER Negative ( $\leq 10\mu\text{M}$ )  ER positive cell proliferation (ZR-75 human breast cancer cell) : ER Positive ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ M)							
11	Diisodecyl Phthalate ( DIDP )	DINP 使用很廣泛，當 PVC 製品如建材、人造皮革、汽車材料、紡織品、電纜等之塑化劑。  國內主要生產廠商為南亞與聯成。	64 g /kg (Oral, Rat)  >3.16 g /kg (dermal, Rat)	RBA (hER expressed in Sf9 Baculovirus) : ER Negative  RBA (ER from Immature SD Rat uterine cytosol) : ER Negative  RBA (recombinant hER) : ER Negative  Yeast two-hybrid assay : ER Negative  Reporter gene assay (MCF-7 cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative  Reporter gene assay (Hela cell, Gal4-hER-luc) : ER Negative	Uterotrophic assay (S.C., 4 days, juvenile Rat) : No effect ( $\leq 2000$ mg/kg/day)	AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR Negative ( $< 10^{-5}$ M)  AR reporter gene assay (HepG2 cell, hAR) : AR Negative ( $< 10^{-5}$ M)	Reproductive NOAEL : 427-929 mg/kg/day (male rat) ; 508-927 mg/kg/day (female rat)	成人暴露量約 3-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw /day 。	歐盟有列管。	代謝物之一 : Monoisodecyl phthalate  NOAEL : ~282 mg/kg/day (Repeat dose toxicity, Rat)	CERHR,2000; Fiala et al., 2000; Doull et al., 1998; Zacharewski et al., 1998; Jobling et al., 1995; Bolger et al., 1998; Nakai et al., 1999; Petit et al., 1997; Gray et al., 2000; Nishihara et al., 2000; Coldham et al., 1997; 張, 2000; Masutomi

				<p>Yeast growth assay (<i>S. cerevisiae</i> PL3 strain, hER) : ER Negative</p> <p>Fish screen assay (VTG) : ER Negative</p> <p>Yeast based assay (Rainbow trout ER) : ER Negative</p> <p>Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Negative (<math>10^{-3} \sim 5 \times 10^{-7}</math> M)</p>						<p>et al., 2004; Harris et al., 1997; Gaido et al., 1997;2000;</p>
12	Diheptyl Phthalate (DHP)	塑化劑	>2 g /kg (Oral, Rat)	Yeast two-hybrid assay : ER Negative			<p>Repeated-dose toxicity test : (oral, 4 Weeks, SD rat) : 睪丸與副睪重降低、輸精管內精蟲減少、副睪精蟲形成細胞剝離、精蟲形成細胞消失 (1000 mg/kg/day)</p>	<p>日本有列管。</p> <p>日本：Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1(MSDS required)。</p>	<p>代謝物之一：Monoheptyl phthalate</p>	<p>Nishihara et al., 2000</p>
13	Diisobutyl phthalate (DIBP)	塑化劑	15 g /kg (Oral, Rat)	Yeast two-hybrid assay : ER Negative				<p>日本有列管。</p>	<p>代謝物之一：Monoisobutyl</p>	<p>Nishihara et al., 2000; Harris et al.,</p>

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

				Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Positive (30 % REE at $10^{-3}$ M, $1/10^7$ E2)  ER positive cell proliferation (ZR-75 human breast cancer cell) : ER Positive ( $10^{-5}$ M)					日本 : PRTR law class 2 (MSDS required) ◦	phthalate	1997
14	Diisooctyl Phthalate (DIOP)	塑化劑	>22.6 g/kg (Oral, Rat)	Yeast two-hybrid assay : ER Negative						代謝物之一 : Monoisooctyl phthalate	Nishihara et al., 2000
15	Dimethyl phthalate (DMP)	塑化劑	6.8 g /kg (Oral, Rat)	ER-CALUX (T47D-luc cell) : ER Negative  Yeast two-hybrid assay : ER Negative  Reporter gene assay (Recombinant yeast cell) : ER Negative ( $10^{-3}$ ~ $5 \times 10^{-7}$ M)			台灣河川底泥 ND-0.07 $\mu$ g/g ; 魚體 <0.05-0.17 $\mu$ g/g	美國、日本、台灣有列管。  日本 : Chemical Substances Control Law; Air Pollution Control Law ◦  <b>Federal Regulatory Program Lists</b> : Air Contaminants (Occupational and Safety Health Act) ; Hazardous Air	代謝物之一 : Monomethyl phthalate  LOAEL : 4 mg/kg (Repeat dose toxicity, Rabbit, kidney, liver effects)	Legler et al., 2002 Nishihara et al., 2000; 張, 2000, 2004 ;Taiwan EPA	

									Pollutants (Clean Air Act) : Hazardous Constituents (Resource Conservation and Recovery Act) : Hazardous Substances (Superfund) : Priority Pollutants (Clean Water Act) : Registered Pesticides (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) : Toxic Release Inventory Chemicals	NOAEL : >3570  mg/kg/day (Development toxicity, rat)	
16	Diisopropyl Phthalate (DIPrP)	塑化劑		Yeast two-hybrid assay : ER Positive (REC10=2×10 <sup>-3</sup> M)		ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen) human breast cancer cell) : 代謝物 MIPrP 有 Anti-ER Positive (>10 <sup>-4</sup> M)			代謝物之一 : Monoisopropyl phthalate	Nishihara et al., 2000; Okubo et al., 2003	
17	Diisoheptyl Phthalate	塑化劑	>10 g /kg (Oral, Rat)			AR reporter gene assay (Yeast, hAR) : AR			代謝物之一 : Monoisoheptyl	Gaido et al., 1997;2000	

環境荷爾蒙調查研究(3/3)

	(DIHP)					Negative(<10 <sup>-5</sup> M) AR reporter gene assay (HepG2 cell, hAR) : AR Negative (<10 <sup>-5</sup> M)				phthalate Development NOAEL : 300 mg/kg/day'。	
18	Dibutoxyethyl phthalate (DBEP)	塑化劑		Yeast two-hybrid assay : ER Negative							Nishihara et al., 2000
19	Di (2-ethylhexyl) Adipate (DEHA : Di-Octyl Adipate (DOA))	當 PVC 塑化劑以取代 Phthalates 用於食物 包材。作皮革、水管、 鞋、手套等製品、合 成潤滑劑、合成橡膠 軟化劑。  台灣生產廠商:南亞,聯 成,大穎  1,361 噸 (生產 440 噸;進口 921 噸, 1998 年, USA)。	9.1 g/kg (Oral, rat)	Yeast two-hybrid assay : ER Negative  ER positive cell proliferation (MCF-7 (E-Screen)) : ER Negative	Fish screen assay  (Japanese Medaka, Vitellogenin) : Negative (≤453.6 μg/L)  降低懷孕率 (ICR Mice, male, 9.2 mg/kg)		ND-0.19 μg/L (7.0 %檢出 率, 2001 年日本 171 處河 川環境檢測)。  ND-17 μg/kg (2.1 %檢出 率, 2001 年日本 48 處底 泥檢測)。  2001 年日本飲食檢出率 22/81 (27 %), 濃度範圍 nd~46 μg/kg  2001 年日本奶粉、嬰兒食	日本、美國有列管  日本 : Chemical Substances Control Law; PRTR law class 1 (MSDS required); Air Pollution Control Law : Marine pollution Prevention Law。  <b>Federal Regulatory Program</b>  Lists : Maximum Contaminant Levels (Safe Drinking Water Act)。	疑似環境荷爾蒙 物種 代謝物之一 : Mono(2-ethylhe xyl) Adipate  Development NOAEL : 200 mg/kg/day。  NOAEL : 28 mg/kg/day (SD	Nishihara et al., 2000; Hashimoto et al., 2003; Hodge et al., 1991; Singh et al., 1975; Dalgaard et al., 2003; MOE, 2001	

		日本 32700 噸 (1996) for adipate plasticizer						品及速食食品檢出率 6/81 (7%), 濃度範圍 nd~56 µg/kg	U.S. Drinking Water Standard: MCL 0.4mg/L, MCLG 0.4mg/L  WHO Drinking Water Guideline: 0.08 mg/L	rat, 體重減 低·輸尿管與骨 骼異常)	
20	Diisobutyl adipate (DIBA)	塑化劑		Yeast two-hybrid assay : ER Negative						代謝物之一 : Monoisobutyl adipate	Nishihara et al., 2000
21	Di-n-butyl adipate (DBA)	塑化劑		Yeast two-hybrid assay : ER Negative						代謝物之一 : Monobutyl adipate	Nishihara et al., 2000

Abbreviation : 1.RBA : Receptor binding assay. 2. YES : Yeast estrogen screen. 3. REC10 : 相當於 10% E2 雌激素作用之所需檢體濃度. 4. REE : 相對雌激素效應; 5. LOAEL : lowest observed adverse effect level. , 6. NOAEL : no observed adverse effect level. 7. ER: estrogen receptor.

8. AR : Androgenic receptor; 9. PRTR law (Pollutant release and transfer register law) .

## 第六章 參考文獻

- 林金雀、陳怡琪，2002特用化學品工業年鑑，工研院產業經濟與資訊服務中心，2002。
- 林金雀、陳怡琪，2003特用化學品工業年鑑，工研院產業經濟與資訊服務中心，2003。
- 內海 英雄，環境化學物質評估導向，POPs，EDCs & Bioassays 研討會要旨集, 1-6, 1998a。
- 內海 英雄等，化學物質對生物及環境負荷總和評估方法之開發與研究，日本環境廳未來環境創造型基礎研究推進制度平成9年度報告書，日本，1998b。
- 內海 英雄等，化學物質對生物及環境負荷總和評估方法之開發與研究。日本環境廳未來環境創造型基礎研究推進制度平成10年度報告書，日本, 1999。
- 內海 英雄，未來環境創造型基礎研究推進計畫概要及背景，化學物質對生物及環境負荷之評估與管理-以生物分析法管理化學物質之新挑戰-研討會要旨集, 1-6, 2000。
- 陳永仁，環境荷爾蒙管制，財團法人孫運璿學術基金會，台北，2001。
- 陳文德，國內環境荷爾蒙管制現況，第二屆環境荷爾蒙與持久性有機污染物研討會，2002，台北，p21-24。
- 張碧芬、袁紹英，鄰苯二甲酸酯類環境荷爾蒙對生物的影響。環境檢驗雙月刊，2000。
- 張碧芬，河川環境鄰苯二甲酸酯類化合物之調查及生物降解之研究。環境荷爾蒙研討會論文集，2000。
- 張碧芬、廖健森、黃柏菁、李俊璋，國內鄰苯二甲酸酯類化合物的環境污染調查現況，第三屆環境荷爾蒙及持久性有機污染研討會，63-66, 2004。
- 廖健森、張碧芬、袁紹英，環境荷爾蒙-塑膠添加物（鄰苯二甲酸酯類）之環境流布，環境檢驗雙月刊，2001。
- 環保署，淡水河體環境分析及研究。環保署環境檢驗年度報告，1998。
- 塑膠產業概況，塑膠資訊，12, 44-51，2001。

- Amato, B., Kael, S., Ng, C., Phthalate plasticizers. CE435, 2001.
- Amdur et al., Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 4<sup>th</sup> Ed., p499.
- ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry U. S. Department of Health and Human Services Public Health Services, 1990.
- Baker, V.A., Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. *Toxicol. In Vitro* 15, 413-419, 2001.
- BD, www.biodetectionsystems.com
- Behnisch, P.A., Hosoe, K. and Sakai, S.I., Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds-a review of bioassay/biomarker technology. *Environ. Int.*, 27, 413-439, 2001.
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., and Sheehan, D.M., The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, 54,138-153, 2000.
- Bolger, R., Wiese, TE., Ervin, K., Nestich, S., Checovich, W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect.* 103, 582-587, 1995.
- Carlsen, E., Givercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*, 305, 609-613, 1992.
- CDC, National report on human exposure to environmental chemicals. Center for Disease Control and Prevention, March, 2001.
- CERI (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan): Report on evaluation and method development for hormone-like effects of exogenous substances. 2000 Contract investigation/research on environment-compatible technology development on behalf of the Ministry of Environment and Industry, 2001a.
- CERI (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan):1999 Contract

task on behalf of the New Energy and Industrial Technology Development Organization-Report on evaluation and method development for endocrine-disrupting effects of chemicals, 2001b.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on dibutyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DBP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on di-n-octyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DNOP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on di(2-ethylhexyl)phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DEHP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on butyl benzyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-BBP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on Diisodecyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DIDP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on Diisononyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DINP-00, 2000.

CERHR, NTP-CERHR expert panel report on Di-n-hexyl phthalate. Center for evaluation of risks to human reproduction, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program.

- NTP-CERHR-DNHP-00, 2000.
- Chen, F.A., Shue, M.F., Chen, T.C., Evaluation on Estrogenicity and Oxidative Hepatotoxicity of Fossil Fuel Industrial Wastewater before and after the Powdered Activated Carbon Treatment. *Chemosphere* 55 (10), 1377-1385, 2004.
- Codbury, D., *The Feminization of Nature*, 1997.
- Colborn T, Vom Saal F.S., Soto, A.M., Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, 101, 378-384, 1993.
- Colborn, T. et al., *Our Stolen Future*, 1997.
- Coldham, N.G, Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D.P., Connor, C. and Sauer, M.J., Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay, *Environ. Health Perspect.*, 105, 734-742, 1997.
- Cole, R.H., Frederick, F.E., Healy, R.P., Preliminary findings of the priority pollutant monitoring project of the Nationwide Urban Runoff Program. *Journal WPCF*, 56(7), 898-908, 1984.
- Codbury, D., *The Feminization of Nature*, 1997.
- CSTEE Opinions on phthalates migration from soft PVC toys and child-care articles, Brussels, 24 Apr. and 27 Nov., 1998.
- Dalgaard, M., Hass, U., Vinggaard, M. A., Jarfelt, K., Lam, H.R., Sorensen, I.K., Sommer, H.M., Ladefoged, O., Di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed wistar rats. *Reprod. Toxicol.*, 17, 163-170, 2003.
- Danzo, B.J., Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.* , 105, 294-301, 1997.
- Davis, B.J., Gaines, L.J., Heindel, J.J., Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-Camp stimulation

- in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 224-228, 1994.
- Dewhurst, R.E., Wheeler, J.R., Chummun, K.S., Mather, J.D., Callaghan, A., Crane, A., The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban groundwater quality. *Chemosphere* 47, 547-554, 2002.
- Doelman, C., Borm, P.J.A., Bast, A, Plasticizers and bronchial hyperreactivity. *The Lancet*, 335, 725, 1990.
- Dogra, R.K., Khanna, S., Shkla, L., et al., Modification of the immune response in rats by di-n-octyl phthalate. *Industrial Health*, 25, 97-101, 1987.
- Doull, J., Cattley, R., Elcombe, C., Lake, B., Swenberg, J., Williams, G., Expert panel report on DEHP:U.S. Environmental Protection Agency, 1998.
- El-Mubarak, A. and Huisingh, D., Environmental xenoestrogens: short-term exposure of low doses of lindane, dieldrin, dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate increases uterine weight in young female mice. *Anal. Sci.*, 17 (suppl.), 261-264, 2001.
- El-Mubarak, A and Huisingh, D., Environmental xenoestrogen: short-term exposure of low doses of lindane, dieldrin, dibutyl phthalate, and diethylhexyl phthalate increases uterine weight in young female mice. *Anal. Sci.*, 17 (suppl.) i261-i264.
- EHC Environmental Health Criteria, 131, Diethylhexyl phthalate, 1992.
- Ema, M. and Miyawaki, E., Kawashima, K., Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Reprod. Tett.*, 111, 271-278, 2000.
- Ema, M. and Miyawaki, E., Hirose, A., Kamata, E., Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butylbenzyl phthalate. *Reprod. Toxicol.*, 17, 407-412, 2003.
- ENDS, Industry glimpses new challenges as endocrine science advances.

- ENDS Report* 290, 26-30, 1999.
- EU, Europea Workshop on Endocrine Disrupters, Aronsborg, Sweden  
Workshop Report, 18-20 Jun 2001.
- Fertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, F., Comhaire, F., Endocrine disruptors:  
effect on male infertility and screening tools for their assessment.  
*Toxicol. In Vitro* 17, 515-524, 2003.
- Fiala, F., Steiner, I., Kubesch, K., Migraion of di-(2-ehthylhexyl)phthalate  
(DEHP) and diisononyl phthalate (DINP) from PVC articles. 2000.
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R.M., Human 'testicular  
dysgenesissyndrome': a possible model using inutero exposure of the  
rat to dibutyl phthalate. *Hum. Reprod.* 18, 1383-1394, 2003.
- Fox, G.A., Practical causal inference for ecoepidemiologists. *J. Toxicol.  
Environ. Health*, 33:359-373, 1991.
- Fredricsson, B., Moeller, G., Pousette, et al., Human sperm mobility is  
affected by plasticizers and diesel particle extracts. *Pharmacol. Toxicol.*,  
72, 128-133, 1993.
- Fricker, S.P., Buckley, R.G., Comparison of two colorimetric assays as  
cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents.  
*Anticancer Research*. 16(6B), 3755-3760, 1996.
- Gaido, K., Leonard, L., Lovell, S., Gould, J., Babai, D., Portier, C, et al.  
Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a  
yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol  
Appl Pharmacol.* 143, 205-212, 1997.
- Gaido, K., Maness, S., McDonnell, D., Dehal, S., Kupfer, D., Safe, S.,  
Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen  
receptor alpha and beta and androgen receptor: structure-activity studies.  
*Mol Pharmacol.* 58, 852-858, 2000.
- Gangolli, S.D., Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Persp.*,  
45, 77-84, 1982.
- Gelbke, H.P., Kayser, M., Poole, A. OECD test strategies and methods for

- endocrine disruptors. *Toxicology* 205, 17-25, 2004.
- Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., Machala, M., Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon and estrogen receptor mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 3-16, 2002.
- Gomes, R.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal. Chem.* 22(10), 697-705, 2003.
- Gutendorf, B. and Westendorf, J., Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogen and xenoestrogen. *Toxicology* 166, 79-89, 2001.
- Gray, L.E. and Gangolli, S.D., Aspects of the testicular toxicology of the phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, 65, 229-235, 1986.
- Gray, L.E. Jr., Wolf, C., Lambright, C., Mann, P., Price, M., Cooper, R.L. and Ostyl, J., Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health.* 15, 94-118, 1999.
- Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramahneni, D.N. and Parks, L., Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58(2), 350-365, 2000.
- Hardin B.D., A recommended protocol for the Chernoff/Kavlock preliminary developmental toxicity test and a proposed method for assigning priority scores based on results of that test. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 7, 85-94, 1987.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P., The estrogenic

- activity of phthalate esters in-vitro. *Environ. Health Perspect.*, 105(8), 802-811, 1997.
- Hashimoto, Y., Kawaguchi, M., Miyazaki, K., Nakamura, M., *Dental Material*, 19, 341-346, 2003.
- Hazleton Washington I, A subchronic (4-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in B6FC3F1 mice. 8D submission, microfische no. OTS0535433. Washington, DC: Submitted to U.S. EPA, Office of toxic substance, 1992a.
- Hazleton Biotechnologies Company, A subchronic (13-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats. CAS 117-81-7, Submitted to Office of Toxic Substance, U.S. EPA, (microfische no. OTS0535433), 1992b.
- Hilton, R.H., Mitchel, F.E., Mann, A., et al., Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environ. Health Perspect.*, 70, 195-210, 1986.
- Hodge, M.C.E., Di(2-ethylhexyl) adipate: Teratogenicity study in the rat, NTIS/OTS 0533689, US Department of Commerce, Springfield, VA., USA.
- Howard P.H., Handbook of environmental fate and exposure data of environmental chemicals. Vol.1 Large production and priority pollutants. Chelsea, MA, Lewis Publishing Inc., 217-228, 1989.
- Hurst, M. R., Balaam, J., Chan-Man, Y. L., Thain, J. E., Thomas, K. V., Determination of dioxin and dioxin-like compounds in sediments from UK estuaries using a bio-analytical approach: chemical-activated luciferase expression (CALUX) assay. *Marine Pollution Bulletin*, 49(7-8), 648-658, 2004.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) , Di(2-ethylhexyl) phthalate. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some Industrial Chemicals*, 77, 2000.
- ICCVAM and NICEATM, ICCVAM evaluation of in vitro methods for detecting potential endocrine disruptors: Estrogen receptor and

- androgen receptor binding and transcriptional activation assays. NIH, 2003.
- ICCVAM and NICEATM, Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity. NIH, 2003.
- IPCS. Concise international chemical assessment document 17 – Butyl benzyl phthalate. Geneva, Switzerland:WHO, 1999.
- Jaakkola, J.J.K., Oie, L., Nefstad, P., Botten, G., Samuelsen, S.O., Magnus, P., Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo. Norway. *Amer. J. Public Health*, 89, 188-192, 1999.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P., A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, 103 (Suppl.7) , 582-587, 1995.
- Kang, KS; Kim, HS; Ryu, DY; Che, JH; Lee, YS, Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats, *Toxicol. Letters*, 118(1-2):109-15, 2000.
- Koppen , G.,Covaci , A.,Cleuvenbergen , R. V.,Schepens , P.,Winneke , G.,Nelen , V.,Schoeters , G.,Comparison of CALUX-TEQ values with PCB and PCDD/F measurements in human serum of the Flanders Environmental and Health Study(FLEHS), *Toxicol. Letters*, 123, 59-67, 2001.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J., Hagenmaier, H., Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.* 225, 33-48, 1999.
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40,

1131-1142, 2000.

- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T., NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Phthalate expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate, *Reproductive Toxicology*, 16, 453-487, 2002.
- Kawaguchi, M., Funabashi, T. and Kimura, F., Butylbenzyl phthalate, an endocrine disruptor, inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion under an insulin-induced hypoglycemic state in ovariectomized rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(6), 486, 2002.
- Kobuke, Y., Tanaka, H. and Magara, Y., Nationwide and regional river monitoring studies as well as bioassays and treatment of EDs in waterworks. *Research in Japan*, 2000.
- Lake, B.G., Foster, J.R., Collins, M.A., Stubberfield, C.R., Gangolli, S.D., and Srivastava, S.P., Studies on the effects of orally administered dicyclohexyl phthalate in the rat. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 51,217-226,1982.
- Lee, S.T., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez, H., Westphal, H. and Gonzales, F.J., Targeting disruption of the  $\alpha$  isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3012-3022, 1995.
- Legler, J., Dennekamp, M., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Koeman, J.H., Burg, B.V.D., Murk, A., Detection of estrogenic in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci. Total Environ.*, 293, 69-83 , 2002.
- Ligocki, m.P., Leuenber, C., Pankow, J.F., Trace organic compounds in rain: II., Gas scavenging of neutral organic compounds *Atmos. Environ.*, 19(10), 1609-1617, 1985.

- MAFF, Food surveillance information sheet number 60 : Phthalates in paper and board packing.. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1995.
- MAFF, Food surveillance information sheet number 83 : Phthalates in infant formulae. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1996a.
- MAFF, Food surveillance information sheet number 82 : Phthalates in food. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1996b.
- Magara, Y., Nishihara, T., Utsumi, H., The environmental application of bioassays for endocrine disrupting chemicals. The proceeding of symposium on evaluation and management of impacts of chemicals to organisms and environment. 27-30, 2000.
- Mann, A.H., Price, S.C., Mitchell, F.E., et al., Comparison of short-term effects of DEHP, DHxP and DnOP in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 77, 116-132, 1985.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M., Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive system in late life. *Toxicology*, 192, 149-170, 2003.
- Menditto, A., Turrio-Baldassarri, L., Environmental and biological monitoring of endocrine-disrupting chemicals. *Chemosphere* 39, 1301-1307, 1999.
- MOE, Strategy Programs on Environmental Endocrine Disruptors ( SPEED 98 ) , Japan, 1998.
- MOE, Survey of endocrine disrupting substances in the aquatic environment. Water Environment Department, MOE, 2002.
- Moore, R.W., Rudy, T.A., Lin, T.M., Ko, K., Peterson, R., Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate. *Environ. Health Perspect.*, 109, 229-237, 2001.

- Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., Di(n-butyl)phthalate disrupts prenatal androgen-regulated male reproductive development in a manner different from flutamide. *Toxicologist*, 42(1-S), 176, 1998.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., Malereproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism. *Toxicol. Sci.*, 43, 47-60, 1998.
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C., Foster, P.M., Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156, 81-95, 1999.
- Mylchreest, E., Wallace, D.C., Cattley, R.C. and Foster, P.M., Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposure to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.*, 55, 143-151, 2000.
- Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., Foster, P.M., Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl)phthalate. *Reprod. Toxicol.*, 16, 19-28, 2002.
- Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S., Ono, H., Effect of butylbenzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod. Toxicol.*, 14, 513-532, 2000.
- Nakai, M., Tabira, Y., Asa, D., Yakabe, Y., Shimyozu, T., Noguchi, M., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y. Binding Characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 311-314, 1999.
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Yoko, K., Hori, S., Utsumi, H., Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay, *J.*

- Health Sci.*, 46 ( 4 ) , 282-298, 2000.
- NIHS, <http://www.nihs.go.jp/hse/envIRON/illieatable.htm>.
- NTPC ( National Toxicity Program's Center ) , Carcinogenesis bioassay of di(2- ethylhexyl) phthalate ( CAS No. 117-81-7 ) in F344 rats and B6C3F1 mice ( feed study ) .*Tech. Rep. Ser.*, 217, 1982.
- NTP, Toxicity studies of di-n-butyl phthalate (CAS no.84-74-2) administered in feed to F344/N and B6C3F1 mice. National Toxicology Program Toxicity Report Series, 30. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program/National Institutes of Health, 1995.
- NTP, Toxicology and carcinogenesis studies of butyl benzyl phthalate (CAS no. 85-68-7) in F344/N rats (feed studies). Rep nr. NTP TR 458, NIH Publication No. 97-3374: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health., 1997.
- NITE, National Institute of Technology and Evaluation, <http://www.nite.go.jp/index-e.html>.
- NTP NICEATM, In vitro endocrine disruptor test methods: Request for comments and nominations. *Federal Register*, 69 (77), 21564, 2004.
- NTP NICEATM, Background review document: current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro estrogen receptor binding assays. NIH publication No.03-4504, 2002.
- NTP NICEATM, Background review document: current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro estrogen receptor transcriptional activation assays. NIH publication No.03-4505, 2002.
- NTP NICEATM, Background review document: current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro androgen receptor binding assays. NIH publication No.03-4506, 2002.
- NTP NICEATM, Background review document: current status of test methods for detecting endocrine disruptors: in vitro androgen receptor transcriptional activation assays. NIH publication No.03-4507, 2002.
- Oh, S.M., Choung, S.Y., Sheen, Y.Y., Chung K.H., Quantitative assessment

- of estrogenic activity in the water environment of Korea by the E-SCREEN assay. *Sci. Total Environ.* 263, 161-169, 2000.
- Oie, L., Hersoug, L.G., Madsen, J.O., Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ. Health Perspect.*, 105, 972-987, 1997.
- Okubo, T., Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I. Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay in vitro. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 26(8):1219-24, 2003.
- OME, Information draft on the development of air standard for Di-n-octyl phthalate. Standard Development Branch, Ontario Ministry of the Environment, 2002.
- Osterlind, A. Diverging trends in incidence and mortality of testicular cancer in Denmark. *Br. J. Cancer* 53, 501-505, 1986.
- Palmer, C.N.A., Hsu, M., Griffin, K.J., Raucy, J.L. and Johnson, E.F., Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  expression in human liver. *Molec. Pharmacol.*, 53, 14-22, 1998.
- Parks, L., Ostby, J., Lambright, C., Abbott, B., Kliefelter, C.D., Barlow, N., Gray, L.J., The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58, 339-349, 2000.
- Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M., Hamilton, T.C. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer.* 29A(3),395-399, 1993.
- Petit, F., Le Golf, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y., Pakdel, F., Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics. Recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte culture. *J. Mol. Endocrinol.*, 19, 321-335, 1997.
- Peters. J.M., Cattley, R.C. and Gonzalez, F.J., Role of PPAR $\alpha$  in the

- mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14, 643. *carcinogenesis*, 18, 2029-2033, 1997.
- Peters, J.M., Taubeneck, M.W., Keen, C.L., Gonzalez, F.J., Di(2-ethylhexyl)phthalate induces a function zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Teratology*, 56, 311-316, 1997.
- Phthalate information center, [www.phthalates.com/index.htm](http://www.phthalates.com/index.htm)
- Phthalates website, <http://website.lineone.net/phthalates.html>
- Pons, M., Gagne, D., Nicolas, J.C. and Mehtali, M., A new cellular model of response to estrogens: A bioluminescent test to characterize (anti)estrogenic moleculars. *BioTechniques* 9(4), 450-459, 1990.
- Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R. et al., Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *ATSDR peer-review draft*. 1995.
- Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V.E., Procter, B.G. and Chu, I., Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem. Toxicol*, 35, 225-239, 1997.
- Roy, P., Salminen, H., Koskimies, P., Simola, J., Smeds, A., Saukko, P., Huhtaniemi, I.T., Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 88, 157-166, 2004.
- Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A., and Boyd, M.R. Comparison of in vitro anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 82, 1113-1118, 1990.
- Scorecard, <http://www.scorecard.org>.
- Selei, J., Jimenez, J., Soto, A.M., Luizzi, M.F. and Sonnenschein, C., Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138,

1406- 1412, 1997.

Singh, A.R. Lawrence, W.H., Autian, J., Dominant lethal mutations and antiinfertility of di(2-ethylhexyl) adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32,566-576.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De, M.E., Main, K.M., Testicular dysgenesis syndrome: an increasing common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16, 972-978, 2001.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13),1107-12, 1990.

Sohoni, P. and Sumpter, J.P., Several environmental oestrogens are also antiandrogens. *Journal of Endocrinology*, 158, 327-339, 1998.

Sonnenschien, C and Soto, AM, An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 65(1-6): 143-150, 1998..

Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 (suppl. 7), 113-122, 1995.

Stahlschmidt-Allner, P., Allner, B., Rombke, J., Knacker, T., Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 4, 155-162, 1997.

Taiwan EPA, <http://www.epa.gov.tw/>

Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Fail, P.A., Seely, J.C., Brine, D.R., Barter, R.A., Butala, J.H., Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod. toxicol.*, 18, 241-264, 2004.

U.S. EPA, Endocrine disruptor screening and testing advisory committee, *Final Report*, August, 1998.

- USEPA, Designation of hazardous substances. US EPA. Code of Federal Regulation.
- [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_00/40cfr14\\_00.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_00/40cfr14_00.html). 2000.
- USEPA, <http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/index.htm>
- USEPA, Report to congress. 2000.
- USEPA, Ecological screening level. Region 5, RCRA, 2003.
- USDHH, Toxicological profile for di-n-octyl phthalate. U.S. Department of Health and Human Services. 1997.
- USDHH, Toxicological profile for di-n-butyl phthalate. U.S. Department of Health and Human Services. 2001.
- USDHHS, Toxicological profile for di-ethyl phthalate. U.S. Department of Health and Human Services. 1995.
- Utsumi, H., Kiyoshige, K., Shibara, S., Hamada, A., Comparative studies on cytotoxicity of micropollutants in water – principle of cytotoxicity matrix. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9, 333-339, 1994.
- Utsumi, H., Nakasugi, O., Nishihara, T., Sakoda, A., Oguri, K., Higuchi, R., Development of bioassays to evaluate human and ecological impacts of pollutants. Asian WATERQUAL '99 - 7<sup>th</sup> IAWQ Asia-Pacific Regional Conference 1, 275-280, 1999.
- Vos, J.G., Dybing, E., Grem, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak., A.D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71-133, 2000.
- WHO, Diethyl phthalate. Concise International Chemical Assessment Document 52, 2003.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, N., Takatsuki, M., Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* 170, 21-30, 2002.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Murori, T., Takatsuki, M., Mutosu, H.,

- Sakamoto, S., Nakai, M. and Yakabe, Y., Comparison of the Hersberger assay and androgen receptor binding assay of twelve chemicals. *Toxicology* 195, 177-186, 2004a.
- Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y., Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding assay affinity. *Toxicol. Letters*, 146, 111-120, 2004b.
- Younes, M., Specific issues in health risk assessment of endocrine disrupting chemicals and international activities. *Chemosphere*, 39(8), 1253-1257, 1999.
- Zacharewski, T., *In-vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. & Tech.*, 31(3),613-623, 1997.
- Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R., and Matthews, J.B., Examination of the in-vitro and in-vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.*, 46, 286-293, 1998.

統一編號
<b>EPA154930074</b>

- ※ 「本報告僅係受託單位或個人之研究意見，僅供環保署施政之參考」
- ※ 「本報告之著作財產權屬環保署所有，非經環保署同意，任何人均不得重製、仿製或為其他之侵害」

中華民國九十三年十二月