

「環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境  
水體奈米物質之細胞毒性研究」研究案

EPA-106-13S5-02-01

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究  
期末報告定稿

計畫經費：新台幣壹佰伍拾萬元整

受託單位計畫執行人員：王應然、顏賢章

受託單位：國立成功大學

計畫執行期間：民國 106 年 2 月 23 日至 106 年 12 月 31 日

印製年月：中華民國一百零六年十二月

## 期末報告基本資料表

### 一、基本摘要內容：

#### 計畫期末報告基本資料表

「環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究」

#### 計畫期末報告基本資料表

委辦單位	行政院環境保護署環境檢驗所		
執行單位	國立成功大學		
參與計畫人員姓名	王應然、顏賢章、葉雅玲		
年 度	106	計畫編 號	EPA-106 - 13S5-02-01
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		
研究領域			
計畫屬性	<input checked="" type="checkbox"/> 科技類 <input type="checkbox"/> 非科技類		
全程期間	106年2月~106年12月		
本期期間	106年2月~106年12月		
本期經費	1500千元		
	資本支出		經常支出
	土地建築 0千元		人事費 771千元
	儀器設備 0千元		業務費 176千元
	其 他 0千元		材料費 415千元
		其他 136千元	
摘要關鍵詞（中英文各三則）			
<u>奈米微粒，細胞毒性，斑馬魚胚胎模式</u>			
<u>Nanoparticles, cytotoxicity, zebrafish</u>			

行政院環境保護署環境檢驗所計畫成果中英文摘要（簡要版）

一、中文計畫名稱：

環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究

二、英文計畫名稱：

Development of green chemistry techniques for environmental nanoparticle exposure assessment (3/3)-A study assessing cytotoxicity of nanoparticles from environmental water sources

三、計畫編號：EPA-106-13S5-02-01

四、執行單位：

國立成功大學

五、計畫主持人（包括共同主持人）：

王應然、顏賢章

六、執行開始時間：

106/02/23

七、執行結束時間：

106/12/31

八、報告完成日期：

106/12/23

九、報告總頁數：

297

十、使用語文：

中文，英文

十一、報告電子檔名稱：

EPA10613S50201.doc

十二、報告電子檔格式：

WORD 5.0

十三、中文摘要關鍵詞：

奈米微粒，細胞毒性，斑馬魚胚胎模式

十四、英文摘要關鍵詞：

Nanoparticles, cytotoxicity, zebrafish embryo

## 十五、中文摘要（約三百至五百字）

奈米技術已應用在許多工業（如紡織、電子、半導體），因此人造奈米微粒有可能在工業廢水的排放過程中進入環境水體，不僅污染生態環境，且有可能經由食物鏈危害人體健康。目前奈米微粒之毒性試驗大多是在成分簡化的實驗條件下進行，然而當奈米微粒進入自然環境中，可能發生化學轉化而改變其物理化學特性，進一步影響其生物效應。因此如何評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是各國都在面對的重要議題。為了解決這個議題，本委託計畫案將嘗試建立水體奈米微粒毒性檢測的標準方法草案，並依此測試環境水體中（包括二仁溪、曾文水庫與成功湖）採樣到的奈米物質的生物危害性。目前我們已針對國際標準組織(International organization for standardization, ISO)、經濟合作暨發展組織(the organization for economic cooperation and development, OECD) 與奈米技術檢測實驗室 NCL (nanotechnology characterization laboratory)等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之細胞株培養與斑馬魚胚胎模式標準方法草案，其細胞培養模式包括存活率、細胞凋亡、自噬作用與氧化壓力；斑馬魚胚胎包含存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡，我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，並提出可行之標準方法草案，而第二階段我們已採集第一、第二季節之成功湖、二仁溪與曾文水庫環境水體，共計六件環境水體，並且檢測奈米微粒之粒徑及分散情形，穿透式電子顯微鏡檢分析結果發現不論第一季及第二季之環境水樣皆有較小粒徑之微粒，但進行動態光散射分析時，卻發現除第一季節二仁溪水樣以外，其餘樣本的微粒含量皆低於偵測極限。而在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且只有在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成。此外在斑馬魚胚胎模式中可發現，不論是成功湖、二仁溪或曾文水庫的水體，經過 1、0.45、0.22 與 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜過濾之濾液都不會讓其存活率明顯下降，而於體長量測上可發現第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，並且環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加，綜上所述，我們藉由以超純水分別添加人造奈米氧化鋅及奈米銀的實驗建立可行之標準方法草案，而六件環境水體的分析結果顯示，其存在環境水體之奈米微粒並不足以對選定細胞株培養與斑馬魚胚胎模式產生顯著毒性。

## 十六、英文摘要：

Nanotechnology has been applied to various industrial sectors (e.g. textiles, electronics, and semiconductors), and therefore engineered nanoparticles (ENPs) are likely to enter the environmental waters during the processes of industrial wastewater discharges. Consequently, they not only directly pollute the eco-environments, but also indirectly endanger human health through the food chain. For the time being, toxicity assessments of ENPs have been largely carried out under simplified and controlled environmental conditions. In reality, chemical transformation of ENPs, however, may take place upon their entrance into the natural environments, thus altering their physico-chemical properties and biological effects. In light of this, how to perform hazard analysis and risk assessment of the ENPs released into the environment has become a worldwide challenging and important issue. To address it, this commissioned project aims to work out a draft regarding the standard methodologies for assessing the toxicity of nanoparticles from environmental water sources, and further conducts a survey of the harmful effects of ENPs sampled from Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake. At present, we have finished the literature review with respect to the methodologies for nanotoxicity assessment, which have been issued from several international organizations, such as ISO, OECD and NCL. We have also written an outline of the cell line- and zebrafish embryo-based standard methodologies applicable for nanotoxicity assessment. The items pertaining to cell-line based tests include viability assay, apoptosis and autophagy analysis, and oxidative stress measurement, and the tests carried out using zebrafish embryos include measurements of the survival rate, lethal dose 50 (LD50), malformation rate, body length, oxidative stress and apoptosis. Furthermore, the synthetic nanoparticles ZnO NPs and AgNPs as well as their bulk counterparts were also subjected to the above-mentioned assessments for the purpose of providing more practical guidance. We have proceeded to the second stage of this project, with completion of the work on the first and second seasons of environmental water sampling at Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake; a total of six independent sampling works were done during this period. We measured the dimensions of potentially contaminating ENPs and characterized their size distribution. Transmission electron microscopy analysis revealed the existence of smaller-sized NPs in the environmental water samples regardless of whether they were gathered in the first

or second seasons. However, when carrying out dynamic light scattering (DLS) analyses, we found the presence of nanoparticles in all samples was at a quantity less than the detection limit, except for that obtained from the first-season Erren River. Our *in vitro* studies demonstrated that exposure to particulate matters, which were isolated from the unfiltered parts of each sample on the 0.22- and 0.1- $\mu\text{m}$  filter papers respectively, didn't show significant cytotoxicity no matter whether they were sampled in first or second seasons. Surprisingly, samples from Cheng-Kung Lake led to mild ROS generation *in vitro*. Regarding the *in vivo* experiments using Zebrafish embryos, we didn't observe a significant reduction in their survival rates when receiving exposure to filtrates, through 1, 0.45, 0.22 and 0.1  $\mu\text{m}$  filters, of the samples from Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake. Interestingly, all of these samples contributed to body length elongation of the hatched fish, whereas they didn't evoke/enhance oxidative stress and apoptosis in such system. Altogether, we've drawn up the practical methodological protocols, by examining the ultrapure water separately spiked with engineered ZnONPs and AgNPs, for assessing toxicity of nanoparticles from environmental water sources. The current data suggest that nanoparticles existing in the collected environmental waters are insufficiently capable of eliciting obvious toxicity towards the selected cultured cells and zebrafish embryos.

## 目錄

第一章、研究緣起 .....	1
1.1 環境水體與奈米微粒之交互作用及可能產生之毒性影響 .....	IX
1.2 奈米微粒細胞毒性測驗方法與相關技術之發展 .....	5
1.3 國際奈米生物毒性測試指引 .....	12
1.4 斑馬魚在水體環境檢測的應用與優勢 .....	17
1.5 國內細胞培養與斑馬魚胚胎模式文獻整理 .....	26
1.6 水體採樣及毒性測試方法 .....	26
第二章、計畫目標、內容及效益 .....	41
2.1 計畫目標 .....	38
2.2 本年度主要工作內容 .....	38
2.3 預期效益 .....	39
第三章、工作方法 .....	44
3.1 研究架構 .....	40
3.2 水體採集 .....	41
3.3 樣品水質檢測 .....	42
3.4 樣品中所含奈米物質之物化特性檢測 .....	44
3.5 添加額外之奈米微粒 .....	46
3.6 毒性測試 .....	47
第四章、結果與討論 .....	56
4.1 目前國際最新文獻及國際上建議之奈米毒性之標準試驗指南 .....	57
4.2 奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案 .....	77
4.3 標準方法草案之技術建立及測試 .....	135
4.4 第一季節及第二季節環境水體之奈米微粒毒性檢測 .....	177
第五章、主要建議意見 .....	220
5.1 前兩期結案報告之摘錄及與本期研究目標之討論 .....	210
5.2 建議意見 .....	212
5.3 結論 .....	212
第六章、相關參考資料 .....	215
第七章、附件 .....	229

## 圖目錄

### 第一章、研究緣起

圖 1.1、陸地奈米毒理生態系統的概念 .....	2
圖 1.2、水生生態系統與奈米微粒交互作用的概念 .....	3
圖 1.3、自體吞噬之分子機轉 .....	8
圖 1.4、斑馬魚成魚-雄魚(上)雌魚(下) .....	18
圖 1.5、斑馬魚是一個適用於篩選環境毒物、人造化學品和藥物的動物模式 ..	19
圖 1.6、轉殖基因斑馬魚監測環境污染方法簡圖 .....	21
圖 1.7、斑馬魚不同的發育階段提供各種毒理反應多種篩選方案 .....	23

### 第三章、工作方法

圖 3.1、研究架構與流程 .....	40
圖 3.2、水體採樣流程圖 .....	41
圖 3.3、pH 值量測流程 .....	42
圖 3.4、真色色度量測流程 .....	43
圖 3.5、導電度量測流程 .....	43
圖 3.6、溶氧量量測流程 .....	44
圖 3.7、TEM 呈像原理(左)、EDS 測是原理 (右) .....	45
圖 3.8、Beckman Coulter Delsa Nano 儀器 .....	46
圖 3.9、由 tetrazolium salt 所形成之 formazan 結晶 .....	47
圖 3.10、暴露天然物 phytosterol oxide (7 $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -sitosterol, CT1)之後使用 Live/Dead cell viability assay 分析其對腫瘤細胞毒殺作用情形 .....	48
圖 3.11、Live/Dead cell viability assay 使用流式細胞儀分析 .....	49
圖 3.12、利用 AnnexinV 與 PI 染劑進行細胞凋亡與細胞壞死之分析 .....	50
圖 3.13、細胞處理 Apicidin 之後，誘導細胞自噬作用的產生 .....	51
圖 3.14、斑馬魚胚胎發育過程時間圖 .....	52
圖 3.15、斑馬魚胚胎存活率測試流程 .....	52
圖 3.16、斑馬魚胚胎畸形狀況(左)正常情形(右)畸形情形 .....	53
圖 3.17、利用 H2DCFDA 測定氧化壓力之定性分析與螢光量化分析 .....	54
圖 3.18、利用 TUNEL assay 測定細胞凋亡之結果 .....	54

### 第四章、結果與討論

圖 4.1、奈米銀以環境水體為媒介經由不同孔徑過濾膜之銀離子濃度 .....	64
--	----

圖 4.2、斑馬魚雄性成魚與雌性成魚 .....	119
圖 4.3、循環養殖系統與飼養槽 .....	120
圖 4.4、產卵容器示意圖 .....	120
圖 4.5、收集魚卵示意圖 .....	121
圖 4.6、斑馬魚之正常受精卵(發育階段:0.75~2 h).....	121
圖 4.7、斑馬魚之正常受精卵(發育階段:0.75~2 h).....	121
圖 4.8、斑馬魚胚胎死亡狀態之觀察 .....	122
圖 4.9、斑馬魚胚胎毒性試驗流程 .....	122
圖 4.10、胚胎受精後 96 小時之型態觀察 .....	123
圖 4.11、斑馬魚胚胎暴露商品化奈米銀微粒膠體溶液之存活率 .....	124
圖 4.12、斑馬魚胚胎於 4 hpf 暴露氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)後於 72 hpf 觀察其體內氧化壓力之表現.....	128
圖 4.13、斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒後體內氧化壓力表現之統計結果。氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)於 48、72、120 hpf 之氧化壓力統計分析.....	129
圖 4.14、斑馬魚胚胎暴露以氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)於受精後 72 小時觀察細胞凋亡之情形 .....	133
圖 4.15、奈米物質之物化特性分析 .....	134
圖 4.16、利用 MTT assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 AgNPs 及 Bulk Ag 暴露後之細胞存活率 .....	136
圖 4.17、利用 MTS assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 AgNPs 及 Bulk Ag 暴露後之細胞存活率 .....	137
圖 4.18、配置 Bulk Ag 之 stock 溶液 .....	138
圖 4.19、以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 細胞經 AgNPs 暴露後之死亡情形 .....	140
圖 4.20、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入奈米顆粒之現象 .....	141
圖 4.21、NIH-3T3 細胞暴露不同劑量之 AgNPs 造成 ROS 量上升.....	143
圖 4.22、NIH-3T3 細胞在經由不同濃度的合成 AgNPs 處理後，利用流式細胞儀分析細胞自體吞噬(Autophagy)的百分比.....	145
圖 4.23、NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs 之後發生細胞凋亡及壞死現象.....	146
圖 4.24、利用 MTT assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 ZnONPs 及 Bulk ZnO 曝露後之細胞存活率 .....	148
圖 4.25、利用 MTS assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 ZnONPs 及 Bulk	

ZnO 暴露後之細胞存活率 .....	150
圖 4.26、以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 經奈米氧化鋅(ZnONPs)暴露後之死亡情形.....	151
圖 4.27、以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 經塊材氧化鋅(Bulk ZnO)暴露後之死亡情形 .....	151
圖 4.28、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 Bulk ZnO 之現象.....	152
圖 4.29、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 Bulk ZnO 之現象.....	153
圖 4.30、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 ZnONPs 之現象 .....	154
圖 4.31、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 ZnONPs 之現象 .....	154
圖 4.32、NIH-3T3 細胞暴露不同濃度 Bulk ZnO 在不同時間點下所造成之 ROS 生成量 .....	155
圖 4.33、NIH-3T3 細胞暴露不同濃度 ZnONPs 在不同時間點下所造成之 ROS 生成量 .....	157
圖 4.34、NIH-3T3 細胞給予不同濃度 Bulk ZnO 處理後於 18 及 24 小時誘發之自體吞噬情形 .....	158
圖 4.35、NIH-3T3 細胞給予不同濃度 ZnONPs 處理後於 18 及 24 小時誘發之自體吞噬情形 .....	159
圖 4.36、NIH-3T3 細胞暴露 ZnONPs 之後發生細胞凋亡及壞死現象.....	163
圖 4.37、NIH-3T3 細胞暴露 Bulk ZnO 之後發生細胞凋亡及壞死現象 .....	162
圖 4.38、斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 及 bulk Ag 之存活率 .....	164
圖 4.39、為斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 各類型畸形比率 .....	165
圖 4.40、為斑馬魚胚胎受精後 4 小時暴露 AgNPs 之體長變化 .....	166
圖 4.41、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 後之氧化壓力表現 .....	167
圖 4.42、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒後之細胞凋亡現象 .....	168
圖 4.43、斑馬魚胚胎暴露奈米氧化鋅微粒之存活率 .....	169
圖 4.44、斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 之受精後 72 小時畸形現象統計比率 .....	171
圖 4.45、斑馬魚在受精後 72 小時暴露 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 之體長.....	172
圖 4.46、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 後體內氧化壓力表現 .....	173

圖 4.47、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 Bulk ZnO 後體內氧化壓力表現.....	173
圖 4.48、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 後之細胞凋亡現象.....	174
圖 4.49、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 Bulk ZnO 後之細胞凋亡現象.....	174
圖 4.50、第一季環境水體之奈米微粒子化特性分析.....	178
圖 4.51、第二季環境水體之奈米微粒子化特性分析.....	179
圖 4.52、濾膜樣品前處理流程.....	180
圖 4.53、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞存活率.....	181
圖 4.54、水樣通過不同孔徑之濾紙後，分別收集 0.22 和 0.1 $\mu\text{m}$ 濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞.....	182
圖 4.55、環境水體樣品暴露於細胞後之自體吞噬分析.....	184
圖 4.56、環境水體樣品暴露於細胞後之自體吞噬分析.....	185
圖 4.57、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞凋亡分析.....	186
圖 4.58、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞凋亡分析.....	189
圖 4.59、斑馬魚胚胎暴露成功湖之不同過濾液存活率.....	189
圖 4.60、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液存活率.....	189
圖 4.61、斑馬魚胚胎暴露過濾後二仁溪水體後體之存活率狀況.....	189
圖 4.62、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液存活率.....	189
圖 4.63、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率.....	189
圖 4.64、斑馬魚胚胎暴露第一季節二仁溪之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率.....	189
圖 4.65、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率.....	189
圖 4.66、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑濾液之體長.....	189
圖 4.67、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖濾液之氧化壓力影像.....	189
圖 4.68、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪濾液之氧化壓力影像.....	189
圖 4.69、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪濾液之氧化壓力影像.....	189
圖 4.70、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖不同孔徑濾液之細胞凋亡.....	189
圖 4.71、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪不同孔徑濾液之細胞凋亡現象.....	189
圖 4.72、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露第一季節曾文水庫之細胞凋亡現象.....	189
圖 4.73、斑馬魚胚胎暴露第二季節成功湖之不同過濾液存活率.....	189
圖 4.74、斑馬魚胚胎暴露第二季節二仁溪之不同過濾液存活率.....	189

圖 4.75、斑馬魚胚胎暴露第二季節曾文水庫之不同過濾液存活率 .....	200
圖 4.76、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率 .....	200
圖 4.77、斑馬魚胚胎暴露第一季節二仁溪之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率 .....	201
圖 4.78、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率 .....	201
圖 4.79、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑濾液之體長 .....	202
圖 4.80、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖濾液之氧化壓力影像 .....	189
圖 4.81、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪濾液之氧化壓力影像 .....	203
圖 4.82、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露曾文水庫濾液之氧化壓力影像 .....	204
圖 4.83、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖不同孔徑濾液之細胞凋亡 .....	205
圖 4.84、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪不同孔徑濾液之細胞凋亡 .....	205
圖 4.85、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露曾文水庫不同孔徑濾液之細胞凋亡 .....	206
圖 4.86、斑馬魚胚胎暴露於環境湖水額外添加奈米銀之水樣 .....	207
圖 4.87、斑馬魚胚胎暴露第二季節成功湖、曾文水庫仁溪之分別添加 1ppm 和 10ppm 奈米銀過濾 0.45 $\mu$ m 孔徑濾紙後暴露斑馬魚胚胎於受精後 72 小時畸形現象統計比率 .....	208
圖 4.87、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露分別添加 1 ppm、10 ppm 奈米銀成功湖、二仁溪、曾文水庫過濾 0.45 $\mu$ m 孔徑濾紙液之體長 .....	209

## 表目錄

### 第一章、研究緣起

表 1.1、OECD 建議之奈米材料測試物質.....	6
表 1.2、NCL 所提供之奈米物質毒性測試項目及方法.....	15
表 1.3、OECD 工作小組之人造奈米材料督導小組.....	15
表 1.4、斑馬魚測定環境物質之現況.....	20
表 1.5、各類水樣之行政院環保署公告採樣方法.....	26
表 1.6、河川、湖泊及水庫水質採樣通則相關內容.....	27
表 1.7、事業放流水採樣方法相關內容.....	28
表 1.8、環境樣品採集及保存作業指引相關內容.....	29
表 1.9、水質樣品保存規定(節錄).....	30
表 1.10、水質檢測方法總則.....	33
表 1.11、水質檢測方法.....	35

### 第三章、工作方法

表 3.1、物化特性分析.....	44
-------------------	----

### 第四章、結果與討論

表 4.1、以體外細胞模式探討奈米微粒之毒性研究.....	57
表 4.2、近年以斑馬魚模式作為環境中化學物質毒性測定之研究.....	60
表 4.3、近年以斑馬魚模式作為天然水體中奈米微粒毒性測定之研究.....	63
表 4.4、篩選測試包含之項目.....	65
表 4.5、篩選檢驗法的限制.....	65
表 4.6、ISO_TR_16197 技術報告所建議的體外試驗方法.....	66
表 4.7、ASTM E56 公佈的毒性測試標準相關列表.....	68
表 4.8、斑馬魚胚胎於受精後 24 至 96 小時之急毒性現象觀察.....	74
表 4.9、斑馬魚胚胎早期生命階段的發育狀況.....	123
表 4.10、斑馬魚胚胎暴露 CM-AgNPs-1 及 CM-AgNPs-2 市售奈米銀微粒膠體溶液之半致死濃度(LC <sub>50</sub> ).....	124
表 4.11、奈米級與大分子級的銀與氧化鋅之物化特性.....	135
表 4.12、斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒之半致死濃度(LC <sub>50</sub> ).....	169
表 4.13、斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 及 Bulk ZnO 之半致死劑量.....	176

表 4.14、第一季節之環境水體之水質分析 .....	177
表 4.15、第二季節之環境水體之水質分析 .....	178

#### 第五章、主要建議意見

表 5.1、預定進度及查核點 .....	213
表 5.2、預定進度及查核點 .....	214

## 報告大綱

在本報告之架構分為前言、計畫目的、研究方法、結果與討論、結論及建議事項等章節。

### 前言：

近年來奈米科技蓬勃的發展，奈米技術已應用在許多工業(如紡織、電子、半導體)。當大量、廣泛應用奈米微粒時，人造奈米微粒將有可能經由工業廢水的排放而進入環境水體，而目前已知奈米微粒是具有危害性的，如：奈米銀會導致哺乳類細胞存活率降低、氧化壓力、細胞凋亡、細胞自噬作用...等細胞毒性路徑的活化，也因此評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是目前各國都在面對的重要議題。然而因奈米微粒其可能因大小、表面修飾或帶電性...等不同，就有可能引發出不同的細胞毒性機轉，所以若是希望評估不同種類的奈米微粒，高通量且快速的測驗方法是必須的，而目前發展之毒性試驗方法學中，細胞培養及斑馬魚胚胎模式是相當符合這樣的概念，因此於本計畫中，我們將建立細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式來探討環境水體之奈米微粒毒性影響。

### 研究方法

- ◇ 本計畫的第一個階段目標是要針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並探討我們所建立的細胞株培養與斑馬魚胚胎模式研究方法是否適合於檢測環境水體之奈米微粒毒性，進而提出檢測奈米微粒之生物毒性指標。針對細胞培養模式的部分，將檢測存活率 (Survival rate)、自噬作用 (Autophagy)、氧化壓力 (Oxidative stress) 與細胞凋亡 (Apoptosis) 之細胞毒性機轉；而斑馬魚胚胎將檢測胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡。當標準方法草案撰寫完成後，將利用自行合成之人造奈米氧化鋅及奈米銀進行比對測試，而測試結束後將提交技術測試報告。
- ◇ 第二階段我們會於採集其包含兩個季節之成功湖、曾文水庫、二仁溪，共計六個水樣，採集後儘快以穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM)、動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS) 分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍，之後再利用建立之細胞株培養和斑馬魚模式標準方法草案進行不同粒徑之奈米微粒之危害毒性測試。

### 結果：

- ◇ 目前我們已針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之細胞株培養與斑馬魚胚胎模式標準方法草案，其內容包含：細胞培養模式之存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉及斑馬魚胚胎模式之胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量

測、氧化壓力和細胞凋亡測驗標準方法草案。

- ◇ 我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，於細胞培養實驗結果中可發現，奈米銀和奈米氧化鋅會導致存活率下降、氧化壓力增加並且誘發細胞凋亡及自噬作用；而斑馬魚胚胎模式的部分可發現奈米銀及奈米氧化鋅會導致存活率下降、體長變短、畸形率、氧化壓力增加、細胞凋亡增加。
- ◇ 我們已採集第一季和第二季之成功湖、二仁溪、曾文水庫環境水樣，共計六件水樣，並且六件水樣皆使用穿透式電子顯微鏡、動態光散射儀分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍。
- ◇ 在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且僅在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成。
- ◇ 在斑馬魚胚胎模式中可發現不論第一季及第二季之成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒皆不會導致明顯存活率下降，但斑馬魚胚胎於環境水體中之體長較控制組長。
- ◇ 在斑馬魚胚胎模式中可發現不論第一季及第二季之成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒皆不會導致誘發明顯之氧化壓力及細胞凋亡現象。

### **結論**

- ◇ 由奈米銀及奈米氧化鋅標準品之技術測試結果證實，細胞培養模式之檢測方法，其包括存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉；斑馬魚胚胎模式包括胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡，是可適用且有效率的檢測奈米微粒之毒性機轉。
- ◇ 透過這樣的檢測方法我們的結果發現，成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒對於生物並不會引發明顯毒性。

### **建議事項**

- ◆ 根據環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(1/3)-奈米微粒細胞毒性檢測系統在環境危害評估上之應用(EPA-104-E3S5-02-03)，於細胞模式上，石英薄膜經過剪碎及震盪處理後，可能容易游離出其成份內容物導致細胞毒性，另外於過去文獻中也指出玻璃纖維會導致細胞損傷[1]。而經實驗確認後已確認鐵氟龍濾膜不會導致明顯細胞毒性，因此建議可使用鐵氟龍濾膜進行實驗。
- ◆ 經由測試細胞培養及斑馬魚胚胎模式後，雖環境水體水樣之實驗結果並不會誘發明顯的毒性效應，但於奈米銀、奈米氧化鋅、相對應之大分子物質及環境水體中額外添加奈米銀之實驗結果證實可反應出奈米毒性，因此建議未來可應用於檢測奈米微粒之毒性。

## 期末報告詳細版摘要

行政院環境保護署委託研究計畫成果報告摘要(詳細版)

計畫名稱：環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究

計畫編號：EPA-106-13S5-02-01

計畫執行單位：國立成功大學

計畫主持人(包括協同主持人)：王應然、顏賢章

計畫期程：106年2月23日起106年12月31日止

計畫經費：新台幣1500仟元整

摘要(中英文各300~500字)

奈米技術已應用在許多工業(如紡織、電子、半導體)，因此人造奈米微粒有可能在工業廢水的排放過程中進入環境水體，不僅污染生態環境，且有可能經由食物鏈危害人體健康。目前奈米微粒之毒性試驗大多是在成分簡化的實驗條件下進行，然而當奈米微粒進入自然環境中，可能發生化學轉化而改變其物理化學特性，進一步影響其生物效應。因此如何評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是各國都在面對的重要議題。為了解決這個議題，本委託計畫案將嘗試建立水體奈米微粒毒性檢測的標準方法草案，並依此測試環境水體中(包括二仁溪、曾文水庫與成功湖)採樣到的奈米物質的生物危害性。目前我們已針對ISO、OECD與NCL等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之細胞株培養與斑馬魚胚胎模式標準方法草案，其細胞培養模式之毒性測驗包括存活率、細胞凋亡、自噬作用與氧化壓力；斑馬魚胚胎包含存活率、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡，我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，並提出可行之標準方法草案。第二階段我們已採集第一、第二季之成功湖、二仁溪與曾文水庫環境水體，共計六件環境水體，並且檢測奈米微粒之粒徑及分散情形，於結果中可發現不論第一季及第二季之環境水樣皆可有較小粒徑之微粒，但除第一季節二仁溪水樣以外，其微粒含量皆低於偵測極限。而在細胞暴露模式中，分別暴露0.22與0.1 $\mu\text{m}$ 濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的3個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且只有在成功湖的樣品中偵測到些許的ROS生成。此外在斑馬魚胚胎模式中發現，不論成功湖、二仁溪及曾文水庫之水體並不會導致明顯存活率下降，而於體長量測

上可發現第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，並且兩個季節之環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加，綜上所述，我們藉由人造奈米氧化鋅及奈米銀測驗已建立可行之標準方法草案，而六件環境水體之奈米微粒樣品中，不論是細胞培養模式或斑馬魚胚胎模式之毒性測驗，環境水體之奈米微粒並不會導致明顯的毒性效應。

Nanotechnology has been applied to various industrial sectors (e.g. textiles, electronics, and semiconductors), and therefore engineered nanoparticles (ENPs) are likely to enter the environmental waters during the processes of industrial wastewater discharges. Consequently, they not only directly pollute the eco-environments, but also indirectly endanger human health through the food chain. For the time being, toxicity assessments of ENPs have been largely carried out under simplified and controlled environmental conditions. In reality, chemical transformation of ENPs, however, may take place upon their entrance into the natural environments, thus altering their physico-chemical properties and biological effects. In light of this, how to perform hazard analysis and risk assessment of the ENPs released into the environment has become a worldwide challenging and important issue. To address it, this commissioned project aims to work out a draft regarding the standard methodologies for assessing the toxicity of nanoparticles from environmental water sources, and further conducts a survey of the harmful effects of ENPs sampled from Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake. At present, we have finished the literature review with respect to the methodologies for nanotoxicity assessment, which have been issued from several international organizations, such as ISO, OECD and NCL. We have also written an outline of the cell line- and zebrafish embryo-based standard methodologies applicable for nanotoxicity assessment. The items pertaining to cell-line based tests include viability assay, apoptosis and autophagy analysis, and oxidative stress measurement, and the tests carried out using zebrafish embryos include measurements of the survival rate, lethal dose 50 (LD50), malformation rate, body length, oxidative stress and apoptosis. Furthermore, the synthetic nanoparticles ZnO NPs and AgNPs as well as their bulk counterparts were also subjected to the above-mentioned assessments for the purpose of providing more practical guidance. We have proceeded to the second stage of this project, with

completion of the work on the first and second seasons of environmental water sampling at Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake; a total of six independent sampling works were done during this period. We measured the dimensions of potentially contaminating ENPs and characterized their size distribution. Transmission electron microscopy analysis revealed the existence of smaller-sized NPs in the environmental water samples regardless of whether they were gathered in the first or second seasons. However, when carrying out dynamic light scattering (DLS) analyses, we found the presence of nanoparticles in all samples was at a quantity less than the detection limit, except for that obtaining from the first-season Erren River. Our in vitro studies demonstrated that exposure to particulate matters, which were isolated from the unfiltered parts of each sample on the 0.22- and 0.1- $\mu\text{m}$  filter papers respectively, didn't show significant cytotoxicity no matter whether they were sampled in first or second seasons. Surprisingly, samples from Cheng-Kung Lake led to mild ROS generation in vitro. Regarding the in vivo experiments using Zebrafish embryos, we didn't observe a significant reduction in their survival rates when receiving exposure to filtrates, through 1, 0.45, 0.22 and 0.1  $\mu\text{m}$  filters, of the samples from Erren River, Zengwun Reservoir, and Cheng-Kung Lake. Interestingly, all of these samples contributed to body length elongation of the hatched fish, whereas they didn't evoke/enhance oxidative stress and apoptosis in such system. Altogether, we've drawn up the practical methodological protocols, by examining the ultrapure water separately spiked with engineered ZnONPs and AgNPs, for assessing toxicity of nanoparticles from environmental water sources. The current data suggest that nanoparticles existing in the collected environmental waters are insufficiently capable of eliciting obvious toxicity towards the selected cultured cells and zebrafish embryos.

## 前言

近年來奈米科技蓬勃的發展，奈米技術已應用在許多工業（如紡織、電子、半導體），當大量、廣泛使用奈米微粒時，人造奈米微粒有可能經由工業廢水的排放而進入環境水體，使得這些奈米微粒成為環境中潛在的風險因子，奈米微粒可能透過影響環境中初級生產者，進而經由食物鏈危害整個生態系生物的安全及健康。而目前已知奈米微粒是具有危害性的，如：奈米

銀會導致存活率降低、氧化壓力、細胞凋亡、細胞自噬作用...等細胞毒性路徑的活化，也因此評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是目前各國都在面對的重要議題。然而因奈米微粒其可能因不同的大小、表面修飾或帶電性...等，可能引發出不同的細胞毒性機轉，所以若是希望評估不同種類的奈米微粒高通量且快速的測驗方法是必須的，除此之外近年來因應綠色毒理學及動物福祉的理念，減少使用感知動物亦是未來的趨勢，而目前發展之毒性試驗方法學中，細胞培養及斑馬魚胚胎模式是相當符合這樣的概念。近年來已有文獻指出，細胞培養模式因具有測試方法快速且便宜、可進行時間依賴性研究及採樣、可使用人類細胞和組織進行體外試驗、減少動物的使用等多項優點，是一個被推薦為適於進行奈米毒理相關實驗的良好工具；此外 ISO/TR16197 技術報告針對體內測試之建議指出，新的體內試驗系統例如斑馬魚胚胎模式是一個能夠被簡單又快速地應用在毒理學分析細胞及分子層次機轉問題的體內動物模式，因此於本計畫中，我們將建立細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式來探討環境水體之奈米微粒毒性影響。

## 研究方法

本計畫的第一個階段目標是要針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並探討我們所建立的細胞株培養與斑馬魚胚胎模式研究方法是否適合於檢測環境水體之奈米微粒的毒性，進而提出檢測奈米微粒之生物毒性指標，針對細胞培養模式將檢測其包括存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉；而斑馬魚胚胎模式將檢測胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡，當標準方法草案撰寫完成後，將利用自行合成之人造奈米氧化鋅及奈米銀進行比對測試，而測試結束後將提交技術測試報告，並且討論其適用性，而第二階段我們會採集兩個季節之成功湖、曾文水庫、二仁溪，共計六件水樣，採集後儘快以穿透式電子顯微鏡、動態光散射儀分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍，確認後將環境水體分別進行過濾 0.45 $\mu\text{m}$ 、0.22 $\mu\text{m}$ 、0.1 $\mu\text{m}$  孔徑之濾膜以分離不同孔徑之奈米微粒，之後再利用建立之細胞株培養和斑馬魚胚胎模式標準方法草案進行不同粒徑之奈米微粒毒性測試。

## 結果

目前我們已針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之

細胞株培養與斑馬魚胚胎模式標準方法草案，其內容包含：細胞培養模式之存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉及斑馬魚胚胎之胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡測驗標準方法草案，並且我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，於細胞培養模式實驗結果中可發現，奈米銀和奈米氧化鋅會導致存活率下降、氧化壓力增加、細胞凋亡及自噬作用；而斑馬魚胚胎模式的部分可發現奈米銀及奈米氧化鋅會導致存活率下降、體長變短、畸形率、氧化壓力增加、細胞凋亡增加，於檢討和修正後提出可行之標準方法草案進行檢測水體樣本，

而第二階段已採集第一季節和第二季節之成功湖、二仁溪、曾文水庫環境水樣，共計六件水樣，並且六件水樣皆使用穿透式電子顯微鏡、動態光散射儀分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍，在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且僅在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成；在斑馬魚胚胎模式中可發現不論第一季及第二季之成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒皆不會導致明顯存活率下降，但斑馬魚胚胎於環境水體中之體長較控制組長，在斑馬魚胚胎模式中可發現不論第一季及第二季之成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒皆不會導致誘發明顯之氧化壓力及細胞凋亡現象。

## 結論

- ◇ 由奈米銀及奈米氧化鋅之技術測試結果證實，細胞培養模式之檢測方法，其包括存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉；斑馬魚胚胎模式將檢測胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡，是可適用且有效率的檢測奈米微粒之毒性機轉。
- ◇ 透過這樣的檢測方法我們的結果發現，成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒對於生物並不會引發明顯毒性。

## 建議事項

- ◆ 根據環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(1/3)-奈米微粒細胞毒性檢測系統在環境危害評估上之應用(EPA-104-E3S5-02-03)，於細胞模式上，石英薄膜經過剪碎及震盪處理後，可能容易游離出其成份內容物導致細胞毒性，另外於過去文獻中也指出玻璃纖維會導致細胞損傷[1]。而經實驗確認後已確認鐵氟龍濾膜不會導致明顯細胞毒

性，因此建議可使用鐵氟龍濾膜進行實驗。

- ◆ 經由測試細胞培養及斑馬魚胚胎模式後，雖環境水體水樣之實驗結果並不會誘發明顯的毒性效應，但於奈米銀、奈米氧化鋅、相對應之大分子物質及環境水體中額外添加奈米銀之實驗結果證實可反應出奈米毒性，因此建議未來可應用於檢測奈米微粒之毒性。

## 第一章、 研究緣起

### 章節摘要：

奈米技術已應用在許多工業（如紡織、電子、半導體），因此人造奈米微粒有可能在工業廢水的排放過程中進入環境水體，不僅污染生態環境，且有可能經由食物鏈危害人體健康。目前奈米微粒之毒性試驗大多是在成分簡化的實驗條件下進行，然而當奈米微粒進入自然環境中，可能發生化學轉化而改變其物理化學特性，進一步影響其生物效應。因此如何評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是各國都在面對的重要議題。

### 1.1 環境水體與奈米微粒之交互作用及可能產生之毒性影響

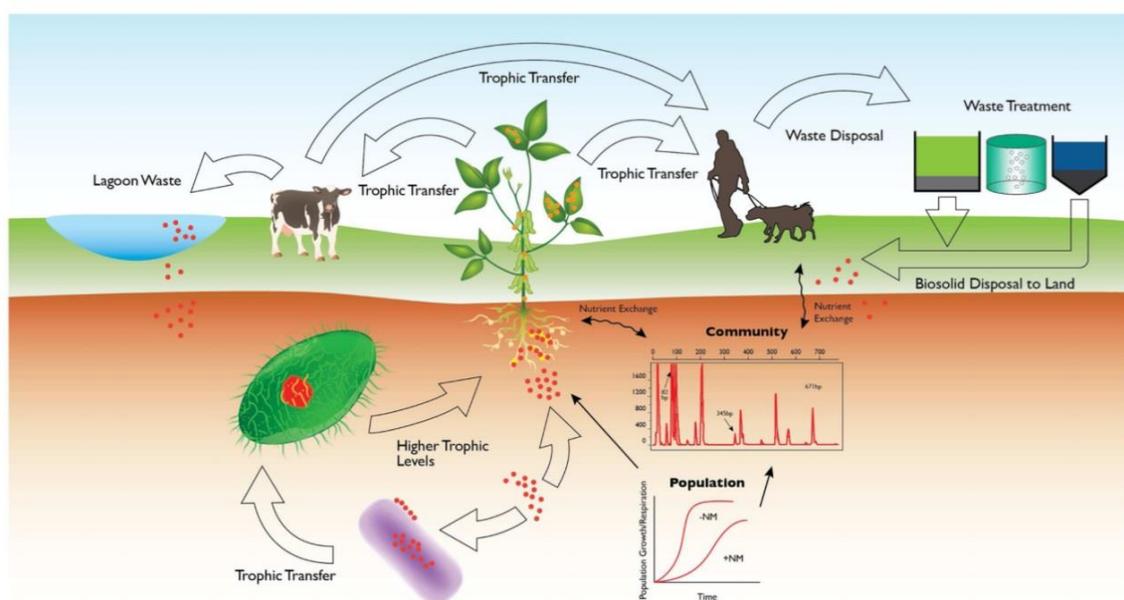
近年來奈米科技蓬勃的發展，許多含有奈米微粒的產品消費者能於市面上輕易的購得，當大量及廣泛使用和應用奈米微粒時，我們將無可避免這些奈米微粒被釋放於環境當中，使得這些奈米微粒成為環境中潛在的風險因子，有鑑於此，奈米微粒於環境中的潛在環境毒性效應是必須且迫切需要去了解與解決的問題。當奈米微粒進入環境時，生態系統過程 (ecosystem processes)[2] 和環境服務 (environmental services)[3] 會處於風險之中，人類社會仰賴於生態系統服務，例如：作物的授粉、水及氣候調節、生物多樣性保育 (biodiversity conservation) 和糧食生產，對於人類與環境而言，維護生態系統服務是非常重要的，這是因為生態系統服務是通過複雜的生態調節過程來維持平衡的生態環境，也因此了解奈米微粒對於環境的影響以及生態學相關的研究是必要的。

### 奈米微粒於陸地環境及水體環境之交互作用

#### 工程奈米材料影響生態系統的證據：陸地的環境

土壤中的細菌具有豐富與多功能的催化作用，可以吸收及分散工程奈米材料的凝聚體[4]。對於一些工程奈米材料，例如硒化鎘量子點(QDs)會與細菌的外膜結合，產生破壞性的過氧化物 (reactive oxygen species, ROS)，QDs 也會進入細菌且累積，進一步產生壓力與抑制生長[5]。在細菌當中的 QDs 會被轉移以及濃縮(生物放大)到原生動物的掠食者中，因此會影響較高等的物種。在土壤微生物中，奈米二氧化鈦(濃度達  $2 \text{ mg g}^{-1} \text{ soil}$ )及奈米氧化鋅(濃度達  $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ soil}$ )會改變細菌群落結構且有劑量效應關係，並會改變物種對於生態系統中氮固定、甲烷氧化及複合物 C 的分解過程[6-8]。

另外工程奈米材料也會影響植物的健康及食物的供應。利用 X 放射線同步加速器技術(X-ray synchrotron techniques)辨別奈米氧化鋅的衍生物，從化學定量結果顯示鋅會移轉(translocation)到水栽的黃豆與原生的沙漠植物，鋅也會進行生物累積，進而抑制根的生長[9-12]。工程奈米材料對於一些水栽農作物，像是氧化鈉奈米材料會轉移到植物的組織中，而氧化鋅奈米材料則不能被溶解，這些都會造成基因改變，並改變植物的發芽、根、莖的生長。[10, 13]。在黃豆的中型生態(mesocosm)研究中，鋅到奈米氧化鋅在土壤中是有生物可利用性的，會散佈在豆和葉中；奈米氧化鈉會侵入到根瘤(root nodules)，干擾氮固定，且阻礙植物的生長[14]。中型生態研究(Mesocosms)可以整合在土壤中微生物族群及群落層面的營養循環與植物產量的反應(圖 1.1)。



**圖 1.1、陸地奈米毒理生態系統的概念。**地底下的工程奈米材料(ENM)(紅點)會進入細菌(紫色)與土壤中，藉由營養轉移而進一步影響植物根部，包括與根部共生(在根部的黃色/綠色點)的原生動物(較大的綠色點)。工程奈米材料從土壤中進入到植物組織後便會產生化學變化(橘色點)。藉由測量或建立模式可以進一步評估 ENM 對細菌群落生長的影响(右下圖)。奈米微粒可能造成生物累積、生物濃縮(bioconcentration)、營養轉移(trophic transfer)和移轉(translocation)(塊狀箭頭)，包括奈米微粒進入食物供應者，影響宿主健康及透過廢水進入土壤[15]。

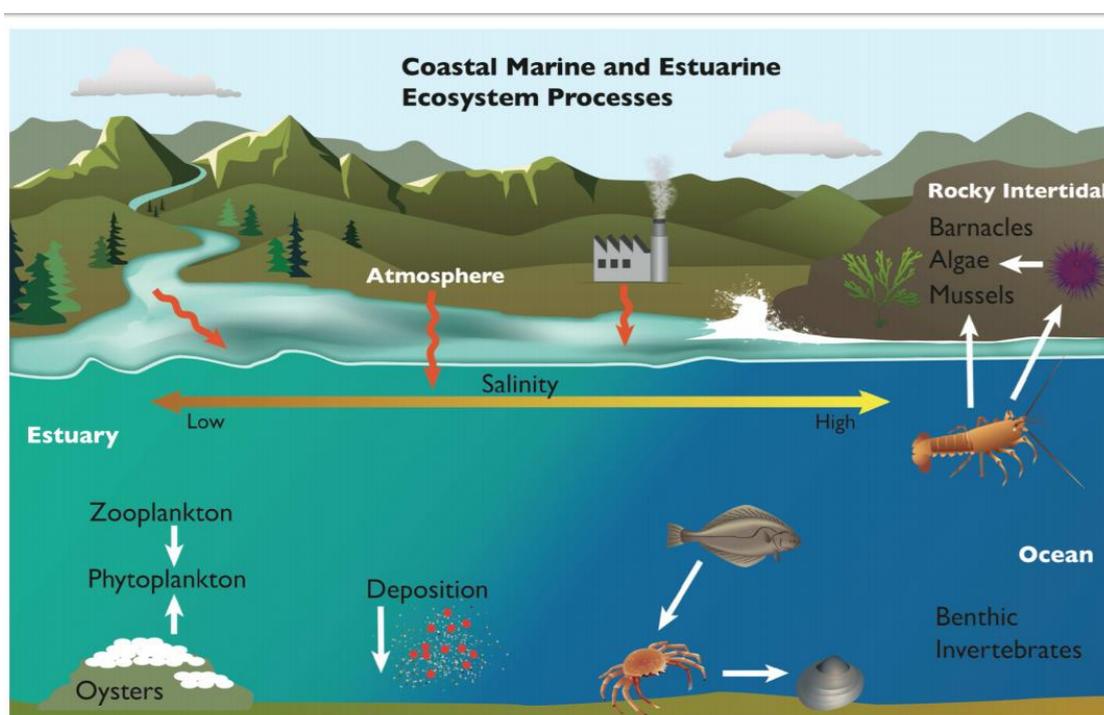
### 工程奈米材料影響生態系統的證據：水生環境

奈米微粒的物化特性會影響毒性，包含自然水生環境媒介及生物組織與細胞

的干擾。例如，以鐵修飾的奈米氧化鋅會減少對哺乳動物細胞與淡水斑馬魚胚胎的溶解度與毒性，但對於海膽胚胎並不會減少其毒性(鋅濃度達  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ )，可能是因為奈米氧化鋅微粒會影響發育中的胚胎[16-18]。奈米微粒於體外和體內實驗中有不同的反應，例如，蚌殼類慢性暴露奈米氧化鋅會造成細胞損傷，而在 *in vitro* 會傷害血球細胞(hemocYTE)的功能，但在 *in vivo* 卻沒有出現影響血球細胞的吞噬作用[19-21]。這種不一致的毒性反應，可能是因為鋅離子(Zn(II))在整個生物體所啟動的螯合與消除作用機制。

環境的條件也許也會影響毒性，如已被證實的海洋浮游生物，其為主要供應海洋食物鏈以及地球碳循環的供應者。對於海洋沿岸浮游生物的研究顯示，在遵照標準條件的人工光照下進行測試，並沒有觀察到二氧化鈦對於浮游生物有不良的影響[22]。然而，在暴露紫外線輻射(ultraviolet radiation, UVR)的實驗結果中顯示二氧化鈦在自然環境中經過低劑量 UVR 照射後會對於海洋表層的浮游生物產生毒性[23]。

許多海底食物鏈中(圖 1.2)的掠食者(fisheries)會以來自表層水的浮游生物做為食物，這意味著奈米微粒可能不單單只是影響到生物鏈的生產者亦會對消費者產生危害。初步數據表示，海洋蚌殼類是一種常見的海洋食物，當這些蚌殼類吃進受到奈米微粒污染的浮游生物，會造成牠們生長減緩及減少繁殖。這些數據可用於開發綜合性模式，可以用於推測族群和生態系統層次的影響機制。



**圖 1.2、水生生態系統與奈米微粒交互作用的概念。**著重於沿海海洋和河口，其中有極端鹽度梯度，從低（淡水區）到高（開放海洋），暴露於空氣和乾燥地區（潮間帶）。沿著這些梯度，奈米微粒會聚集、沉降和暴露並被底棲族群和群落的生物所食入。食物鏈包含生物體在水流與水流交換介面的交互作用，浮游生物和大型藻類從其它水生生物累積奈米微粒，因此奈米微粒能夠在初級消費者中進行生物濃縮 (bioconcentration)，特別是在浮游生物和底棲草食動物，以及底棲懸浮液和沈積飼料物。底棲無脊椎動物和魚類捕食者（次要消費者）的暴露和生物累積是透過攝入初級消費者。類似的過程也發生在淡水水生生態系統中。橙色箭頭表示奈米微粒的進入，白色箭頭表示營養轉移的機制[15]。

### 奈米微粒於環境中可能的行為

目前有關奈米微粒的生態毒性相關研究很少，這使得我們難以比較。在簡易條件下所得出的實驗數據指出，有些奈米微粒即使在低濃度的情況下仍對於生物體是具有毒性的，包含：奈米銀、氧化鋅、二氧化鈦和二氧化矽...等。舉例來說在之前的研究中已證明奈米銀能透過緩慢釋放銀離子以及通過多種機制使得奈米銀具有優異的抗菌效果，也因此奈米銀被廣泛的應用在許多的產品當中，如燒燙傷敷料、家用消毒劑、紡織工業等，廣泛應用奈米銀將會增加其釋放至環境中而增加風險危害的可能性[24]，目前的確有許多研究團隊已證實奈米銀會釋放至環境當中，如經由浸泡含有奈米銀的襪子就會使得將近 100 % 奈米銀流失[24]，或是於洗衣機中加入漂白水的狀況下會加速奈米銀的解離[25]，也因此奈米銀是一個很有可能會釋放於環境當中的奈米物質。除此之外奈米銀先前已被證實可能會透過釋放銀離子、破壞細胞膜、產生過量 ROS 和誘導出多種細胞毒性的機制導致生物毒性[26]，所以若是奈米銀釋放至環境當中可能會導致水生生態環境系統受到損害。而奈米氧化鋅目前被廣泛的應用，如：化妝品、藥物、抗菌及催化劑領域，奈米氧化鋅可能透過家庭工業廢水進入環境水體中，並對於魚類及其它生物造成有害的影響，已有研究報導指出奈米氧化鋅暴露會造成體內累積效應，除此之外由於奈米氧化鋅具有一些獨特的物化特性，包含粒徑大小、形狀、表面修飾及團聚狀況，而導致基因毒性、致突變性或引發細胞毒性[27]。有鑑於奈米銀與奈米氧化鋅的廣泛應用和可能引起的潛在風險，探討奈米銀和奈米氧化鋅於環境水體中可能產生的毒性與危害反應是本計畫建立奈米物質之生物毒性檢測標準方法的最佳選擇。

奈米微粒一旦被釋放到環境中，生物體就可能經由不同的方式暴露其中。在很多的奈米微粒傳播情形之下，水都扮演著傳播介質和暫時的奈米微粒儲存處的角色

色，而最終，任何散播在環境中的非揮發性化合物或顆粒，都會被沉積物和土壤所接收 [28]。不過對於奈米微粒是否會對於生物和環境產生風險及影響，現階段仍缺少一些關於環境影響的流動性、轉移性、吸收率等的關鍵資訊[28]。

### 奈米微粒於環境中的流動性 (Mobility)

奈米微粒最終會停留於環境當中，如在水中、沉積物中或土壤中。而在流動與停留的過程中有三個重要的面向是用以評估奈米微粒做為污染物對於環境的影響，這三個面向包含流動性(傳輸跟轉移)、生態毒性以及變化。流動性(傳輸跟轉移):奈米微粒自一個地方移動至另一個地方的能力(例如:從含量高的地方到沒有受污染的地方)或是在不同的接收者間轉換(例如:從土壤到飲用水或是食用作物) [28];生態毒性:奈米顆粒對生長於水中、沉澱物中和土壤中的生物體可能造成的危害[28];變化:多少程度的奈米顆粒在和環境接觸時會改變，又是如何改變(關於生態毒性和流動性改變的結果) [28]。

另外在懸浮液中的奈米微粒的穩定性是決定顆粒流動性的一個主要的原因，如果不穩定，顆粒的懸浮液會聚集，就會形成塊狀的沉積物[29]。事實上，奈米微粒的表面電位及許多因素皆可能使懸浮液不穩定，包含 pH 值的改變、離子濃度的增加、穩定劑(表面活性劑或塗層)的稀釋或降解[30]，另一方面，奈米微粒本身有很大的比表面積以及在天然有機物質的水溶液中有很高的吸附能力...等。環境因子像是 pH 值和離子強度[31]，奈米顆粒的物化特性、結構和濃度[32]都可能決定它們是否會停止或轉移出土壤和沉澱物中。另一個有趣的議題是氧化還原轉換會如何影響工程奈米微粒的命運和改變，氧化還原反應在很多的環境中都會發生[33]，在有機物質降解、化學無機營養生物體產生能量時，以及影響金屬螯合和流動性的沉澱和溶解反應中都很重要。也因為奈米微粒本身元素的組成、表面電位和大的比表面積，有些奈米顆粒對於無機和有機污染物具有很好的吸附能力。另一個重要的主題則是奈米微粒是如何影響流動性、生物可利用性和環境中潛在有害物質的降解，例如:多環芳香烴、重金屬等。比起分解反應，奈米微粒事實上更傾向累積在環境中，一些金屬奈米微粒如氧化鋅，會在長時間暴露於一般環境之後再解離。某些金屬奈米微粒會在環境水體中聚集，而這樣的大分子聚集很容易因物理作用而產生變化，如:氧化鐵[34]。

## 1.2 奈米微粒細胞毒性測驗方法與相關技術之發展

由於近年來奈米科技的蓬勃發展，使得奈米微粒將有機會直接或間接暴露到人體，正因如此近期「環境、健康、安全(Environmental, Health and Safety, EHS)」的議題受到先進國家與國際組織的重視，然而現在全世界都面臨缺乏安全性評估的困境，因此建立人體健康和環境風險評估是有急迫性且必要的。目前奈米毒理的相關資料仍舊缺乏因此對於奈米微粒所誘發的毒性機轉仍需投入許多的研究來進行了解。奈米微粒因材料本身的物理化學特性，如元素、尺寸、形狀和表面官能基及表面修試劑...等，可能會與生物系統及環境產生不同的交互作用，進而導致與塊材截然不同的毒理機轉。針對奈米材料的應用而言經濟合作暨發展組織(OECD)已在網站上提出 11 項經常使用或未來即將使用的奈米材料(表 1.1)，建議並推動執行相關的危害測試分析[35]，根據表 1.1 內所提到的奈米材料，本計畫所規劃使用之奈米銀與奈米氧化鋅皆被列為廣泛使用的材料。

**表 1.1、OECD 建議之奈米材料測試物質**

	奈米材料
1	氧化銻 (Cerium oxide)
2	樹枝狀聚合物 (Dendrimers)
3	富勒烯 (Fullerene)
4	金奈米微粒 (Gold nanoparticles)
5	多壁碳奈米管 (Multi-walled carbon nanotube)
6	奈米黏土 (Nanoclays)
7	二氧化矽 (Silicon dioxide)
8	奈米銀 (Silver nanoparticles)
9	單壁碳奈米管 (Single-Walled carbon nanotubes)
10	二氧化鈦 (Titanium Dioxide)
11	氧化鋅 (Zinc oxide)

### 奈米微粒所引發的毒性及細胞毒性機轉

對於奈米微粒所引發的不良反應主要與生物體對於奈米物質本身的反應、給予的劑量、奈米微粒的形狀、電荷數、包覆物質、物化特性的整體結果有關，但目前科學界對於“什麼特徵”或“劑量反應”為最重要導致毒性的原因尚未達成共識。不過雖然我們仍無法確切明白真正導致毒性的原因，但我們仍然能嘗試著依照先前奈米微粒的研究整理出大部分奈米微粒可能會誘發的細胞機轉。目前最常見共同

發現的毒性反應的是存活率的下降、細胞凋亡(apoptosis)、氧化壓力的增加與細胞自體吞噬 (autophagy)過度活化或功能失調...等。

### 氧化壓力(Oxidative stress)

目前氧化壓力已被認為是奈米材料所造成的共同細胞毒性機轉[36]，在正常生理所需的濃度之下，活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS)能於細胞中參與訊息傳遞，但過度的氧化壓力可能造成細胞膜的損害、脂質過氧化 (lipid peroxidation)、蛋白質及 DNA 損傷 (DNA damage)...等。

### 細胞凋亡(Apoptosis)

當細胞中產生高度的壓力時，將會引發細胞凋亡，又稱為細胞程序性死亡[37]，細胞凋亡的過程中，細胞會呈現萎縮、DNA被核酸內切酶降解成180 bp-200 bp的小片段，而細胞凋亡主要走兩種不同的路徑，分別為(1)內源性路徑 (Intrinsic pathway) (2)外源性路徑 (Extrinsic pathway)誘發細胞死亡。

### 自體吞噬(Autophagy)

自體吞噬是存在於真核生物中高度保留的一種溶酶體依賴降解系統，在基礎狀態下，自體吞噬參與調節細胞內的物質之間的利用與平衡，如：蛋白質、醣類與脂質...等，除此之外，自體吞噬也參與胞器之合成、降解和重新利用。當細胞接受到外來或內部壓力刺激後，自體吞噬會快速的活化進而執行細胞保護的功能。當自體吞噬活化的過程中，細胞內的欲分解物質或外來的入侵物會被雙層膜結構--隔離膜 (isolation membrane) (又稱為吞噬泡(phagophore)) 包圍，之後將欲分解物質或外來的入侵物隔離形成酸性的囊狀胞器自噬體(autophagosome)，接著自噬體會與溶酶體融合，自噬體的包裹物就會被溶酶體內的水解酵素所降解。細胞可將降解後所產生的物質回收利用並可用於產生能量，以對抗氧化性傷害、細菌病毒入侵、DNA受損、暴露環境毒物時的環境壓力，藉此促進細胞存活(圖 1.3)[38]，但當細胞遭遇過度的壓力時，過度活化的自體吞噬作用將會誘導細胞的死亡。

自體吞噬與細胞凋亡都屬於計畫性細胞死亡，但兩者的特徵有所不同。自體吞噬的特徵是可於細胞質內觀察到酸性囊泡胞器(acidic vesicular organelles, AVOs)的產生，然而細胞凋亡的特徵則包含細胞核濃縮、胞器無結構上的改變、細胞萎縮，活化去氧核酸內切酶造成 DNA 片段化(DNA fragmentation)、但細胞膜仍是保持完整，而在最後細胞會形成凋亡小體(apoptotic body)被巨噬細胞辨認吞噬。

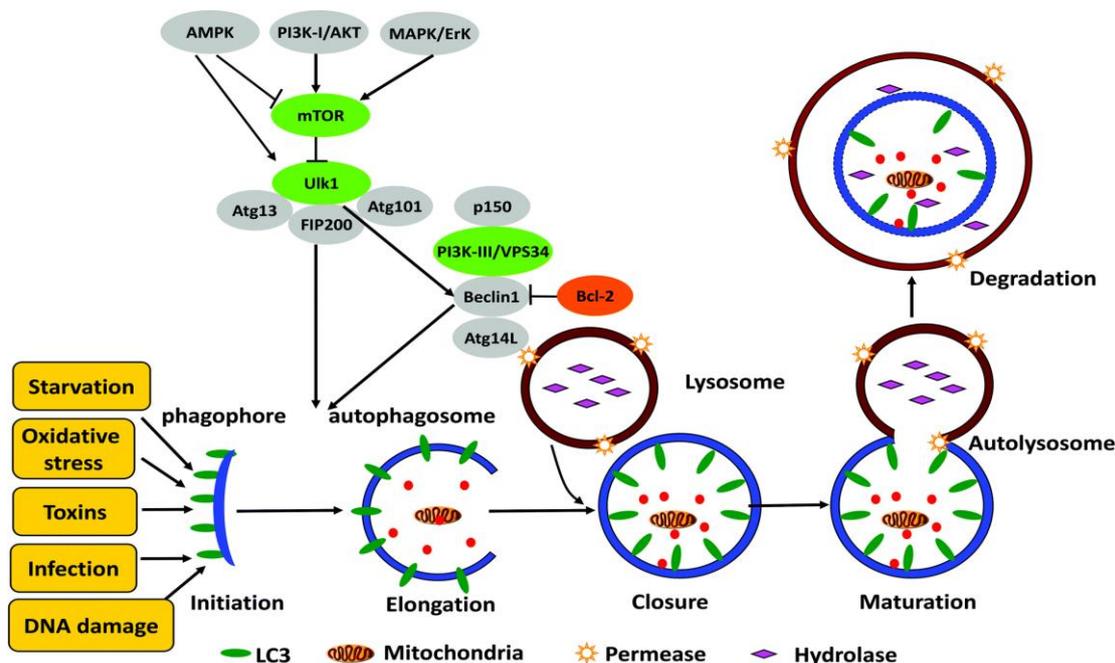


圖 1.3、自體吞噬之分子機轉

### 體外試驗的優勢和應用

奈米微粒對於生物體的影響評估應與其它任何人造材料一樣進行體外及體內試驗，目前相關管理單位對於奈米材料的檢測或評估並沒有明確的規範。體外的試驗模型系統為快速且有效的方式，能進一步提供許多奈米微粒與人類細胞間如何相互作用的準確資訊。事實上在任何臨床試驗中，特別是有牽涉到人類受試者之前，必須強制性提供實驗室之動物體內試驗研究報告，然而，體外試驗的優點是能在進行動物及臨床試驗之前，更節省且快速地準確評估毒性終點[39]。

### 近來用於評估奈米毒性的體外試驗優點：

- (1) 測試方法快速且便宜。
- (2) 減少實驗之間的變異性。
- (3) 可以在多種測試系統（細胞和組織）中測試相同的濃度範圍。
- (4) 可以進行時間依賴性(Time-dependent) 研究及採樣。
- (5) 所需測試材料非常少量的。
- (6) 產生限量的有毒廢物。
- (7) 可使用人類細胞和組織進行體外試驗。
- (8) 可使用攜帶人類基因的轉殖基因細胞。

(9) 減少動物的使用。

### 目前奈米物質之細胞培養模式毒性研究及毒性測驗方法

細胞毒性試驗最初是一種被用來鑑定化學物質一般毒性和基因毒性的方式。傳統的細胞測試僅應用於檢視化學物質本身的特性，而近年來發展的分子生物技術相關方法可以提供化學物質毒性所造成的訊息機轉之改變[40]。用以評估奈米微粒的細胞毒性試驗方法日益發展，在 Sutter 等人的研究中指出了 6 種常用的細胞毒性試驗，包括可經由篩選而得到最符合人體情況的動物模式及具有可快速審查一系列毒性物質能力的測試方法[41]。相較於動物模式，細胞試驗可提供更簡單、快速、花費少的優勢來評估毒性影響效應，然而不可否認的，細胞試驗系統缺乏動物模式與人體中的複雜交互作用[40]，且標準化的細胞株生物影響測試並不能包括所有生物的特性[42]。為了解決並尋求細胞與動物毒性試驗結果之關聯性，許多科學家開始設計與模擬測試的方法，例如，在 Sayes 等人的研究裡發現，有些奈米微粒所引起的肺部毒性於細胞或動物試驗中證實有些微的關聯性[43]。另一方面，Donaldson 等人的報告指出，由於民眾對於動物保護與福祉的保障觀念提升且其對於使用物質之安全性的意識抬頭，使得國際間對於動物與細胞測試上的觀念產生極大的變化，針對毒性與安全性的測試方法，將由現行的動物試驗為主，逐漸朝向推動細胞試驗成為標準化和合法化的實驗方法[44]。細胞體外測試系統並搭配合理的動物測試規劃，將成為未來世界各國進行物質安全與生物體危害效應測試的新趨勢。

目前對於探討環境奈米微粒對於環境及生物所造成的影響相關的研究十分的少，而先前在部分的研究中是使用較為單純的條件之下進行毒性的測試，如奈米微粒會導致細胞中細胞毒性機轉的活化，包含存活率下降、氧化壓力、細胞凋亡、自體吞噬...等，也因此為了要探討奈米微粒所引發的不良反應，最近也有許多文獻提出建立測試奈米物質的方法。

### 細胞培養模式之存活率測驗方法

細胞存活率是細胞毒性測試中最常被用來研究的參數。藉由對於細胞不同測試終點的分析，可以用來評估體外試驗培養中的細胞狀態。

#### (1) 臺盼藍不相容試驗(Trypan blue exclusion assay)

此試驗是利用臺盼藍這種重氮染料進行細胞染色，當染色時臺盼藍會被死細胞吸收，而活細胞則不會的原理來判定細胞存活，將暴露奈米微粒的細胞使用 trypsin 收集，並透過細胞計數盤在顯微鏡下觀察，即可計算活細胞的數量，觀察細

胞存活率。此方法之優點為可真實地計算出細胞的數量，並與控制組比較可以清楚地看出細胞增生與毒性的情形。

## (2) MTA 試驗(Microculture Tetrazolium Assay, MTA)

短期 MTA 試驗是測定細胞代謝能力，也因此無法直接計算細胞數目，在暴露奈米微粒後於細胞中加入可溶性的黃色鹽類例如：MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 或 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，於 37 度反應 2-4 小時，在反應過程中，活細胞之線粒體中的琥珀酸脫氫酶(succinic dehydrogenases) 會將 MTT 或 MTS 進行生物還原，產生不溶性的紫色產物，接著利用 DMSO 將紫色結晶溶解，即可透過分光光度計進行定量。

## (3) 細胞群落生成分析 (Clonogenic Assay or Colony Forming Efficiency, CFE)

細胞群落生成分析可觀察細胞在較長時間(數週)中的減少存活率與增生的情形，將非常低密度的細胞量種於細胞培養盤中，使細胞持續生長至肉眼可見之群落(約莫 10 天至三周)。而暴露物質可在塗盤前或塗盤後進行暴露，由於每個群落皆由一個細胞生成，故命名為群落分析。形成的群落可使用結晶紫(crystal violet)或細胞核染色(nuclear stains)進行細胞的染色，並根據數量或群落大小進行定量。

## (4) 細胞壞死的乳酸去氫酶(LDH)釋放偵測

乳酸去氫酶試驗比色法其原理是基於黃色的 2,3,5-三苯基氯化四氫唑(tetrazolium salt) 2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-苯基氯化四唑(INT)經氧化反應後轉變成紅色的代謝產物四氫唑(formazan)，在臨床上用以推論組織或細胞的受損[45]。乳酸去氫酶的量會明顯地由細胞內細胞壞死過程中的細胞溶質(cytosol)釋放出來，而乳酸去氫酶的活性是由懸浮式細胞培養中測得。

## (5) 經由中性紅(neutral red)染色偵測完整無損的溶酶體

1984 年起中性紅即被用於作為測量存活率的染劑並且已應用在許多細胞毒性試驗、細胞增生能力試驗及細胞附著能力試驗[46, 47]。中性紅(3-氨基-7-二甲氨基-2-methylphenazine 鹽酸鹽)具有較弱的負離子且可進入細胞溶質中，透過非離子性溶液穿過細胞膜然後累積在活細胞的溶酶體中，而此過程可排除掉死細胞。帶有中性紅染劑者可透過螢光或是吸光值來檢測。事實上小鼠的纖維組織母細胞 NIH-3T3 已利用中性紅攝入數值(NRU)來確認其細胞毒性試驗測試，並且歐盟也已經將中性紅試驗加入其組織中的 REACH 法規之化學物細胞毒性評估法中。其它的奈米微粒也都已經過中性紅試驗的測試，像是奈米二氧化鈦[48]、單壁奈米碳管(SWCNTs)[49]、多壁奈米碳管(MWCNTs)[50]、奈米級甲殼素[51]。

## 氧化壓力 Oxidative Stress Assay

### (1) 活性氧化物偵測

細胞內的壓力反應時常用 H<sub>2</sub>DCF-DA 作為檢測的方式，是一種廣泛使用於活性氧化物(ROS)的細胞檢測探針[52-54]。乙酸酐化的非螢光分子可經由細胞培養進入細胞中，並且可能經去乙酰化作用(deacetylation)被細胞溶質抓住後，透過細胞內氧化而產生螢光。有許多研究對於確切的 H<sub>2</sub>DCF-DA 氧化作用相關機制提供多樣的結論，因而建議 DCF 應該被應用作為一般細胞氧化性壓力的訂量指標[54]。當細胞培養暴露於有些奈米微粒中時可能會增加 DCF 的螢光表現，例如奈米級的二氧化鈦、單壁奈米碳管、富勒烯，及奈米級的二氧化矽[55, 56]。去乙酰化作用(deacetylation)的 H<sub>2</sub>DCF-DA 並非僅存在於細胞質中作用，其也可能累積在細胞外的地方，並與在細胞外部具催化性功能的活化物質有交互作用[57]。

### (2) 脂質過氧化測驗 (lipid peroxidation assay)

脂質過氧化是由 ROS 的存在引發的細胞膜的氧化降解，並且是最多的通常通過測定丙二醛 (MDA) 或其他的存在來測量硫代巴比妥酸反應物質 (TBARS)。

## 細胞凋亡 Apoptosis

### (1) Annexin V/PI 染色以偵測細胞凋亡和細胞壞死的細胞

Annexin V(VAC alpha)是經常被用於偵測細胞凋亡細胞的染劑[58]，且在鈣離子相關作用中會強烈地與磷脂酰絲氨酸作結合作用[59, 60]。磷脂酰絲氨酸通常會由細胞外的原生質膜上被排除，但是內部和外部之間關於細胞凋亡的部分會開始產生[60]。標的螢光的 Annexin V 染劑可因此被利用於偵測細胞凋亡細胞[61]。在原生質膜內部中壞死的細胞會由 Annexin V 與 PS 作結合，而細胞錯誤的結合作用則會造成偽陰性的結果產生。因此細胞必須同時以 PI 染色，這樣將可以排除染色的細胞壞死細胞[62]。奈米微粒利用 Annexin V 染色與流式細胞儀測定細胞凋亡已經被報導過，像是奈米級的二氧化鈦[63, 64]、純的和多羥基化的富勒烯[64]及量子點[65]。

### (2) TdT dUTP Nick End Labeling (TUNEL) and Apoptosis staining Assays

當進行細胞凋亡後期會發生細胞核內 DNA 斷裂而片斷化的現象。當 DNA 被內源性核酸內切酶降解，產生帶有 3'末端的切口、或斷裂 DNA 片段，末端脫氧核苷酸轉移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)能夠辨認 DNA 切口並催化有螢光色素的特殊核甘酸鏈(dUTP)接到 DNA 片段的 3'末端，也因此可透過顯微鏡即可觀測並根據螢光強度對凋亡細胞進行定量分析。

### (3) DNA 片段化分析 (DNA laddering)

細胞凋亡時，其中一樣的生化特徵是發生染色質濃縮，染色質 DNA 在核小體單位之間的連接處會在細胞凋亡時斷裂，因而形成 50-300 kbp 長的 DNA 大片段或 180-200 bp 整數倍的寡核苷酸片段，在凝膠電泳上表現為梯形電泳圖譜 (DNA ladder)。細胞經處理後，用常規方法分離萃取 DNA，進行瓊脂糖凝膠和溴化乙啶 (EtBr) 染色，在凋亡細胞群中可觀察到典型的 DNA 片段。

## 自體吞噬 Autophagy

### (1) 偵測 LC3I / LC3II、p62 蛋白質表達量

先前已有體外實驗證明在暴露奈米物質時會導致自噬作用活化[66]，在自噬作用活化的過程中會增加 LC3I (microtubule-associated protein-1 light) 轉變為 LC3II 以及 p62 蛋白的表現，也因此可以利用西方墨點法或螢光染色來偵測 LC3I/LC3II 和 p62 的蛋白質表達量進而得知自噬作用的活化[66, 67]。

### (2) Lysotracker staining

Lysotracker 是針對活細胞中的酸性囊泡進行染色的一種螢光染料，lysotracker 的結構本身是由鹼性基和螢光基團所組成，除此之外 lysotracker 也能夠穿越細胞膜，因此能夠用於觀察酸性的溶酶體的位置，另外因 lysotracker 是以偵測酸性的所在位置，也因此使用時應再搭配標記細胞膜位置的染劑同時使用才可正確標的溶酶體和自噬小體[67]。

## 1.3 國際奈米生物毒性測試指引

近年來由於奈米科技的快速多元發展，且使用在許多不同產品當中，一般大眾暴露到人造奈米物質的機會大幅增加之外，也促使國際間相關組織開始重視且進一步評估奈米物質可能造成的潛在毒性反應。奈米化的物質潛在著龐大的多樣性且幾乎每一種元素週期表上的元素都能被應用於奈米科技，因此對於每一種新的奈米材料進行毒性檢驗是一項極大的挑戰。然而科技的創新進步仍舊必須與大眾的安全健康以及環境的維護同時發展，才能相輔相成、永續經營。

### 國際標準組織(ISO)之指導規範

針對奈米物質的管理規劃，國際標準組織(ISO)於 2005 年成立了 TC229 技術委員會 (Technical Committees)，主要負責奈米物質標準的制定。TC229 技術委員會一共有 4 個工作小組，分別為 JWG 1，負責奈米物質的術語及命名(Terminology and nomenclature)、JWG 2，負責奈米物質的量測及特性分析(Measurement and characterization)、WG3，負責奈米物質的 EHS (Health, Safety and Environmental Aspects of Nanotechnologies)以及 WG4，負責奈米物質規範(Material specifications)，

其中奈米物質毒性篩選的標準方法即為 ISO/TC 229 WG3 的工作重點之一。經過近 10 年的努力，國際標準化組織於 2014 年公告 ISO/TR16197 技術報告，其內容為人造奈米材料毒性篩選方法之編撰與描述。

以下之計畫內容為參考 ISO/TR16197 技術報告進行翻譯與整理之撰寫[68]：

毒性篩選測試的目的在於提供一個對人體健康或環境潛在不良結果與影響的指標。而篩選測試的原則與項目包含：

- 不使用(或使用有限數量)感知動物(sentient animals)；
- 產生可量化的試驗終點(end point)或廣被接受並可靠的「是與否」之篩選結果 (yes/no screen)；
- 有被多個實驗室證實的重複性；
- 有可再現性並具有適當的陽性及陰性對照。

一般而言毒性篩選可作為人造奈米材料毒性評估分層方法的一部分。分層測試方法是基於一種逐步評估的方式，隨著評估的每一個步驟提供後續步驟可能需要的或是在安全測試方法中將被使用的數據/資訊。毒性篩選通常是被執行在最早的分層之一，提供早期的危害基本資料作為產品開發、使用等的決策。奈米材料毒性篩選方法之建立，首先即須找出適當的體外分析方法納入其中。一般來說，為了確保分析方法的有效性，測試奈米材料的體外分析方法應包含正、負對照組。理想上，正負對照組應為與人體危害相關(或者無相關，就負對照組來說)之奈米微粒，其機制基礎也需以此分析方法評估。

ISO/TR16197 技術報告所建議的體外試驗方法包括：**(1) 細胞毒性篩選方法 (2) 發炎及免疫反應篩選方法 (3) 壓力反應(包含氧化及蛋白產物)篩選方法**，其項目細分為 **a. 奈米微粒的非細胞氧化還原活性 b. 細胞內產生的 ROS (4) 血液中成分之篩選方法 (包含凝血因子、溶血) (5) 基因毒性篩選方法 (6) 體外屏蔽檢測以及適合的檢測系統用來評估生物屏障毒性，例如肺部和皮膚 (7) 體學測量 (Omics measurements) (8) 其他毒性 (包含神經毒性、發育毒性、胚胎毒性及器官影響)**。以下先就細胞毒性篩選以及氧化壓力產生之反應進行技術報告之內容整理。

針對奈米物質之細胞毒性研究，細胞毒性試驗是最基本且常用的體外試驗方法，當選擇合適的細胞株進行試驗時，可與體內試驗給予急性高劑量的結果一致。通常細胞毒性偵測方法是評估暴露 24 小時後之 50%致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 或 50%有效濃度(EC<sub>50</sub>)。評估化學物質細胞毒性的方法以現階段而言，依舊適用於分析奈米材料之細胞毒性。最常用的方法是 MTT 或改良的 MTT(如 MTS 或 WST-1)。Alamar blue、乳酸脫氫酶釋放實驗(LDH release)，以及以 trypan blue 染色計數細胞數目的方法等，也都是常用的方法。在細胞毒性試驗中，偵測樣本所存在的不透明奈米材

料可能干擾可見光或螢光值，可以透過在測量前仔細取出樣本的上清液並轉移到另一個圓孔(well)或分析管(cuvette)中來避免這樣的問題。然而，受測試的奈米微粒在吸附測試試劑而形成的產物之能力，以及/或是干擾螢光值或紫外線-可見光吸附之能力也必須被探討。若此吸附及干擾的情形被確定，這些分析方法可能無法提供可信的受試奈米材料毒性結果。因此在實驗中必須包含影響干擾因素的適當控制組別。

細胞內氧化壓力的測試與篩選方式，先前的研究已經探討了氧化壓力在環境奈米材料之毒性及與細胞內氧化壓力反應相關路徑中所扮演的角色[69-71]。細胞產生之活性氧物種(ROS)為正常細胞活動之副產物，可被細胞的抗氧化防禦系統中和。若活性氧物種產物超過抗氧化防禦系統的中和能力就會導致氧化壓力生成。根據以下提出的三個分層模式，氧化壓力期間的細胞性反應包括多種氧化還原易感的訊息傳遞流[70]。在受到低程度的氧化壓力時，第一層的保護反應會誘導抗氧化酵素生成，例如穀胱甘肽 S 轉移酶，以恢復氧化還原平衡。若 ROS 產物更多的增加或是起始的抗氧化反應失效就會導致促發炎(分層 2)與最終導致細胞毒性(分層 3)影響。奈米材料可能透過數種途徑誘發氧化壓力。例如，由二氧化鈦的光學活化形成之電洞對，或是半導體奈米材料的導電帶之電子跳躍都可能導致  $O_2^{\bullet-}$  與  $OH^{\bullet}$  自由基生成[72]。此外，奈米材料分解所釋放的金屬離子以及奈米材料表面存在的過渡金屬如鐵、鎳、銅、鈷、鉻，都可以經由 Fenton 反應生成  $OH^{\bullet}$ 。最後，甚至一些惰性奈米材料也能藉由干擾粒線體的功能導致 ROS 產物生成[70]。

### 奈米科技鑑定實驗室(Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL)

除了 ISO 所提出之奈米毒性篩選測試之建議方法之外，設置於美國國家癌症研究中心之下的奈米科技鑑定實驗室(Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL)，針對奈米微粒的臨床前毒性與藥理性質分析，已經發展出一系列的標準測試方法，其中包含物化特性、細胞實驗與動物實驗等實驗步驟於其網頁上 (<https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>)。NCL 在毒性(Toxicity)的測試分析方面提供了相當多的測試方法選擇，例如氧化壓力、細胞壞死、細胞凋亡、細胞自體吞噬等實驗步驟(如下表所示)，其中近年來研究指出奈米物質所造成的細胞自體吞噬失調(*autophagic dysfunction*)作用，可以做為一種毒性反應的體外測試指標。

表 1.2、NCL 所提供之奈米物質毒性測試項目及方法

Toxicity	
<b>Cytotoxicity (necrosis) (Questions?)</b>	
GTA-1 	MTT and LDH release in LLC-PK1 cells
GTA-2 	MTT and LDH release in Hep G2 cells
<b>Cytotoxicity (apoptosis) (Questions?)</b>	
GTA-5 	Caspase 3 activation in LLC-PK1 cells
GTA-6 	Caspase 3 activation in Hep G2 cells
GTA-14 	Caspase3/7 activation in Hep G2 cells
<b>Oxidative Stress (Questions?)</b>	
GTA-3 	Glutathione assay in Hep G2 cells
GTA-4 	Lipid peroxidation assay in Hep G2 cells
GTA-7 	ROS assay in primary hepatocytes
<b>Autophagy (Questions?)</b>	
GTA-11 	MAP LC3I to LC3II conversion by western blot
GTA-12 	Autophagic dysfunction in LLC-PK1 cells

### 其它相關國際活動與公佈的文件

另一個標準化奈米毒性測試是由經濟合作暨發展組織(OECD)、美國材料與試驗協會(ASTM International)及數個國家計量機構(National Metrology Institutes)所主導[73]。OECD 的人造奈米材料工作小組(WPMN)在 2006 年成立，並且截至 2011 年，已組成九個督導小組(steering groups, SG)。

表 1.3、OECD 工作小組之人造奈米材料督導小組

督導小組	督導小組名稱
SG1/SG2	人造奈米材料之 OECD 資料庫提供資訊與分析 EHS 研究活動
SG3	代表性人造奈米材料之安全測試
SG4	人造奈米材料與測試準則
SG5	自願計畫與管制計畫之合作
SG6	風險評估之合作
SG7	替代方法在奈米毒物學中的角色
SG8	暴露測量及暴露減緩
SG9	人造奈米材料之環境永續利用

WPMN SG4 曾經就 OECD 測試準則對人造奈米材料的適用性進行全面性審

閱，調查結果認為，原則上現有的 OECD 測試方法能夠檢測奈米材料之影響。此奈米材料安全測試之樣品製備與劑量以及風險評估的準則於 2012 年公佈[74]。歐洲食品安全局(EFSA)在 2011 年公佈一份工程奈米材料(ENM)應用於食品及飼料之風險評估的指導文件。這份指引涵蓋食品及飼料應用的風險評估，包括食品添加物、酵素、調味料、食品接觸性材料、新穎食品、飼料添加物以及殺蟲劑(可取自 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2140.htm>)。

### 經濟合作暨發展組織(OECD)對於奈米毒性評估之生物毒性標準方法

有鑑於奈米技術為一種刺激經濟、就業率與競爭力成長的高科技產業，歐盟 the European Union's (EU)在 2012 年的奈米物質第二次監管審查會議中，建議針對奈米物質的研究與開發方面需提供更多的資源與持續經營的概念。為了確認奈米物質的風險評估程序，歐盟成立了 NanoSafety Cluster 的合作資助計畫，截至 2012 年底，一共有 46 個 nanosafety projects 包含在此計畫內，並且已投入 1.3 億歐元的資金針對奈米物質的物化特性表徵、暴露、危害評估與研究上的挑戰等各個方面進行研究[75]。

NanoSafety Cluster Working Group 10 (WG 10)為 NanoSafety Cluster 計畫中的其中一個研究項目，其內容為關注於目前奈米物質毒性測試與評估的方法和途徑[75]。WG 10 的研究報告內容指出，過去十年來奈米物質的毒性研究不斷的進行，然而，許多研究的實驗流程並未有標準的方法可以加以遵循，導致有時再現性差、數據結果難以比較等問題，因此不能夠去進行明確的危害及風險評估。此外，相同研究中無法獲得一致性的物化特性數據，使得難以確定哪些材料特性，是決定毒性作用的關鍵因子。物化特性數據有時無法獲得一致性的背後原因可能為奈米物質很難測定其當下連續發生的反應[76, 77]。然而，已經證明許多因素，例如離子強度、pH 值和其它介質特有的特性會影響奈米物質的初始狀態，一旦進入介質中(例如:與奈米物質凝聚作用有關、聚合反應以及表面修飾作用)將會影響生物利用性及毒性[78]。目前毒理學方法來評估奈米物質的危害主要是基於從基礎毒理學採用的方法或是替代方法，然而這些方法並不能涵蓋整個奈米物質的獨特之處，例如 1) 在不同的生物性介質中會產生不同形式的奈米；2)攝入/吸附，分布，蛋白質聚體的形成(corona formation)/去除，(ADCE，用以表示 ADME，吸收，分布，代謝，排出，因為對於大多數奈米物質的代謝，corona formation 反而取代了 metabolism 的作用)；3) 對器官功能和細胞質層級的影響。

鑑於各種奈米材料和奈米系統的複雜應用與多樣性(例如，在不同介質條件中分散的穩定性)，必需透過大量的特性配對測試，才能被視為評估單一種材料類型

的整體風險，因此目前針對奈米物質的危害/風險評估中，藉由逐案(case-by-case)的方式進行分析已廣泛被科學家和監管機構接，但是考量到大量的新興奈米形式的材料，這樣的方式將是一個耗費時間和資源的任務，且與 3R(減量(reduce)、精緻化(refinement)、替代(replace))的原則[79]以及歐盟 2010/63/EU 實施動物試驗用於科學目的的動物保護指令[80]互相衝突。為了發展並實現對於奈米物質的危害/風險評估，NanoSafety Cluster 提出於 2020 年完成奈米物質的潛在風險調查與推動指導守則發展之展望，透過蒐集暴露程度、狀況和暴露途徑的資料、材料特性以及在電腦模擬中危害反應和生物動力學的數據等，除了提倡動物僅用於關鍵和重點研究，降低動物的使用數量及造成動物的苦難之外，進一步開發毒理或生態毒理之測試與評估綜合方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) [75]。

IATA 是一種描述化學物質危害訊息的方式，基於科學的方法整合現有的訊息，並經過綜合分析以及使用測試策略產生新的資訊，提供物質的風險評估參考依據。奈米物質的危害/風險評估也將勢必採取此種方式來提供日後相關管理規範與法規的制定，而其首要目標即為透過建立標準的毒性測試方法來取得再現性佳且試驗結果具比較性的數據資料。

### 體內試驗毒性篩選相關方法

ISO/TR16197 技術報告針對體內測試之建議指出，新的體內試驗系統例如斑馬魚胚胎，能夠被簡單又快速地應用在細胞及分子的層次上。斑馬魚胚胎模式透過結合一系列的形態的(morphological)、發育的(developmental)及行為的(behavioural)分析，提供完整的系統影響(integrated system effects)測試，此模式不僅屬於全動物篩選方法(Whole animal screening approaches)模式系統，還能快速提升我們對於暴露奈米材料所產生的生物體影響結果之認知。

針對斑馬魚的體內測試系統而言，OECD 過去針對化學物質的魚類毒性測試方法已有相關的測試指引公告提供參考，因此今年度之計畫將先就 OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試進行水體樣品之奈米物質斑馬魚體內毒性測試系統之建立。

## 1.4 斑馬魚在水體環境檢測的應用與優勢

### 斑馬魚簡介

斑馬魚(*Danio rerio*)為輻鰭魚綱鯉形目鯉科，主要分布於東南亞的溪流，外觀體色為銀色或金色，從頭部延伸至尾鰭後端覆蓋著藍色的橫紋，大部分雄魚體型較雌魚小且細長如圖 1.4 所示[81]。

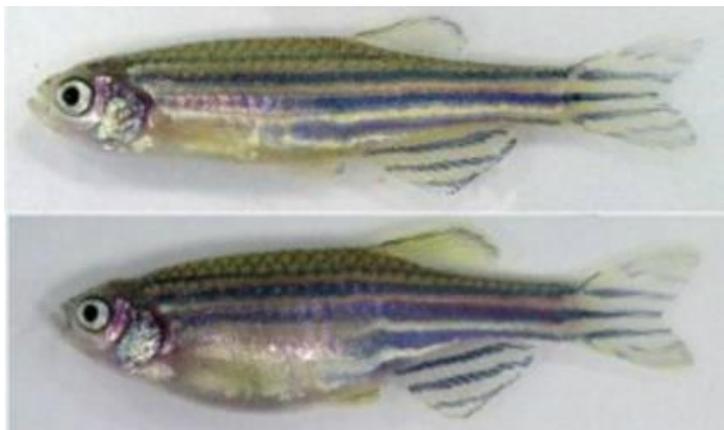


圖 1.4、斑馬魚成魚-雄魚(上)雌魚(下)

近年來斑馬魚被認為是一個良好的動物模式生物系統用於測試生物毒性，斑馬魚本身擁有許多難以取代的優勢，包含繁殖力強、胚胎透明性、發育速度快及明顯外觀、低成本、基因改變方便性、繁殖時間短等優點[82-84]，這些優點使斑馬魚動物模式具有很大的應用性，斑馬魚能一步確認體外毒性實驗結果及提供體內動物實驗前的優先試驗[85]（圖 1.5）。事實上，斑馬魚早已被認為是一個適用於篩選環境毒物、人造化學品和藥物的動物模式[86, 87]，斑馬魚也被認為是評估環境毒性的“黃金標準”[88]。除此之外，斑馬魚的基因是具有高度保留性的，斑馬魚許多的基本細胞及分子機制途徑，如：毒物或壓力反應都具有高度遺傳保留性[89, 90]，甚至因斑馬魚擁有與人類相同高保留性的疾病基因，因此斑馬魚也成功發展出疾病模式[91, 92]。

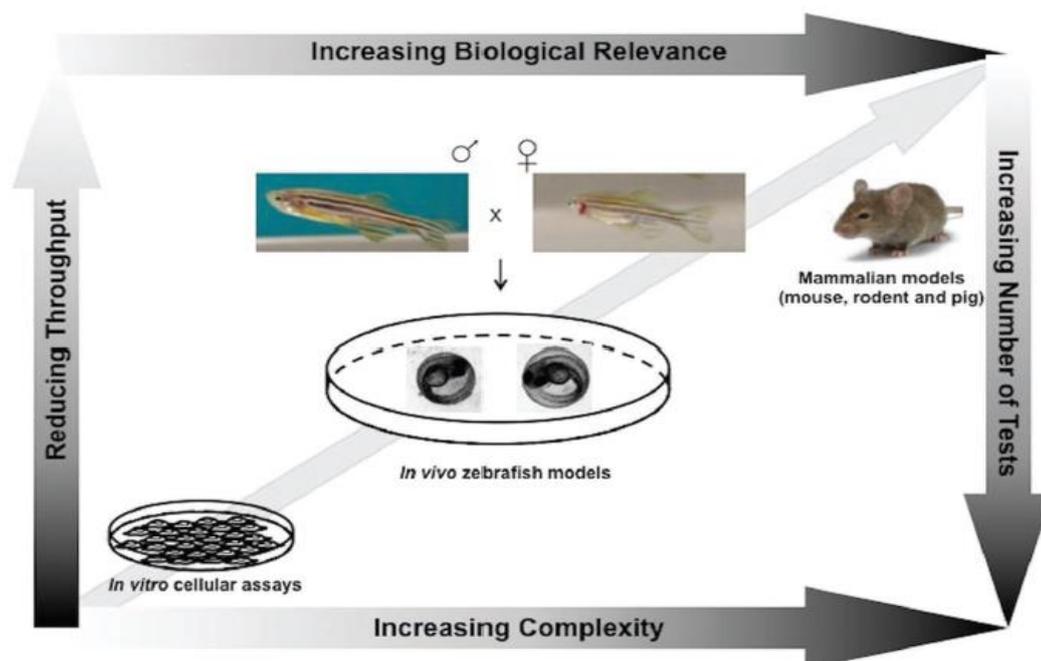


圖 1.5、斑馬魚是一個適用於篩選環境毒物、人造化學品和藥物的動物模式。斑馬魚可應用於在高通量的技術中，因而可望取代實驗老鼠的使用，並與體外細胞測定相比，斑馬魚更能提供更高層次的生物相關性和複雜性，同時保持高通量及提供更多數據生成能力。

### 斑馬魚於環境物質監測應用

世界各地環境污染中，特別是水污染不僅影響整個水體環境與水生生物的存活及繁殖，並通過生物群集間接影響人體健康，因此水污染在環境中仍是其中一個重要的環保議題。

由於野生種斑馬魚對於不同污染物有著高度敏感性，能夠透過斑馬魚的外觀變化、行為模式觀察、基因表達...等生物指標來探討污染物對於生物的影響，也因此斑馬魚是一個理想監測環境的模式系統。最早國際標準組織 (ISO) 在 1984 年首次公告斑馬魚可做為動物毒性試驗的模式系統[93]，而近幾年許多國家也開始根據 ISO 7346-1996 的斑馬魚測驗準則公布自己國家的毒性測試準則如：英國標準 BS / EN / ISO 7346-3-1998，德國標準 DIN / EN / ISO 7346-3-1998，以及中國標準 GB / T13267-91 等測驗內容。日前在許多斑馬魚環境物質測定中包含如：重金屬、內分泌干擾物及有機污染物等物質如(表 1.4)所示[94]。

表 1.4、斑馬魚測定環境物質之現況[94]

Classes	Contaminants	Biomarkers/endpoints
Heavy metals	Cadmium acetate, lead acetate, mercury chloride, zinc chloride Mercury chloride Cd <sup>2+</sup> Cadmium, zinc, Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> Arsenic Nano-scale TiO <sub>2</sub> , ZnO and their bulk forms	Acetylcholinesterase activity, gene expression pattern, antioxidant competence in the brain Adenosine deaminase activity, gene expression mRNA expression of smtB and mt2 Superoxide dismutase, catalase, acetylcholinesterase Metallothionein (zMT) gene expression Dvr1 expression Acute toxicity, oxidative stress, oxidative damage
Endocrine disruptors	BDE-47 PBDEs DE-71 TCDD Bisphenol A and triclocarban Bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor, tetrabromobisphenol A	Behavior Retinoid content, gene transcription levels Thyroid hormone levels, gene transcription TCDD-induced transcriptional changes Brain-specific expression of aromatase Vitellogenin expression
Organic pollutants	Chlorpyrifos and nickel chloride Chlorpyrifos Perfluorononanoic acid Methyl parathion	Behavior Behavior Transcriptional expression of FABPs Membrane protein

雖然野生種斑馬魚被廣泛使用於監測環境污染物的毒性，但斑馬魚仍具有許多可改良之處，如檢測靈敏度和繁瑣的統計實驗等，因此近年來轉殖基因技術成功地應用於斑馬魚模式中並改善這些缺陷，使得斑馬魚已逐漸成為許多研究領域中的最佳工具。轉殖基因斑馬魚也被發展成更加先進的系統來監測環境污染物[95]。隨著轉殖基因斑馬魚螢光蛋白表現的成功發展，這使得斑馬魚能更加簡單及方便監測環境。螢光蛋白可標的表達基因並可以在異源細胞中表達，除此之外螢光蛋白本身容易檢測且不會對魚體產生任何毒性。因此螢光蛋白已被廣泛用於斑馬魚轉殖基因動物的研究中。

當暴露於環境污染物時，反應機制可以驅使特定基因的表現，如圖 1.6 所示 [96, 97]，目前研究人員已經開發多種不同的反應機制來檢測不同特定環境污染物。利用顯微注射來重組建構質體後，就可以通過篩選斑馬魚品系來獲得穩定遺傳的螢光蛋白表達基因。

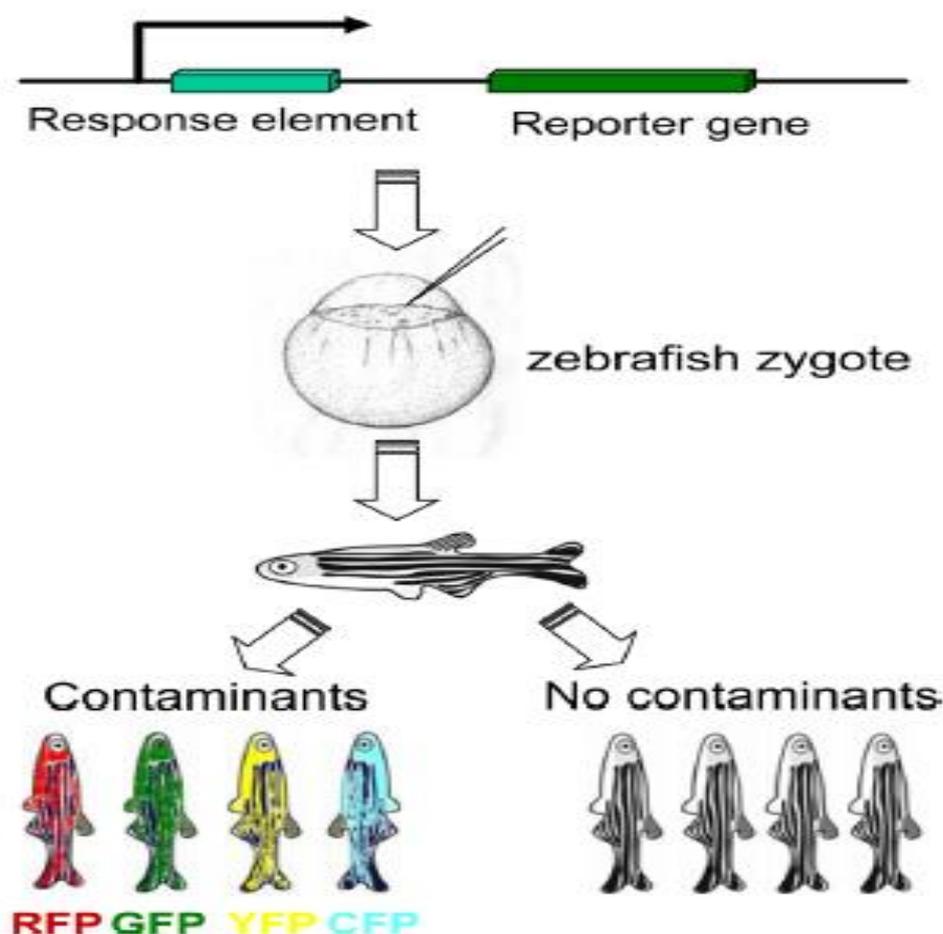


圖 1.6、轉殖基因斑馬魚監測環境污染方法簡圖。(1)於質體中插入特定基因和螢光蛋白質基因 (2)將建構完成的質體注入在斑馬魚胚胎中 (3)篩選帶有轉殖基因的斑馬魚後代，穩定的轉殖基因斑馬魚可暴露於不同的環境污染物並用於觀察螢光監測水生危害物質。RFP：紅色螢光蛋白；GFP：綠色螢光蛋白；YFP 黃色螢光蛋白；CFP 青色螢光蛋白[94]。

### 斑馬魚做為奈米物質毒性測試物種

斑馬魚模式的優勢已從奈米 EHS (*the environmental health and safety*) 研究的角度嶄露頭角，包含近期研究指出斑馬魚胚胎暴露奈米銀後會干擾氧氣在體內擴散，因而導致缺氧及內質網壓力增加，最後導致心血管疾病[98]。除此之外斑馬魚魚體暴露奈米碳管會影響其神經系統的發展[99]。斑馬魚適用於評估奈米物質毒性的動物模式其概括四個優點，包含：具生物複雜性、高繁殖力、不同階段暴露及分子和遺傳分析。

(1) **生物複雜性**：斑馬魚可提供單細胞無法提供的動態作用，交互作用和多重器官

要素。許多研究顯示，很多生物性作用在細胞模式中並沒有再現性，除此之外細胞的三維環境狀況下可能影響生物性作用的功能和命運。另外，在真實生物體中新陳代謝所產生的化學物質可能完全不同。因此若需要快速並且早期評估奈米微粒對真實生物體之生物活性的潛在影響，斑馬魚模式生物系統是具有高度可行性的。

**(2) 高繁殖力：**每年產生的奈米物質和奈米相關產物的數量及種類不斷增加，也因此建立毒性篩選高通量平台是非常需要的，因成年斑馬魚每次交配後所產生大量的胚胎使得能同時供給大量重複性試驗，這可以提供與體外細胞實驗相當的統計學效力，對於奈米毒性測驗而言，此樣的優勢特別具有吸引力，也因此斑馬魚的高繁殖力使其成為篩選大量奈米材料之理想選擇。

**(3) 不同階段暴露：**斑馬魚不同的發展階段能設計適合的篩選方法和執行特定暴露場景或奈米物質的毒性機制(圖 1.7)，例如：胚胎毒性能評估且快速提供奈米物質引發型態異常、低孵化率和在受精後約 3-5 天存活率的早期警告。晚期階段的斑馬魚皮膚、胃腸道和鰓暴露奈米物質，其可能導致亞急性毒性終點，包括皮膚損傷、GI 間歇性受損、內分泌干擾、鰓受損等等損傷，除了短期急性毒性測驗，斑馬魚亦適合做為長期暴露實驗，促進奈米材料慢性毒性的研究。

**(4) 分子和遺傳分析：**斑馬魚非常適合分子和遺傳分析，並可深入調查奈米材料發揮的具體毒性機轉[100]，例如：斑馬魚胚胎的透明度可以透過 RNA 原位雜交(*in situ hybridization*)檢視整個胚胎中的特定基因表達位置及基因表達量差異。另外斑馬魚微陣列 (*micro array*) 也已被開發以促進快速和同時評估數千個基因表現差異[101]，此外，斑馬魚也已建立許多基因轉殖斑馬魚品系，到目前為止，數以百計的轉殖基因斑馬魚品系已作為標記特定類型的細胞、組織、器官或信號分子，並成功地用於遺傳和分子分析，這可用於監控特定細胞/組織/器官中特定基因表達的表現，因此可用於直接觀察和即時監測暴露於奈米物質活體動物的生理變化。

不可否認的是任何模式皆具有其限制性，斑馬魚亦有其局限性，與嚙齒類動物相較而言，斑馬魚做是一個相對較新發展出的動物模式，對於斑馬魚的相關知識較少，因此關於大多數化學物質之代謝和藥物動力學的可用數據是較有限的。除此之外，對於小型生物而言，測量生理狀態和解剖學是具有相當大的挑戰性的，最後，斑馬魚雖同為脊椎動物，但並非哺乳動物，也因此當從斑馬魚研究外推至人類時須較為小心處理數據。

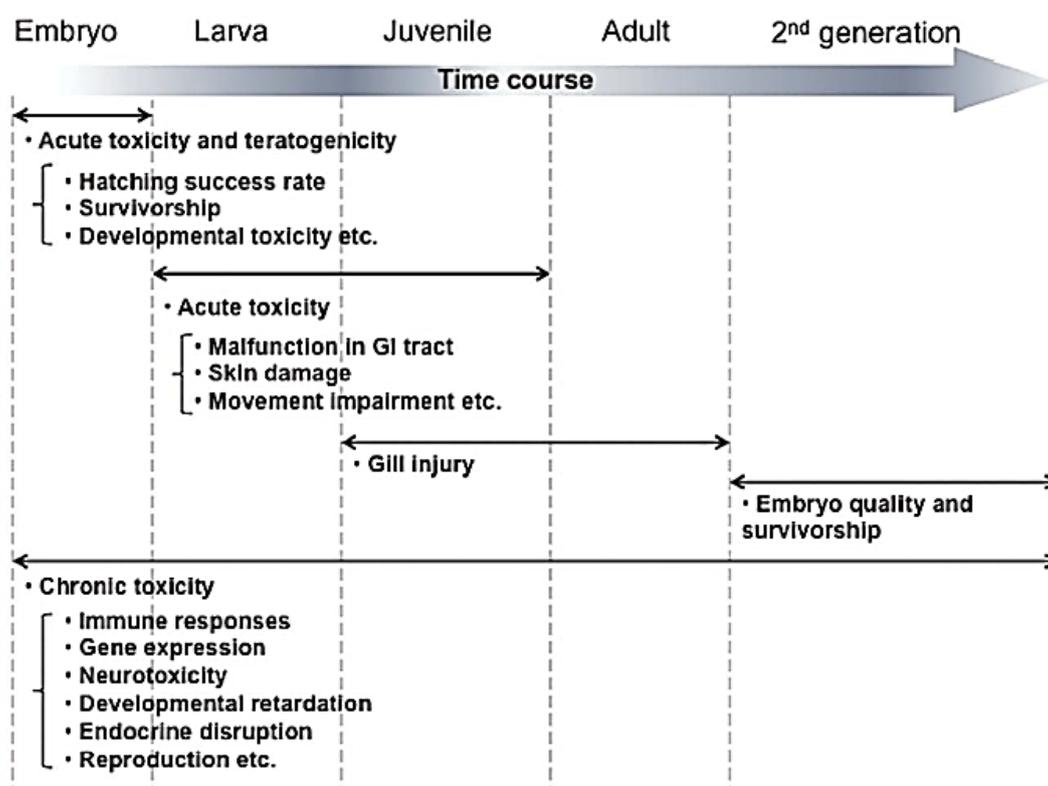


圖 1.7 斑馬魚不同的發育階段提供各種毒理反應多種篩選方案，包括孵化成功率、存活率、發育毒性、皮膚受損、運動受損、鰓受損、神經毒性、生殖毒性等[85]。

### 斑馬魚胚胎發育毒性測試模式重要性

隨著斑馬魚模式快速發展，FET-test 內容也主要以斑馬魚作為此指引的測試物種，目前 FET-test 已應用在諸多具有多樣化、溶解度、揮發性、疏水性等特性的化學物質作為毒性測試的材料，透過受精斑馬魚胚胎暴露測試化學物質 96 小時的方式，每 24 小時觀察胚胎發育狀況，並觀察是否有受精卵凝結、缺乏體節形成、缺乏尾部從卵黃囊分離及缺乏心跳四種死亡測試指標作為測試終點存活率之依據，並透過存活率的數據來計算半致死濃度數值 ( $LC_{50}$ )[102]。

此外美國環境保護署( Environmental Protection Agency, EPA ) 也有制定魚類急性毒性測試 ( Fish Acute Toxicity Test, OPPTS 850.1075 )，以從胚胎受精後到 96 小時之化學物質暴露影響評估作為測試原理，最終期望能建立半致死濃度數值 ( $LC_{50}$ ) 及無可觀察毒性效應濃度( No Observable Effect Concentration, NOEC )，通常  $LC_{50}$  表示胚胎培養液中的暴露濃度，而非胚胎體內的濃度，另外 EPA 測試指引使用孵

化及存活兩項指標[103]。

以 OECD、EPA 及諸多單位已將斑馬魚胚胎發育毒性模式中存活率列為測試指引外，在許多研究中外觀變異等指標也被列為胚胎發育毒性之一，包含體型改變、眼睛大小、頭部大小及成形、身體曲度、尾部形成、色素形成、魚鰾膨脹、水腫、心包及卵黃水腫等[103]。

目前已經有許多成功案例使用斑馬魚胚胎做為化學物質篩檢，之後可應用在環境水體之中，此外在經過必要的驗證之後，這些資料皆有助於促使斑馬魚做為高通量毒性篩檢的動物，並有助於降低毒性試驗成本及動物犧牲數量。在毒性試驗中，使用斑馬魚模式的優點為暴露途徑可以透過簡單的擴散作用，或者親水性或大分子物質可以透過顯微注射方式，將毒物注射進卵黃 (yolk sac)、靜脈竇 (sinus venosus) 或循環系統[104]。

### 1.5 國內細胞培養與斑馬魚胚胎模式文獻整理

對於細胞毒性模式之建立，過去許多單位包含行政院環保署、行政院衛生署已利用相關細胞毒性模式來檢測不同領域物質之毒性影響其中包含許多在新興物質奈米微粒中利用許多細胞毒性模式包含 Colony forming assay、Trypan blue exclusion assay、MTT/MTS、細胞凋亡或氧化壓力測試證實奈米金溶液可增加細胞凋亡或細胞週期停滯，進而抑制細胞的生長，另外在此計畫中以 DNA microarray 分析找出幾個重要的生物分子標誌，這些特定蛋白分子明顯與基因損壞及細胞週期調控機制有重要的關係，並以全面系統性的細胞毒性檢測，證實奈米金溶液以不同的機制抑制細胞的生長。

最後歸納此計畫：

- (1) 對於多種哺乳類細胞株之生長特性，成功建立以細胞連續及即時生長分析儀分析奈米物質標毒性分析平台。
- (2) 確定奈米金溶在本系統的評估之下是具有細胞毒性，且不同粒徑的奈米金對不同的細胞株有不同程度的生長抑制作用。
- (3) 一般細胞毒性分析系統較不易區分出不同細胞株對奈米金生長抑制作用之不同。
- (4) 細胞連續及即時生長分析儀可適用於大多數的細胞株，包括無法利用其它細胞毒性方法測試的 MRC-5 細胞以及無法應用於 colony-forming 及 flow cytometry 的 PK-15 細胞。
- (5) 細胞連續及即時生長分析儀可在整個測試過程中，全面觀察細胞生長的動態

變化，而非單一時間點的細胞毒性方法

- (6) 此方法並無一般傳統方法需要染劑的使用，因此並無染劑與奈米物質干擾的現象。
- (7) 細胞電阻的測量為電腦自動化，減少以其他測試法所容易產生的人為操作誤差。研究中使用的奈米金為市售之純奈米金，實驗使用濃度為因應實驗需求直接強迫細胞暴露，與一般人體可能的暴露情況完全不同，目前無法以現有的研究結果反推人體暴露劑量與可能產生之立即毒性，因此本計畫的目的旨在建立細胞毒性評估工具與平台，而非依據有限之研究成果推論人體可能之暴露劑量 與毒性反應(EPA-101-1605-02-01)。

另外在其他領域方面包含食品方面利用細胞株 A-549 中之細胞毒性、基因毒性、抗氧化酵素影響及 8-OHdG 之影響探討市售大豆油、葵花油及豬脂油對於細胞毒性之影響，因此透過市售油品之影響對於環境之毒性探討(DOH91-TD-1088)。在不同領域之細胞毒性模式建立之探討因此對於目前細胞毒性模式建立已有想當的成熟技術，已可從下列幾種計畫如下：

- 1.奈米微粒對細胞毒性及生物標記之篩選技術建立- EPA-101-1605-02-01
- 2.黃酮類衍生物的合成及生物活性評估- NSC95-2320-B127-004
- 3.高科技製程廢水之生態、遺傳及細胞毒性資料庫之建立，及新型快速毒性分析儀之研發- NSC101-2221-E009-067-MY3
- 4.體外細胞毒性試驗方法之建立- DOH92-FD-2032
- 5.食用油脂加熱油煙對細胞之基因毒性與可能機制之研究- DOH91-TD-1088

對於斑馬魚胚胎毒性模式的建立，過去政府相關單位如：行政院環保署或行政院農委會，已依照經濟合作發展組織之試驗規範建立之相關技術，包含利用斑馬魚胚胎模式暴露時間從 24 小時到 96 小時存活率來檢測新竹科學園區中高科技產業之廢水之重金屬成分包含硫酸銅、硫酸鋅、硫酸鎘、硫酸鎘、硫酸銻、硫酸銻、硝酸銅、硝酸鎘、硝酸鉛、三氧化鉬等金屬鹽類代表放流水主要毒物並建立放流污水之毒性檢測知資訊(EPA-102-E3S5-02-01)、以及利用斑馬魚胚胎暴露模式 96 小時存活率來檢測多種農藥包含勃激素、亞滅培、嘉磷塞、菲克利和亞特松等多種原體農藥，並依照毒性大小來作為毒性分級之資訊(99 農科-9.2.3-藥-P3(7))，因此目前對於斑馬魚胚胎毒性試驗已經運用在許多領域中，而目前已建立模式之計畫如下列所示：

- 1.高科技製程廢水之生態、遺傳及細胞毒性資料庫之建立，及新型快速毒性分析儀之研發-NSC101-2221-E009-067-MY3

2.高科技產業放流水中生物毒性成因之探討(1/4)- EPA-102-E3S5-02-01

3.農藥之水生毒性與健康風險評估- 99 農科-9.2.3-藥-P3(7)。

## 1.6 水體採樣及毒性測試方法

### 水體採樣

#### 水體採樣之重要性:

環境污染一直是全世界重要且重視的議題之一，直至今日全世界所面臨的環境水污染仍舊非常嚴重，也因此為探討環境水體污染的問題及監測各地的水質品質是十分重要的，而在監測水質狀況的首要且關鍵的步驟的便是進行水體採樣，水體採樣的過程是利用採樣器採集環境中需要的水體樣本，通過化學及物理分析得到水體的基本資訊，最後再使用採集的水體進行後續實驗，如：水質檢測和毒性測驗...等，事實上水體採集是扮演著影響最終結果的關鍵性的角色，也因此在水體採樣中應遵循採樣原則才可得到值得信賴且準確的結果，反之，若無遵循正確之水樣採集方法或因不當保存等因素都可能影響最終結果，因此正確的水體採樣態度非常重要。

#### 水體採集方法通則

水體採樣中遵循採樣原則才可得到值得信賴且準確的結果，也因此採樣方法是必須遵守其準則並嚴謹執行，目前行政院環保署公告許多採樣方法如表 1.5 所示。

表 1.5、各類水樣之行政院環保署公告採樣方法

	公告編號 (NIEA)	方法名稱
1	W101.54A	飲用水水質採樣方法－自來水系統
2	W102.51C	水質檢測方法總則
3	W103.54B	監測井地下水採樣方法
4	W104.51C	河川、湖泊及水庫水質採樣通則
5	W105.50B	深層大口徑監測井地下水微洗井採樣方法
6	W106.50C	土壤及地下水直接貫入採樣及篩選測試方法
7	W107.50C	水域油污採樣方法
8	W108.50C	監測井地下水揮發性有機物被動式擴散採樣袋採樣方法
9	W109.51B	事業放流水採樣方法

10	PA102	採樣作業規定 (環境樣品採集及保存作業指引)
----	-------	------------------------

於此計畫中環境水體採樣方法我們將參考水體採樣適用通則為河川、湖泊及水庫水質採樣通則(NIEA W104.51C)、事業放流水採樣方法(NIEA W109.51B)及採樣作業規定 (環境樣品採集及保存作業指引)( NIEA PA102)三種採樣方法並遵循其通則，以下摘錄這三種採集方式並進行探討[105-107]。

#### (1) 河川、湖泊及水庫水質採樣通則(W104.51C)：

主要依據河川、湖泊及水庫的特性選擇適當的採樣器及樣品瓶，並採取具代表性之水樣，此通則公告可以分為幾點項目如表1.6所示。

表1.6、河川、湖泊及水庫水質採樣通則相關內容

項目	內容
1.干擾	1. 若所採水樣要分析揮發性有機物含量時，不可使用混樣方法，以避免待測物逸散而低估其含量 2. 採樣器材應避免交互污染。 3. 避免底泥干擾
2.設備與材料	1.定位設備 2.安全設備 3.採水器 4.過濾裝置 5.水質檢測裝置 6.樣品容器
3.試劑	1.試劑水 2.保存試劑(參照環保署公告「水質檢測方法總則－保存篇（NIEA W102.50A）」)
4.採樣與保存	1. 河川、湖泊及水庫採樣基本原則 2. 採樣點的選擇應考慮因素 3. 採樣方式與保存
5.步驟	記錄採樣環境狀況→採水器採樣→水質量測→樣品保存
6.結果處理	使用防水紙張及筆墨進行採樣記錄

7.品質管制	1.設備空白 (Equipment blank) 2.現場空白 (Field blank) 3.運送空白 (Trip blank)
--------	--

(2) 事業放流水採樣方法(NIEA W109.51B)：

以下為適用於事業、污水下水道系統及建築物污水處理設施放流水之採樣通則，其方法、內容及注意事項摘錄於表1.7。

表1.7、事業放流水採樣方法相關內容

項目	內容
1.干擾	1.採樣器材應避免交互污染。 2.部分待測物可能會被容器壁所吸附，容器壁也可能溶出待測物至水樣中。 3.塑膠樣品瓶可能會造成鄰苯二甲酸酯之污染。 4.重金屬項目若使用含重金屬襯裏之蓋子，可能因溶出而造成污染樣品。 5.微生物的活動會影響硝酸鹽、亞硝酸鹽、氨之間的平衡，減低酚類的含量及生化需氧量，使硫酸鹽還原為硫化物，餘氯還原成氯鹽；硫化物、亞硫酸鹽、亞鐵離子、碘離子及氰化物等亦可能經由氧化而減低其含量。
2.設備與材料	1.定位設備 2.安全設備 3.採水器 4.過濾裝置 5.水質檢測裝置 6.樣品容器及冷藏設備
3.試劑	1.試劑水 2.保存試劑(參照環保署公告「水質檢測方法總則－保存篇(NIEA W102.50A)」) 3. pH計標準緩衝溶液：參照「水之氫離子濃度指數 (pH 值) 測定方法－電極法 (NIEA W424)」之規定。

	4.導電度計標準溶液：參照「水中導電度測定方法－導電度計法（NIEA W203）」之規定。
4.採樣與保存	1.規劃適當之採樣方式 2.採樣方式：一般可採抓樣（Grab samples）或混樣（Composite samples）方式 3.採樣容器清洗 4.手動採水設備採樣 5.自動採水設備採樣 6.採樣方法與保存規定
5.步驟	略
6.結果處理	略
7.品質管制	1.樣品標籤 2.空白樣品(1)設備空白（Equipment blank）(2)現場空白（Field blank）(3)運送空白（Trip blank）

### (3) 採樣作業規定 (環境樣品採集及保存作業指引)(NIEA PA102)：

除了環境水體採樣方法通則應須留意以外，後續水體採樣保存作業規定也需嚴謹遵守，若保存不得當將影響後續結果，也因此採集後保存作業也應有遵循規範，水體保存目的在於延長環境水體檢驗時之效性，此通則適用於環境實驗室執行空氣、水質水量、飲用水、地下水、土壤、廢棄物、毒性化學物質及環境用藥等各檢測類別之樣品採集及保存作業，如表 1.8 所示；此外各類採樣樣品會依據樣品特性及分析項目等因素各有不同保存方式，水體樣品保存規定如表 1.9 所示。

表1.8、環境樣品採集及保存作業指引相關內容

項目	內容
1. 樣品採集與保存	樣品之採集及保存時，應依據行政院環保署公告之相關採樣或檢測方法及本指引之規定為之。

2. 作業規定	<p>1. 各檢驗室均應依照各檢測類別採樣或檢測方法及本指引之規定，確實執行樣品之採集及保存作業，各類樣品保存規定詳見附表。</p> <p>2. 採樣時，若無法立即於現場進行檢測，應依照樣品保存規定，確實執行樣品之保存步驟後，再行運送；運送時，樣品之保存條件應符合規定，其中樣品保存溫度若低於樣品保存規定時，應注意樣品之完整性。</p> <p>3. 樣品之保存期限，應自完成各樣品之採樣動作後起算。</p> <p>4. 檢驗室對樣品之採集及保存等作業，必須要有適當之樣品監控程序，並保留相關紀錄，以利後續之樣品追蹤與管理。</p>
---------	---

表 1.9、水質（包括水質水量、飲用水及地下水）樣品保存規定(節錄)[107]

檢測項目	水樣需要量 (mL)	容器	保存方法 註 2	最長保存期限
色度	500	玻璃或塑膠瓶	暗處，4°C 冷藏	48 小時
導電度	500	-	若採樣後無法在 24 小時內測定完成，應立即以 0.45 μm 之濾膜過濾後，4°C 冷藏並避免與空氣接觸	
硬度	500	玻璃或塑膠瓶	加硝酸使水樣之 pH < 2	7 天
臭度	1,000	玻璃瓶	4°C 冷藏	6 小時
pH 值	300	-	-	立刻分析（現場測定）

溫度	1,000	-	-	立刻分析（現場測定）
濁度	100	-	暗處，4°C 冷藏	48 小時
懸浮固體	500	抗酸性之玻璃或塑膠瓶	暗處，4°C 冷藏	7 天
總溶解固體	500	抗酸性之玻璃或塑膠瓶	暗處，4°C 冷藏	7 天
一般金屬	200	以 1+1 硝酸洗淨之塑膠瓶	加硝酸使水樣之 pH < 2（若測定溶解性金屬，須於採樣後立刻以 0.45 μm 之薄膜濾紙過濾，並加硝酸使濾液之 pH < 2）。加酸後之水樣應貯藏於 4±2°C 下。	180 天
鹼度	200	PE 或硼矽玻璃	4°C 冷藏	若有生物性作用影響的疑慮時，應在 6 小時內分析。儘可能在一日內完成，絕不可超過 48 小時
氯鹽 W406.51A	50	使用清潔並經試劑水清洗過之塑膠瓶或玻璃瓶。在取樣前，採樣瓶可用擬採集之水樣洗滌二至三次	-	28 天

真色色度	100	使用清潔並經試劑水清洗過之塑膠瓶或玻璃瓶，在取樣前採樣瓶要用擬採集之水樣洗滌二至三次	暗處，4°C 冷藏	儘可能在最短時間內分析；若無法即時分析，水樣應貯存於 4°C 暗處運送及保存，並於 48 小時內完成分析。
餘氯	500	玻璃或塑膠瓶	-	立刻分析（現場測定）
總凱氏氮 W420.51B W451.50B	500	玻璃或塑膠瓶	加濃硫酸將樣品酸化至 pH 值為 1.5 ~ 2.0，並儲存於 4°C。水樣中含有餘氯，則應於採樣現場加入去氯試劑	14 天
硝酸鹽	100	玻璃或塑膠瓶	暗處，4°C 冷藏	48 小時(已氯化水樣則為 28 天)
亞硝酸鹽	100	玻璃或塑膠瓶	暗處，4°C 冷藏（樣品不可加酸保存）	48 小時
溶氧 — 碘定量法	300	BOD 瓶	採樣後立刻加入 0.7 mL 濃硫酸及 1 mL 疊氮化鈉溶液，在 10~20°C 時以水封保存	8 小時
總 磷	100	以 1+1 熱	加硫酸使水	7 天(若為檢測正磷酸鹽，

W427.52B W444.50C		鹽酸洗淨之 玻璃瓶	樣 pH < 2， 暗處，4°C 冷 藏	則無須添加硫酸，且須於 48 小時內進行檢測)
生化需氧 量	1,000	玻璃或塑膠 瓶	暗處，4°C 冷 藏	48 小時
化學需氧 量	100	玻璃或塑膠 瓶	加硫酸使水 樣 pH < 2，暗 處，4°C 冷藏	7 天

- 1、表中所列水樣需要量僅足夠使用一種檢測方法分析一次樣品之用，若欲配合執行品管要求時，則應依需要酌增樣品量。
- 2、表中冷藏溫度 4°C 係指 4±2°C 之變動範圍。
- 3、表中未列之檢測項目，建議以玻璃或塑膠瓶盛裝，於 4±2°C 冷藏，並儘速分析。

## 水質檢測

水體特性會隨著環境改變而不同，因此在水樣採集之後需進行水質檢測確認水體水質狀況，並能依照水體水質的不同來進行不同實驗的設計，在後續實驗分析才能有較精確且具意義之結果。

## 水質檢測方法總則

環境水體水質檢測有許多種，檢測方法也會根據水體不同而有不同檢測參數設定，目前行政院環保署已設立並公告水質檢測方法總則(NIEA W102.51C)，內容包括水質檢測之干擾、設備材料、試劑、樣品保存、樣品處理、方法選用、結果處理以及品質管制等之綜合指引，做為執行特定水質樣品之指定項目檢測時之參考，此總則也適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、海域水體、地下水、放流水及廢(污)水等水質樣品之法規管制檢測時之一般規定，總則內容摘錄於表 1.10。

**表 1.10、水質檢測方法總則[108]**

項目	內容
1.干擾	1. 環境水體中採集的樣品除了待測物之外，尚存在其他複雜的組成成分，可能影響檢測的結果：

	<p>(1) 樣品濁度(水中微生物及其他膠質或所含懸浮固體物含量)</p> <p>(2) 檢驗室中的塑膠製品易產生鄰苯二甲酸酯(Phthalate esters)污染,進行微量有機物檢測時,必須儘量避免使用。</p> <p>2. 為了符合分析方法的需求(或限制)、或降低樣品中可能存在的干擾物對待測物分析的影響,樣品分析前可以進行適當的前處理程序。</p> <p>3. 樣品容器必須經適當的清洗程序,以降低因容器所造成的污染。有關檢驗室使用容器清洗程序可參考行政院環境保護署公告之「環境檢驗室器皿清洗及校正指引(NIEA PA106)」</p> <p>4. 其他包括溶劑、試劑及其他樣品處理過程中使用的器皿,皆可能對樣品分析造成誤差及 / 或干擾,可以在設定的分析條件下,進行方法空白分析,瞭解其干擾的程度。</p> <p>5. 器皿之使用必須考慮器皿材質、等級、乾淨與否及是否影響分析項目的準確性。</p>
2.設備與材料	<p>1. 檢驗室透過定期對儀器進行校正維護,並對儀器性能進行驗證,確保儀器設備能維持在最佳狀態。同時,藉由各種校正程序之驗證結果,可以診斷儀器設備可能的缺陷或異常,並及時進行修復或矯正措施,避免可能的儀器故障或分析誤差(甚至錯誤)的發生。</p> <p>2. 依據儀器設備原理構造、零配件的壽命及使用頻率的不同,檢驗室應製作儀器設備校正維護計畫,並依據訂定的計畫進行定期的校正維護工作。校正的結果應予適當評估,所有的校正維護均應保存適當的紀錄。儀器設備的校正維護工作可以分為性能規格檢查、校正及維護等。</p>
3.試劑	<p>1. 試藥使用應以符合分析所需的等級為前提</p> <p>2. 為保障檢驗的正常進行,新購試藥時應確認廠商提供之試藥品質是否確實符合需求,並確認所需藥品之名稱、成分、等級及包裝容量。</p> <p>3. 購入之試藥應核對並確認保存年限,同時於試藥瓶身標示相</p>

	<p>關資訊，應儘可能不要遮蓋原廠商標籤為宜。</p> <p>4. 取用試藥應注意試藥標籤上的危險標示</p> <p>5. 取試藥過程中，避免將匙、刮勺或其它物品放入裝化學試藥的容器中。</p> <p>6. 試劑水的品質</p> <p>7. 標準品 (Standards and reference materials)</p>
4.採樣與保存	<p>1.規劃適當之採樣方式</p> <p>2.採樣計畫的目的就是要確保在樣品進行分析之前，保持樣品不會變質或遭受污染，並符合檢測方法相關規定。</p> <p>3.採樣前，應先確認採樣工具及樣品容器沒有受到污染。</p> <p>4.混合樣品並不適合用於樣品中某些不穩定之檢測項目</p> <p>5.因為所採的樣品本身可能具有毒性，所以必須採取適當的採樣步驟以策安全。</p>
5.步驟	<p>1. 樣品前處理 2. 檢驗方法選擇</p>
6.結果處理	<p>1. 環境法規中所使用的單位是公制單位</p> <p>2. 分析數據的結果通常以有效位數來表示</p>
7.品質管制	<p>1.方法空白 (Method blank) 2. 查核樣品 (QC Check sample)</p> <p>3. 添加分析 (Spike analysis) 4. 重複分析 (Duplicate analysis)</p> <p>5. 內標準品 (Internal standard) 6. 擬似標準品 (Surrogate) 7. 檢量線製備及儀器校正 (Calibration curve preparation and instrument calibration) 8. 管制圖表 (Control charts)</p>

### 水質檢測方法

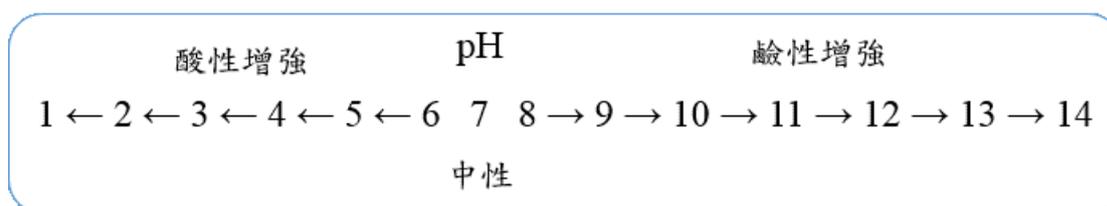
雖然在水質檢測方法總則中提及部分檢測的作業事項，然而仍需要更了解各類水質檢測方法，而行政院環保署也公告幾項水質檢測方法如表 1.11 所示:

表 1.11、水質檢測方法

項目	公告編號 (NIEA)	方法名稱
pH 值	W424.52A	水之氫離子濃度指數(PH 值)測定方法-電極法
真色色度	W223.52B	水中真色色度檢測方法－分光光度計法
導電度	W203.51B	水中導電度測定方法－導電度計法
濁度	W219.52C	水中濁度檢測方法－濁度計法
水溫	W217.52A	水溫檢測方法
溶氧	W422.52B	水中溶氧檢測方法－碘定量法

透過不同水質檢測方法能檢測並了解所採集之水體水質狀況，另外我們截取其中幾項水質檢測方法測定原理依序簡介[109]：

**(1) pH 值：**水中氫離子濃度可以用 pH 值表示，pH 為氫離子活性倒數之對數，pH 等於 7 時，氫離子和氫氧離子濃皆為  $10^{-7}$  M。pH 小於 7 時，氫離子濃度大於氫氧離子濃度，並且呈現酸性。pH 大於 7 時，氫離子濃度小於氫氧離子濃度，並且呈



現鹼性。

**(2) 真色色度：**色度即為水中顏色，當水樣中含有懸浮固體物時，一般水之色度除了來自水溶液中的物質，也會受懸浮固體物的影響。因此可將色度分為外觀色 (apparent color) 與真色 (true color)。外觀色則為水樣直接測得之色度，也稱為視色；真色色度是將水樣經由去除程序除去懸浮固體物所得的水樣色度，水樣會利用分光光度計在 590 nm、540 nm 及 438 nm 三個波長測量透光率，由透光率計算三色激值 (Tristimulus value) 及孟氏轉換值 (Munsell values)，最後利用亞 當-尼克森色值公式 (Adams-Nickerson chromatic value formula) 算出中間值 (DE, Delta E 或稱 Delta Error)。利用 DE 值與標準品檢量線比對可求得樣品之真色色度值 (ADMI 值，美國染料製造協會，American Dye Manufacturers Institute)。[110]

**(3) 導電度：**導電度 (conductivity) 為將電流通過  $1 \text{ cm}^2$  截面積，長 1 cm 之液柱時電阻 (resistance) 之倒數，單位為 mho/cm，導電度較小時以其  $10^{-3}$  或  $10^{-6}$  表

示，記為  $\text{mmho/cm}$  或  $\mu\text{mho/cm}$ 。導電度大小和水中解離狀況及溫度變化有關。一般物質在水中解離時會產生電流，陽離子往陰極方向接近，陰離子則往陽極方向靠近，大多數物質像是無機酸、鹼與一些鹽類均為良好的導電體，但是某些有機分子物質如酒精在水中不易解離，其導電度較小[111]。

**(4) 濁度：**水體中的懸浮物質因光線通過水體時會產生干擾，因而增加混濁的程度，濁度為水樣的其中一種光學性質，當水樣中含有懸浮物質時，可使光線受到干擾而散射，而散射強度和懸浮物質含量及特性有關，目前已知造成混濁度高的懸浮物很多，如：水中微粒、有機物、微生物等，從小的膠狀分子(1-100 奈米)到大而分散的懸浮物質都可能造成水體的混濁[112]。

**(5) 水溫：**在水體中可做為冷熱之程度，當水體熱量過高時其水溫會升高，反之則會降低，溫度計測定方式主要是透過熱脹冷縮之原理，當溫度計碰觸到熱水體時，溫度計裡的液體會受因熱膨脹因而會上升，而當溫度計接觸到寒冷水體時則會因為液體收縮而下降。

**(6) 溶氧：**溶氧分析在水質檢測中也是其中一個重要的分析之一，溶氧分析意指偵測水樣中之氧氣量，目前水中溶氧有許多檢測方式。其中一種為碘定量法，其原理為水樣中先加入硫酸亞錳後，再加入鹼性碘化物-疊氮化鈉溶液，其亞錳離子於鹼性條件下生成氫氧化亞錳沉澱物，而水中溶氧會將氫氧化亞錳沉澱物氧化成高價錳氧化物，當水樣酸化後，高價錳氧化物氧化碘離子生成與溶氧相同量之碘分子，再以硫代硫酸鈉溶液進行滴定，由其消耗量即可求得水樣中溶氧量。

上述幾種水體測試方法對於環境水體採樣後進行水質分析影響甚大，透過以上的分析方式可了解水樣是否會影響最後檢驗結果。

## 第二章、年度目標

### 章節摘要：

評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是刻不容緩的重要議題。為了解決這個議題，本委託計畫案將嘗試建立水體奈米微粒毒性檢測的標準方法草案，並依此測試環境水體中奈米物質的生物風險危害性，而於技術建立並測試後，將進行技術轉移至環檢所。

### 2.1 計畫目標：

建立奈米物質之生物毒性檢測標準方法草案，並依此測試環境水體中奈米物質的生物風險危害性。

### 2.2 本年度主要工作內容

#### (1) 建立奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案

- A. 根據 ISO/TR 16197 或 OECD 等國際相關奈米微粒之生物毒性標準方法進行文獻整理，並探討所參考之細胞株培養與斑馬魚模式研究方法是否適用於環境水體之毒性檢測，進而提出奈米微粒之生物毒性標準方法草案，其包括 4 種細胞毒性測試方法(細胞存活、細胞凋亡、氧化壓力測試、自噬作用測試)及 5 種斑馬魚胚胎模式毒性測驗方法 (斑馬魚存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡)
- B. 標準方法之技術建立及測試：標準方法草案完成後，以人造奈米銀及奈米氧化鋅做為示範樣品，並與相對應之塊材進行前項所提草案之實際比對測試，提交技術測試報告。

#### (2) 環境水體樣品之生物毒性測試：

採集 6 件環境水樣(分別於兩個不同季節採集二仁溪、成功湖和曾文水庫之水樣)進行生物毒性測試，毒性測試前所有樣品皆會進行穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM)、動態光散射儀(dynamic light scattering, DLS)及能量分散 X 射線(Energy dispersive x-ray analysis, EDX)之分析，以確定所含之奈米微粒及其粒徑分布。環境水樣也將額外添加奈米材料進行模擬測試

#### (3) 技術轉移：本計畫執行完畢之研發成果移轉本所

本計畫所協助建立之環境水體奈米微粒生物毒性檢測方法，於期末報告整理之後將提供環檢所使用，完成技術轉移之工作。

### 2.3 預期效益

- (1) 收集並整理歐洲經濟合作暨發展組織(OECD)、國際標準化組織 (International Organization for Standardization) 及國際文獻目前對於環境水體和奈米微粒之毒性測試方式，並作為後續危害測試之參考。
- (2) 建立環境水體之細胞培養模式毒性測驗分析方法，並針對實驗結果進行討論，進而提出可能的環境水體測驗標準方法。
- (3) 以細胞作為毒性測驗模式探討環境水體之毒性，藉以評估環境水體和奈米微粒對於生物體之危害程度，並且探討環境水體可能誘發的細胞毒性機轉，包括 ROS 之產生量、細胞凋亡之相關毒性機轉，此可提供環境水體所含之奈米微粒更多面向思考與定位。
- (4) 建立環境水體之水體動物毒性測驗分析方法，並針對實驗結果進行討論，進而提出可能的動物環境水體毒性測驗標準方法。
- (5) 以斑馬魚胚胎模式作為毒性試驗模式，探討環境水體之毒性對於水生動物之危害風險，藉以了解環境水體可能誘發的危害效應，包括半致死劑量、外觀形態的改變等，除此之外也透過討論動物層次和細胞層次之實驗結果，提供奈米微粒毒性危害更多面向的思考與定位。
- (6) 評估台灣環境水體之奈米毒性的可能性，並探討其對環境及生物所引發的危害問題。

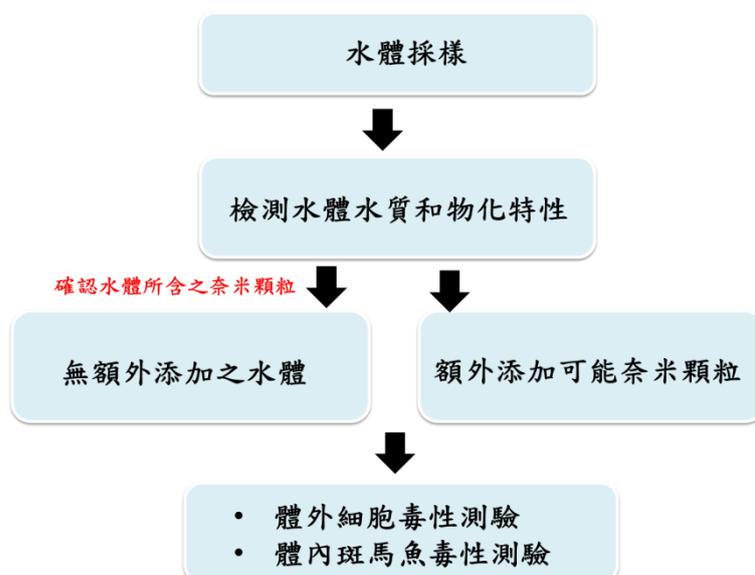
## 第三章、工作方法

### 章節摘要：

本計畫的第一個階段目標是要針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並探討我們所建立的細胞株培養與斑馬魚胚胎模式研究方法是否適合於檢測環境水體之奈米微粒的毒性，進而提出檢測奈米微粒之生物毒性指標，針對細胞培養模式將檢測其包括存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉；而斑馬魚胚胎模式將檢測胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡，當標準方法草案撰寫完成後，將利用自行合成之人造奈米氧化鋅及奈米銀進行比對測試，而測試結束後將提交技術測試報告，並且討論其適用性，而第二階段我們會於採集其包含兩個季節之成功湖、曾文水庫、二仁溪，共計六個水樣，採集後儘快以穿透式電子顯微鏡、動態光散射儀分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍，之後再利用建立之細胞株培養和斑馬魚模式標準方法草案進行不同粒徑之奈米微粒毒性測試，而於未來我們會將完成第一及第二季水樣之奈米微粒毒性測驗，最後修正並提出環境水體奈米微粒毒性檢驗方法草案並將技術轉移至環檢所。

### 3.1 研究架構

於計畫中將遵循水體採樣通則的方式採集水體樣品，再將水樣進行檢測並進行水樣物化特性分析，之後再進行體外細胞毒性試驗及體內斑馬魚胚胎模式毒性試驗，並透過計畫的執行將毒性試驗之方法建立為一套完整並可使用的系統，計畫研究架構流程參考如圖 3.1：



### 圖 3.1、研究架構與流程

### 3.2 水體採集

#### 採集流程

進行水體採樣的過程中各步驟將會嚴格執行，因此能盡量減少採集結果的誤差，為了確切執行各個採集步驟事前規劃是必須的，因此研究計畫將參考環保署水樣採集公告標準進行，其包含河川、湖泊及水庫水質採樣通則(NIEA W104.51C)、事業放流水採樣方法(NIEA W109.51B)及採樣作業規定(環境樣品採集及保存作業指引)(NIEA PA102)，我們將三種採樣方法通則中內容彙整成整體採集水樣流程如下(圖 3.2)，往後我們將遵循此環境水體採樣流程準則進行採集。

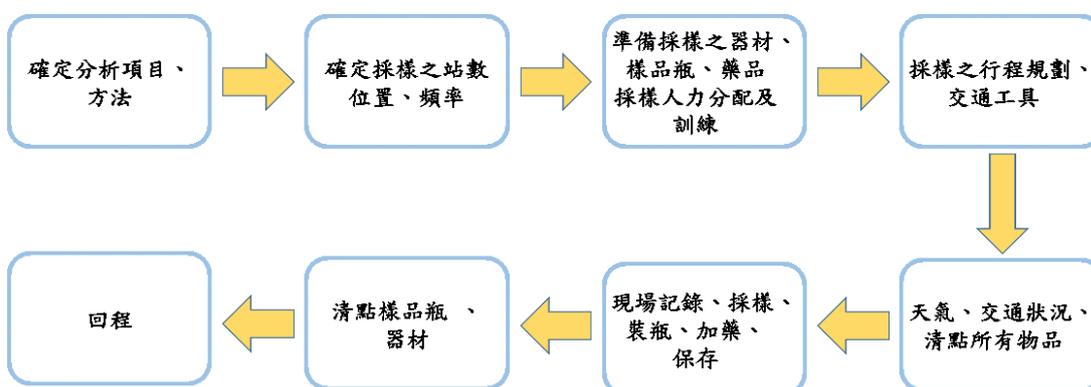


圖 3.2、水體採樣流程圖

#### 採集前置作業規劃

採集水樣之前應確認採集過程中各種採集相關資訊包含採集方法、水體環境位置、器材樣品瓶、人力分配確認、水質測試項目等眾多資訊，確認各項資訊之後，將進行環境水體採樣並經由保存之後移至實驗室進行其他試驗分析，以下為此研究中之採集作業需確認之項目及資訊：

- A. 採集方式：利用採樣桶採集每條河川數升之水樣
- B. 分析項目：(1) pH 值 (2) 導電度 (3) 濁度 (4) 溫度 (5) 溶氧
- C. 位置選取：本研究採集地點主要根據人體與環境活動範圍關係性來選取，分別為二仁溪(汙染最嚴重的河川)、曾文水庫和成功湖
- D. 器材準備：塑膠袋(垃圾袋)、手套、伸縮式吊桿、採樣桶(塑膠瓶或玻璃瓶)、採樣器具、pH meter(測酸鹼值)、攜帶式導電度計、懸浮固體濁度計型式、攜帶式溶氧檢測儀、溫度計。
- E. 行程規劃：依照汙染程度的差異，本計畫將會同一條河川採取兩個季節的水樣

樣本進行毒性測驗。

- F. 樣品保存方式：進行環境水體採樣後，水樣放置 4°C 冰箱內保存，因為低溫可以減少溶液中膠體的碰撞次數，也可以減少奈米微粒聚集沉澱的發生。

### 3.3 樣品水質檢測

水樣採集之後，應進一步分析水樣水質，透過水樣的檢測更能設計出相關的毒性試驗。由於本計畫在後期試驗將以細胞培養及斑馬魚胚胎模式毒性試驗為主，因此在採集水樣之後將進行檢測指標的測試，並可根據水質的狀況調整實驗，而檢測水質的標準流程會根據行政院環保署規範的標準水質測定準則測試各項指標，而於此計畫中，我們測試指標包含 **pH 值**、**導電度**、**水溫**、**溶氧** 水質指標，各項測試指標步驟如下：

#### pH 值：

一般淡水生物如斑馬魚主要生活在中性的環境當中  $\text{pH}7\text{-}8$ [113]，而不同的酸鹼度會影響生物的生存或奈米微粒的交互作用。本計畫測試方法為電極法[114]，流程圖如圖 3.3 所示，所使用儀器為 pH 測定儀，先將儀器電極進行校正後以標準緩衝液( $\text{pH}=7$ )查核 pH 值正確性，確認過後即可將電極插入樣品中測試。

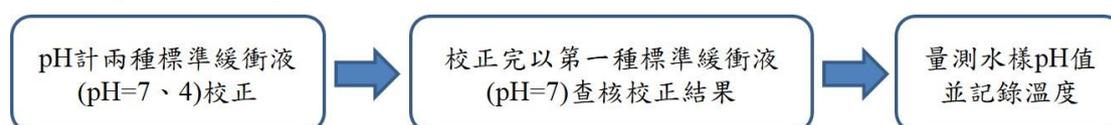


圖 3.3、pH 值量測流程

#### 真色色度：

水體的組成不同會導致環境水體呈現不同的顏色，以往汙染程度會透過肉眼去分辨顏色，然而以肉眼判定顏色會有所差別，也因此應以真色色度是否符合法令標準值而判別汙染程度。本計畫主要是透過分光光度計來量測真色色度[110]，測試流程如圖 3.4 所示，首先先進行檢量線製備，減量線會以五種不同濃度的標準溶液分別偵測波長 590 nm、540 nm 及 438 nm，在依照測試指引的結果進行上述換算和校正，之後在測樣品之前，用試劑水將波長 590 nm、540 nm 及 438 nm 設定三個透光率為 100%，再將標準溶液與樣品以 590 nm、540 nm 及 438 nm 測定三個透光率，最後將透光率利用真色色度公式進行計算並能得到樣品的真色色度。



### 圖 3.4、真色色度量測流程

#### 導電度：

導電度為水傳導電流的能力，通常一般環境水體導電度與解離程度、溫度、總濃度有密切關係，導電度越高代表水中電解質愈多，對於生物體在水中生長也會有所影響。本計畫會利用導電度計測定水中導電度[111]，測試流程如圖 3.5 所示，一開始會先使用標準氯化鉀溶液在水溫為  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  調整導電度，以去離子蒸餾水沖洗電極後，再測定水樣之導電度。



### 圖 3.5、導電度量測流程

#### 水溫：

於環境水體中，水溫是非常重要的指標之一，水溫的變化主要是受氣候所影響，在水體中生物會於在不同的水溫中生存，例如：斑馬魚大多會在水溫大約  $28.5^\circ\text{C}$  的環境下生存[114]，除此之外水溫亦會影響微生物的活性及代謝速率等，因此水溫的量測是必須的。此計畫中會利用溫度計做為環境水體溫度的量測工具[115]，在溫度計經校正後將溫度計放入環境水體中，以平視的方式讀取溫度計的溫度值即可測得水體水溫的狀況。

#### 溶氧量：

改變水中溶氧量有許多因素，如大氣溶解、自然或人為曝氣及水生植物的光合作用等因素，此外若水受到有機物質污染，則水中微生物在分解有機物時會消耗水中的溶氧，而造成水中溶氧降低甚至導致缺氧狀態，因此可能會影響環境水體水生生物的生長，此計畫中會使用碘定量法做為溶氧的測試[116]，實驗流程如圖 3.7 所示，水體採集完後對於水體的測驗可區分為採集完立即測驗及保存後帶回實驗室測驗，而採集完後立即測驗的方式是採集水樣結束後立即在 BOD 瓶內先加入 1 mL 硫酸亞錳溶液，再加入 1 mL 鹼性碘化物—疊氮化鈉溶液，將 BOD 瓶加蓋並上下倒置數次，等沉澱物下沉至瓶身一半後打開蓋子再加入 1 mL 濃硫酸，並在加蓋上下倒置數次等沉澱物溶解完取適當水樣移至其他容器，以標定過

之硫代硫酸鈉滴定溶液滴定至淡黃色，加入幾滴澱粉指示劑滴定至第一次藍色消失時，即為滴定終點。若為實驗室測定，則一開始需將水樣加入 2 mL 硫酸亞錳溶液後，再加入 3 mL 鹼性碘化物溶液，之後步驟同上，須注意的是濃硫酸從 1 mL 改為 2 mL，滴定終點結束後再利用溶氧量公式計算求得溶氧量。



圖 3.6、溶氧量量測流程

### 3.4 樣品中所含奈米物質之物化特性檢測

奈米微粒的物化特性會影響到生物毒性的程度，也因此檢測物化特性是必要的，在環境水體中可透過奈米物化特性分析得知是否水體含有奈米物質及其粒徑範圍，其中較重要的奈米物化特性分析包含外形與構形、大小、奈米粒徑分佈、表面電位(zeta potential)、奈米物質在溶液中均散程度(表 3.1)。

表 3.1、物化特性分析

項目	分析方法與原理
真實粒徑	TEM (Transmission electron microscopy)
外形	TEM (Transmission electron microscopy)
化學組成	EDX (Energy dispersive x-ray analysis)
水合粒徑	DLS (Dynamic light scattering)
分散性	DLS (Dynamic light scattering)
表面電位	PALS (Phase analysis light scattering)
穩定度	UV-Vis spectrometry

為了避免大顆粒污染物干擾水樣分析，於分析粒子特性前水樣需先經過前處理，我們會透過過濾去除沉澱較大粒徑的物質，之後再進行動態光散射儀(dynamic light scattering)、穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscopy)分析粒子特性。

#### 奈米物質真實粒徑、外形及化學組成：

奈米物質可以利用穿透電子顯微鏡(TEM)來觀察奈米物質的外形，TEM 是藉由穿透電子束與樣品中的原子碰撞而改變方向，從而產生立體角散射，進而成像放

大，聚焦後顯示在影像程式中(圖 3.8)。本計畫中先將採集之水樣在照射 TEM 前一晚先進行前置作業，先將樣本滴至鍍碳銅網上，並將處理好的樣品放置烘箱烘乾乾燥一晚，隔天將樣品放入 TEM 儀器中並可以透過影像程式觀察到水樣中的奈米物質，最後以計算程式計算水體中奈米物質的粒徑。此外在使用 TEM 照射樣品時，同時可以使用**能量色散 X-射線光譜儀(EDS)**進行水體奈米物質元素含量分析，其原理為當電子束撞擊樣品時，會產生特性的 X 射線，並藉由分析 X 射線來鑑定各個組成元素，而透過 EDS 的測定即可了解水體中含有的奈米物質。

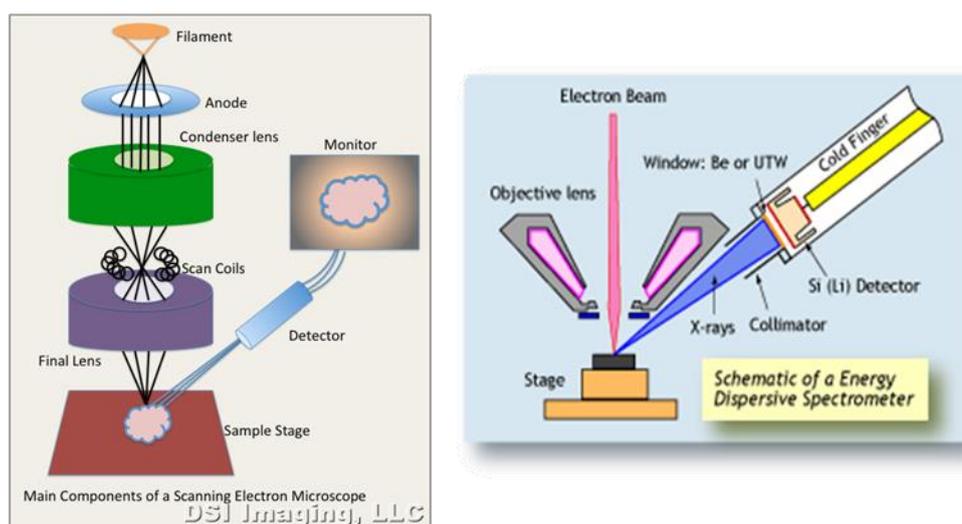


圖 3.7、TEM 呈像原理(左)、EDS 測是原理[117](右)

水合粒徑、分散性及表面電荷(zeta potential)：

取適量濃度約 1 ml 的水樣溶液放置於樣瓶槽(cuvette)中，並以試鏡紙擦拭，再放入 Beckman coulter delsa nano (particle size analyzer)儀器中(圖 3.9)，分別利用動態光散射法以及向位分析光散射法，分析水樣中的粒徑平均值(number distribution)與分散指數以及粒子的表面電位。



### 圖 3.8、Beckman Coulter Delsa Nano 儀器[69]

#### 穩定度：

水樣穩定度藉由 UV-Vis 一種分析材料透光率及反射率的儀器來進行水樣的吸收光譜測量，以確保水體奈米物質的穩定度，其原理根據光電效應。將空白試劑 (MQ water) 放入超微量分光光度計儀器中進行空白校正，再取適量濃度約 1 ml 的樣品溶液放置於樣瓶槽(cuvette)中，再放入儀器進行分析。

經過一系列的水樣物化特性分析，可確認水體中的樣本是否含有奈米物質和粒徑分布範圍，透過探討環境中水體含奈米物質之概況可以使我們更了解水體環境中的毒性來源。

#### 3.5.1 環境水樣之暴露前處理

本計畫於採集水樣後，會先使用 63  $\mu\text{m}$ 、53  $\mu\text{m}$  孔徑之濾網進行初步過濾，之後再透過過濾 1000 nm、450 nm、220 nm、100 nm 三種孔徑之濾膜進行分離，於過濾後將可分之為濾膜及濾液兩個部分。

我們將濾膜的部分進行超音波震盪後，將濾膜上之粒子震於細胞培養液當中，再進行後續細胞模式之毒性試驗，而本實驗以此做為測試細胞毒性的暴露溶液。不同濃度是基於添加的暴露溶液體積為依據，例如細胞在 96 孔盤中所需培養液總體積為 150 微毫升/孔盤，那麼 10%的組別則是以 15 微毫升(暴露溶液)+135 微毫升(細胞培養液)來進行 24 小時的暴露實驗，細胞培養模式之毒性試驗會以 220 nm 及 100 nm 之濾膜進行試驗。

而濾液則於過濾後直接進行斑馬魚胚胎模式毒性試驗，而斑馬魚胚胎會以 1000 nm、450 nm、220 nm、100 nm 四種濾液進行試驗。

#### 3.6 添加額外之奈米微粒

計畫中除了以環境水體直接暴露進行奈米毒性試驗外，我們亦會透過額外添加奈米微粒的來模擬真實水體與奈米微粒的交互作用，進而瞭解奈米微粒於水體中經過交互作用後所產生的毒性，於本計畫中我們將使用**奈米銀**做為額外添加的奈米物質。

奈米銀能透過緩慢釋放銀離子以及通過多種機制使得奈米銀具有優異的抗菌效果，也因此奈米銀被廣泛的應用在許多的產品當中，如：燒燙傷敷料、家用消毒劑、紡織工業等，廣泛應用奈米銀將會增加其釋放至環境中而增加風險危害的可能

性[24]，除此之外奈米銀先前已被證實可能會透過釋放銀離子、破壞細胞膜、產生過量 ROS 和誘導出多種細胞毒性的機制導致生物毒性[26]，所以若是奈米銀釋放至環境當中可能會導致水生生態環境系統受到損害。

而針對添加額外之奈米銀微粒之操作方法為，將奈米銀微粒直接加於原始未經處理之原水樣後，水平混和 30 分鐘以模擬真實水體，之後再利用 450 nm 孔徑之濾膜進行過濾，使用 450 nm 孔徑之濾膜目的是為了要去除大部分之生物性危害，另外於計畫中，亦會進行先過濾 450 nm 之濾膜後再進行添加奈米微粒，反覆推敲是否因奈米微粒的粒徑改變而導致毒性改變。

### 3.7 毒性測試

#### 3.6.1 體外試驗-細胞毒性試驗

##### 細胞存活率試驗

##### a. MTT assay

3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)比色法試驗 (MTT assay)一直以來都是最廣泛被利用進行毒性測試的方法，MTT 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞線粒體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶 (SDH)和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍紫色的 formazan 結晶(圖 3.10)，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比(死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原)。可利用測 O.D.值得知細胞還原 MTT 的能力(formazan 形成量)，此 O.D.值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。對於奈米微粒的細胞毒性測試已有許多研究以 MTT assay 方法分析，包括奈米銀的研究[118]以及奈米二氧化鈦的研究[119]。優點為實驗操作簡單，只需使用少量的細胞數與測試樣品即可完成測定，且使用 Multiwell sanning septrophotometers (ELISA readers)可以測定大量的測試樣品。

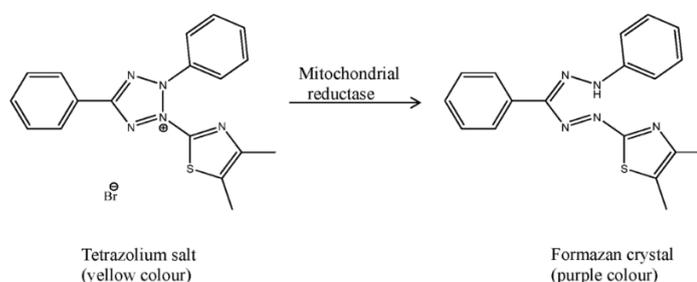


圖 3.9、由 tetrazolium salt 所形成之 formazan 結晶[120]。

### b. Live/Dead cell viability assay

針對細胞毒性的分析方式，Belyanskaya 等人的研究指出，應至少使用兩種分析方法來獲得可靠的實驗結果[121]。Live/Dead cell viability assay，此方法是利用方便快捷的雙色分析試劑測試細胞群中細胞的活性。該試劑根據膜完整性和酯酶活性來區分活細胞和死細胞。此試劑含兩種化合物 calcein acetoxymethyl (calcein AM)和 ethidium homodimer (EthD-1)。calcein AM 為中性電荷的酯類物質，所以很容易藉由擴散進入細胞中。一旦進入細胞後，藉由細胞內的酯酶會轉變為 calcein(一種綠色螢光物質)。另一方面受傷或死亡的細胞會染到 ethidium homodimer，當染劑和核酸結合時會發出紅色螢光；而活細胞不會被 ethidium homodimer 所染上。

該試劑組可應用於顯微鏡的分析技術、流式細胞測量儀或微孔板分析。使用激發光 495 nm 照射後 calcein AM 和 ethidium homodimer 分別會散發出 515 nm 和 635 nm 的螢光。此種方法的螢光背景值較低，因為這兩種染劑未和細胞作用前本身是不具有螢光，透過快速、便宜、安全、高敏感性等優點，廣泛應用於動物細胞的存活率和細胞毒性的偵測。

#### (1) 螢光顯微鏡觀察

將蓋玻片放入培養皿中，然後將細胞種回，貼壁 24 小時處理暴露物。將培養液吸掉，加入 2 ml 的 1 PBS 清洗培養皿。之後取出載玻片，加入適當濃度的 calcein AM 和 EthD-1，45 度角蓋上蓋玻片，避光染色 30-45 分鐘，利用螢光顯微鏡觀察及拍照 (圖 3.11)。

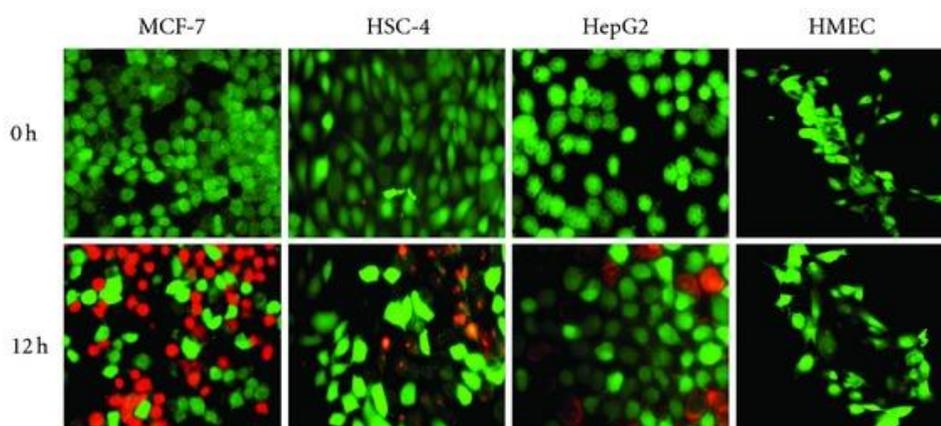


圖 3. 10、暴露天然物 phytosterol oxide ( $7\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -sitosterol, CT1)之後使用 Live/Dead cell viability assay 分析其對腫瘤細胞毒殺作用情形[122]。

## (2) 流式細胞儀量化

細胞培養於培養皿中並處理暴露物，收細胞至離心管，離心 2000 rpm，5 分鐘，4°C。將上清液吸掉，用 1X PBS 重新懸浮細胞，離心 2000 rpm，5 分鐘。去除上清液，每一管細胞加入 1 ml 適當濃度的 calcein AM 和 EthD-1。細胞避光染色 15-20 分鐘，用流式細胞儀進行測定綠光和紅光。

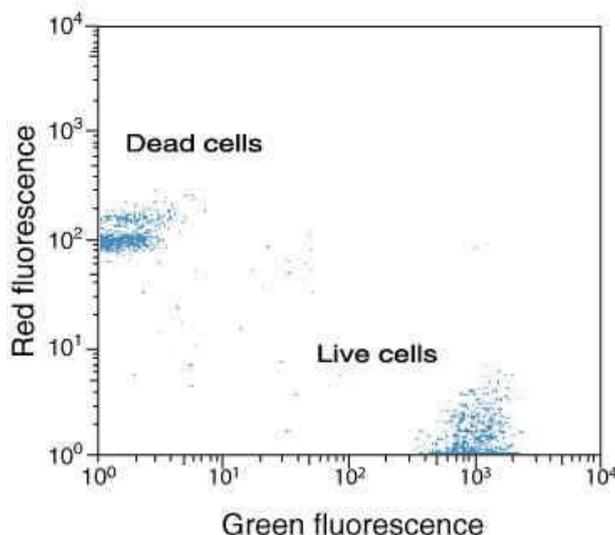


圖 3. 11、Live/Dead cell viability assay 使用流式細胞儀分析(圖源來至 [thermofisher.com/order/catalog/product/L3224](http://thermofisher.com/order/catalog/product/L3224))

## 細胞凋亡/細胞壞死

細胞膜內的磷脂絲氨酸 (Phosphatidyl Serine, PS) 暴露到膜外，是細胞凋亡的早期變化之一。健康的細胞膜有一不對稱性(asymmetry)，即 PS 只存在胞膜內層而不外露，此不對稱性之維持，需借助一套酵素酶系統與能量 ATP，而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，故而無法維持此不對稱性，而使得磷脂絲氨酸外露。Annexin V 是一種鈣依賴性的磷脂結合蛋白，它與 PS 具有高度的親和力，因此可以作為檢測暴露在細胞膜表面 PS 的探針。碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一種核酸染料，它不能透過完整的細胞膜，但在凋亡中晚期的細胞和死細胞，PI 能夠透過細胞膜而使細胞核染色。同時結合使用 PI 雙染後，進行流式細胞儀的分析，該方法可以區分活細胞、壞死細胞及凋亡細胞[123]。實驗過程為，細胞經過 24 小時貼壁培養後，於培養皿中加入暴露物，暴露時間終了，收集細胞至離心管，離心 2000 rpm，5 分鐘，4°C。將上清液吸掉，用 1X PBS 重新懸浮細胞，離心 2000 rpm，5 分鐘。去除上清液，視細胞數加入 binding buffer. ( $1 \times 10^6$  cells/mL) 均勻混合後取出 100  $\mu$ L 到 Falcon tube，加入 Annexin V 與 PI 染劑，避光染色 15~30 分鐘，利

用流式細胞儀進行綠光和紅光的分析測定。

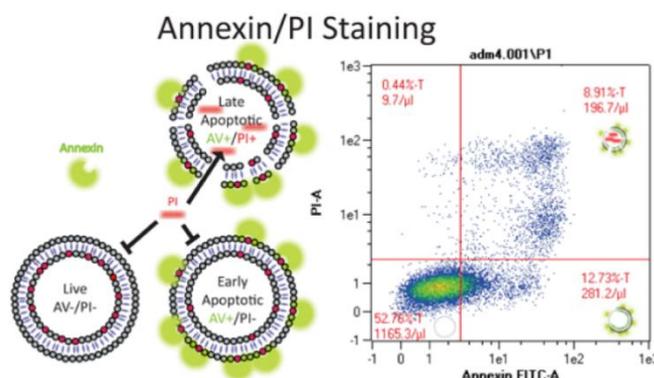


圖 3.12、利用 AnnexinV 與 PI 染劑進行細胞凋亡與細胞壞死之分析。圖為流式細胞儀分析之結果，左下為存活的細胞(正常細胞)百分比；左上表示細胞壞死百分比；右下為早期細胞凋亡的百分比；右上為晚期細胞凋亡的百分比(Copyright © 2017 Research at St. Michael's Hospital. All rights reserved)。

### 活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)分析

ROS 為具有高度氧化力的分子。它的生成可能來自於細胞內或細胞外的物質所誘發。研究指出 ROS 在訊息傳遞過程中扮演著很重要的角色，在正常的情形下，體內 ROS 的濃度是很低的；只有在細胞發生變故或處於高濃度的 ROS 之下，才會導致體內的 ROS 累積量增加，並促使生物體內氧化壓力(oxidative stress)的提高，最後造成蛋白質、核苷酸以及脂肪的代謝異常，而直接危害生物體的健康。DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)是目前用來測量 ROS 相當常用的化學螢光物質，DCFH-DA 能夠自由通透細胞膜，當 DCFH-DA 進入細胞後，會被細胞內的酯解酶 (esterase)作用變成 DCFH (dichlorodihydrofluorescein)，此時 DCFH 因無法自由通透細胞膜而留在細胞內。而當 DCFH 與 ROS 反應後轉變成具有螢光特性的 DCF (dichlorofluorescein)，此時利用流式細胞儀偵測細胞螢光強度之改變，即可定量細胞內 ROS 之改變情形。將細胞培養於 6 cm dish 上，細胞經過 24 小時貼壁培養後，於培養皿中加入暴露物，暴露時間終了，收集細胞至離心管，以 1500 rpm 進行離心並除去 medium，以 PBS 進行清洗 1~2 次，再次以 1500 rpm 離心，再以含有 5 μM H<sub>2</sub>DCFDA 500 μl 之 PBS 進行回溶，染劑作用時間約 15 分鐘，再利用流式細胞儀設定以 488 nm 雷射光來激發，藉由 FL1 接收 526 nm 的放射光進行分析。

### 自噬作用(Autophagy)

在細胞產生自噬作用的過程中會形成 autophagosome 的囊泡，進入成熟階段後會產生自體酸化的情況，形成酸性小泡(acidic vesicular organelles, AVOs)，分析酸性小泡的數量便可得知細胞族群中產生 autophagy 現象的程度[124]。細胞培養於 6 cm dish 並經過處理後，收集細胞於離心管中，離心 2000 rpm，4°C，5 分鐘後，將上清液去除，以 PBS 均勻混合清洗細胞，再離心 2000 rpm，4°C，5 分鐘。倒掉上清液後，每一管細胞加入 500  $\mu$ l 的 AO (Acridine orange 1 mg/ml)，細胞避光染色 10~15 分鐘後，將細胞液轉移至 Falcon tube，最後以流式細胞儀進行分析。此外，在細胞發生自體吞噬現象時，會引發 LC3 的表現。在一般的情況下，細胞中普遍存在兩種 LC3 蛋白的型式，一為細胞質型式的 LC3-I，當 autophagosome 形成後會轉換成 LC3-II 並存在於 autophagosome 的膜上，所以 LC-3 蛋白的增加，即表示 autophagosome 的增加，亦可代表自噬作用的增加。因此本計畫也會利用西方墨點法(Western blotting)分析 LC3 蛋白的表現量，進而分析自噬作用的發生情形。

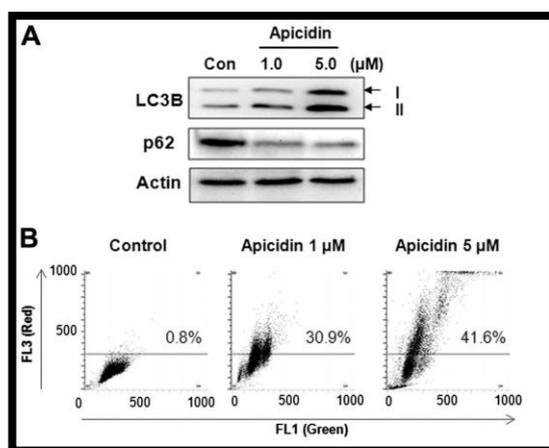


圖 3.13、細胞處理 Apicidin 之後，誘導細胞自噬作用的產生。(A) LC3-II 蛋白隨著處理濃度的上升而表現量增加；(B)利用流式細胞儀分析酸性小泡(AVO)表現量的改變[125]。

### 3.6.2 體內試驗：斑馬魚胚胎模式毒性試驗

#### 斑馬魚胚胎存活率：

斑馬魚胚胎平均受精後 72 小時就會孵化，其胚胎發育過程如圖 3.15 所示，斑馬魚在不同發育時間其所分裂的細胞數會不同，而根據 OECD. TG 236: Fish Embryo

Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 2013 的內容提及，斑馬魚胚胎的死亡率有受精卵凝結、缺乏體節形成、缺乏尾部從卵黃囊分離及缺乏心跳有四種標準指標，因此此計畫將以此指引做為參考標準，此試驗流程如圖 3.16 所示，首先將受精後 4 小時 (4 hpf) 的斑馬魚胚胎，放入 12 孔盤中，每 10 顆胚胎放置 1 孔中，每天更換新鮮的測試液。在加入測試液後依照 OECD 提供的指引每 24 小時利用解剖顯微鏡觀察胚胎的存活狀況，每次觀察時將死亡的胚胎移除並記錄剩下存活胚胎數，持續觀察至 96 小時，整體試驗將重複三次。

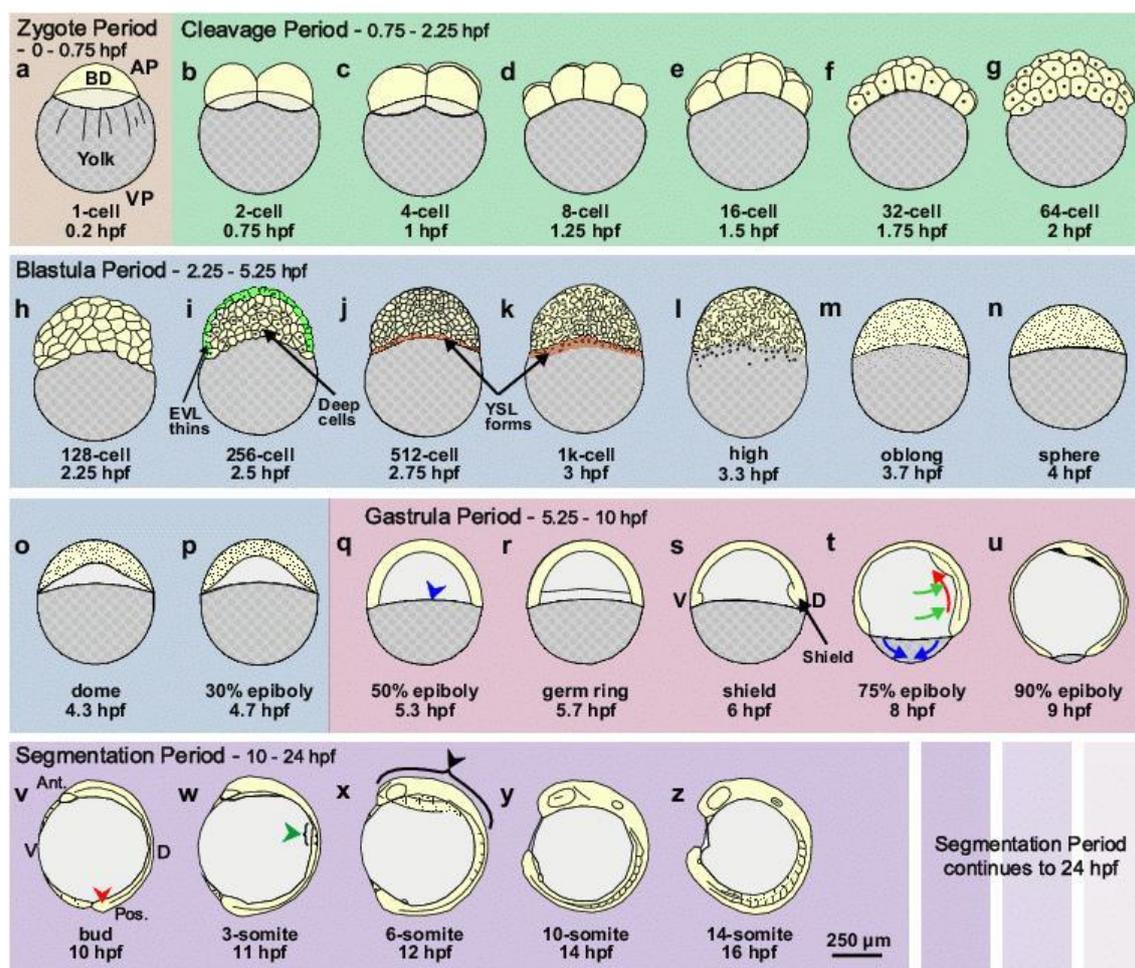


圖3.14、斑馬魚胚胎發育過程時間圖[126]



圖3.15、斑馬魚胚胎存活率測試流程

### 外觀型態畸形率：

由於斑馬魚在發育時期會有許多外觀上的改變，因此可以透過外觀改變來做為毒性指標的其中一環，近年研究指出，斑馬魚胚胎外觀變異包含：體軸、魚鰭、下頷、眼部、耳部等多項外觀變異及心苞與卵黃囊腫脹都可做為外觀變異指標[127, 128]。而本計畫在進行斑馬魚胚胎存活率試驗過程中，會在每 24 小時的時間點利用解剖顯微觀察胚胎的外觀變異狀況並做記錄，且在實驗終點 96 小時時統計胚胎顆數之畸形變異狀況如圖3.17(右)所示包含心苞囊水腫(pericardial edema, PE)、卵黃囊腫脹(yolk sac edema, YSE)、體軸彎曲(axial curvature, AC)等幾種畸形狀況。

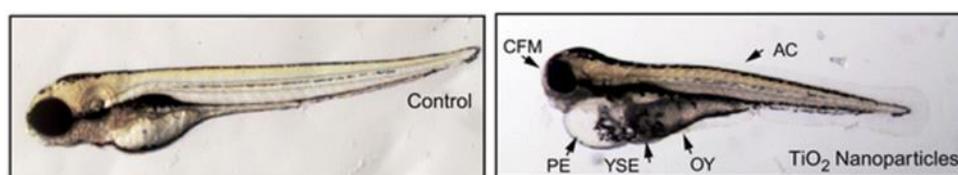


圖3. 16、斑馬魚胚胎畸形狀況(左)正常情形(右)畸形情形[129]

### 體長量測：

除了觀察其變異狀況外也可根據胚胎發育的體長探討物質對於斑馬魚發育的狀況，早期OECD其中一種指引[(TG 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test)]也將體長量測列為毒性測試的一個項目，斑馬魚胚胎暴露毒性物質也會影響到體長的發育狀況[130]。於此計畫中體長量測會先以3%甲基纖維素將斑馬魚胚胎以側躺方式固定在玻片上，並拍攝斑馬魚幼魚全身照片，再運用電腦軟體View 7記錄和計算體長數值。

### 氧化壓力測試：

許多研究已證實奈米微粒會經由直接或間接機制產生過量的ROS [131]，進而導致脂質、蛋白質與DNA的受損。先前已有報導指出當奈米氧化鋅暴露到斑馬魚胚胎時，會造成其體內產生氧化壓力進而造成細胞凋亡[132]。本計畫實驗將使用具有細胞膜穿透性的螢光染劑2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular probes, D-399) 來偵測ROS的產生。H<sub>2</sub>DCFDA在細胞內水解產生無螢光產物2',7'-dichlorodihydrofluorescein，當細胞內產生過量ROS時會與其氧化成2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 並放出螢光，螢光強度可反應細胞中總體的氧化狀態[133]。因此本實驗將暴露溶液後的胚胎，利用螢光染劑H<sub>2</sub>DCFDA進行染色，並使用螢光顯微鏡進行氧化壓力的定性分析，並利用定量軟體定量其螢光強度。

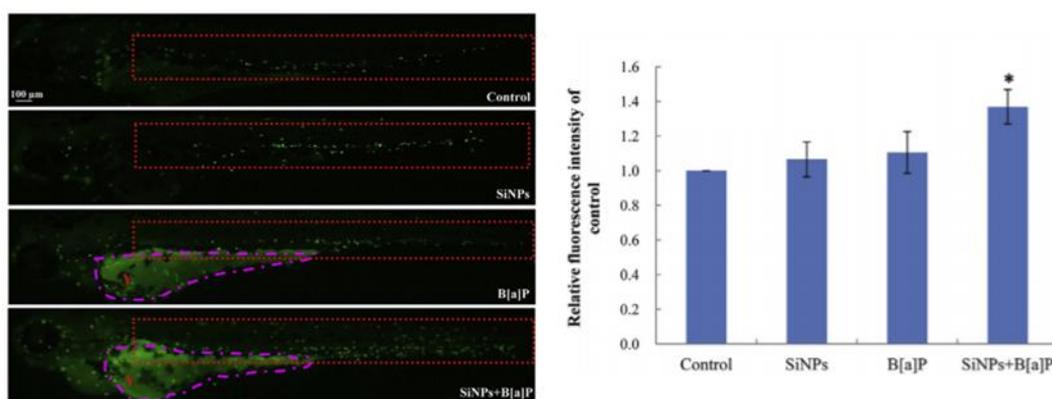


圖3.17、利用H2DCFDA測定氧化壓力之定性分析(左)與螢光量化分析(右)[134]

### 細胞凋亡：

先前研究指出當纖維母細胞及肝細胞暴露奈米銀微粒時，奈米銀微粒會進入到細胞並造成DNA損傷及細胞凋亡[135]，此外在 *in vivo*的模式中，近年來研究表示當斑馬魚胚胎暴露到奈米氧化鋅微粒會產生過多ROS，造成DNA受損與細胞凋亡進而產生毒性[136]。本研究計畫利用TUNEL assay探討斑馬魚胚胎細胞凋亡的情形。將暴露環境水體的斑馬魚胚胎以4%多聚甲醛於4°C下進行固定，接著利用TUNEL assay的試劑進行分析，當細胞有凋亡時會產生紅色螢光(圖3.19)。

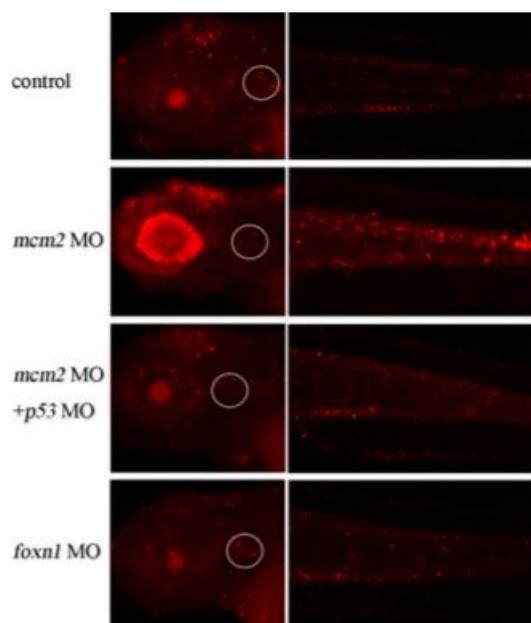


圖 3.18、利用 TUNEL assay 測定細胞凋亡之結果[137]。紅色螢光訊號及代表細胞凋亡發生

## 第四章、結果與討論

### 章節摘要：

於第一期報告中，我們已透過整理關於奈米毒性之國際最新文獻及國際標準規劃出適於環境水體之奈米微粒生物毒性標準方法草案，並且透過奈米銀和奈米氧化鋅及相對應之大分子物質作為測試物質，於測試結果中顯示所規劃之標準方法草案的確具有可行性，因此將此標準方法草案用於檢測環境水體之奈米微粒毒性。

而針對環境水體之奈米微粒毒性檢測部分，我們已採集第一、二季節的成功湖、二仁溪、曾文水庫，共計六個環境水樣進行環境水體之奈米微粒生物毒性試驗，結果中可發現不論第一季及第二季之環境水樣皆可存有較小粒徑之微粒，但除第一季二仁溪水樣以外，其微粒含量皆低於偵測極限。而在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且只有在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成，此外在斑馬魚胚胎模式中可發現不論成功湖、二仁溪及曾文水庫之水體並不會導致明顯存活率下降，而於體長量測上可發現第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，並且兩個季節之環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加。綜上所述，我們藉由人造奈米氧化鋅及奈米銀測驗已建立可行之標準方法草案，而六件環境水體之奈米微粒樣品中，環境水體之奈米微粒並不會導致明顯的細胞株培養與斑馬魚胚胎模式毒性反應。

### 達成目標：

#### ◇ 建立奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案

##### (1) 以動物細胞株(*in vitro*)及斑馬魚胚胎(*in vivo*)為主之建議方法

為了尋找和規劃最適於建立環境水體之奈米毒性測驗方法，我們搜尋並整理(1)奈米毒性相關之國際最新文獻，其包含國際上對於環境水體之奈米微粒研究、奈米微粒細胞毒性試驗方法及斑馬魚胚胎毒性試驗方法，除此之外我們亦參考(2)國際建議之毒性測驗標準方法，如：ISO\_TR\_16197 技術報告以及 OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試，藉由參考以上資料統整出(3)奈米微粒之細胞/斑馬魚胚胎模式之毒性試驗初步標準方法草案，其包含撰寫 4 種細胞毒性測試方法（細胞存活、細胞凋亡、氧化壓力測試、自噬作用）測試以及 5 種斑馬魚胚胎模式毒性測驗方法(存活率、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡)共計 9 種以上奈米物質之生物毒性標準方法草案。

#### ◇ 測試奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案

為了建立適合奈米微粒之生物毒性檢測標準方法草案，我們針對規劃之標準方法草案進行測試，利用奈米銀及奈米氧化鋅和相對應之大分子物質進行比對測試，測試結果顯示，4 種細胞培養模式毒性測試方法（細胞存活、細胞凋亡、氧化壓力測試、自噬作用測試）以及 5 種斑馬魚胚胎模式毒性測驗方法(存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡)具有可行性，可反應奈米微粒之毒性效應。

#### ◇ 探討環境水體之奈米微粒是否具生物毒性

針對環境水體之奈米微粒毒性檢測部分，我們已採集第一、二個季節的成功湖、二仁溪、曾文水庫，共計六個環境水樣進行環境水體之奈米微粒生物毒性測驗，結果顯示，不論是第一季及第二季之環境水樣皆存在較小粒徑之微粒，但除第一季二仁溪水樣以外，其微粒含量皆低於 DLS 偵測極限。而在細胞培養模式中，暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質後，不論是第一季及第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性，且僅於成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成，此外斑馬魚胚胎模式中可發現兩個季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫之水體並不會導致明顯存活率下降，而於體長量測上可發現不論第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，而於毒性機轉上，兩個季節之環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加。綜上所述，我們藉由人造奈米氧化鋅及奈米銀測驗已建立可行之標準方法草案，而六件環境水體之奈米微粒樣品中，環境水體之奈米微粒並不會導致明顯的細胞與斑馬魚模式胚胎毒性反應。

### 4.1 目前國際最新文獻及國際上建議之奈米毒性之標準試驗指南

於計畫中，為了尋找和規畫最適於建立環境水體之奈米毒性測驗方法，我們搜尋並整理**(1)奈米毒性相關之國際最新文獻**，其包含國際上對於環境水體之奈米微粒研究、奈米微粒細胞培養模式毒性試驗方法及斑馬魚胚胎模式毒性試驗方法，除此之外我們亦參考**(2)國際建議之毒性測驗標準方法**，如：ISO\_TR\_16197 技術報告以及 OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試，藉由參考以上資料統整出**(3)奈米微粒之細胞/斑馬魚胚胎模式之毒性試驗初步標準方法草案**，相關內容整理於下。

#### 4.1.1 目前奈米毒性之國際文獻回顧

### 奈米微粒之體外細胞培養模式毒性試驗

在傳統上對於工業化學品而言，想早期發現和確認其不良反應是非常困難的，因為目前常規的毒理學測驗方法並不符合快速、相對便宜且減少材料的需求，在過去傳統動物試驗不僅僅只是耗費時間和金錢，其使用資源和能源的效率較低，並且會產生大量的生物危害性廢棄物，因此傳統的動物模式是無法長期使用的。根據統計，歐洲的監管單位測試一種新興化合物需要大約 **300 隻動物**，以及一種農藥測試需使用高達 **10000 隻動物**[138]。所以在測試如奈米微粒這樣的新興化合物時，更聰明的作法是利用體外測試策略，這能透過排定優先級別以及更高效率的篩選來減少動物來源的使用，因此以長遠來看，使用細胞培養模式而非傳統動物模式來進行毒性測驗是一個較好的策略。

### 目前奈米物質之細胞毒性研究及毒性試驗方法

相關管理單位對於奈米材料的檢測或評估方法目前並沒有明確的規範，而國際文獻上認為對於評估奈米毒性而言，體外細胞模式是適用於評估奈米毒性的策略，因為體外的試驗模式系統為快速且有效的方式，能進一步提供許多奈米微粒與人類細胞間如何相互作用的重要資訊，然而目前對於探討環境奈米微粒對於環境及生物所造成的影響相關的研究十分的少，而針對利用細胞培養模式測試環境水體中奈米微粒的毒性試驗，目前尚未有研究團隊進行相關研究。先前的研究中是著重於使用合成或是商品化的奈米微粒進行毒性的測試，如檢測奈米微粒會導致細胞中細胞毒性機轉的活化，包含存活率下降、氧化壓力、細胞凋亡、自體吞噬...等，下表為目前利用體外細胞培養模式所進行的相關文獻整理(表 4.1)。

表 4.1、以體外細胞模式探討奈米微粒之毒性研究

NPs and size (nm)	Concentration and exposure duration	Species/cell culture	Assay technique	Result	Ref.
Aluminum oxide (8-12)	1-10 $\mu$ M 24 h	HBMVECs	MTT DHE	Cell viability↓ Mitochondrial function↓ Oxidative stress ↑ Alter proteins expression	[139]

				of the BBB	
Aluminum oxide (50-80)	10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	Mammalian cells	EZ4U	No significant toxic effect on cell viability	[140]
Aluminum oxide (160)	25-40 $\mu\text{g/mL}$ 12 h	HMSC	MTT	Cell viability $\downarrow$	[141]
Aluminum oxide (30-40)	500-2000 mg/kg 72 h	Rat blood cells	Comet Micronucleus	Dose-dependent genotoxicity	[142]
Aluminum oxide (50)	0-5000 $\mu\text{g/mL}$ 2 h	MLCL	Comet	DNA damage	[143]
Copper oxide (50)	10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	Human lung epithelial cells	MTT LDH	Cell viability $\downarrow$ LDH $\uparrow$ Lipid peroxidation $\uparrow$	[144]
MWCNTs (20)	0.002-0.2 $\mu\text{g/mL}$ 4 days	Lung cancer cells	MTT	Cell viability $\downarrow$	[145]
SWCNT (800)	0-400 $\mu\text{g/mL}$ 10 days	HACECs NHBECS	Clonogenic	Cell death	[146]
Fullerenes (178)	1 ng/mL 80 days	CHO HELA HEK293	Micronucleus test	DNA strand breakage Chromosomal damage	[147]
Silica (15-46)	10-100 $\mu\text{g/mL}$ 48 h	Human bronchoalveolar carcinoma cell	DCFH-DA Commercial kit	ROS $\uparrow$ LDH $\uparrow$ Malondialdehyde $\uparrow$	[148]

Silica (43)	25-200 $\mu\text{g/mL}$ 3-24 h	HepG2	DCFH-DA	ROS $\uparrow$ Mitochondrial damage Oxidative stress $\uparrow$	[149]
Silver (15- 100)	10-50 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	BRL 3A	LDH MTT Glutathione DCFH-DA	Cell viability $\downarrow$ LDH $\uparrow$ ROS $\uparrow$	[150]
Silver (30-50)	0-20 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	Human alveolar cell line	MTT DCFH- DA	Cell viability $\downarrow$ ROS $\uparrow$	[151]
Silver (20-40)	---	Human leukemia cell line	LDH WST-1	Cell viability $\downarrow$ LDH $\uparrow$	[152]
Zinc oxide (50-70)	11.5 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	Human colon carcinoma cells	ELISA Flow- cytometry	Oxidative stress $\uparrow$ Cell viability $\downarrow$ Inflammatory biomarkers	[153]
Zinc oxide (307- 419)	10-100 $\mu\text{g/mL}$ 24-48 h	Human cervix carcinoma cell line (HEp-2)	Comet micronucleus test MTT	DNA damage Cell viability $\downarrow$	[154]
Zinc oxide (50)	0-100 $\mu\text{g/mL}$ 24 h	Human hepatocytes HEK 293 cell line	MTT Comet	DNA damage Cell viability $\downarrow$ Oxidative stress Mitochondrial damage	[155]
Zinc oxide ( $<20$ )	100 $\mu\text{g/mL}$	Human bronchial epithelial cells	---	Cell viability $\downarrow$ Oxidative stress $\uparrow$ LDH release	[156]
Iron oxide (100- 150)	0.1 mg/ mL 7 days	Human macrophages	MTS	Cell viability $\downarrow$	[157]

Iron oxide (13.8)	123.52 $\mu\text{g/mL}$ 12 h	Human hepatocellular carcinoma cells	MTT	Cell viability $\downarrow$	[158]
Iron oxide (20)	0.1 mg/mL 2 days	Rat mesenchymal stem cells	MTS	Cell viability $\downarrow$	[159]
Titanium oxide (<100)	10-50 $\mu\text{g/mL}$ 6-24 h	Human lung cells	ELISA Trypan blue DCFH-DA	Oxidative stress $\uparrow$ DNA adduct formation Cytotoxicity $\uparrow$	[160]

#### 奈米微粒之體內斑馬魚胚胎模式毒性試驗

許多的奈米微粒可能會排放至環境水體當中，也因此可能與環境水體交互作用，並且可能對於水生生物具有潛在性的毒性，而奈米微粒可能因為與水體交互作用，使得其物化特性改變，所以在環境中的奈米微粒（如：環境水體中排放奈米微粒），可能與僅有奈米微粒的毒性其情況下不見得相同（如：純水加奈米微粒）。目前全世界對於環境中之化學物質毒性測驗大部分會利用水生動物作為毒性檢測之動物模式，而近幾年來斑馬魚研究模式常作為環境化學物質的毒性測驗之動物模式，下表(表 4.2)為斑馬魚作為環境中有害的化學物質的毒性測定。

表 4.2 近年以斑馬魚模式作為環境中化學物質毒性測定之研究

測定物質	取樣地點	文獻
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	Elizabeth River estuary (VA, USA)	<i>Effect-directed analysis of Elizabeth River porewater: Developmental toxicity in zebrafish (Danio rerio)</i> . Environmental toxicology and chemistry, 2014. <b>33</b> (12): p. 2767-2774.[161]
Heavy metal	Urban highway runoff in Shanghai (China)	<i>Toxicity of urban highway runoff in Shanghai to Zebrafish (Danio rerio) embryos and luminous</i>

		<i>bacteria (Vibrio qinghaiensis. Q67). Environmental Science and Pollution Research, 2014. 21(4): p. 2663-2676[162]</i>
Water and sediment	Neckar River (Southern Germany)	<i>Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (Danio rerio) embryos. Environmental Sciences Europe, 2014. 26(1): p. 3.[163]</i>
Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)	Downstream Shiniu Stream , Kenting Ditch, and Shiaowan Ditch (Taiwan)	<i>Assessment of ichthyotoxicity and anthropogenic contamination in the surface waters of Kenting National Park, Taiwan. Environmental monitoring and assessment, 2015. 187(5): p. 265.[164]</i>
Water	Surface water from Huangpu River (China)	<i>Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (Vibrio qinghaiensis SP. Q67) and zebrafish (Danio rerio) embryos. Ecotoxicology and environmental safety, 2015. 112: p. 137-143.[165]</i>
Sediment cores	Yangtze River estuary (China)	<i>Toxicity of sediment cores from Yangtze River estuary to zebrafish (Danio rerio) embryos. Environmental Science and Pollution Research, 2015. 22(21): p. 16423-16433[166]</i>
Pesticide	Itirapina ,SãoPaulostate	<i>Impact of runoff water from an experimental agricultural field</i>

(Avermectin)	(Brazil)	<i>applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. Chemosphere, 2016. 144: p. 1408-1414.[167]</i>
Copper	Dong nai River and Mekong River waters (Viet Nam)	<i>Copper toxicity and the influence of water quality of Dongnai River and Mekong River waters on copper bioavailability and toxicity to three tropical species. Chemosphere, 2016. 144: p. 872-878[168]</i>
Metals	Scheppelijke Nete and the Kneutersloop (Belgium)	<i>Evaluating Complex Mixtures in the Zebrafish Embryo by Reconstituting Field Water Samples: A Metal Pollution Case Study. International Journal of Molecular Sciences, 2017. 18(3): p. 539.[169]</i>
Metals	Lake Hornträsket (Sweden)	<i>Transcriptional responses of zebrafish to complex metal mixtures in laboratory studies overestimates the responses observed with environmental water. Science of The Total Environment, 2017. 584: p. 1138-1146[170]</i>

此外由於近幾年奈米微粒已應用於許多產業當中，也因此奈米微粒可能對於環境造成相當的負擔。奈米微粒會透過環境中的空氣、水體、土壤等多種途徑進入環境生態中，目前許多研究指出奈米微粒主要是透過水體及空氣途徑進入環境當中，但目前對於環境水體之奈米微粒毒性測驗相關文獻較少，主要是透過實驗室較乾淨之水源添加奈米材料來探討其毒性，而少數的研究是針對環境水體中之奈米微粒，而這些研究大多著重於急毒性，並沒有對於毒理機轉有更深一層的探討，如

表 4.3 所示。

表 4.3 近年以斑馬魚模式作為天然水體中奈米微粒毒性測定之研究

測定物質	取樣水體	毒性	出處
Ag and TiO <sub>2</sub> nanoparticles	Reservoir (catchment area) (Singapore)	Uptake of Ag and TiO <sub>2</sub> nanoparticles	<i>Uptake of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles by zebrafish embryos in the presence of other contaminants in the aquatic environment. Water research, 2014. 55: p. 280-291.[171]</i>
Ag and CuO nanoparticle	Lake Greifen (Switzerland)	Ag NPs were very toxic (48 h EC50 1e5.5 mg Ag/L) to <i>D. magna</i> as / <i>D. rerio</i> embryos	<i>Natural water as the test medium for Ag and CuO nanoparticle hazard evaluation: An interlaboratory case study. Environmental Pollution, 2016. 216: p. 689-699.[172]</i>

#### 奈米微粒之環境水體相關研究及研究策略

目前仍尚未有對於環境中之奈米微粒之毒性測驗相關研究，對於環境水體與奈米微粒的相關研究大多是透過額外添加奈米微粒至環境水體，而透過先前研究可發現在過濾孔徑小於 100 μm 之濾液，其測定奈米微粒濃度則較低[173](圖 4.1)，根據此研究之結果，本計畫將會回收未過濾至孔徑 100 μm 之濾液進行毒性試驗，於本計畫中我們將透過不同孔徑，其包含 0.45μm、0.22μm 及 0.1μm 之過濾膜將水體進行過濾，而過濾後將收集環境水體之奈米微粒進行毒性分析。

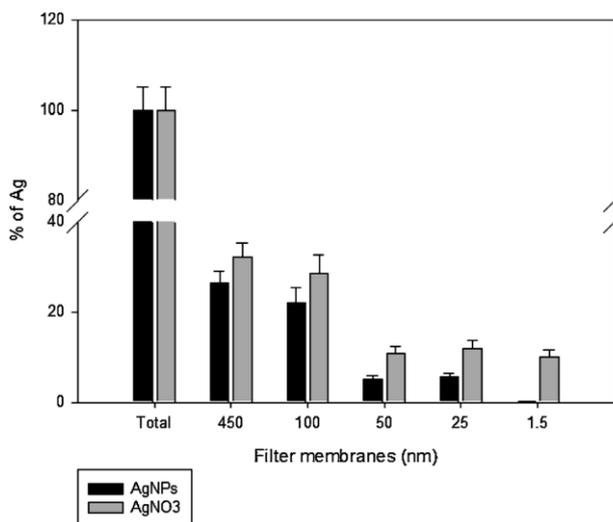


圖 4.1 奈米銀以環境水體為媒介經由不同孔徑過濾膜之銀離子濃度 [173]

#### 4.1.2 國際建議之毒性測驗標準方法

奈米物質其因表面積大且化學活性高，其物化特性皆與一般傳統化學物質不同，這使得我們並不能對應到過去所做的相關文獻，也因此我們急需奈米物質之毒性篩選報告，除此之外，因奈米物質種類繁多使得我們必須發展出適當且快速的策略來因應其需求，也因此於 **(1) ISO\_TR\_16197 技術報告**中，已建議用細胞培養的模式來進行快速的毒性篩選是一個良好的策略，另外，此技術報告中也建議斑馬魚胚胎是一個良好的非感知動物模式，能夠提供更多複雜的體內模式資訊，也因此於計畫中我們亦選用斑馬魚胚胎模式進行研究，針對斑馬魚胚胎，我們參考**(2) OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試**，並且將其整理於下，作為我們研究的重要根基。

#### ISO\_TR\_16197 技術報告

近年來因奈米微粒大量的應用及開發，使得我們急需一個重要的平台能夠快速、方便且高通量的方法來評估奈米微粒的危害，而 ISO\_TR\_16197 技術報告中所提出之高通量毒性篩選方法對於測試奈米微粒這樣的新興化學物質是十分適合的，同時 ISO\_TR\_16197 技術報告中也提出許多檢測奈米微粒時許多必要且值得注重的概念值得我們參考。

#### Role and relevance of toxicological screening for the safety evaluation of

## manufactured NMs

### 毒性篩選在人造奈米材料之安全性評估中的角色及相關性

元素週期表上的每一種元素都有可能應用於奈米科技，這些不同的奈米材料種類之繁多，使得目前難以逐一評估每一種新興奈米材料毒性危害，因此近來隨著大量具有新特性之新興奈米材料的開發，進行毒性篩選是一項極大的挑戰，也因此高通量毒性篩選(high-throughput toxicological screening)方法對於奈米材料毒性之篩選再合適不過。高通量篩選測試的目的，主要是提供一個對人體健康或環境潛在不良結果的指標，而此篩選法需考量多項參數，包含成本、基礎設備以及時間上的限制，大部分會採取細胞培養模式或其他體外試驗之技術；除此之外，透過此作法也可以如同3R原則中所呈現的(取代、減量以及替代)減少使用感知體外動物試驗。

表 4.4 篩選測試包含之項目

	項目
(1)	限制使用感知動物(sentient animals)。
(2)	產生可量化之試驗終點(end point)或廣泛被接受並可靠的是與否之篩選(yes/no screen)。
(3)	多方實驗室證實之重複性。
(4)	有可再現性並具有合適之陽性及陰性作為對照組。

篩選測驗往往可以提供特定機制相關的數據，這樣的數據可以提供相關不良反應的訊息上下游路徑，而目前此技術報告已將評估奈米材料毒性之篩選測試數據用來作為評估奈米材料產品未來是否能繼續發展，且這些數據能夠被應用在分級測試策略(a tiered testing strategy)上，其中高通量篩選方法具有減少動物試驗或是利用體外研究來分辨有害物質之潛能，進而減少危害辨識過程之複雜性。考量奈米材料之複雜度以及大量化，使用高通量之篩選測試方式對於人體健康影響具有其重要性，然而篩選測試也有其限制，所以此測試方法應須建立在更完整的試驗策略之中。

表 4.5 篩選檢驗法的限制

	項目
(1)	大部分缺乏被驗證的人體可預測性。
(2)	測試篩選之數據推估到人體暴露的劑量效應關係(dose-response)

	relationships)較複雜。
(3)	急性暴露篩選作為預測人體慢性暴露之危害較困難。

### 奈米材料毒性測試的正對照組與負對照組

為了達到有意義的結果，篩選實驗必須包含正對照組與負對照組。一般而言，正對照組是用以驗證實驗的程序是否完整。正對照組應由過去已知實驗的結果，如：當暴露到測試系統時能引起不良反應，為了達到與實驗本身的相關性，正對照組本身盡量具有與奈米微粒共同的物理化學特性，或至少屬於同一類，例如：金屬氧化物、金屬、聚合物等材料。如此，未知毒性的奈米材料須與毒性已被充分研究之參考材料立於同樣的標準，並且可優先參考目前已知的生物機制，如：二氧化矽晶體 (nanoUsil)已在微粒毒理學研究的氣管內注射實驗 (intratracheal instillation studies) 中被用來作為正對照組。另一方面，負對照組應為可忽略或鮮少的影響，使其可被用來作為毒性背景值。若暴露負對照組後觀察到陽性反應，這通常意味著有其他的因子參與其中，並且其實驗結果應被捨棄。

已建立的毒性篩選規章是為了化學物質與較大尺寸的微粒而發展出來的，因此，目前的奈米毒性篩選分析方法大多是依賴化學物質或較大的微粒物質作為分析的對照組。當奈米微粒專用的毒性篩選分析方法被發展出來時，以奈米材料為基礎的對照組將逐漸取代傳統的對照組，隨著其他奈米微粒參考材料種類的出現，將有助於奈米毒性測量方法基礎架構之建立，能夠簡化篩選程序並降低不同實驗室之間最終結果的不一致性。

### 人造奈米材料之體外毒性篩選方法

若想要建立一套體外試驗的篩選方法，第一步驟是先找出適當的體外分析方法納入其中，一般來說，為了確保分析方法的效能，測試奈米材料的體外分析方法應包含正負對照組以及驗收標準。理想上，正負對照組應為與人體危害相關之奈米微粒，其機制基礎也需以此分析方法評估。若此奈米微粒之對照組尚未被鑑定出來，則小分子的對照組也是合適的，此外分析方法也應包含鑑定奈米微粒干擾之方法，這是因為有許多奈米微粒可能會干擾光譜、催化 (catalytic) 或試劑吸附特性，另外為了避免可能有偽陽性與偽陰性結果，應以多重分析方法來測量同樣的機制。

表 4.6 ISO\_TR\_16197 技術報告所建議的體外試驗方法

	建議的體外試驗方法
(1)	細胞毒性篩選方法

(2)	發炎及免疫反應篩選方法
(3)	壓力反應 (包含氧化及蛋白產物)篩選方法，其項目細分為: a.奈米微粒的非細胞氧化還原活性 b.細胞內產生的 ROS
(4)	血液中成分之篩選方法 (包含凝血因子、溶血)
(5)	基因毒性篩選方法
(6)	體外屏蔽檢測以及適合的檢測系統用來評估生物屏障毒性，例如肺部和皮膚
(7)	體學測量 (Omics measurements)
(8)	其他毒性 (包含神經毒性、發育毒性、胚胎毒性及器官影響)

以下先以細胞毒性篩選及氧化壓力產生之反應進行技術報告之內容整理。

#### 細胞毒性篩選方法-細胞存活率

通常被用來評估化學物質細胞毒性的方法也適用於分析奈米材料之細胞毒性，最常用的方法是MTT或改良的MTT、Alamar blue、乳酸脫氫酶釋放實驗(LDH release)，以及以trypan blue染色計數細胞數目的方法等，也都是常使用的方法。

#### 細胞毒性篩選方法-氧化壓力

先前的研究已經探討奈米微粒在細胞內氧化壓力反應中所扮演的角色。細胞產生之活性氧化物為正常細胞活動之副產物，可透過細胞的抗氧化機制減緩，若活性氧化物種產物超過抗氧化機制能負荷的程度，將導致細胞中氧化壓力過高。不同的氧化壓力在身體中有著不同的角色，事實上氧化壓力在細胞之中本身就是重要的二級傳訊者，當細胞中存在低程度的氧化壓力時，第一層的保護反應會誘導抗氧化酵素生成，例如穀胱甘肽 S 轉移酶，以減緩氧化壓力，但若活性氧化物產物過多或是起始的抗氧化反應失效就會導致發炎反應，最終導致細胞毒性產生。

由於奈米材料可能引起的毒性相似於微粒或超微粒引起的毒性，因此氧化壓力與發炎反應的發生被認為是奈米材料之合理毒性機轉，奈米材料可能透過數種途徑誘發氧化壓力，例如半導體奈米材料的導電帶之電子跳躍導致  $O_2^{\cdot-}$  與  $OH^{\cdot}$  自由基生成，以及奈米材料所釋放的金屬離子誘發生成  $OH^{\cdot}$ ，除此之外奈米材料也能透過進入粒線體並干擾其功能導致過量 ROS 生成。

#### 人造奈米材料之體內試驗毒性篩選相關方法

全動物篩選模式 (包含對代謝體學、蛋白質體學、轉錄體學及基因毒性的測試) 使用非感知物種(non-sentient species)的模式系統進行全動物篩選，可作為評估奈米材料對環境及人體健康與毒性效應的可能工具，例如斑馬魚胚胎模式已成為對

脊椎生物及人類毒理學而言，具有方便性且有價值的模式。此模式提供有力的體內動物探討毒理學機轉（例如：完整的生物體、具有功能性的恆定回饋機制以及細胞間訊息傳遞）。

斑馬魚的胚胎模式可用來快速提供篩選奈米材料對全動物系統的生物影響資訊，並且可以提供對於奈米材料毒性整合系統效應的敏感指標，這是因為脊椎動物在生命週期的早期階段對外來物質的干擾是較為敏感，除此之外，發育在各物種間都具有高度保守的特性，使得試驗結果能夠被廣泛解讀；另外在發育的過程中，分子訊息傳導是非常重要的，這是因為發育的過程本身需要高度的細胞與細胞的溝通，倘若奈米材料會干擾細胞溝通的過程，則可預期會破壞發育的過程，而受干擾的胚胎發育過程可能會呈現畸形的形態、行為的異常或是胚胎死亡，透過結合形態的呈現、發育及行為分析，斑馬魚胚胎模式可提供完整的系統效應測試。

#### 其他相關國際活動與公佈文件之回顧

另一種奈米毒性標準化測試是由經濟合作暨發展組織(OECD)、美國材料與試驗協會(ASTM International)及數個國家計量機構(National Metrology Institutes)所組成[112]。OECD之人造奈米材料工作小組(WPMN)在2006年成立，截至2011年為止，並已組成九個推動小組(steering groups, SG)。另外，ASTM國際奈米技術委員會(ASTM international Technical Committee on Nanotechnology) E56則公佈三種奈米材料毒性測試標準，如表4.7所示。

表 4.7 ASTM E56 公佈的毒性測試標準相關列表

文獻編號	標題
E2524-08	奈米微粒溶血特性(Haemolytic Properties)分析之標準測試方法
E2525-08	奈米微粒材料影響小鼠顆粒球巨噬細胞群落 (Granulocyte Macrophage Colonies)形成評估之標準測試方法
E2526-08	奈米微粒材料對豬腎細胞與人類肝癌細胞毒性評估之標準測試方法

歐盟第7期科研架構(EU 7th Framework)近期建立一種「奈米微粒造成健康、安全與環境影響」綜合資料庫(NHECD) (內容取自[www.nhecd-fp7.eu](http://www.nhecd-fp7.eu))，此資料庫開放給使用者自行更新資訊及評估意見。

ISO/TR16197 技術報告針對體內測試之建議指出新的體內試驗系統：斑馬魚胚胎模式，能夠被簡單又快速地應用在細胞及分子的層次上，除此之外，針對斑馬魚的體內測試系統而言，OECD 過去針對化學物質的魚類毒性測試方法已有相關的

測試指引公告提供參考，因此今年度之計畫將根據 OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試準則，進行水體樣品之奈米物質斑馬魚胚胎體內毒性測試系統之建立。

### OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試指南

ISO/TR16197 技術報告體內測試建議指出：使用非感知物種的模式系統進行全動物篩選，可作為評估奈米材料對環境及人體健康與毒性效應的可能工具，例如：斑馬魚胚胎模式，除此之外斑馬魚胚胎模式目前已廣泛的被應用於奈米毒性研究、環境水體毒性研究、及環境水體中之奈米微粒毒性研究，也因此在此計畫之中我們將會使用斑馬魚胚胎模式進行研究，而在研究中我們將參考 OECD TG236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 魚類胚胎急毒性測試指南作為草案依據。

#### 斑馬魚胚胎試驗開始所須注意事項

- (1) 如果此指引被用來測試混合物，其組成應盡可能的鑑定化學成分及特性，如：化學物質含量比例、物質-專一特質。
- (2) 考量化學物質可能於代謝後活化：已有證據顯示斑馬魚胚胎已具有生物轉化的活性，然而斑馬魚胚胎之代謝活性與幼魚或成魚並不全然相似。例如：Protoxicant allyl alcohol 對胚胎毒性較成魚低，因其是需要透過代謝活化。
- (3) 若化學物質之分子量大於 3 kDa 的大分子結構物質；其可能導致斑馬魚胚胎延後孵化，使得孵化後階段之暴露時間減少。在這些狀況之下，胚胎的敏感較為不足，所以可能以其他的毒性測試會較為適合。

#### 進行斑馬魚試驗時，以下設施是必須的

- (1) 魚缸材質必須是化學鈍性材料 (像是：玻璃)，並且符合建議容載量。
- (2) 倒立式顯微鏡和/或雙目式，至少應有 80 倍放大倍率。
- (3) 若觀察記錄房間不能維持在  $26 \pm 1$  °C，則需要其他方法來控制實驗過程中之溫度。
- (4) 測試容器：需使用玻璃或聚苯乙烯材質 5 之測試容器 (例如：24 孔盤，一個孔容積為 2.5-5 ml)。若物質 (例如：非極性、平面化合物，具有高 KOW) 可能會吸附到聚苯乙烯上，則應使用惰性材料 (玻璃) 來降低因吸附造成的損失。
- (5) 控制溫度的培養箱或空調室，讓測試容器能維持在  $26 \pm 1$  °C。
- (6) pH 計。
- (7) 溶氧計。

- (8) 測試水硬度及導電度之儀器。
- (9) 收集卵器材：由玻璃、不鏽鋼或其他惰性材料構成；篩網（網格大小  $2 \pm 0.5 \text{ mm}$ ）由不鏽鋼或其他鈍性材料，以保護新生的卵。
- (10) 將收集卵的移液管(或滴管)的開口擴大，以避免讓魚卵受到壓力。
- (11) 準備不同的玻璃器皿稀釋藥品(燒杯、錐形瓶、量筒、滴管)或收集斑馬魚魚卵(例如：燒杯、玻璃盤)。
- (12) 若為其他暴露系統：如流通式或是被動給藥等，需適當的相關設施及設備。

### 養殖水及測試之條件

建議稀釋養殖水至地表水硬度程度，稀釋用水需來自重組水(reconstituted water)，其最後硬度程度應相當於  $100\text{-}300 \text{ mg/L CaCO}_3$ ，以避免碳酸鈣沉澱。重組水可能由低硬度的養殖水與去離子水稀釋(1:5)至最小硬度  $30\text{-}35 \text{ mg/L CaCO}_3$ 。

水在加入化學物質之前，應先通氣至氧氣飽和狀態。測試過程中溫度應該維持在  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。pH 值應該於 6.5 及 8.5 之間，在測驗的過程中不應超過誤差 1.5。如果 pH 值未介於 6.5 及 8.5 之間，在試驗開始之前應先調整 pH 值。調整 pH 值時不應使用會顯著影響原液濃度的溶劑，也不應產生任何化學反應或沉澱。建議使用 HCl 及 NaOH 來校正 pH 值。

### 測試溶液

- (1) 能準備特定濃度的測試溶液，例如：稀釋原液的過程中，藉由機械裝置(旋轉攪拌和/或超音波)來混合或攪拌稀釋水中的測試化學物質。如果測試化學物質難溶於水，則依據 OECD Guidance Document No. 23 裡的標準流程來進行處理。
- (2) 避免使用溶劑，但在某些情況可能需要使用溶劑配製成合適的濃縮原液，在這情況下，每一個測試組中，溶劑的濃度不應超過  $100 \mu\text{l/L}$ ，除此之外當使用溶劑時，則實驗設計上另外增加一個溶劑控制組。

### 魚的養殖應注意以下事項：

- (1) 光週期固定為 12-16 小時。
- (2) 斑馬魚不可有可見的感染或生病，也不應在產卵前兩個月有接受任何投藥（急性或是預防性皆是）。
- (3) 斑馬魚之建議生存空間為一公升/一隻魚。
- (4) 應調整至最佳的過濾率，應避免過高的過濾率造成水體的擾亂。
- (5) 餵食時應避免過多餵食。

(6) 應定期監控魚缸中的水質及乾淨度，如果需要的話應調整至初始狀態。

### 測驗斑馬魚試驗技術之完整性

為了檢測此品系的斑馬魚敏感度，須以 3,4-dichloroaniline 作為參考物質，測試完整的劑量效應範圍，且一年檢測兩次。對於初建立此試驗的實驗室，使用參考化學物質證實技術完整性是必須的，實驗室在開始正式試驗前，也可用此化學物質來描述實施此測試之技術完整性。

### 確保斑馬魚試驗之實驗有效性

為了確保每次實驗之有效性，應留意以下之注意事項：

- (1) 測試批次之卵的總體受精率  $\geq 70\%$ 。
- (2) 測試容器及測試期間水溫維持  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- (3) 負控制組 (dilution-water) 組及溶劑組直到 96 小時結束時，其整體存活率  $\geq 90\%$ 。
- (4) 正控制組直到 96 小時結束時，最小值死亡率必須達 30%。
- (5) 控制組 (及溶劑組，如果可行的話) 直到 96 小時結束時，其孵化率必須  $\geq 80\%$ 。

### 斑馬魚產卵

- (1) 斑馬魚產卵的方式可透過在個別交配盒中或是透過在魚缸中大量產卵。
- (2) 公魚和母魚之比例為 2:1，在測試前一天的傍晚(暗週期前幾個小時)將斑馬魚放於交配盒之中。
- (3) 因為可能有時沒有產卵，建議至少使用 3 個交配盒。
- (4) 為避免遺傳差異，卵應至少由 3 個交配盒中收集，並且將卵均勻混合，再從其中隨機挑選。
- (5) 集卵器在試驗前一天傍晚前或於試驗當日天亮前放至交配盒或魚缸中。此外，為避免卵被成魚食入，收卵器材上覆有惰性篩網 (網格大小約  $2 \pm 0.5\text{ mm}$ )。交配、產卵及受精會在亮燈的半小時內發生，而取出卵時建議使用重組水進行潤洗，將雜質潤洗掉。

### 試驗流程-暴露條件

- (1) 一種實驗濃度需 20 個胚胎進行暴露測試。
- (2) 暴露濃度應於整個測試過程中維持標準化學濃度  $\pm 20\%$ 。若在靜水式系統中無法達到，則應使用半靜水式系統 (例如：每 24 小時更換)。

- (3) 如果無法維持標準化學濃度 $\pm 20\%$ ，在開始及每個暴露階段都應測量濃度。
- (4) 當更新溶液時，要注意胚胎仍要覆蓋少許舊溶液以避免乾涸。  
此項試驗設計適用於特定物質的測試要求，例如：流動式系統、用於易分解或高吸附性物質的被動式給藥系統、揮發性物質系統。
- (5) 操作過程中應小心謹慎，降低對胚胎產生任何壓力或傷害。
- (6) 在試驗進行之前應先將測試物質放置於測試容器至少 24 小時。

### 試驗流程-測試濃度

- (1) 通常測試化學物質應有 5 個濃度，其濃度間距不超過 2.2 倍以符合統計要求。如果試驗設計上小於 5 個濃度時應提出理由。
- (2) 最高濃度應造成 100 %死亡，最低濃度應不造成可觀察反應。
- (3) 在正式試驗開始前，應先測試出適當的濃度範圍。
- (4) 每個試驗濃度通常需 10 顆胚胎。  
以上指示皆於 24 孔盤進行實驗，若有更換試驗容器或是測試更多濃度時，應隨之調整。

### 控制組

- (1) 負控制組：稀釋水的控制組作為實驗中的負控制組及盤內控制組。若有大於 1 個控制組的胚胎死亡，則此 24 孔盤的實驗組皆不採用。若發生整個 24 孔盤的實驗組不被採用的情況，則要來評估及辨別觀察效應將會變得困難，特別是溶劑控制組或是胚胎有被影響的組別。
- (2) 正控制組：在每一批胚胎試驗時，都應使用正控制組(4 mg/L 3,4-dichloroaniline)。
- (3) 溶劑控制組：在使用溶劑的情況時，應有額外的 20 個胚胎單純暴露溶劑作為溶劑控制組。為考量測試的可接受性，溶劑需為不會造成顯著改變孵化時間、存活率及不會造成任何胚胎不良效應。

### 暴露起始及暴露期間

- (1) 暴露試驗盡量在胚胎受精後開始，且在暴露 96 小時後結束。
- (2) 胚胎應於分化成 16 顆細胞 (16-cell)之前就暴露測試溶液。
- (3) 為了最小化延遲時間的問題，應準備需要量的兩倍胚胎顆數，並隨機挑選分配至各別濃度測試組別和控制組中，整個過程不能超過胚胎受精後 90 分鐘。
- (4) 受精卵應與未受精卵分開，並在受精後 180 分鐘前加入 2 ml 新鮮準備的測試

溶液。

(5) 使用解剖顯微鏡(大於 30 倍放大率)挑選出分裂中的不正常受精卵 (例如：不對稱、小泡形成或是卵膜破損)。

### 將卵分配至 24 孔盤中應注意之事項

- (1) 一個濃度的組別放入 20 個胚胎於 24 孔盤中。
- (2) 溶劑控制組需於 24 孔盤中放入 20 個胚胎 (如果需要時)。
- (3) 正控制組(positive control)需於孔盤中放入 20 個胚胎。
- (4) 以上孔盤中放入4個胚胎與稀釋水(dilution water)作為內部控制組(internal plate control)。
- (5) 需以 24 個胚胎與稀釋水共同測試作為負控制組(negative control)。

### 觀察胚胎

胚胎的觀察重點包含：胚胎凝結(coagulated embryos)、體節發育不全或缺乏(lack of somite formation)、尾部未分離(non-detachment of the tail)、缺乏心跳(lack of heartbeat)。

- (1) 胚胎凝結(Coagulation of the embryo)：凝結的胚胎為乳白色，於顯微鏡下顯示為黑色。凝結胚胎於 24、48、72 及 96 小時記錄。
- (2) 體節發育不全或缺乏(Lack of somite formation)：於  $26 \pm 1$  °C 下，正常發育的斑馬魚胚胎在 24 小時後約形成 20 個體節，而正常發育的胚胎會自主運動(收縮運動)，自主運動即表示體節之形成。體節發育不全或缺乏於 24、48、72 及 96 小時記錄。若在 24 小時後沒有形成體節，可能為整體發育遲緩，而最晚至少在 48 小時前體節就應已形成。若於 48 小時未形成體節，則斷定為死亡。
- (3) 尾部未分離(Non-detachment of the tail)：正常發育的胚胎，在胚胎身體末端延伸時，尾部會從卵黃囊分離。尾部未分離是於 24、48、72 及 96 小時記錄。
- (4) 缺乏心跳(Lack of heartbeat)：於  $26 \pm 1$  °C 下，正常發育胚胎的心跳可於 48 小時觀察到。在觀察心跳時應特別小心，因為不規則心跳的情況不應紀錄為死亡。此外，若有可見的心跳，但是沒有觀察到腹主動脈循環(circulation in aorta abdominalis)，判斷為非死亡。要觀察心跳時，應該在至少在 80 倍放大的情況下觀察 1 分鐘。缺乏心跳是於 48、72 及 96 小時記錄。

\*以上這些觀察項目觀察到任何一項即表示胚胎死亡。此外測試組及控制組從暴露後 48 小時，每天都要記錄孵化的情形，每 24 小時進行記錄直至試驗結束。

\*測試組別及控制組的孵化率應該於暴露後 48 小時後記錄，雖然孵化率並不用來計算 LC<sub>50</sub>，但是孵化率能確定胚胎有沒有潛在的卵膜保護屏障，這將有益於數據

上的解讀。

**表 4.8 斑馬魚胚胎於受精後 24 至 96 小時之急毒性現象觀察**

	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
胚胎凝結	+	+	+	+
缺乏體節形成	+	+	+	+
尾部未分離	+	+	+	+
缺乏心跳		+	+	+

+ 代表需觀察的時間點

### 分析測量

- (1) 在試驗的開始及結束，皆需檢測控制組及最高濃度組的 pH 值、總硬度、導電度。在半靜水式系統中，在換水前後都應測量其 pH 值。
- (2) 在試驗結束時，需要測試負控制組及最高濃度含有存活胚胎組的溶氧量，須符合測試規範。
- (3) 如果顧慮 24 孔盤之間的溫度差異，則隨機選取其中 3 個孔槽測試。溫度應在試驗過程中每天持續地記錄。
- (4) 在靜水式系統中，試驗前後至少要測量最低濃度及最高濃度，最好的情況是每個濃度都測量。
- (5) 在半靜水式系統中，測試物濃度應在標準濃度 $\pm 20\%$  範圍，建議測試物在更換前新鮮溶液前先測量其濃度，應包括最低濃度和最高濃度。

### 數據及報告-試驗報告

測試報告應該包含以下資訊：

- (1) 測試化學物質：
  - a. 單一組成物質(Mono-constituent substance)：
    - 物理外觀、水溶性、其他相關物化特性
    - 化學鑑定：如 IUPAC 或 CAS 名稱、CAS 號碼、SMILES、InChI 碼、結構式、純度、不純物鑑定等 (包含有機碳組成)。
  - b. 多組成物質(multi-constituent substance)，UVBCs 及混和物：
    - 盡可能的進行化學特性檢定(如上述)、檢測組成含量及相關化學特性。

- (2) 測試生物：包含科學名稱、品系、來源、收集受精卵方法及相關操作。
- (3) 測試條件：
- 使用的測試條件(例如：半靜水式)。
  - 光週期。
  - 試驗設計 (例如：測試容器數目、控制組種類)。
  - 斑馬魚飼養環境的水質鑑定 (例如：pH 值、硬度、溫度、導電度、溶氧量)。
  - 應在開始及暴露後 96 小時後結束時，測試溶液的溶氧濃度、pH 值、總硬度、溫度、導電度。
  - 原液及測試溶液準備方法、更換溶液的頻率。
  - 如果使用水以外的溶劑，應提供使用及選擇的理由。
  - 分析測試化學物在測試容器內的測量值、偵測方法及測試極限。
  - 控制組符合整體存活標準的相關數據。
  - 卵的受精率。
  - 實驗組及控制組的孵化率。
- (4) 結果：
- 試驗過程中不造成死亡的最高濃度。
  - 測試過程中導致 100 %死亡的最低濃度。
  - 在建議觀察時間點的各濃度累計死亡率。
  - 48 小時及 96 小時的  $LC_{50}$  值，如果可能應在 95 %信賴區間。
  - 測試結束時之死亡率須以濃度曲線圖呈現。
  - 控制組的死亡 (負控制組、盤內控制組、正控制組、溶劑控制組)。
  - 4 個觀察時間點的實驗數據。
  - 外觀和生理異常的發生率和描述(如果有的話)。
  - 試驗過程中可能會影響實驗結果的任何事件。
  - 統計分析及數據處理 (使用 probit analysis、logistic regression model 和幾何平均計算  $LC_{50}$ )。
  - 利用回歸(regression)轉換過後的劑量-效應曲線之斜率及信賴區間。
  - 任何相關的指引或相關的解釋。
  - 結果的討論或詮釋

## 4.2 奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案

### 4.2.1 細胞培養模式之標準方法草案

#### 生物毒性檢測方法-小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)細胞培養(Cell culture)

##### 一、方法概要

本方法係將細胞收集，進行計數後，種植於10公分培養皿繼代或是種植於不同試驗容器中進行其它實驗。

##### 二、干擾

- (一) 細胞健康狀況不佳，導致繼代後產生飄起死亡的情形。
- (二) 因操作台或培養箱不乾淨，而導致細胞汙染。

##### 三、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658-TM。
- (二) 培養基: Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM), Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061。
- (三) 胎牛血清(FBS): HyClone, South Logan, UT, USA。
- (四) Antibiotic-Antimycotic solution (100×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML。
- (五) 控制設備：使用培養箱(NUAIR)，將細胞培養於37°C，5% 二氧化碳的培養環境。
- (六) 培養容器：10公分培養皿。
- (七) 血球計數盤:Mini Monitor Series 900, Morgan。

##### 四、試劑

- (一) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)。
- (二) Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: TRL02-100ML。
- (三) Trypan blue (0.2 % trypan blue powder 溶於1×PBS 中)。

##### 五、藥品保存

- (一) Trypsin-EDTA Solution 平時存放於-20°C冰箱，於實驗前置於37°C 水浴

槽內回溫。

(二) 細胞培養液與 PBS 平時存放於4°C冰箱，於實驗前置於37°C 水浴槽內回溫。

## 六、步驟

### 1. 配置含有 10% FBS 之 DMEM 細胞培養基 (500 ml)，並加入 Penicillin/Streptomycin (1×)

		<u>Final concentration</u>	
445 mL	DMEM with high glucose		
5 mL	Penicillin/Streptomycin (100×) µg/mL(1×) (10,000 U/mL/10,000 µg/mL)	100	U/mL/100
50 mL	FBS (heat inactivated)	10%	

### 2. 將 FBS 去補體 (heat inactivated)

將冷凍於-80°C冰箱內的 FBS，在室溫下解凍(可藉由流水沖洗加速解凍)。去補體前，先將水浴槽溫度升至56°C。將已經解凍的 FBS 放入水浴槽中，加熱至少30分鐘（偶爾搖晃）。冷卻後分裝等量體積於50毫升試管中，儲存在-20°C，備用。

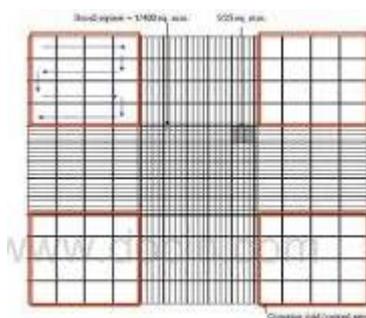
### 3. 細胞株

將裝有細胞株的凍管至液態氮桶中取出，於水浴槽中快速回溫。

1. 在15ml 離心管中裝2ml 培養液。待凍管中的細胞溶化成液態後，使用微量吸管將凍管中的細胞取至含 2ml 培養液的離心管中，並混合均勻。
2. 於1500rpm 離心3分鐘後抽除上清液，留下細胞，並回溶於1ml 的培養液中。將含有細胞的1ml 培養液種植於10公分培養皿中，待細胞生長至8~9分滿，即能進行繼代。
3. 試驗容器及相關器材之清洗：在操作台盡量使用酒精燈火烤使用的器具，例如：10c.c.塑膠吸管、培養液及 PBS 瓶口處、玻璃巴特氏管。
4. 接觸過樣品的塑膠器皿，不得重複使用。
- 5.

#### 4. Trypan blue dye exclusion assay-細胞計數

- (1) 細胞培養於培養皿中待長至8~9分滿時，依細胞繼代培養之方式，收集培養之細胞並加入適量之新鮮培養基，均勻混合成細胞懸浮液。
- (2) 取20  $\mu$ l 細胞懸浮液與20  $\mu$ l trypan blue 等體積混合均勻於0.5 ml 小離心管中；並由小離心管中取少許混合液約(15  $\mu$ l)至血球計數盤 chamber 上方凹槽注入，蓋上蓋玻片，於100 $\times$  倒立顯微鏡下觀察計數。
- (3) 數四個大方格之細胞總數，再除以4，乘以稀釋倍數(乘以2，因與 trypan blue 等體積混合)，最後乘以 $10^4$ ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞總數。若細胞位於線上，只計算上線與右線之細胞(或計算下線與左線之細胞)。
- (4) 4大格細胞總數/4  $\times$  2  $\times$   $10^4$ = 細胞數/ml。



#### 七、結果處理

以繼代細胞數量做為之後實驗種植細胞的參考，以及在各種不同容器中所需的細胞數，若是以2天做為細胞繼代的天數，則需種入的細胞密度約為 $8 \times 10^5$  cells/10 ml DMEM/ in 10 公分培養皿，3天約為 $7 \times 10^5$  cells/10 ml DMEM/ in 10 公分培養皿。

以下表格為目前依據測試結果在10 公分培養皿、6 公分培養皿、6 孔培養盤、24孔培養盤、96 孔培養盤進行加藥暴露前24小時，需要種入的細胞數 (種入細胞24小時後會達到8成滿的細胞數)：

10 cm dish (in 10 ml DMEM)	6 cm dish (5 in ml DMEM)	6 well plate (in 3 ml DMEM/well)	96 well plate (in 0.2 ml DMEM/well)
$1.2 \times 10^6$ cells	$6 \times 10^5$ cells	$3 \times 10^5$ cells	$1 \times 10^4$ cells

八、品質管制

略

九、精密度與準確度

略

十、參考資料

- (一) R W Holley and J A Kiernan., "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1968 May; 60(1): 300–304.
- (二) R. Ian Freshney., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition. 2000.

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄。

## 生物毒性檢測方法-小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)細胞存活率分析(MTT assay)

### 一、方法概要

本方法係以細胞模式檢測生物毒性，計算24及48小時之細胞存活率。MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，經還原酶琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 的作用下，tetrazolium 環會裂開，產生 Formazan 紫色沉澱，利用 DMSO 將 Formazan 溶解後，因為 Formazan 在570 nm 會有吸光值，可藉由 ELISA reader 測定570 nm 的吸光值，便可得到活細胞的比例，在一定細胞數範圍內，MTT 結晶形成的量與細胞數成正比。此方法已廣泛用於一些生物活性因子的活性檢測、大規模的抗腫瘤藥物篩選、細胞毒性試驗以及腫瘤放射敏感性測定等。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

### 三、干擾

- (一) 有些特定物質的吸收波段與偵測 MTT 的570nm 接近，會影響 ELISA reader 的讀值。
- (二) 細胞健康狀況不佳，影響實驗結果的偵測。
- (三) 種植在 96 孔培養盤之細胞密度太多或太少，影響實驗結果的偵測。
- (四) 實驗的時候需關閉操作台上的日光燈來避光。

### 四、設備與材料

- (一) 細胞株: 以 mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658TM 進行實驗。
- (二) 控制設備：使用培養箱(NUAIR)，將細胞培養於 37°C，5% 二氧化碳的培養環境培養容器：10 公分培養皿。
- (三) 試驗容器：96 孔培養盤。
- (四) 微量吸管。

### 五、試劑

- (一) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 ( Phosphate buffered saline , PBS )。
- (二) 細胞培養液：  
細胞培養液含下列成分：  
培養基： Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM),  
Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061  
胎牛血清(FBS)：HyClone, South Logan, UT, USA  
Antibiotic-Antimycotic solution (100×)：Caisson Laboratories, Inc. Catalog  
number: ABL02-100ML。
- (三) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT  
solution) (MDBio, Inc , Lot.M6021201)：以磷酸緩衝液( PBS )配製成(5  
mg/mL)，於 4°C下避光保存。
- (四) DMSO (MERCK , Germany , Catalog number:K42350131 , Lot.145)。
- (五) Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog  
number: TRL02-100ML

## 六、藥品保存

MTT 粉末和原液(stock solution)保存時都需要避光，用鋁箔紙包好即可，粉末保存於-20°C冰箱內、原液(stock solution)保存於4°C冰箱內。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 細胞培養：

- (1) 將8~9分滿的細胞利用 trypsin-EDTA 溶液使其自培養皿上脫落，計算其細胞數。
- (2) 使用八爪微量分注器將適量細胞種入96孔培養盤中，每格100 $\mu$ L (每格約 $1 \times 10^4$ 個細胞，可再依據密度多寡進行微調)，待隔天細胞貼壁，進行加藥處理。

#### 2. 試驗容器及相關器材之清洗：

- (1) 新的96孔培養盤，使用前須照射 UV。
- (2) 裝載細胞及加藥的容器為樣品槽，使用前從烘箱取出，於操作台照射 UV。

(3) 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。

(二) 範圍尋找試驗 (Range - finding test)

MTT assay 即為範圍尋找試驗，測試不同濃度之暴露物處理下的細胞存活率，進而得知半致死劑量。

(三) 確定試驗 (Definitive test)

1. 細胞暴露至反應時間後，進行 MTT assay，首先，將 well 中的培養基移除。
2. 使用 PBS 清洗一次。
3. 將濃度 5mg/mL 的 MTT 加入 PBS 中稀釋 10 倍，每格加入 100 $\mu$ L 的 MTT 混和液。
4. 放入 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養 2~4 小時。
5. 將盤中的 MTT 移除，留下紫色結晶。
6. 每格加入 100 $\mu$ L DMSO，並左右均勻搖晃。

八、結果處理

- (一) 以 ELISA 讀取儀測其吸光值，在波長 570nm 下測定細胞的 O.D. 值。
- (二) 存活率(%)=(處理組 O.D. 值/對照組 O.D. 值)  $\times$  100

九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過 10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若所測出的 O.D. 值低於 0.4 或是高於 1.4，則整個實驗必須重做。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率於 30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

十、精密度與準確度

略

十一、參考資料

- (一) Chan EL et al., Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic

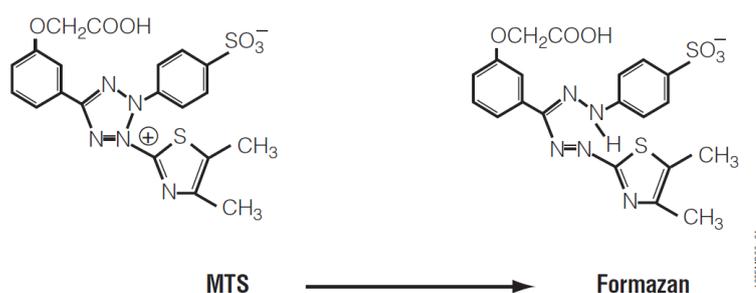
- irrigant, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2015 13;7:65-74.
- (二) Mirta Milić et al., Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells, *Journal of Applied Toxicology*. 2015 ;35(6):581-92.
- (三) Terry L Riss et al., *Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual*. 2017.

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄

## 細胞毒性檢測方法—小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)細胞存活率分析(MTS assay)

## 一、方法概要

MTS 為一種淡黃色的 tetrazolium 化合物。MTS assay 普遍應用於毒理中測試某些毒性化學物質對於細胞毒性強弱的方法，其原理為活細胞內之粒線體具有 NADPH 去氫酶（NADPH dehydrogenase）能使化學藥劑 MTS 轉化成可溶性且可經由吸收光定量的 formazan 染劑，然而死掉的細胞無此酵素活性，所以可作為細胞存活率的指標。



(Promega, Madison, Wisconsin)

## 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

## 三、干擾

- (一) 細胞培養箱及試驗室若未維持固定生長條件、器皿或試驗容器未徹底滅菌，會影響細胞生長情形且可能造成耐受性改變。
- (二) 細胞型態或狀況不佳，會影響細胞生長速度與細胞密度。
- (三) 有些特定物質的吸收波段與偵測 MTS 的 450-540 nm 接近，會影響 ELISA 讀取儀的讀值。

## 四、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658™。
- (二) 控制設備：使用培養箱(NUAIR)，將細胞培養於 37°C，5% 二氧化碳的培養環境培養容器：10 公分培養皿。

- (三) 試驗容器：96孔培養盤。
- (四) 微量吸管。

## 五、試劑

- (一) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)。
- (二) 細胞培養液：

細胞培養液含下列成分：

培養基: Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM), Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061

胎牛血清(FBS): HyClone, South Logan, UT, USA

Antibiotic-Antimycotic solution (100×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML。

- (三) Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: TRL02-100ML

## 六、藥品保存

- (一) 本試驗所使用之 MTS (stock solution)須保存於-20°C且避光保存。
- (二) 購買較大包裝之產品需分裝使用，避免多次重複退冰解凍。
- (三) 本試驗所使用之細胞培養液(含胎牛血清、抗生素)須保存於-20°C冰箱中。
- (四) 本試驗所使用之暴露藥劑須保存於4°C冰箱中。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 細胞培養：

- (1) 將8~9分滿的細胞利用 trypsin-EDTA 溶液使其自培養皿上脫落，計算其細胞數。
- (2) 使用八爪將適量細胞種入96孔培養盤中，每格100 $\mu$ L(每格約 $1\times 10^4$ 個細胞，可再依據密度多寡進行微調)，待隔天細胞貼壁，進行加藥處理。

#### 2. 試驗容器及相關器材之清洗：

- (1) 新的96孔培養盤，使用前須照射 UV。
- (2) 裝載細胞及加藥的容器為樣品槽，使用前從烘箱取出，於操作台照射 UV。
- (3) 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。

(二) 範圍尋找試驗 (Range - finding test)

MTT assay 即為範圍尋找試驗，測試不同濃度之暴露物處理下的細胞存活率，進而得知半致死劑量。

(三) 確定試驗 (Definitive test)

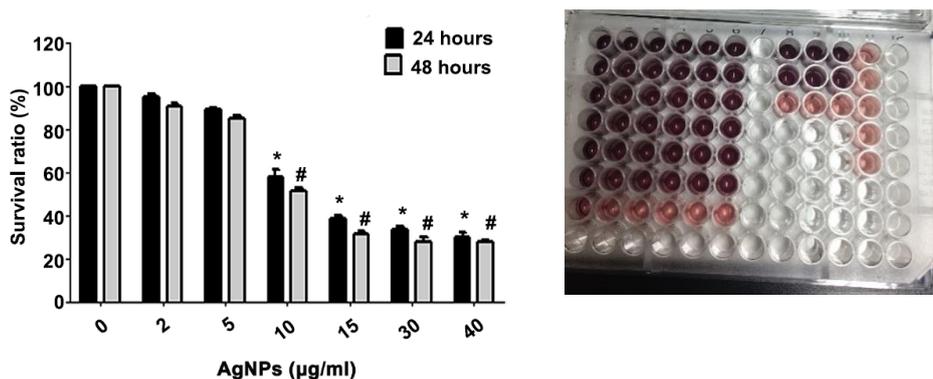
1. 細胞暴露至反應時間後，進行 MTT assay，首先，將 well 中的培養基移除。
2. 使用 PBS 清洗一次。
3. 將濃度5mg/mL 的 MTT 加入 PBS 中稀釋10倍，每格加入100 $\mu$ L 的 MTT 混和液。
4. 放入 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>的細胞培養箱中培養2~4小時。
5. 將盤中的 MTT 移除，留下紫色結晶。
6. 每格加入100 $\mu$ L DMSO，並左右均勻搖晃。

八、結果處理

- (一) 以 ELISA reader 測其吸光值，在波長490nm 下測定細胞的 O.D.值。
- (二) 存活率(%)=(處理組 O.D.值/對照組 O.D.值)  $\times$  100

結果示意圖：

以 MTS assay 分析經奈米銀暴露後之 NIH-3T3細胞存活情形。褐色越深代表存活的細胞愈多，實驗組吸光值除以控制組吸光值後 $\times$  100，可以獲得存活率(%)，量化圖如下所示。



## 九、品

## 質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過 10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若所測出的 O.D. 值低於空白試驗(NC)，則實驗必須重做或調整溶劑體積量。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於 30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

- (一) CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)(Promega, Catalog number:G3581)
- (二) Barltrop, J.A. *et al.* 1991. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611-4.
- (三) Saberi A, Shahbazi-Gahrouei D, Abbasian M *et al.* 2017. Gold nanoparticles in combination with megavoltage radiation energy increased radiosensitization and apoptosis in colon cancer HT-29 cells. *Int J Radiat Biol.* 93(3):315-323.

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄。

註2：結果處理及呈現是以實驗組的 O.D.值除以對照組 O.D.值所得百分比(以對照組知吸光值作為存活率100%)，以代表細胞在經過暴露後存活之比率。最後以圖呈現在不同濃度或時間暴露下細胞存活之比率。

## 細胞毒性檢測方法—LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit

### 一、方法概要

此方法是利用方便快捷的雙色分析試劑盒，可用於測定細胞群中細胞的活性。該試劑盒根據膜完整性和酯酶活性來區分活細胞和死細胞。該試劑盒可用於顯微技術、流式細胞測量儀或微孔板分析。此試劑盒含兩種化合物 **calcein acetoxymethyl (calcein AM)** 和 **ethidium homodimer**。**calcein AM** 為中性電荷的酯類物質，所以很容易藉由擴散進入細胞中。一旦進入細胞後，藉由細胞內的酯酶會轉變為 **calcein**(一種綠色螢光物質)。另一方面受傷或死亡的細胞會染到 **ethidium homodimer**，當染劑和核酸結合時會發出紅色螢光；而活細胞不會被 **ethidium homodimer** 所染上。使用激發光495 nm 照射後 **calcein AM** 和 **ethidium homodimer** 分別會散發出515 nm 和 635 nm 的螢光。此種方法就是依據細胞的物理和生化特性偵測細胞存活率；另外，此種方法的螢光背景值是很低的，因為這兩種染劑未和細胞作用前本身是不具螢光的。此方法具有快速、便宜、安全、高敏感性等優點，廣泛應用於動物細胞的存活率和細胞毒性的偵測。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

### 三、干擾

- (一) 細胞培養箱及實驗室若未維持固定生長條件、器皿或試驗容器未徹底滅菌，會影響細胞生長情形且可能造成耐受性改變。
- (二) 細胞型態或狀況不佳，會影響細胞生長速度與細胞密度。

### 四、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658™。
- (二) 細胞培養箱。
- (三) 培養容器：塑膠材質之10 cm 細胞培養皿。
- (四) 試驗容器：塑膠材質之6孔培養盤。
- (五) 上樣管 (Flow Tube)：Falcon，Catalog number: 22315058。

- (六) 流式細胞儀：使用 Flow Cytometry FACScalibur：BD Biosciences。
- (七) 正立式免疫螢光顯微鏡 (BX51, OLYMPUS)
- (八) 微量吸管。
- (九) 蓋玻片(22×22 mm)與載玻片(1"×3")

## 五、試劑

- (一) LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit

內含：

Calcein AM (Component A): 4 mM 原液(stock)溶於 DMSO 中, 40  $\mu$ L/vials, 一共有2管

Ethidium homodimer-1 (Component B): 2 mM 原液(stock)溶於 DMSO/H<sub>2</sub>O 1:4 (v/v) 200  $\mu$ L/vials, 一共有2管

- (二) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)。
- (三) 細胞培養液：

細胞培養液含下列成分：

培養基: Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM), Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061

胎牛血清(FBS): HyClone, South Logan, UT, USA

Antibiotic-Antimycotic solution (100 $\times$ ): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML。

- (四) Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10 $\times$ ): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: TRL02-100ML
- (五) DMSO (MERCK, Germany, Catalog number:K42350131, Lot.145)

## 六、藥品保存

- (一) 試劑組內的試劑需要密封、避光並且儲存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的冰箱內。試劑使用

前可進行回溫與短暫的離心。使用過後的試劑可密封後重新冷凍。**Calcein AM** 遇到濕氣容易產生水解作用，因此配置好的作用溶液 (working solution) 必須在1天內用完，無法進行保存。**Ethidium homodimer-1**對於濕氣較不敏感，試劑本身較為穩定，原液與稀釋液可冷凍保存於 $\leq -20^{\circ}\text{C}$  的冰箱內至少1年。

- (二) 本試驗所使用之細胞培養液(含胎牛血清、抗生素)須保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。
- (三) 本試驗所使用之暴露藥劑須保存於 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 細胞培養：

- (1) 10 cm 細胞培養皿生長至8-9分滿之細胞，利用 Trypsin-EDTA 溶液使細胞自培養皿脫落，計數細胞後，將細胞培養至6孔盤。

細胞密度： $2 \times 10^5$  cell/well(視細胞程度微調)

培養基體積：3000  $\mu\text{l}$ /well

- (2) 待24小時後，細胞貼附於孔盤中即可開始試驗

#### 2. 試驗容器及相關器材之準備：

- (1) 新的塑膠器皿，使用前須照射紫外光燈進行殺菌。
- (2) 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。
- (3) 準備一支乾淨的鑷子，用來夾蓋玻片。

### A. 流式細胞儀量化 (Flow Cytometry Protocol: Viability Assay)

- 1. 將細胞種於6孔盤，貼壁24小時
- 2. 24小時後移除原培養基，並加入2 ml/well 含不同濃度暴露物之培養基
- 3. 細胞暴露至反應時間後，移除原培養基，加入1 ml PBS 洗滌細胞表層
- 4. 移除 PBS，加入 Trypsin-EDTA 溶液 500  $\mu\text{l}$  於 well 中，放置 $37^{\circ}\text{C}$ 恆溫箱3分鐘後使細胞脫落

5. 加2 ml 培養基終止反應，用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊並收集至15 ml 離心管
6. 離心2000 rpm、4°C、5分鐘，結束後移除上清液，以1 ml 的 PBS/細胞培養基回懸至少 $0.1 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL 的細胞量
7. 將 Calcein AM (Component A)試劑以 DMSO 稀釋80倍，得到濃度為50  $\mu$ M 的作用溶液 (working solution)
8. 每 $1 \times 10^6$ 細胞所需之染劑濃度為50  $\mu$ M calcein AM 作用溶液 2  $\mu$ L，加上2 mM ethidium homodimer-1 原液(stock) 4  $\mu$ L。(也就是每毫升需要 calcein AM working solution, 2  $\mu$ L; ethidium homodimer-1, 4  $\mu$ L)
9. 在室溫下避光培養15~20 min
10. 上流式細胞儀(Flow cytometry)，使用 FL1、FL2 channel 偵測

#### **B. 螢光顯微鏡觀察(Fluorescence Microscopy Protocol)**

1. 將蓋玻片(22×22 mm)先過火，用鑷子夾著稍微烤一下(滅菌用)，再放入孔盤 (每個 well 中各含一片蓋玻片)，直接培養細胞，讓細胞貼壁在上面，貼壁24 小時
2. 24小時後移除原培養基，並加入2 ml/well 含不同濃度暴露物之培養基
3. 細胞暴露至反應時間後，移除原培養基，接著沿壁緣加1 ml PBS，洗1~2次(稍微搖動即可)，不可直接沖玻片，此舉為將染劑之非特異性的物質洗掉(把雜質洗掉，避免干擾)
4. 收細胞前可先配好染劑：
  - (1) 使用前5分鐘先在室溫下回溫 Live/Death solution.  
(即 Component A: 4 mM calcein AM 與 Component B: 2 mM EthD-1)
  - (2) Component A 可先以 DMSO 稀釋10倍(濃度變成400  $\mu$ M)後，再進行染劑的混合配置
  - (3) 將 Component A 與 Component B 染劑稀釋並配置於同一管 PBS 中，染劑最終濃度為2  $\mu$ M calcein AM 與4  $\mu$ M EthD-1 作用溶液 (working solution)，每個樣本所需染劑體積為20~50  $\mu$ l

$$\boxed{2 \text{ mM EthD-1}} + \boxed{\text{D-PBS}} - *$$

$2 \text{ mM(要再稀釋)} \times V1 = 4 \text{ }\mu\text{M} \times V2(\text{估計要的總體積數})$

**4 mM calcein AM** + **上述之溶液\***

$4 \text{ mM(要再稀釋)} \times V1 = 2 \text{ }\mu\text{M} \times V2(\text{估計要的總體積數})$

5. 載玻片先滴上50  $\mu\text{l}$  染劑，體積量視情況而定，但至少需要20 $\lambda$ 。(較粗糙那面可標組別寫字)
6. 接著小心夾起6孔盤中的蓋玻片，不可硬夾，否則蓋玻片會碎掉
7. 注意事項：細胞長在蓋玻片的上方(正面)，因此要反向過來蓋在載玻片上，染劑才染得到細胞
8. 再將蓋玻片反向45度角傾斜慢慢蓋上，不要有氣泡。(避免顯微鏡觀察時受到干擾)
9. 放在紙巾上並且置於盒內避光，於室溫下靜置作用30-45分鐘(作用時間依染劑濃度與室溫而定)
10. 使用正立式螢光顯微鏡拍照

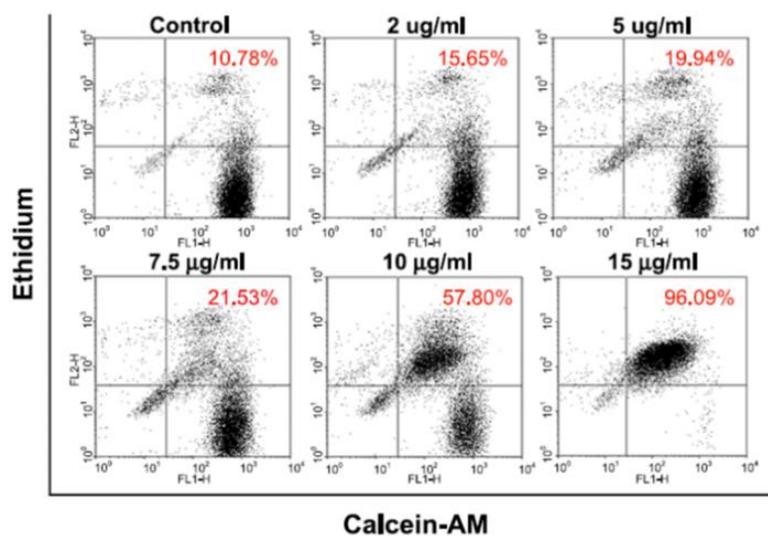
## 八、結果處理

(一) 統計軟體：

### **流式細胞儀量化 (Flow Cytometry Protocol: Viability Assay)**

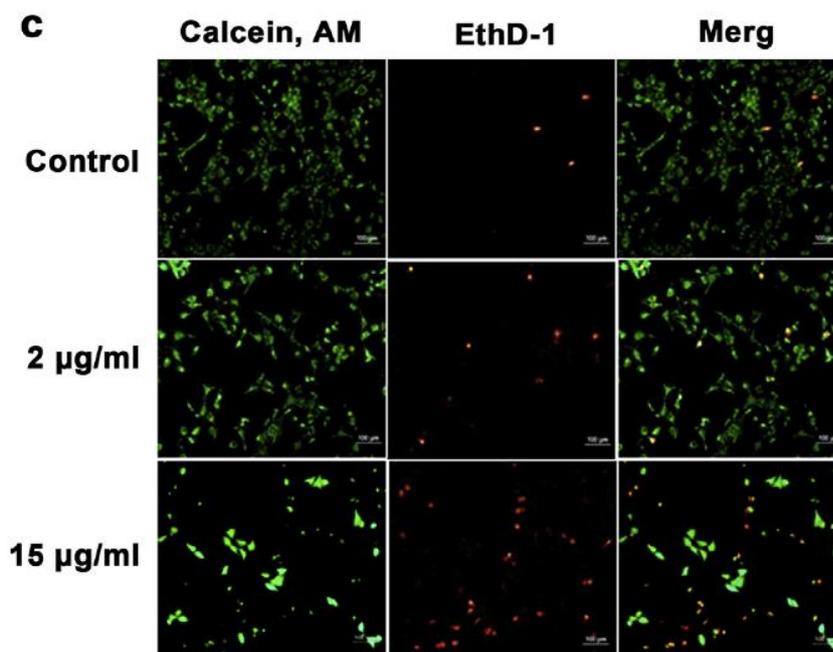
上機後之數據使用 Flow jo 等第三方軟體開啟 FSC 檔案進行分析，使用未暴露藥物之控制組細胞分布 dot 圖拉出象限分隔線。橫坐標 FL1-H(Calcein-AM) 表示存活的細胞；縱坐標 FL2-H(Ethidium)表示死亡或死亡中(dying cell)的細胞。染到 Ethidium 紅螢光的細胞，以 Flow jo 軟體進行量化，獲得細胞死亡的百分比。

結果示意圖：



(二) 螢光顯微鏡分析：

以 Live/Dead cell viability assay 分析經物質暴露後之 NIH-3T3 細胞死亡情形。綠色螢光代表存活的細胞；紅色螢光代表死亡或死亡中(dying cell)的細胞。



## 九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若細胞死亡百分比大於空白試驗，則該次之試驗結果不可採用。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

- (一) LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit, Thermo Fish Scientific. Catalog number: L3224
- (二) Principles and Methods of Toxicology, Third Edition, A.W. Hayes, Ed., Raven Press.1994. pp. 1231–1258
- (三) Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. 1996. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. J Cell Biol. 133(5):1041-51.

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄。

## 生物急毒性檢測方法—小鼠纖維母細胞 (NIH-3T3) 細胞氧化壓力分析 (DCFH-DA assay)

### 一、方法概要

本方法係以小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)為試驗生物，利用 DCFH-DA 螢光探針進行活性氧檢測[174, 175]。DCFH-DA 本身沒有螢光，可以自由穿過細胞膜，進入細胞內後，可以被細胞內的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透細胞膜，從而使探針很容易被裝載到細胞內。細胞內的活性氧可以氧化無螢光的 DCFH 生成有螢光的 DCF。檢測 DCF 的螢光就可以知道細胞內活性氧的水準。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

### 三、干擾

分子量 3 kDa 以上的化合物、巨大分子和會限制可利用性，會降低毒性敏感度。

### 四、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658TM。
- (二) 細胞培養箱。
- (三) 培養容器：塑膠材質之10 cm 細胞培養皿。
- (四) 試驗容器：塑膠材質之6孔培養盤。
- (五) 上樣管 (Flow Tube)：Falcon，Catalog number: 22315058。
- (六) 流式細胞儀：使用 Flow Cytometry FACScalibur：BD Biosciences。
- (七) 微量吸管。

### 五、試劑

- (一) 細胞培養液：
- (二) 細胞培養液含下列成分：
- (三) 培養基: Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM),

Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061

- (四) 胎牛血清(FBS): HyClone, South Logan, UT, USA
- (五) Antibiotic-Antimycotic solution (100×): Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML
- (六) Trypsin-EDTA Solution 0.05%
- (七) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline , PBS)

10倍 PBS 含下列成分(使用前將其稀釋十倍) (試藥級以上):

MQ water 1900ml

氫氧化鈉 (NaCl) 160g

氯化鉀(KCl) 4g

磷酸一氫鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 15.26g

磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 4.8g

PH=7.4

- (八) DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (ab113851)

#### 六、藥品保存

- (一) 本試驗所使用之螢光染劑 DCFDA stock solution 須避光保存於-20°C冰箱中。
- (二) 本試驗所使用之細胞培養液(含胎牛血清、抗生素)須保存於-20°C冰箱中。
- (三) 本試驗所使用之暴露藥劑須保存於4°C冰箱中。

#### 七、步驟

- (一) 試驗準備

細胞培養：

- (1) 10 cm 細胞培養皿生長至8-9分滿之細胞，利用 Trypsin-EDTA 溶液使細胞自培養皿脫落，計數細胞後，將細胞培養至6孔盤。  
細胞密度： $2 \times 10^5$  cell/well(視細胞程度微調)  
培養基體積：3000  $\mu\text{l}$ /well

(2) 待24小時後，細胞貼附於孔盤中即可開始試驗

試驗容器及相關器材之準備：

(3) 新的塑膠器皿，使用前須照射紫外光燈進行殺菌。

(4) 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。

(二) 範圍尋找試驗 (Range - finding test)

利用細胞存活率之試驗濃度範圍進行確定試驗

(三) 確定試驗 (Definitive test)

1. 細胞經24小時貼壁後，移除原培養基，並加入2 ml/well 含不同濃度暴露物之培養基。
2. 細胞暴露至反應時間後，移除原培養基，加入1000  $\mu$ l PBS 洗滌細胞表層，加入2ml 含40 $\mu$ M DCFH-DA 的培養基作用1小時。
3. 移除原培養基，加入1000  $\mu$ l PBS 洗滌細胞表層，移除 PBS，使用 Trypsin-EDTA 溶液 500  $\mu$ l 放置37  $^{\circ}$ C恆溫箱、3分鐘使細胞脫落。
4. 加2 ml 細胞培養液終止反應，用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊並收集至15 ml 離心管。
5. 離心2000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分鐘，結束後移除上清液，加1ml PBS 用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞。
6. 離心2000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分鐘，抽掉上清液後每一個樣品加入500  $\mu$ l，用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊後移至上樣管。上流式細胞儀，使用 FL1 channel 偵測。
7. 將結果另存新檔成 FSC 檔案格式，再以 Flow jo 等第三方軟體進行分析。

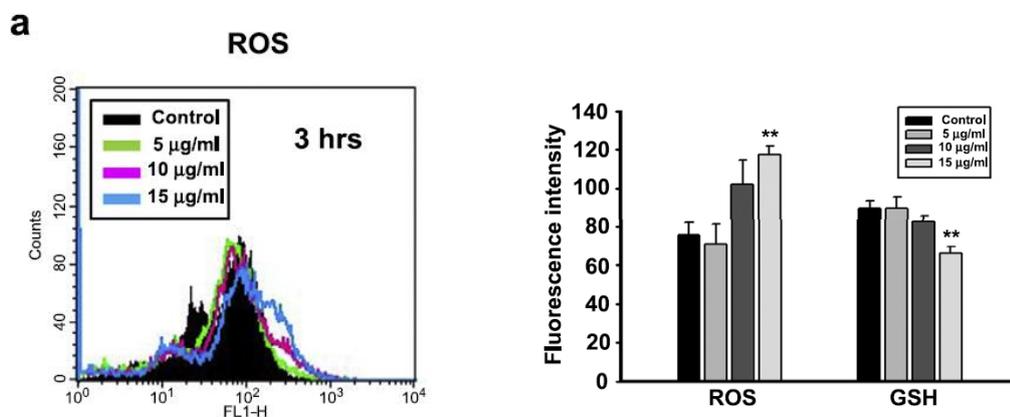
八、結果處理

樣品自由基程度計算：

1. 以 Flow jo 等第三方軟體開啟 FSC 檔案，將圖形之 X 軸調整成 FL1，Y 軸調整成數量。
2. 計算各圖形螢光之平均值，進行量化後以長條圖呈現結果。
3. 利用疊圖功能將各圖形呈現於同一張示意圖中，以比較各組別自由基產生程度。

結果示意圖：

以 DCFH-DA 染劑分析經奈米銀暴露後之 NIH-3T3 細胞 ROS 生成情形。圖形向右位移表示綠色螢光強度增強，ROS 的生成量增加。右圖為量化示意圖。



## 九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若細胞死亡率超過10%或大於空白試驗，則該次之試驗結果不可採用。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

- (一) Curtin JF. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*.
- (二) Kang HS. 2004. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ros) generation. *Arch Pharm Res*.

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄。

## 生物急毒性檢測方法—小鼠纖維母細胞(NIH-3T3) 細胞自噬分析 (Autophagy assay)

### 一、方法概要

本方法係以小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)為試驗生物，將處理過後的細胞與吖啶橙 (acridine orange, AO) 結合進行染色，其特性是能與因細胞自噬而產生的酸性囊狀胞器相結合[176, 177]，再以流式細胞儀定量分析來檢測細胞自體吞噬作用的程度。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

### 三、干擾

分子量 3 kDa 以上的化合物、巨大分子和會限制可利用性，會降低毒性敏感度。

### 四、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number: CRL-1658TM。
- (二) 細胞培養箱。
- (三) 培養容器：塑膠材質之10 cm 細胞培養皿。
- (四) 試驗容器：塑膠材質之6孔培養盤。
- (五) Flow Tube：Falcon，Catalog number: 22315058。
- (六) 流式細胞儀：使用 Flow Cytometry FACScalibur：BD Biosciences。
- (七) 微量吸管。

### 五、試劑

- (一) 細胞培養液：
- (二) 細胞培養液含下列成分：  
培養基： Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM), Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061

胎牛血清(FBS)：HyClone, South Logan, UT, USA

Antibiotic-Antimycotic solution (100×)：Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML

(三) Trypsin-EDTA Solution 0.05%

(四) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline , PBS)

10倍 PBS 含下列成分(使用前將其稀釋十倍) (試藥級以上)：

MQ water 1900ml

氫氧化鈉 (NaCl) 160g

氯化鉀(KCl) 4g

磷酸一氫鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 15.26g

磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 4.8g

PH=7.4

(五) Acridine orange (Thermo Fisher Scientific A-3568 content approx. 90%)

#### 六、藥品保存

(一) 本試驗所使用之螢光染劑 Acridine orange stock solution (100  $\mu\text{g/ml}$ )須避光保存於4°C冰箱中。

(二) 本試驗所使用之細胞培養液(含胎牛血清、抗生素)須保存於-20°C冰箱中。

(三) 本試驗所使用之暴露藥劑須保存於4°C冰箱中。

#### 七、步驟

(一) 試驗準備

細胞培養：

1. 10 cm 細胞培養皿生長至8-9分滿之細胞，利用 Trypsin-EDTA 溶液使細胞自培養皿脫落，計數細胞後，將細胞培養至6 孔盤。

細胞密度：2 x 10<sup>5</sup> cell/well(視細胞程度微調)

培養基體積：3000  $\mu\text{l/well}$

2. 待24小時後，細胞貼附於孔盤中即可開始試驗

試驗容器及相關器材之準備：

1. 新的塑膠器皿，使用前須照射紫外光燈進行殺菌。
2. 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。

(二) 範圍尋找試驗 (Range - finding test)

利用細胞存活率之試驗濃度範圍進行確定試驗

(三) 確定試驗 (Definitive test)

1. 細胞經24小時貼壁後，移除原培養基，並加入2 ml/well 含不同濃度暴露物之培養基。
2. 細胞暴露至反應時間後，移除原培養基，加入1000  $\mu$ l PBS 洗滌細胞表層。
3. 移除 PBS，使用 Trypsin-EDTA 溶液 500  $\mu$ l 放置37 $^{\circ}$ C恆溫箱、3分鐘使細胞脫落。
4. 加2 ml 細胞培養液終止反應，用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊並收集至15 ml 離心管。
5. 離心2000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分鐘，結束後移除上清液，加1ml PBS 用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞。
6. 準備 AO working solution：原液 stock (100  $\mu$ g/ml)，以 PBS 稀釋100倍，並準備符合樣品數之體積(每一個樣品加入500  $\mu$ l AO working solution)。
7. 離心2000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分鐘，抽掉上清液後每一個樣品加入500  $\mu$ l AO solution，用微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊後移至上樣管避光作用15分鐘。
8. 上流式細胞儀，使用 FL1、FL3 channel 偵測(AO 螢光容易衰退，要盡速偵測完畢)。
9. 將結果另存新檔成 FSC 檔案格式，再以 Flow jo 等第三方軟體進行分析。

## 八、結果處理

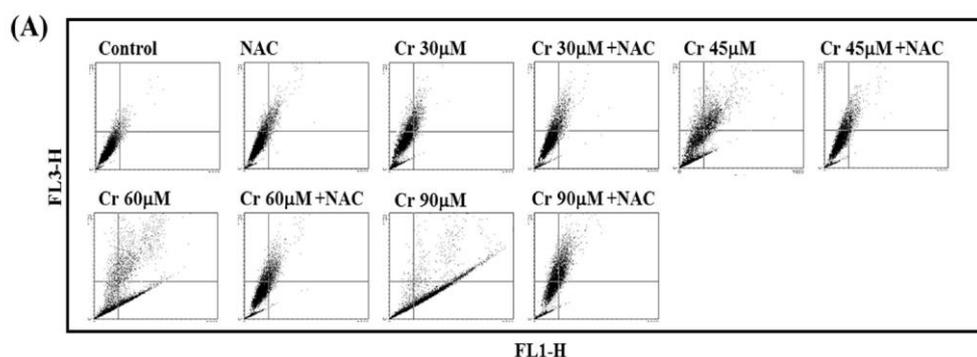
樣品自體吞噬作用程度計算：

1. 以 Flow jo 等第三方軟體開啟 FSC 檔案，將圖形之 X 軸調整成 FL1，Y 軸調整成 FL3。

2. 設定象限分界線，將控制組 FL3+區域比例設定在5%。
3. 紀錄各實驗組 FL3+區域比例，以此作為樣品自體吞噬作用程度。

結果示意圖：

以 AO 染劑分析經六價鉻暴露後之 HaCaT 細胞自體吞噬(Autophagy)生成情形。流式細胞分析儀之圖形向右上方位移表示橙色螢光強度增強，Autophagy 的生成量增加。



#### 九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若細胞死亡率超過10%或大於空白試驗，則該次之試驗結果不可採用。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

#### 十、精密度與準確度

略

#### 十一、參考資料

- (一) Daido S. 2004. Pivotal role of the cell death factor bnip3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *CANCER RESEARCH*.
- (二) Ren Y. 2009. Autophagy inhibition through pi3k/akt increases apoptosis by sodium selenite in nb4 cells. *BMB reports*

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄

## 細胞毒性檢測方法－Annexin V&PI 雙染 Apoptosis/Necrosis 測試

### 一、方法概要

流式細胞術是一種生物學技術，用於對懸浮於流體中的微小顆粒進行計數和分選。這種技術可以用來檢測流過光學或電子檢測器的一個個細胞的螢光信號，並進行定性定量與多種參數分析。

細胞膜內的磷脂絲氨酸 (Phosphatidyl Serine, PS) 暴露到膜外，是細胞凋亡的早期變化之一。健康的細胞膜有一不對稱性(asymmetry)，即 PS 只存在胞膜內層而不外露，此不對稱性之維持，需借助一套酵素酶系統與能量 ATP，而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，故而無法維持此不對稱性，而使得磷脂絲氨酸外露。Annexin V 是一種鈣依賴性的磷脂結合蛋白，它與 PS 具有高度的親和力，因此可以作為檢測暴露在細胞膜表面 PS 的探針。碘化丙啶(propidine iodide, PI)是一種核酸染料，它不能透過完整的細胞膜，但在凋亡中晚期的細胞和死細胞，PI 能夠透過細胞膜而使細胞核染色。同時結合使用 PI 雙染後，進行流式細胞儀的分析，該方法可以區分活細胞、壞死細胞及凋亡細胞。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及環境用藥對哺乳類細胞株之生物毒性檢測。

### 三、干擾

- (一) 細胞培養箱及實驗室若未維持固定生長條件、器皿或試驗容器未徹底滅菌，會影響細胞生長情形且可能造成耐受性改變。
- (二) 細胞型態或狀況不佳，會影響細胞生長速度與細胞密度。

### 四、設備與材料

- (一) 細胞株: mouse embryonic fibroblast cell line, ATCC Number : CRL-1658TM。
- (二) 細胞培養箱。
- (三) 培養容器：塑膠材質之10 cm 細胞培養皿。
- (四) 試驗容器：塑膠材質之6孔培養盤。
- (五) 上樣管：Falcon，Catalog number: 22315058。
- (六) 流式細胞儀：使用 Flow Cytometry FACScan：BD Biosciences。
- (七) 微量吸管。

## 五、試劑

(一) 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)。

(二) 細胞培養液：

細胞培養液含下列成分：

培養基：Dulbecco's Modified eagle medium high glucose (DMEM), Thermo Fish Scientific. Catalog number: 12100061

胎牛血清(FBS)：HyClone, South Logan, UT, USA

Antibiotic-Antimycotic solution (100×)：Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: ABL02-100ML

(三) Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10×)：Caisson Laboratories, Inc. Catalog number: TRL02-100ML

(四) Binding buffer：

Binding buffer 含下列成分：

0.1M (pH7.4) HEPES

3M NaCl

25mM CaCl<sub>2</sub>

(五) Annexin V：100 tests，BD Biosciences，Catalog number: 556547

(六) Propidine iodide (PI)：50μg/mL，BD Biosciences，Catalog number: 556547

## 六、藥品保存

(一) 本試驗所使用之螢光染劑 Annexin V/ Propidine iodide 以及 Binding buffer 須保存於4°C冰箱中。

(二) 本試驗所使用之細胞培養液(含胎牛血清、抗生素)須保存於-20°C冰箱中。

(三) 本試驗所使用之暴露藥劑須保存於4°C冰箱中。

## 七、步驟

## (一) 試驗準備

細胞培養：

1. 10 cm 細胞培養皿生長至8-9分滿之細胞，利用 Trypsin-EDTA 溶液使細胞自培養皿脫落，計數細胞後，將細胞培養至6 孔盤。

細胞密度： $2 \times 10^5$  cell/well(視細胞程度微調)

培養基體積：3000  $\mu$ l/well

2. 待24小時後，細胞貼附於孔盤中即可開始試驗。

試驗容器及相關器材之準備：

- (一) 新的塑膠器皿，使用前須照射紫外光燈進行殺菌。
- (二) 接觸過樣品溶液的耗材，不得重複使用。

## (二) 範圍尋找試驗 (Range - finding test)

利用細胞存活率之試驗濃度範圍進行確定試驗。

## (三) 確定試驗 (Definitive test)

1. 細胞經24小時貼壁後，移除原培養基，並加入2 ml/well 含不同濃度暴露物之培養基。
2. 細胞暴露至反應時間後，移除原培養基，使用冰的1×PBS 洗滌細胞表層1至2次。
3. 加入1 ml Trypsin-EDTA 溶液，使其均勻覆蓋細胞表層並放入37°C恆溫箱3分鐘，將6孔盤取出後輕敲使細胞輕自培養皿壁脫落，加入適量 PBS 收集至15 ml 離心管，2000 rpm，4 °C，離心5分鐘後去除上清液。
4. 加入適量之1×PBS，以微量吸管上下吸放數次以均勻打散並沖洗細胞團塊，混和均勻後，再以2000rpm，4°C，離心5分鐘後去除上清液。
5. 以目測觀察細胞多寡，並加入適量之 Binding buffer，以微量吸管上下吸放數次以均勻打散細胞團塊，並使細胞液濃度約在 $1 \times 10^6$  cell/mL，每個 sample 取出100 $\mu$ L 至 Flow Tube 中。
6. 於 Flow Tube 中加入 PI 染劑5 $\mu$ L 與 Annexin V 染劑5 $\mu$ L，除樣品之

外需另外準備 negative、Annexin V alone、PI alone 之組別，並在室溫下避光反應15~30分鐘。

7. 於染劑反應時間結束時加入400 $\mu$ L 之 Binding buffer 終止反應，並在1小時內以流式細胞儀偵測樣品。

## 八、結果處理

### (一) 統計軟體：

上機後之數據使用 Flowjo 軟體進行分析，使用未暴露藥物之控制組細胞分布 dot 圖拉出象限分隔線，定義第一象限為晚期凋亡細胞、第二象限為細胞壞死、第三象限為存活細胞、第四象限為早期凋亡細胞，並將此象限套用至所有數據。

### (二) 細胞凋亡百分比計算：

將晚期細胞凋亡與細胞壞死之百分比相加，定義為細胞死亡率，並以量化之長條圖表示。

## 九、品質管制

(一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若細胞死亡率超過10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

(二) 內對照試驗(iC)：每次試驗皆暴露相對應之最高濃度組別之溶劑體積量。若細胞凋亡百分比超過10%或大於空白試驗，則該次之試驗結果不可採用。

(三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若正控制組所誘發之 apoptosis 比率低於30%，該試驗結果不可採用，必須重做。

## 十、精密度與準確度

略

## 十一、參考資料

- (一) FITC Annexin V apoptosis detection kit，BD Biosciences，Catalog number: 556547
- (二) Chia Han Tsai, Chien Chun Li .2017. Docosahexaenoic acid, an omega-3 fatty acid, induces autophagy in human breast cancer cells: role of oxidative stress-induced growth inhibitor 1. FASEB J. 31(7):135.7

- (三) Wei Ge, Yong Zhao, Fang-Nong Lai, Jing-Cai Liu, Yuan-Chao Sun, Jun-Jie Wang, et ai. Cutaneous applied nano-ZnO reduce the ability of hair follicle stem cells to differentiate. NANOTOXICOLOGY.11(4):465-474

註1：執行毒性試驗後之試驗細胞須廢棄。

#### 4.2.2 體內斑馬魚胚胎模式奈米毒性標準方法草案

##### 一、方法概要

本方法係以斑馬魚(*Danio rerio*)之胚胎為試驗生物，以半靜水式(semi-static)生物毒性試驗方法，每 24 小時更換測試奈米溶液，檢測斑馬魚胚胎急毒性，計算96小時之半致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC<sub>50</sub>) 並觀察紀錄胚胎之型態及量測胚胎之體長。

##### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水、環境用藥及新興化學物品(包括奈米材料)對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。

##### 三、干擾

- (一) 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體侵入、馴養水或稀釋水含有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨殘留有毒物質，會影響斑馬魚健康且可能造成耐受性改變。
- (二) 生物有病或健康狀況不佳，影響產卵及孵化率。
- (三) 分子量3 kDa 以上的化合物、巨大分子和會引起延遲孵化之物質，可能對胚胎生物可利用性限制，會降低毒性敏感度。
- (四) 測試物質為混合物時，必須盡可能的鑑定特性，如化學成分組成、含量比例、物質的專一特性、物理及化學特性等，以了解此胚胎檢測毒性模式是否適用於測試物質。
- (五) 測試物質為奈米材料時，須以膠體溶液形式存在，其奈米微粒之分散性及粒徑會影響毒性之結果。

##### 四、設備與材料

- (一) 斑馬魚: 試驗中所使用之斑馬魚為野生種斑馬魚 (Wild-type AB strain zebrafish, *Danio rerio*)，使用3至6月齡且全長(上顎前端至尾鰭後端的長度) 2.0 至3.0 公分之性成熟斑馬魚(圖4.2)，雄魚體型具流線型，臀鰭較母魚長，在魚鰭末端，時常可看到有明顯的黃色出現，而雌魚在性成熟後，卵囊會形成卵，肚子開始膨大，臀鰭較公魚來得小、短且較圓，魚鰭末端有時也有黃色出現，但相對於公魚出現的時間比較少。本試驗所使用的是性成熟雄雌斑馬魚所產之受精卵來進行試驗。斑馬魚可購自台灣斑馬魚核心設施或市面繁殖場或自行繁殖。(註1)

- (二) 生物馴養及毒性試驗室：須與其他化學實驗室區隔之獨立空間、通風良好、化學氣體影響，且可屏蔽外界干擾（如噪音、震動、強光及人為騷擾等），光照強度同一般工作亮度，光照時間應維持在每天  $14 \pm 2$  小時。
- (三) 飼養容器：材質為化學鈍性材料(如玻璃或塑膠)，且符合建議容載量，本實驗室使用實驗魚動物房循環養殖系統(圖4.3)作為飼養容器，魚缸為塑膠材質，並具有水循環過濾裝置。
- (四) 溫度控制設備：可使用循環式水浴槽、培養箱、加溫控制裝置等方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在  $28 \pm 1$  °C。  
\*建議馴養於  $26-28 \pm 1$  °C
- (五) 時間(光週期)控制器：時間控制器裝置於養殖系統，以維持斑馬魚之光週期14:10 (14小時亮，10小時暗)。
- (六) 採樣容器：玻璃或塑膠材質。如使用塑膠材質容器，不可重複使用。
- (七) 試驗容器：玻璃或 polystyrene 材質之24 孔培養盤，孔格直徑約16 mm，每孔容量2.5 mL 以上。若物質（例如：非極性、平面化合物，具有高 KOW）可能會吸附到聚苯乙烯上，則應使用惰性材料（玻璃）來降低因吸附造成的損失。
- (八) 產卵容器(配對盒)：由玻璃、不鏽鋼、塑膠或其他惰性材料構成，並有篩網（網格大小  $2 \pm 0.5$  mm），以保護新生的卵不被成魚吃掉，且容器中間具有可移除之隔板(圖4.4)。
- (九) 收集魚卵之器具：篩網大小合適且具握柄的軟質尼龍網。
- (十) 培養皿：玻璃或塑膠材質，直徑 9 cm 以上，用於收集魚卵。
- (十一) 移液管：玻璃或塑膠材質。
- (十二) 溫度監測裝置：須可顯示毒性試驗期間之最高及最低水溫。
- (十三) 水質檢測設備及試劑：pH 計、導電度計；總硬度(GH)、碳酸鹽硬度(KH)、硝酸鹽( $\text{NO}_3$ )及亞硝酸鹽( $\text{NO}_2$ )、銨/氨、溶氧量檢測試劑組。
- (十四) 分析天平：待測物重量大於2 g 時，須能精秤至0.01 g；待測物重量不大於2 g 時，須能精秤至0.001 g。
- (十五) 魚飼料：飼料須考量適口性，大小須適合斑馬魚，建議使用市售超細微粒、半沉浮性魚飼料或豐年蝦等。

- (十六) 倒立式光學顯微鏡或解剖光學顯微鏡：放大倍率須達80倍以上。
- (十七) 曝氣設備。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：比電阻值須大於 10 MΩ-cm。
- (二) 稀釋水：
- (三) 稀釋水含下列成分（試藥級以上）：

碳酸氫鈉 (NaHCO<sub>3</sub>) 63.0 mg/L

七水硫酸鎂 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 123.3 mg/L

氯化鉀 (KCl) 5.5 mg/L

二水氯化鈣 (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 294.0 mg/L

配製量可根據檢測需求量，依配方比例配製。將試藥溶解於試劑水後，劇烈曝氣至少 8 小時，硬度須為 200 至 250 mg CaCO<sub>3</sub>/L，pH 須為6.5 至8.5，若需調整 pH，須以氫氧化鈉或鹽酸進行。避光冷藏保存不宜超過 14 天。

- (四) 馴養水：可使用稀釋水、去氯自來水（註2）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應為 200 至 250 mg CaCO<sub>3</sub>/L，pH 須為6.5至8.5，可混合適量之逆滲透水或試劑水進行調整。

## 六、採樣與保存

- (一) 水樣採樣方法參照「監測井地下水採樣方法 (NIEA W103)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣通則 (NIEA W104)」、「事業放流水採樣方法 (NIEA W109)」。
- (二) 水樣採樣時樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。採樣後立即避光保存於 4 ± 2 °C。
- (三) 水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行確定試驗。
- (四) 環境用藥採樣時應採取足夠供給檢測之數量。樣品為已包裝完善且密封完整之環境用藥成品時，以原包裝在室溫保存。
- (五) 奈米材料應保存於 4 °C 且避光，暴露前須以超音波震盪儀進行震盪。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 斑馬魚馴養：

- (1) 從廠商所購買之實驗用斑馬魚成魚，飼養於魚類養殖循環系統，3 公升的魚缸飼養 10 至 15 隻成魚，而 10 公升的魚缸飼養 20 至 30 隻成魚，每缸會標記魚隻來源及年齡，並依照性別分開飼養，以便配對時使用。馴養時間至少 14 天，觀察魚隻健康情形，如有生病或死亡魚隻應立即移出。
- (2) 每一個魚缸維持水溫在  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ，並設定光週期 14 小時照光/10 小時黑暗(早上八點至晚上十點燈亮)，每日以活體-豐年蝦 (Brine shrimp) 進行餵食，餵食豐年蝦時間為 12:00-13:00 及 17:00-18:00，一天共餵食兩次。
- (3) 循環系統缸中備有過濾槽吸附水中雜質並保持水體流動，每月更換底缸中約10公升的養殖水，換水後定期(每週)水質監測並記錄以下水質之指標: 硝酸鹽 $< 40$  ppm、亞硝酸鹽 $< 1$  ppm、氨 $< 2$  ppm、PH=6.5~8.0、水質總硬度(GH)=60~120 ppm、溶氧量=8mg/l、碳酸鹽硬度(KH)=80~180 ppm，並每兩週更換吸附水中雜質及排泄物的過濾棉(白棉)；每月應清洗一次生化棉(黑棉-提供硝化細菌附著生長)，可連續使用一年以上；每半年更換一次系統濾心(大胖)；每年應更換進水前處理濾心及活性碳(小胖)及曝氣硝化槽各濾材，以維持良好的養殖環境。
- (4) 魚隻成長速度與馴養之密度及餵食狀況有關，須依實際情況調整馴養容器中魚隻數量及餵食次數。過剩之飼料宜移除以免導致水質惡化。
- (5) 選擇正常無畸形之魚隻為產卵之親魚，開始產卵前 2 個月內，不應接受任何藥物（慢性或預防）治療。

#### 2. 試驗容器及相關器材之清洗：

- (1) 新的塑膠器皿，使用前須用試劑水潤洗1次（全新之 24 孔培養盤不須清洗）。
- (2) 新的玻璃器皿，須用新鮮配製之10%（v/v）鹽酸或硝酸浸泡一夜後，再用試劑水沖洗乾淨。使用前以試劑水潤洗 1 次。
- (3) 接觸過樣品的塑膠器皿，不得重複使用。

(4) 接觸過樣品的玻璃器皿（如試驗容器、量筒等），如需重複使用，則必須依下列步驟清洗：

- A. 自來水浸泡 15 分鐘後，用清潔劑清洗內壁，再以自來水沖洗 2 次。亦可使用洗瓶機清洗。
- B. 以新鮮配製之 10% (v/v) 鹽酸或硝酸潤洗 1 次。
- C. 以試劑水潤洗 2 次。
- D. 以丙酮潤洗 1 次。
- E. 以試劑水沖洗 3 次。
- F. 進行毒性試驗前，再以試劑水潤洗 1 次。

### 3. 測試物質之準備：

- (1) 奈米銀微粒：奈米銀微粒原液避光儲存於4°C 冰箱中，實驗前將其取出至水浴超音波震盪器震盪30分鐘，以去離子水序列稀釋成測試濃度，分別裝於50毫升離心管中，儲存於4°C，每次進行奈米銀微粒暴露試驗前將儲存在4°C 冰箱的奈米銀微粒測試溶液於水浴槽回溫至28°C，並以 vortex 進行震盪。
- (2) 環境水樣：將採集後之環境水樣經濾膜過濾後，以玻璃瓶保存於4°C，於試驗前將水樣於水浴槽回溫至28°C，並測定水樣之 pH 值、真色色度、導電度、濁度、溶氧及水溫，以控制環境水樣與實驗條件之一致性。

### 4. 斑馬魚胚胎受精卵之收集：

- (1) 將具有生殖能力之雄、雌成魚於配對前一個晚上(暗週期的前幾個小時)放入產卵配對盒，配對盒中雄魚與雌魚的比例為2 (雄魚) : 1 (雌魚)，一缸配對盒中的魚隻數量不宜超過10隻，配對環境必須維持水溫在28°C，光暗週期為14 : 10小時。為避免可能有時候斑馬魚沒有產卵，所以建議至少使用3個配對盒。於隔天早上拉起隔板並照光，使雄魚受光刺激而往雌魚方向前去追尾，進行產卵。

\*建議26-28°C 皆可。

- (2) 交配、產卵及受精在燈亮的半小時內即發生，利用收卵器具(篩網)來收集魚卵至培養皿中，以塑膠滴管吸取去離子水，溫和的潤洗並吸除排泄物或雜質後，以 0.1 mg/L 甲基藍溶液浸泡5分鐘，以防止黴菌，最後再

以去離子水潤洗 (圖4.5)。

- (3) 使用解剖光學顯微鏡區分魚卵是否受精，並挑除沒有受精或發育不健全或已死亡的魚卵，受精卵收集數量須以能做完毒性測驗為準，受精卵(圖4.6、4.7)須於受精後4小時開始進行毒性試驗。
3. 斑馬魚胚胎出現以下任一種狀況即判定為死亡 (圖4.8)：
    - (1) 胚胎凝結 (Coagulation of the embryo)：凝結的胚胎為乳白色，在顯微鏡下，顯示為不透明的深色物質。凝結胚胎的數量在24, 48, 72及96小時記錄。
    - (2) 體節發育不全或缺乏 (Lack of somite formation)：在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，正常發育的斑馬魚胚胎在24小時後大概會形成20個體節(somite)，且正常發育的胚胎會自主運動(收縮運動)，自主運動表示體節的形成。缺乏體節形成在24, 48, 72和96小時記錄。若在24小時後沒有形成體節，可能為發育遲緩，體節至少在48小時前應該形成，如果沒有形成的話，胚胎判定為死亡。
    - (3) 尾部從卵黃囊剝離不全(Non-detachment of the tail)：正常發育的胚胎，在胚胎身體末端延伸時，尾部會從卵黃囊分離，會向胚胎後部延長。須在24、48、72和 96 小時記錄尾部未分離的狀況。
    - (4) 缺乏心跳 (Lack of heartbeat)：在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  正常發育的胚胎，其心跳在48小時可以被觀察到。在記錄此項目時應特別小心，不規則的心跳不應記錄為死亡。胚胎缺乏心跳至少在80倍下觀察1分鐘，如1分鐘心臟無跳動，即判定為死亡。缺乏心跳在48, 72和96小時記錄。
  4. 開始試驗每次後，每隔 $24\pm 1$ 小時須更換試驗水樣(須於觀察胚胎後執行)，直到第 96 小時試驗結束。方式如下：
    - (1) 取1瓶測試溶液依七、(一)3.之規定進行試驗前之水樣準備。
    - (2) 依選定濃度稀釋水樣。
    - (3) 將孔格內原有液體吸除後，立即加入與原試驗水樣濃度相同之新製備試驗水樣，過程中須避免胚胎暴露於乾燥環境。
  5. 結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之 pH 及溶氧，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

#### (四) 試驗流程 (圖4.9)

- (1) 暴露濃度通常以稀釋水至少稀釋為 5 個測試濃度，濃度間距不超過2.2 倍，以符合統計要求。如果小於5個濃度，應提供理由。最高濃度應造成100 %死亡，最低濃度應不造成可觀察效應。每組測試濃度必須要有控制組(空白試驗, **Negative Control**)。在正式試驗開始前，先進行濃度範圍選擇實驗，選擇適當的測試濃度。
- (2) 使用解剖顯微鏡(大於30倍放大率)挑選出分裂中的受精卵，或是沒有受精的卵 (例如：不對稱、小泡形成或是卵膜破損)。篩選出發育達囊胚期 (**blastula stage**)，即為受精後第 3 小時(**3 hour post fertilization, 3 hpf**)的正常發育胚胎，將發育正常的胚胎隨機選取並轉置於 24 孔盤中，每個孔槽中放置 1 顆受精卵，每組測試濃度皆為 30 顆胚胎。  
\*OECD 指南中建議以4 hpf 進行試驗。
- (3) 將囊胚期(4 hpf)的胚胎轉置於 24 孔盤後，使用1 ml 微量吸量管將孔槽中殘存的水吸出，暴露前須將測試奈米溶液再以 **vortex** 震盪，而後沿孔槽壁面加入 2 ml 配置好之奈米銀溶液(每格孔槽皆為 2 ml 測試溶液)，加入測試溶液時須小心不能大力衝擊到胚胎。每次胚胎毒性試驗皆同時有控制組，控制組加入 2 ml 的去離子水。  
\*亦可使用稀釋水作為控制組。
- (4) 暴露模式採用半靜水式系統，每 24 小時更換測試溶液，當更換測試奈米溶液時，要小心操作，降低對胚胎產生任何壓力。
- (5) 將加完暴露溶液的孔盤放置於 28°C 培養箱培養，暴露時維持飼養環境溫度(28°C)及光週期(14 小時照光；10 小時黑暗)。  
\*建議26-28°C 皆可。
- (6) 分別於胚胎24、48、72、96 hpf 觀察並記錄存活率、孵化率、畸形的現象，並使用 CCD 相機拍攝胚胎形態，於觀察後移死亡胚胎並更換新的試驗溶液。
- (7) 毒性試驗會進行三重複並進行統計分析。

#### (五) 胚胎型態之觀察 (**Malformation**)

本研究使用 Nikon SMZ800 解剖顯微鏡並搭配 MD-500 Digital Microscope

Camera 於24、48、72、96 hpf 觀察並記錄胚胎暴露奈米銀後的畸形形態 (Malformation)。斑馬魚胚胎發育過程當中，利用解剖顯微鏡可觀察到的畸形形態有：卵黃囊腫脹 (YSE, Yolk sac edema)、卵黃不透明 (OY, Opaque yolk)、心苞囊水腫 (PE, Pericardial edema)及體軸彎曲(AC, Axial curvature)等現象，毒性試驗過程中將觀察上述生物指標並記錄(圖4.10)。

#### (六) 胚胎體長之量測 (Body length)

於實驗過程中拍攝孵化後之斑馬魚胚胎(72 hpf)全身照片，並利用電腦軟體 View 7 介面校正標準刻度後，將胚胎照片像素轉換為距離單位，點選軟體最上排之介面 Line 工具線段功能量測參數，會出現紅色線段，將紅色線段從魚體頭部最前端拉至尾鰭最末端，所出現之數值即為魚體體長，單位為 mm；對於不同天數的發育，體長會有相對應的標準長度(表4.9)，量測體長是為了判斷胚胎是否會因毒性造成發育遲緩，最後將量測結果進行統計分析。每一組測試濃度為30顆胚胎，三次重複試驗。

### 八、結果處理

- (1) 計算各試驗濃度之 24、48、72、96 小時胚胎死亡總數及死亡百分率：胚胎存活總數 = 試驗孔格數之存活數量加總 (如胚胎畸形但尚有心跳則算存活) 胚胎存活百分率 = 胚胎存活總數 ÷ 30 (試驗中胚胎的 n 值) × 100% 最後以 SigmaPlot 繪圖軟體繪製存活百分率之統計圖(如4.11所示)。
- (2) 胚胎96小時半致死濃度(LC<sub>50</sub>) 之計算：以統計軟體的機率單位法(Probit method)來計算。(如表4.10所示)
- (3) 使用 two-tailed student's test 進行統計分析，分析兩組以上數據則以單分子變異數分析(One-Way ANOVA)。統計水準以 p value < 0.05 視為具有顯著意義，資料結果以平均值±標準差表示。

### 九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一組空白試驗，若胚胎死亡率超過10%，或孵化率低於80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每個24孔培養盤皆須執行培養盤之內對照試驗。若4個孔格中之胚胎死亡數超過 1 個，則該盤之試驗結果不可採用。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低

於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

#### 十、品質管制

略

#### 十一、參考文獻

(一) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF: Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1995, 203(3):253-310.

(二) OECD. TG 236: Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 2013

註1：動物之科學應用應依行政院農業委員會訂定之「動物保護法」及其相關規定辦理。生物屍體之清除及處理，依一般事業廢棄物相關規定辦理。

註 2：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。

#### 十二、圖表

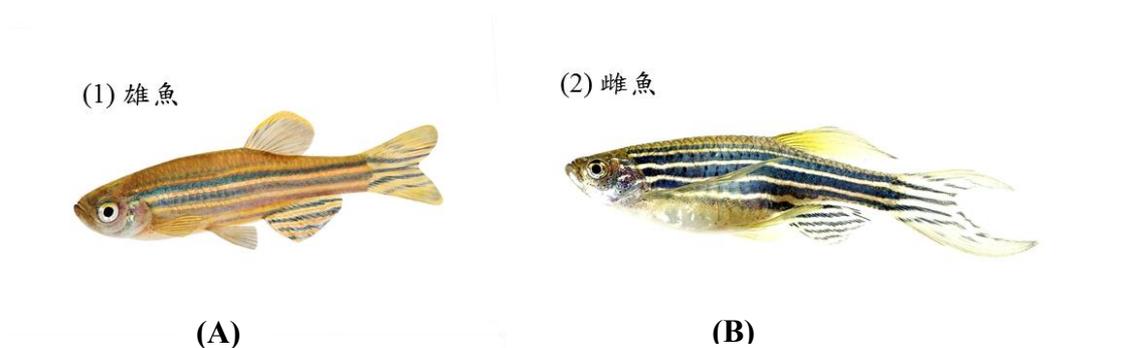


圖 4.2 斑馬魚雄性成魚與雌性成魚

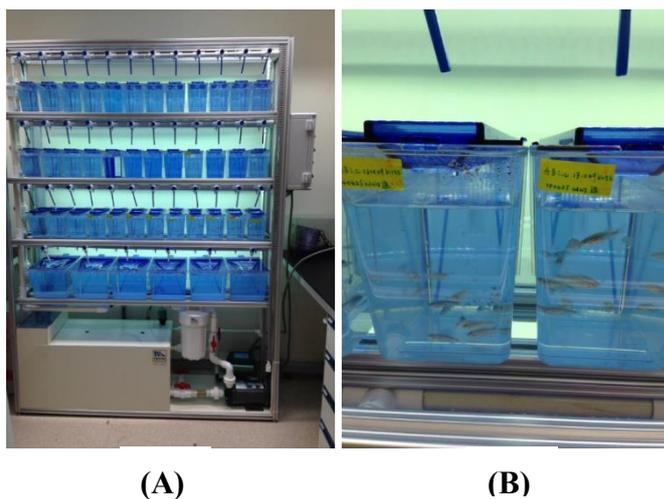


圖 4.3 循環養殖系統與飼養槽

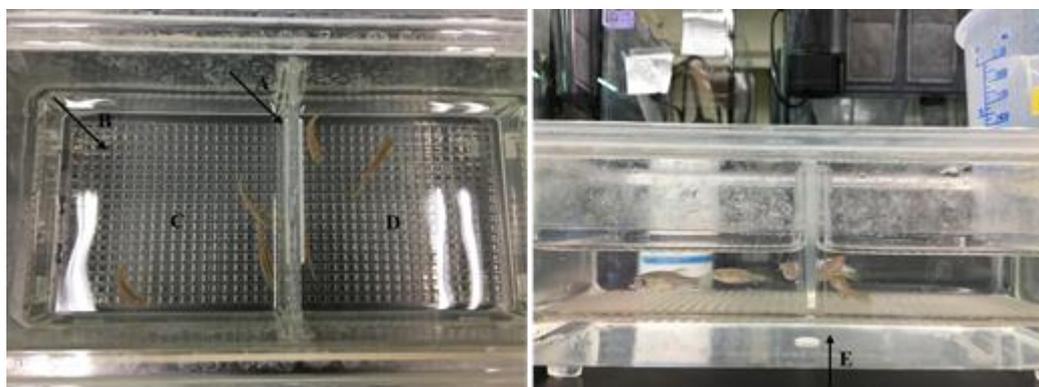
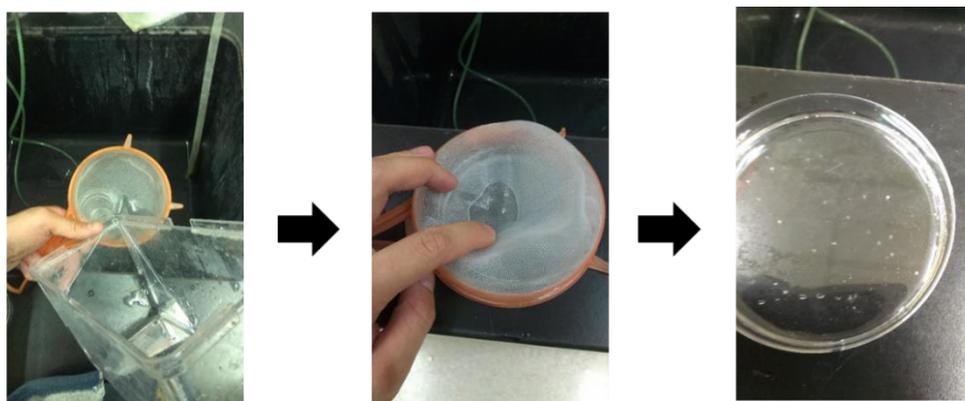


圖4.4產卵容器示意圖。A 為活動式隔板，B 為篩網，C、D 為放置雌魚與雄魚區，E 為魚卵收集區。



(1)將產卵配對盒中的卵利用篩網收集 (2)將篩網中的魚卵放置於dish中 (3)將dish中的魚卵進行溫和的潤洗並吸除排泄物或雜質

圖 4.5 收集魚卵示意圖

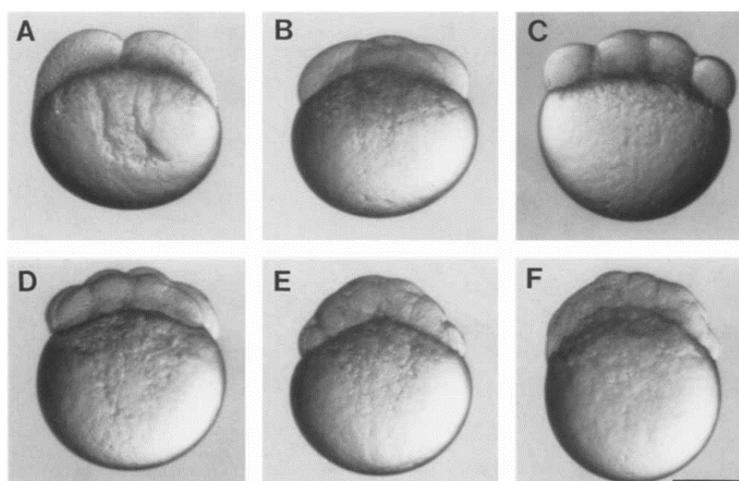


圖 4.6 斑馬魚之正常受精卵(發育階段:0.75~2 h)。(A)兩個細胞階段(Two cell stage, 0.75 h)；(B)四個細胞階段(Four cell stage, 1 h)；(C)八個細胞階段(Eight cell stage, 1.25 h)；(D)十六個細胞階段(Sixteen cell stage, 1.5 h)；(E)三十二個細胞階段(Thirty-two cell stage, 1.75 h)；(F)六十四個細胞階段(Sixty-four cell stage, 2 h)。Scale bar = 250  $\mu\text{m}$ 。[178]

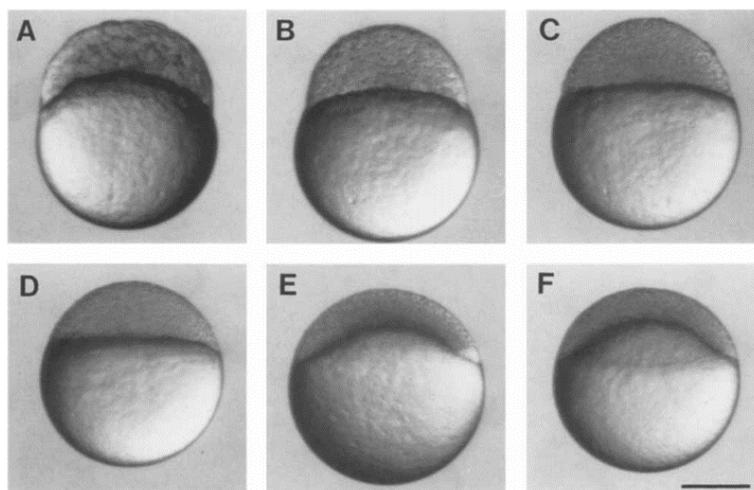


圖 4.7 斑馬魚之正常受精卵(發育階段:0.75~2 h)。(A) 256 個細胞階段(256-cell stage, 2.5 h)；(B)高度細胞分裂階段(High stage, 3.3 h)；(C)高度至橢圓過渡階段(Transition between the high and oblong stages, 3.5 h)；(D)橢圓至球形過渡階段(Transition between the oblong and sphere stages, 3.8 h)；(E)拱門型細胞階段(Dome stage, 4.3 h)；(F) 30%外包階段(30%-epiboly stage, 4.7 h)。Scale bar = 250  $\mu\text{m}$ 。[178]

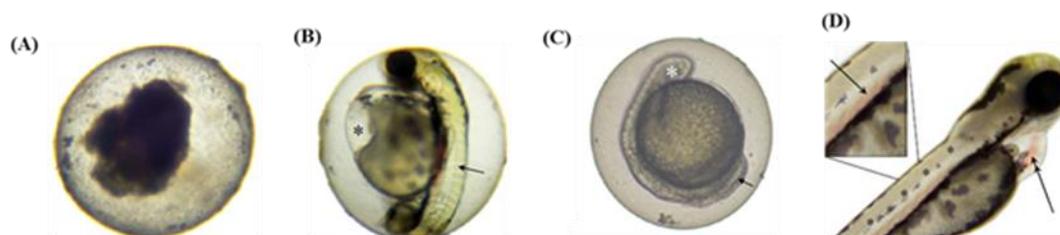


圖 4.8 斑馬魚胚胎死亡狀態之觀察 (A) 胚胎凝結 (Coagulated embryos) ; (B) 體節發育不全或缺乏 (Lack of somite formation) ; (C) 尾部未分離 (Non-detachment of the tail) ; (D) 缺乏心跳 (Lack of heartbeat) 。 (OECD. TG 236: Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 2013) 。

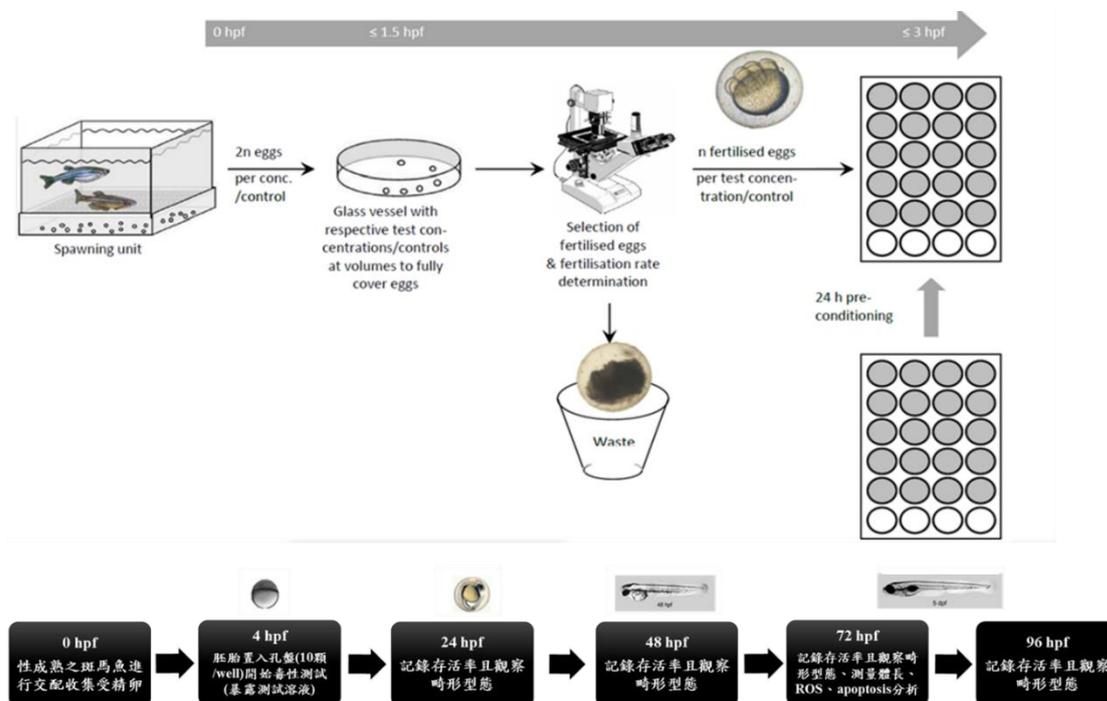


圖 4.9、斑馬魚胚胎毒性試驗流程。(OECD. TG 236: Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 2013)，斑馬魚胚胎於收下後，篩選出受精的胚胎，將胚胎置入孔盤後開始進行毒性試驗，每 24 hpf 紀錄存活率及胚胎的畸形型態，並且於 72 hpf 進行體長量測、氧化壓力及細胞凋亡分析。

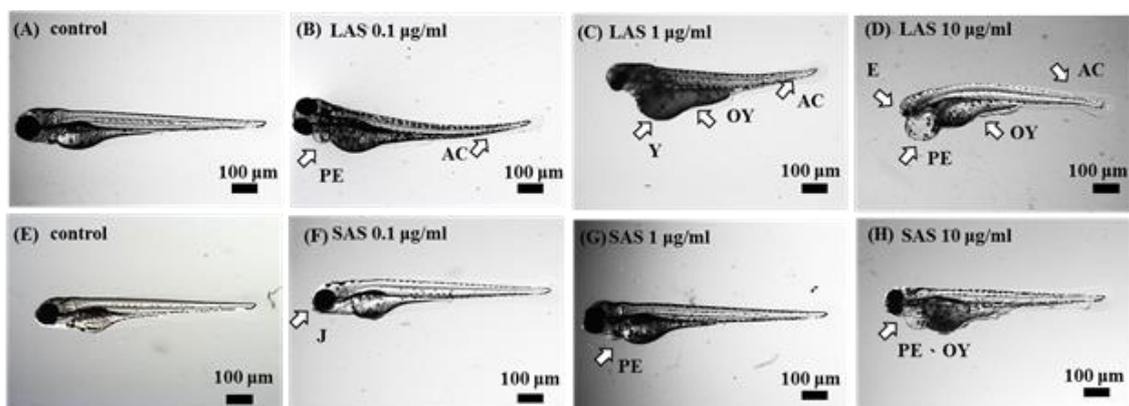


圖4.10、胚胎受精後96小時之型態觀察。PE(心苞囊水腫, Pericardial edema); YSE(卵黃囊腫脹, Yolk sac edema); OY(卵黃不透明, Opaque yolk); AC(體軸彎曲, Axial curvature); J(下顎突出, Jaw malformation)。

表 4.9 斑馬魚胚胎早期生命階段的發育狀況。正常胚胎於三日齡時，其體長約為 3.5 mm 為正常長度，而於五日齡及七日齡分別為 3.9 mm 及 4.5 mm[179]。

Table 2 Stages of larval development

Stage	Day	Description
Early larva	3	TL = 3.5 mm; StL = NA; 6 teeth Open mouth protrudes anterior to eyes; iridophores in yolk stripe and half of eye; gill filament buds; cartilage in arches and pectoral girdle; operculum rudiment; cleithrum; motile intestine
	5	TL = 3.9 mm; StL = NA; 6 teeth Swim bladder inflates; active feeding; pronephric tubules
	7	TL = 4.5 mm; StL = NA; 8 teeth Tail fin narrows; cartilage in anterior vertebrae; 3 lines of trunk neuromasts
Mid-larva	14	TL = 6.2 mm; StL = NA; 10 teeth First hypural cartilage in tail fin; Rohon-Beard neurons completely replaced by dorsal root ganglia
	21	TL = 7.8 mm; StL = 7.0 mm; 10 teeth Ossified pharyngeal skeleton; radials in pectoral fins; dorsal and anal fin buds
Juvenile	30	TL = 10.0 mm; StL = 9.0 mm; 10 teeth Adult fin and pigmentation patterns; 7 hypural cartilages in tailfin; old mid-body lateral line shifts ventrally and new mid-body line forms; kidney haematopoietic; mesonephros replaces pronephros
	45	TL = 14.0 mm; StL = 12.5 mm; 12 teeth
Adult	90	TL = 18.0 mm; StL = 15.0 mm; teeth?

TL: total length; StL: standard length; NA: not applicable.

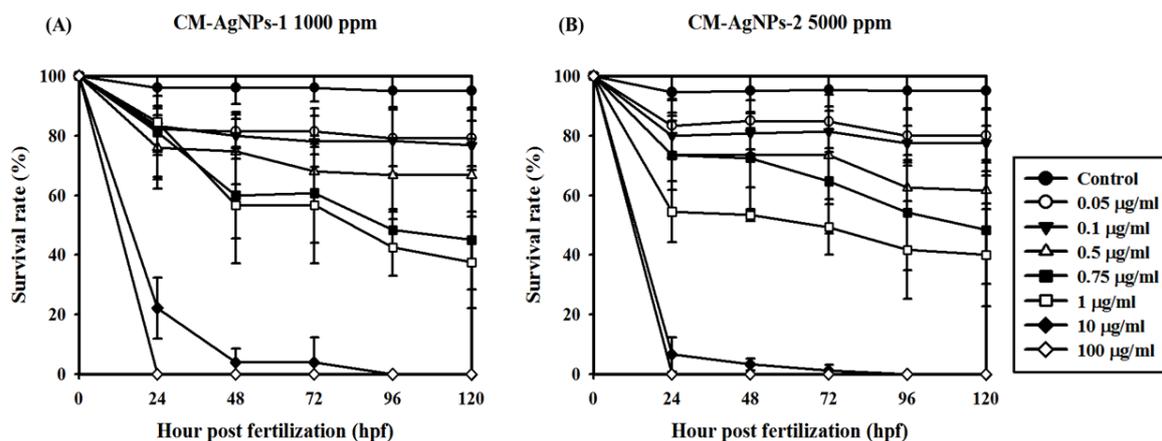


圖 4.11 斑馬魚胚胎暴露商品化奈米銀微粒膠體溶液之存活率。(A)斑馬魚胚胎暴露 AgNPs-1 之存活率；(B)斑馬魚胚胎暴露 AgNPs-2 之存活率。斑馬魚胚胎於兩種商品化奈米微粒中，皆隨著濃度增加而死亡率隨之提高。每組測試濃度各有 30 個胚胎，分別在不同發育時期 (0, 24, 48, 72, 96, 120 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。

表 4.10、斑馬魚胚胎暴露 CM-AgNPs-1及 CM-AgNPs-2市售奈米銀微粒膠體溶液之半致死濃度(LC<sub>50</sub>)

Hour post fertilization (hpf)	LC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	CM-AgNPs-1	CM-AgNPs-2
24	2.60±1.72	1.07±0.37
48	1.57±0.89	1.00±0.44
72	1.13±0.83	0.69±0.21
96	0.84±0.71	0.53±0.18
120	0.67±0.47	0.47±0.17

## 斑馬魚胚胎氧化壓力(Oxidative Stress)分析

### 一、方法概要

本方法係以斑馬魚 (*Danio rerio*) 之胚胎為試驗生物，並利用 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 螢光染劑測定細胞內活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的含量，以檢測斑馬魚胚胎因奈米材料或環境水體或環境用藥所造成之氧化壓力，觀察紀錄胚胎產生氧化壓力之情形。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水、環境用藥及新興化學物品(包括奈米材料)對斑馬魚胚胎之氧化壓力檢測。

### 三、干擾

- (一) 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體侵入、馴養水或稀釋水含有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨殘留有有毒物質，會影響斑馬魚健康且可能造成耐受性改變。
- (二) 生物有病或健康狀況不佳，影響產卵及孵化率。
- (三) 分子量 3 kDa 以上的化合物、巨大分子和會引起延遲孵化之物質，可能對胚胎生物可利用性限制，會降低毒性敏感度。
- (四) 測試物質為混合物時，必須盡可能的鑑定特性，如化學成分組成、含量比例、物質的專一特性、物理及化學特性等，以了解此胚胎檢測毒性模式是否適用於測試物質。
- (五) 測試物質為奈米材料時，須以膠體溶液形式存在，其奈米微粒之分散性及粒徑會影響毒性之結果。
- (六) 活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)為不穩定，可能會影響試驗結果。

### 四、設備與材料

- (一) 2,7-DICHLORODIHYDROFLUO (DCFH-DA)，購自 Life technologies 公司。
- (二) 1-phenyl-2-thiourea (PTU)，購自 Sigma 公司。
- (三) Methylcellulose，購自 Sigma 公司。

- (四) 正立式免疫螢光顯微鏡 : BX51, OLYMPUS。
- (五) 雷射共軛焦全光譜影像系統 (Laser Scanning Confocal Microscope) : Nikon C1-Si。
- (六) 凹槽載玻片。

#### 五、試劑

- (一) 0.003 % 1-phenyl-2-thiourea (PTU): 取3 mg 1-phenyl-2-thiourea (PTU)粉末溶於100 ml 去離子水中。[180]
- (二) 10  $\mu\text{g/ml}$  DCFH-DA: 取 DCFH-DA 粉末配置成10 mg/ml 溶於 DMSO 作為 stock, 再將10 mg/ml 稀釋至所需濃度為10  $\mu\text{g/ml}$ 。(註:斑馬魚對於 DMSO 的耐受度為1 % v/v))
- (三) 3 % methylcellulose: 取3 g methylcellulose 溶在100 ml hot water(約80-90  $^{\circ}\text{C}$ ), 置於 stirrer 上進行隔水加熱(並加 stir bar 進行攪拌), 隔水加熱約30分鐘後, 將加熱關掉, 但讓 stir bar 繼續攪拌, 直到降溫至室溫後將之放入4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 隔夜後可用(冷卻後才變透明)。
- (四) 過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

#### 六、採樣與保存

略

#### 七、步驟 [181]

- (一) 將受精後3小時的胚胎暴露於不同濃度之測試溶液, 暴露模式與前述斑馬魚胚胎奈米毒性試驗相同。控制組(Negative control)為暴露去離子水, 而正控制組(Positive control)為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 測試溶液體積皆為2 ml, 接著加入0.003 % 1-phenyl-2-thiourea (PTU), 延緩魚體斑點出現的時間。於受精後72小時分析斑馬魚胚胎體內活性氧物種(ROS)之表現量。
- (二) 於暴露終點(72 hpf)將測試溶液從孔盤中吸除, 以 PBS 加入孔盤中進行潤洗胚胎 3 次, 吸除 PBS 後, 將10  $\mu\text{g/ml}$  DCFH-DA 染劑加入待測組別, 於室溫下避光培養 1 小時, 培養時間結束以去離子水清洗 3 次。
- (三) 將3 % methylcellulose (甲基纖維素)放置於凹槽載玻片上且將斑馬魚胚胎固定於甲基纖維素上, 並調整好以魚體側躺的方向。
- (四) 利用正立式免疫螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡(488 nm)觀察及拍攝影像,

產生氧化壓力的細胞會呈現綠色螢光，綠色螢光的產生表示測試溶液對斑馬魚胚胎所造成的氧化壓力。

- (五) 最後利用全景組織體細胞定量軟體 TissueQuest 進行螢光量化統計分析。

#### 八、結果處理

- (一) 利用正立式免疫螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡(激發/散射=488 nm/543 nm) 觀察及拍攝影像，需拍攝可見光、螢光、可見光與螢光合併之影像，每一測試濃度組別拍攝10隻斑馬魚。
- (二) 利用全景組織體細胞定量軟體進行螢光定量化，以定量每一組別之螢光強度，每一組測試濃度隨機選取30隻已拍攝螢光影像之斑馬魚胚胎，將螢光強度數值紀錄並作統計分析。
- (三) 將每一組別之螢光強度數值與控制組比較(以控制組作為基準，% of control)，最後數值以平均值與標準差呈現。

#### 九、品質管制

- (一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若胚胎死亡率超過10%，或孵化率低於80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。
- (二) 內對照試驗(iC)：每個24孔培養盤皆須執行培養盤之內對照試驗。若4個孔格中之胚胎死亡數超過 1個，則該盤之試驗結果不可採用。
- (三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

#### 十、精密度與準確度

略

#### 十一、參考文獻

- (一) Thisse C, Thisse B: High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols* 2008, 3(1):59-69.
- (二) Kim M-S, Louis K, Pedersen J, Hamers R, Peterson R, Heideman W: Using citrate-functionalized TiO<sub>2</sub> nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity. *Analyst* 2014, 139(5):964-972.

## 十二、圖表

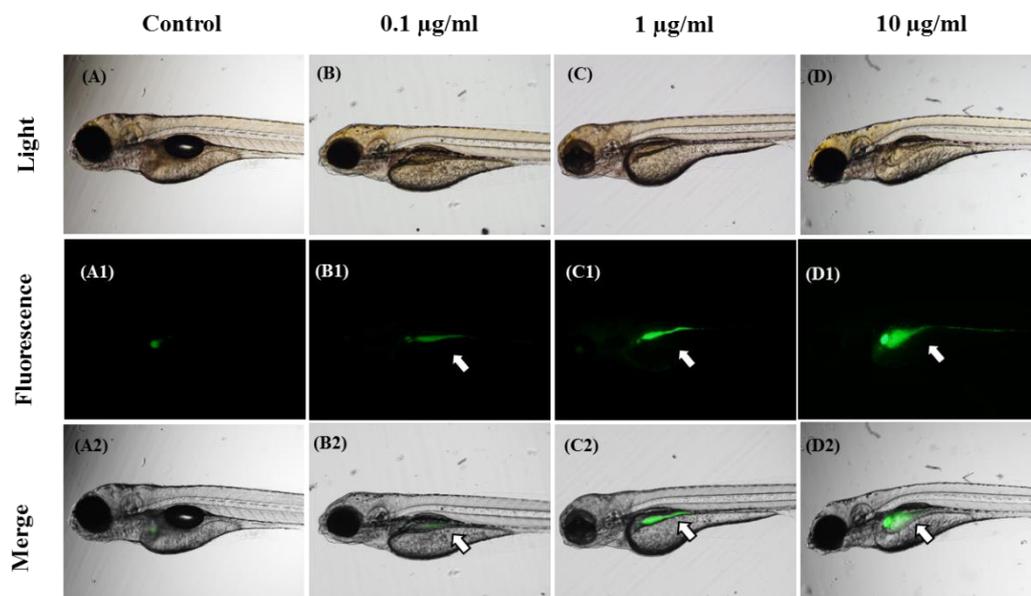


圖 4. 12、斑馬魚胚胎於 4 hpf 暴露氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)後於 72 hpf 觀察其體內氧化壓力之表現。隨著奈米銀微粒之濃度提高，其氧化壓力隨之而增加。(A、A1、A2) Control；(B、B1、B2) 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ；(C、C1、C2) 1  $\mu\text{g/ml}$ ；(D、D1、D2) 10  $\mu\text{g/ml}$ 。白色箭頭為奈米銀微粒所造成的 ROS，其主要發生在腸道的區域。在此綠色螢光代表氧化壓力之發生。

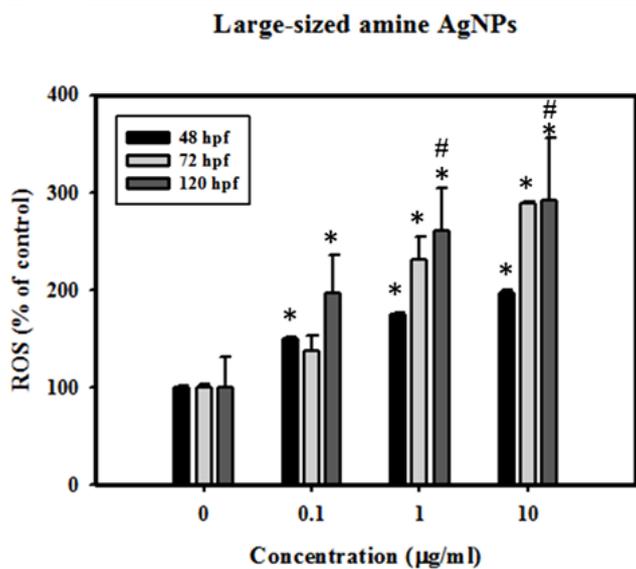


圖 4.13 斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒後體內氧化壓力表現之統計結果。隨著奈米銀微粒之濃度提高，其氧化壓力隨之而增加。氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)於 48、72、120 hpf 之氧化壓力統計分析。使用 DCFH-DA 螢光染劑測量總體氧化壓力表現，並利用 TissueQuest 軟體進行定量之統計分析。平均值與標準差為三次試驗所得。

## 斑馬魚胚胎模式細胞凋亡試驗(Whole-mount TUNEL assay)分析

### 一、方法概要

本方法係以斑馬魚(*Danio rerio*)之胚胎為試驗生物，並利用 TUNEL assay 測定細胞凋亡的細胞，以檢測斑馬魚胚胎因奈米材料或環境水體或環境用藥所造成之細胞凋亡，觀察紀錄胚胎產生細胞凋亡之情形。TUNEL assay 的分析原理為，當細胞凋亡後期時，會發生細胞核內 DNA 斷裂，當 DNA 被內源性核酸內切酶降解，會產生帶有3'末端的缺口或斷裂的 DNA 片段，在 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)作用下使標記螢光的特殊核苷酸(如，TMR red、Brdu)，連接到 DNA 片段的3'末端，螢光強度與 DNA 片段含量成正比，且可以依據螢光強度對於細胞凋亡做定量的分析。

### 二、適用範圍

本方法適用於陸域地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水、環境用藥及新興化學物品(包括奈米材料)對斑馬魚胚胎之氧化壓力檢測。

### 三、干擾

- (一) 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體侵入、馴養水或稀釋水含有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨殘留有毒物質，會影響斑馬魚健康且可能造成耐受性改變。
- (二) 生物有病或健康狀況不佳，影響產卵及孵化率。
- (三) 分子量3 kDa 以上的化合物、巨大分子和會引起延遲孵化之物質，可能對胚胎生物可利用性限制，會降低毒性敏感度。
- (四) 測試物質為混合物時，必須盡可能的鑑定特性，如化學成分組成、含量比例、物質的專一特性、物理及化學特性等，以了解此胚胎檢測毒性模式是否適用於測試物質。
- (五) 測試物質為奈米材料時，須以膠體溶液形式存在，其奈米微粒之分散性及粒徑會影響毒性之結果。
- (六) 以4% paraformaldehyde 固定魚體，魚體會變深色，可能會影響螢光之觀察。

### 四、設備與材料

- (一) 1.5 mL / 2 mL 微量離心管(eppendorf)，購自 ExtraGENE 公司。
- (二) 蓋玻片。
- (三) 振盪器。
- (四) 水浴槽。

#### 五、試劑

- (一) In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red、DNaseI，購自 Roche 公司。
- (二) Washing buffer: PBS 。
- (三) 4 % paraformaldehyde 。
- (四) Blocking buffer: 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 。
- (五) Permiliation solution: 0.1% TritonX-100 in 0.1% sodium citrate；(配置完須放置於4°C 冰上)。
- (六) TUNEL reaction mixture: Labeling solution:Enzyme solution=9:1 。
- (七) Positive control: DNaseI recombinant: 3000 U/ml in 50 mM Tris-HCl、1 mg/ml BSA, pH=7.5 。

#### 六、採樣與保存

略

#### 七、步驟 [182]

- (一) 將受精後3小時的胚胎暴露於不同濃度之測試溶液，暴露模式與前述斑馬魚胚胎奈米毒性試驗相同，於受精後72小時為實驗終點。其中測試組別須包括一組 Positive control，將受精後72小時胚胎暴露已配置適當濃度的 DNaseI recombinant，於15°C 至25°C 培養 10 分鐘，以誘導 DNA 斷裂。
- (二) 將孔盤中測試溶液吸除，並以去離子水清洗三次，將胚胎依測試濃度組別收集於微量離心管(eppendorf)中，接著以 4 %甲醛於室溫下固定 1 小時，固定 1 小時之後，以 PBS 於 shaker (50-100 rpm，以使 PBS 於 eppendorf 內有晃動清洗即可)上進行清洗，每次清洗 5 分鐘，共兩次。
- (三) 接著將胚胎與 Blocking buffer 於振盪器(shaker)上培養 30 分鐘，30 分鐘後以 PBS 於 shaker (50-100 rpm)上進行清洗，每次清洗 5 分鐘，共兩

次。

(四) 再以 Permiliation Solution 在冰上培養 30 分鐘，30 分鐘後以 PBS 於 shaker (50-100 rpm)上進行清洗，每次清洗 5 分鐘，共兩次。

(五) 最後將 TUNEL reaction mixture (Labeling solution: Enzyme solution=9:1，每一管 sample 總體積為10  $\mu$ L，體積覆蓋過魚體即可)，其中 Negative control 只需加入10  $\mu$ L 的 Labeling solution，於水浴槽 37°C 培養 1 小時。

(六) 將處理好之魚體放置蓋玻片上，以共軛焦顯微鏡進行觀察與拍照。

#### 八、結果處理

利用正立式免疫螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡(543 nm)觀察及拍攝影像，需拍攝可見光、螢光、可見光與螢光合併之影像，每一測試濃度組別拍攝10隻斑馬魚。

#### 九、品質管制

(一) 空白試驗(NC)：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗，若胚胎死亡率超過10%，或孵化率低於80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

(二) 內對照試驗(iC)：每個24孔培養盤皆須執行培養盤之內對照試驗。若4個孔格中之胚胎死亡數超過 1個，則該盤之試驗結果不可採用。

(三) 正控制試驗(PC)：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡率低於30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

#### 十、精密度與準確度

略

#### 十一、參考文獻

〈一〉 Lee H-C, Lu P-N, Huang H-L, Chu C, Li H-P, Tsai H-J: Zebrafish transgenic line huORFZ is an effective living bioindicator for detecting environmental toxicants. *PloS one* 2014, 9(3):e90160.

## 十二、圖表

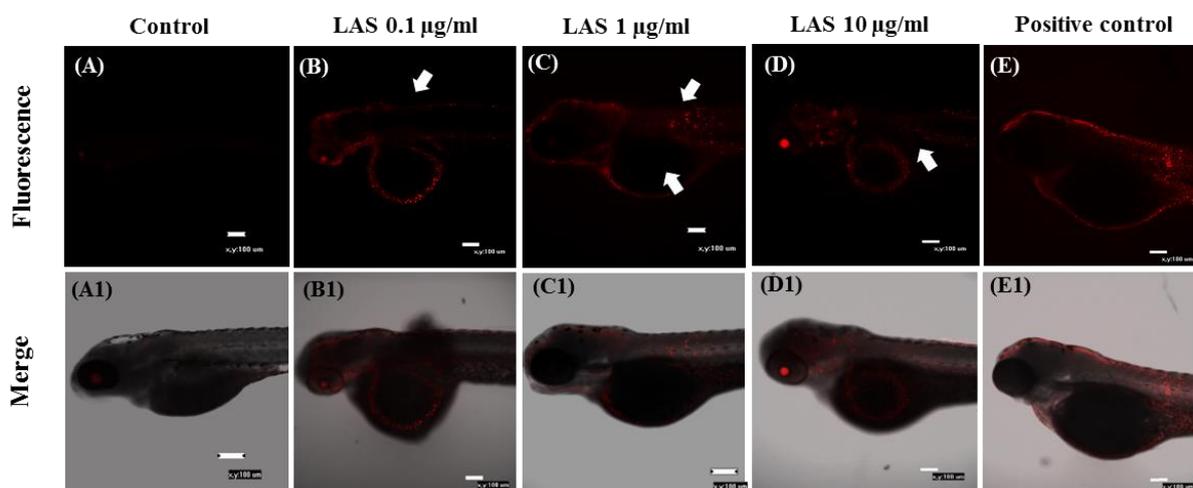


圖 4.14 斑馬魚胚胎暴露以氨基修飾之奈米銀微粒(LAS)於受精後 72 小時觀察細胞凋亡之情形。(A、A) Control；(B、B1) LAS 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ；(C、C1) LAS 1  $\mu\text{g/ml}$ ；(D、D1) LAS 10  $\mu\text{g/ml}$ ；(E、E1) Positive control。白色箭頭所指的紅色螢光區域為細胞凋亡之現象，主要發生在體軸、卵黃及頭部的區域。

### 4.3 標準方法草案之技術建立及測試

為了測試上述所提出之細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式標準方法草案，我們選用了自行合成之奈米銀及奈米氧化鋅及相對應塊材進行技術測試。

#### 4.3.1 奈米銀及奈米氧化鋅之物化特性

奈米微粒所引發的不良反應主要與生物體對於奈米物質本身的反應、給予的劑量、奈米微粒的形狀、電荷數、包覆物質、物化特性的整體結果有關，除此之外，根據國際標準組織(ISO)於 TR13014 所提出之規章中提及，進行細胞及動物毒性評估前必須提供該測試物質之物化特性描述，因此於本計畫中，將先進行奈米微粒物化特性之檢測。結果顯示(圖 4.15)(表 4.11)所示，可以觀察到 Bulk Ag 以及 Bulk ZnO 在初始粒徑及水合粒徑均遠大於 AgNPs 與 ZnO NPs，此外利用分光光度計進行奈米銀及奈米氧化鋅之光譜分析，結果顯示奈米銀的波長範圍為大約在波長 390 nm 左右以及奈米氧化鋅的波長約在波長 370 nm 左右，而 ZnO NPs 波長的吸收度會急劇下降代表 ZnO NPs 在水中極不穩定。

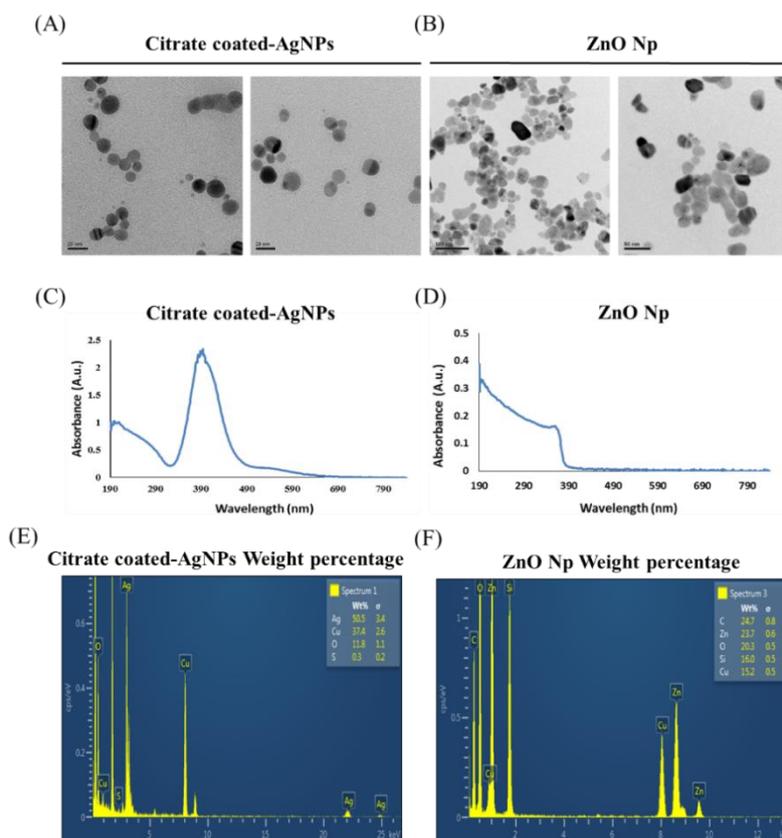


圖 4.15 奈米物質之物化特性分析。(A-B)奈米銀(左)及奈米氧化鋅(右)之 TEM 拍

攝；(C-D)光譜分析圖譜；(E-F) 能量色散 X 射線元素分析

表 4. 11、奈米級與大分子級的銀與氧化鋅之物化特性

	Ag NPs	Bulk Ag	ZnO NPs	Bulk ZnO
<b>Surface chemistry</b>	Citrate	N.D.	Amide	N.D.
<b>Primary particle size (nm)</b>	12.5±3.3	1300-3200	27.8±7.9	>500
<b>hydrodynamic diameter (nm)</b>	16.0±3.8	1330.2±89.5	43.2±11.5	1446.8±351.2
<b>Dispersity</b>	1.53x10 <sup>-8</sup>	0.868	0.223	0.567
<b>Surface charge (mV)</b>	-13.9	N.D.	25.4	N.D.
<b>Chemical composition</b>	99.7%	99.91%	84%	99.99%

#### 4.3.2 奈米微粒體外細胞模式毒性檢測標準方法測試

為了進行本計畫所整理出之標準草案應用於測試奈米微粒細胞毒性反應的可行性，本計畫利用人造奈米銀及奈米氧化鋅做為示範樣品，並與相對應之大分子材料進行前項所提草案之實際比對測試，提交技術測試報告。

##### (1) 利用不同測試方法與生物效應指標分析合成之奈米銀微粒與相對應之大分子材料銀粉對細胞造成的毒性效應

首先進行奈米銀(AgNPs)與相對應之大分子材料銀粉(Bulk Ag)的細胞存活率分析，分別使用 MTT assay、MTS assay 與 Live/Dead cell viability assay 測試。藉由細胞存活率所獲得之毒性效應濃度之後，將近一步分析與毒性反應相關的生物效應指標如氧化壓力、細胞自體吞噬與細胞凋亡。

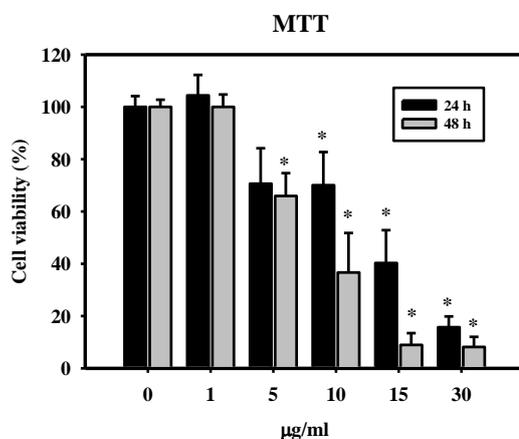
進行細胞毒性測試前，先以水浴超音波震盪 5 分鐘加以均散奈米微粒與銀粉，並以含有 10%FBS 之培養液稀釋，以達到所需暴露之濃度。

##### a. 利用 MTT assay 測定細胞存活率

為量化合成之 AgNPs 及 Bulk Ag 對 NIH-3T3 細胞所造成細胞存活率之影響，我們先採用 MTT assay 進行實驗。MTT assay 是一種被廣泛用來測試細胞毒性的方式，其優點為實驗操作簡單，使用少量細胞與測試樣品即可完成測定。在對 NIH-3T3 細胞暴露合成 AgNPs 及 Bulk Ag 24 與 48 小時之後，暴露 AgNPs 之 MTT 結果呈現出明顯的濃度-時間效應，而其顯著的毒性發生於 5、10 µg/ml，當濃度提高到 30 µg/ml 時，則多數細胞已產生毒性造成死亡。此現象在 48 小時的暴露條件下

更趨明顯(圖 4.16(A))。而在 NIH-3T3 細胞暴露 Bulk Ag 之 MTT 結果和暴露 AgNPs 組別相比，在我們所選擇的暴露條件下，Bulk Ag 並不會有顯著的毒性反應，一直到 48 小時細胞仍舊維持平穩的生長(圖 4.16 (B))。

(A)



(B)

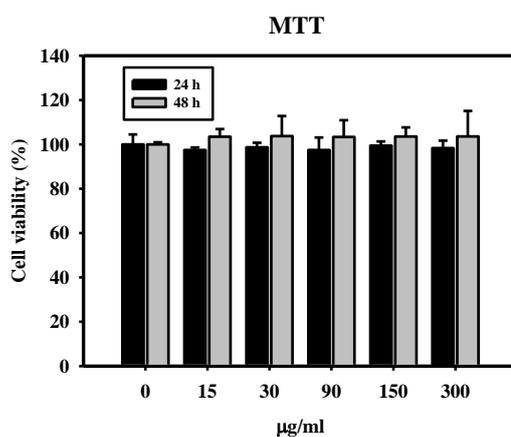


圖 4.16 利用 MTT assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 AgNPs 及 Bulk Ag 暴露後之細胞存活率。(A) NIH-3T3 細胞暴露合成 AgNPs 24 及 48 小時後細胞存活率。不論是 24 小時或 48 小時暴露，合成 AgNPs 皆隨著濃度-時間的上升而使細胞毒性增加。(\* $p < 0.05$ , control v.s. 合成 AgNPs) (B) NIH-3T3 細胞暴露合成 Bulk Ag 24 及 48 小時後細胞存活率。

#### b. 利用 MTS assay 測定細胞存活率

MTS assay 為 MTT assay 改良後的細胞存活測試方法，近年來普遍應用於毒理學試驗中測試某些毒性化學物質對於細胞毒性強弱的方法。為確定暴露物的毒性

效應，因此我們再利用類原理的測試方法確認合成之 AgNPs 及 Bulk Ag 對 NIH-3T3 細胞所造成細胞存活率影響之濃度。細胞暴露合成之 AgNPs 及 Bulk Ag 24 及 48 小時後，為降低氧化鋅對 MTS 之干擾作用，我們經由離心  $1080\times g$ ，10 分鐘後，吸取培養盤內之細胞上清液，利用 ELISA reader 測定 490 nm 之吸光值並加以計算細胞存活率。

在細胞暴露 AgNPs 的部分，其結果呈現出明顯的濃度-時間效應關係，而其毒性反應開始於  $1\ \mu g/ml$ (圖 4.17(A))，然而顯著的毒性濃度與 MTT assay 的測試結果一致，不過值得注意的地方是，由於 MTS 試劑本身有顏色，因此分析測量吸光值時會有背景值產生，也因此在高濃度暴露的組別無法計算出較低的存活率。在細胞暴露 Bulk Ag 的部分，其結果也和使用 MTT assay 所得之數據雷同，並無明顯的細胞毒性效應(圖 4.17(B))。

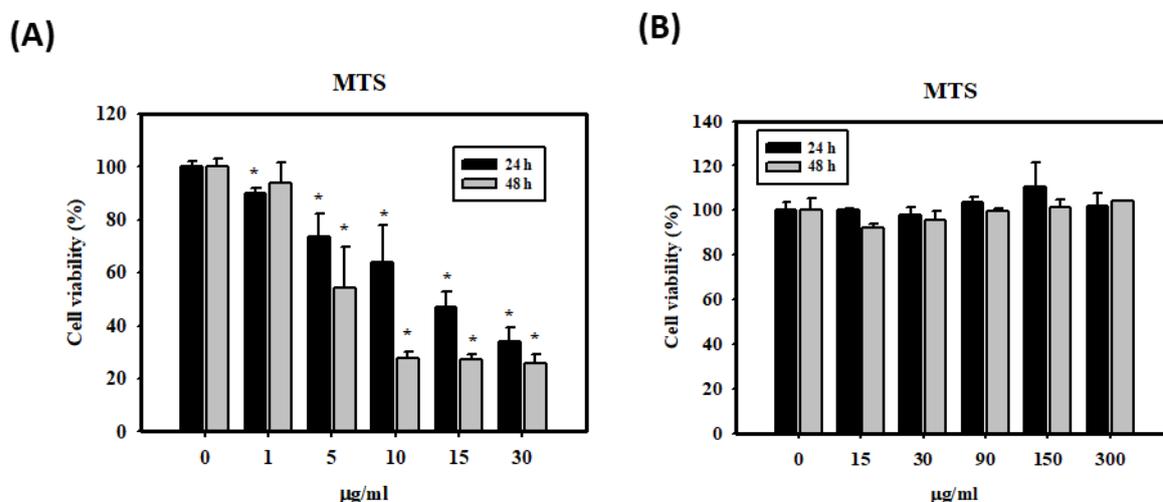
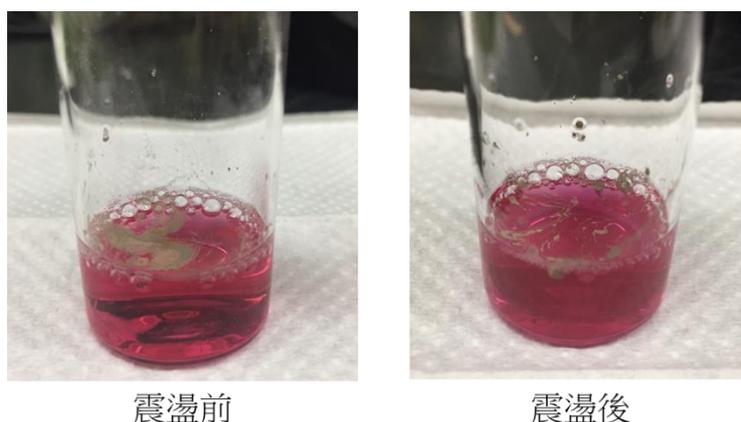


圖 4.17 利用 MTS assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 AgNPs 及 Bulk Ag 暴露後之細胞存活率。(A) NIH-3T3 細胞暴露合成 AgNPs 24 及 48 小時後細胞存活率。不論是 24 小時或 48 小時暴露，合成 AgNPs 皆隨著濃度的上升而使細胞毒性增加。(\* $p < 0.05$ , control v.s. 合成 AgNPs) (B) NIH-3T3 細胞暴露合成 Bulk Ag 24 及 48 小時後細胞存活率。

Bulk Ag 在我們的實驗設計中，已將濃度提高至  $300\ \mu g/ml$ ，然而仍舊無法在分析試驗中發現明顯的毒性，其主要的原因我們認為是 Bulk Ag 在配置暴露溶液時並不溶於培養液，且容易漂浮在表面，即使進行強力的震盪或攪拌，仍舊無法達到膠體溶液的型態(圖 4.18)。由於 Bulk Ag 不論是在 MTT 或 MTS assay 中皆無法造成

細胞的毒性效應，因此將不進行後續其他的生物效應指標的測試分析，僅針對 AgNPs 繼續進行技術測試。

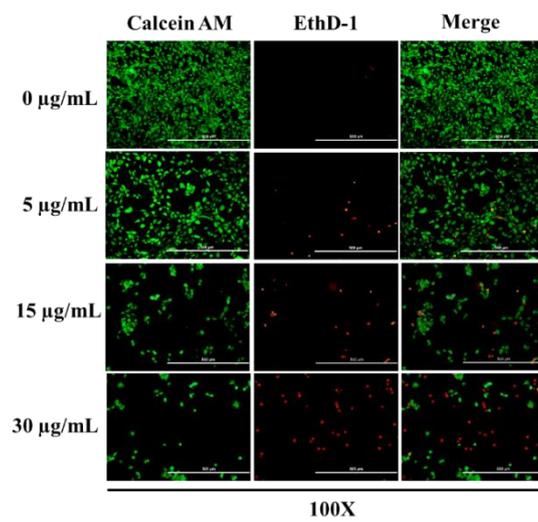


**圖 4.18 配置 Bulk Ag 之 stock 溶液。**所配置之溶液濃度為 1 mg/ml，Bulk Ag 的粉末會懸浮於培養液之上，即使進行超音波水域震盪後，仍舊無法均勻分散，且有時會結成團塊附著於玻璃瓶瓶身，導致濃度的損失。

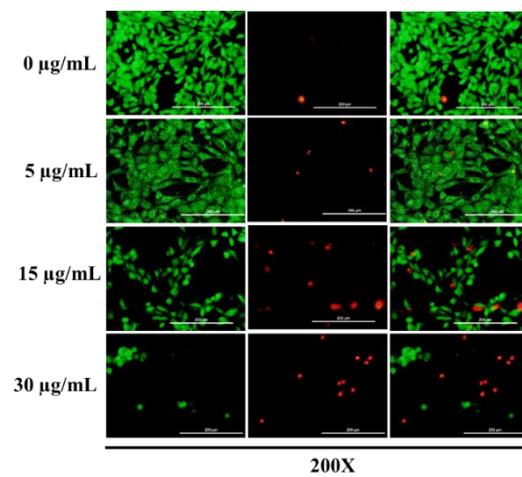
### **c. Live/Dead cell viability assay**

針對奈米材料而言，MTT assay 的實驗分析方法於測試的過程中已在不同的細胞或者不同的試劑、藥物處理下發現它的不穩定性，此外 MTS assay 雖然已為 MTT assay 之改良方法，但由於仍須經由離心抽取細胞上清液之過程來降低奈米微粒存在之干擾，而可能有人為因素之誤差，因此我們進一步使用 Live / Dead 細胞存活率分析試劑來確認 MTT 與 MTS assay 之分析結果。以螢光顯微鏡觀察之細胞染色情形作為定性之依據。NIH-3T3 細胞暴露合成奈米銀 24 小時及 48 小時之後，同時雙染 calcein AM (使得活細胞產生綠色螢光) 和 ethidium homodimer (使得死細胞產生紅色螢光) 兩種染劑，結果顯示在不同的顯微鏡放大倍率下，皆能觀察到隨著濃度的增加，表現紅色螢光的細胞數量也有增加的趨勢，明顯觀察到高低濃度的存活率差異(圖 4.19)，而由於在高濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下，細胞已經產生太多死亡，使得 calcein AM 的偵測太過稀少，因此結果有點難以判讀，所以額外使用了中間劑量，例如:15 $\mu\text{g}/\text{mL}$  去處理。此結果與 MTT/MTS 細胞存活率的數據雷同。

(A)



(B)



(C)

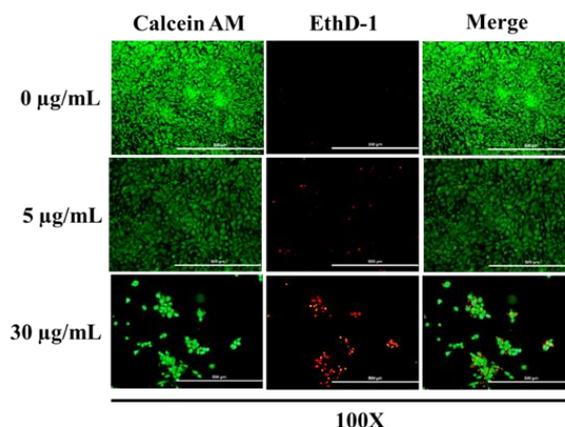


圖 4. 19 以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 細胞經 AgNPs 暴露後之死亡情形。NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs 5 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL 與 30  $\mu$ g/mL，於 (A) 24 小時後以放大 100 倍及(B)放大 200 倍暴露 AgNPs 5 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL、30  $\mu$ g/mL，(C) 48 小時後放大 100 倍之觀察結果，可發現 NIH-3T3 細胞經 AgNPs 暴露後產生顯著之紅色螢光。

隨後再以流式細胞儀分析 NIH-3T3 細胞染色與細胞攝入奈米微粒之情形。將 NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs 24 及 48 小時之後，收集各組別細胞並進行染色。其結果顯示 AgNPs 能造成顯著的細胞死亡情形，並且在處理 24 小時之後，10  $\mu$ g/mL 的劑量下約造成 46.4%的死亡率(圖 4.20 (A))，並在呈現濃度相關效應，在處理 48 小時之後，10  $\mu$ g/mL 的濃度下約造成七成(68.7%)的死亡率(圖 4.20(C))，而高濃度 15  $\mu$ g/mL 及 30  $\mu$ g/mL 的組別明顯比 24 小時時有更多的死亡情形發生，其中在 30  $\mu$ g/mL 的組別則幾乎完全死亡(95.7%)。在分析流式細胞儀中 FSC 與 SSC 的圖形後，可以發現隨著 AgNPs 的暴露劑量增加，有一部份 FSC 向左位移，一部份 SSC 向上位移之情形(圖 4.20(B))，這樣的結果證實 NIH-3T3 細胞在暴露 AgNPs 後，的確會造成型態上的改變，其改變的原因可能是因為細胞凋亡變成碎屑而縮小，以及細胞攝入奈米銀而造成細胞內複雜度增加。

藉由上述三種不同細胞毒性測試方法之結果，我們可以瞭解以 AgNPs 做為細胞測試平台之受試物質，利用 MTT/MTS assay 以及 Live/Dead cell viability assay 之分析皆能獲得類似的結果，並且達到評估初步毒性反應之目的。

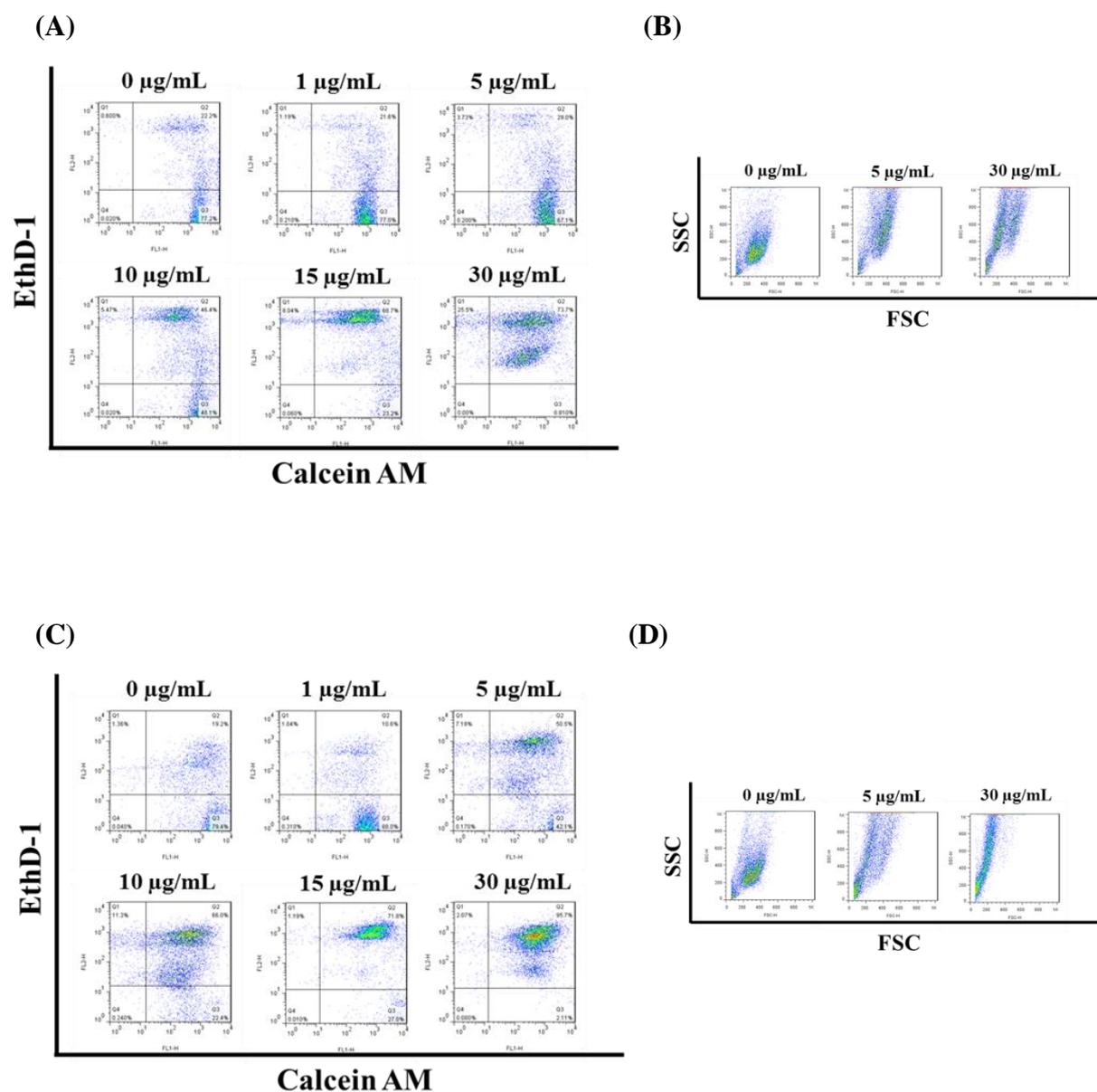
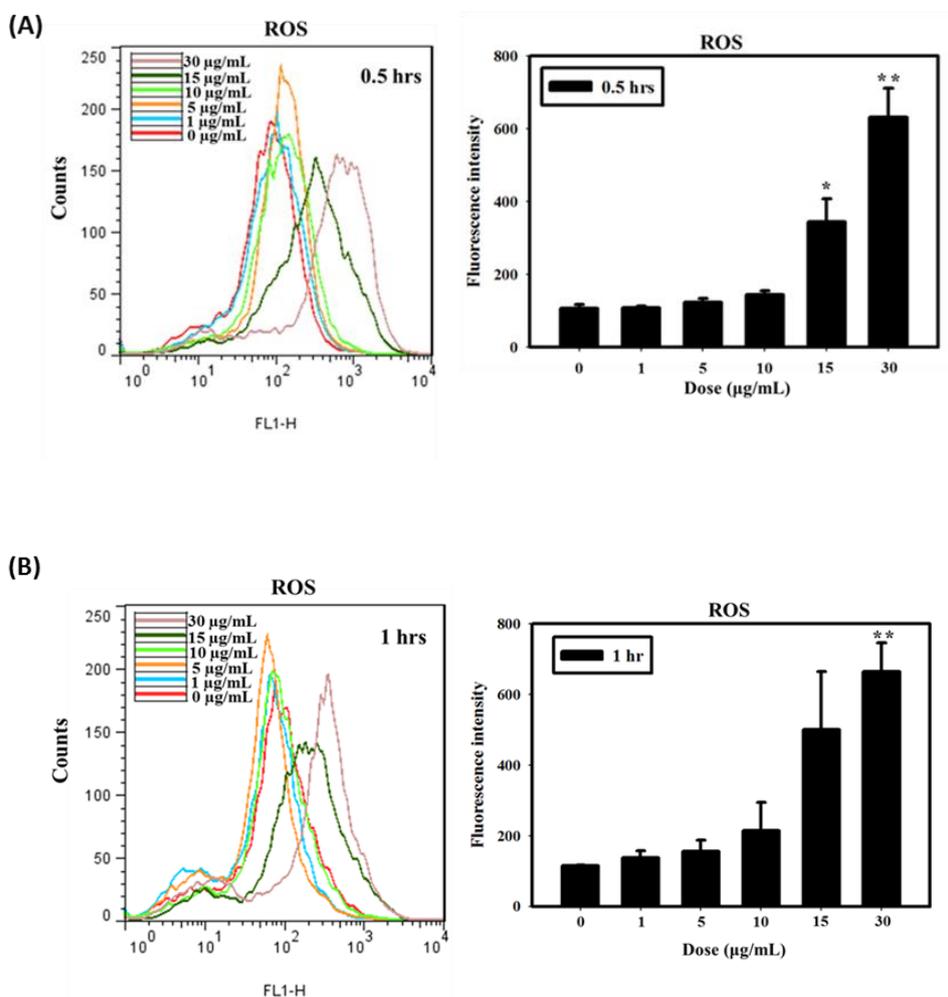


圖 4.20 以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入奈米顆粒之現象。NIH-3T3 細胞暴露不同劑量之合成 AgNPs，於 24 小時及 48 小時後以流式細胞儀分析(A)(C)細胞死亡情形與(B)(D)細胞攝入奈米微粒之情況 (每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。X 軸：Calcein-AM 表示存活的細胞；Ethidium 表示死亡的細胞。FSC 表示細胞大小；SSC 表示細胞內顆粒複雜度。

藉由上述三種不同細胞毒性測試方法之結果，我們可以瞭解以 AgNPs 做為細胞測試平台之受試物質，利用 MTT/MTS assay 以及 Live/Dead cell viability assay 之分析皆能獲得類似的結果，並且達到評估初步毒性反應之目的。

#### d. 以流式細胞儀測量 ROS 之生成情形

將 NIH-3T3 細胞暴露於不同劑量(1、5、10、15 及 30  $\mu\text{g/mL}$ )之 AgNPs 之後，分別在 0.5、1、3 小時進行 ROS 生成之測量，其結果顯示隨著處理的濃度增加，在 0.5 及 1 小時的時間點皆有濃度相關效應，而 1 小時的表現量又比 0.5 小時來的高，此外，ROS 的產生量從暴露 AgNPs 0.5 小時持續至 1 小時後，在 3 小時時發現 ROS 生成量有下降恢復的情形 (圖 4.21)，並以  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ) 作為 positive control。



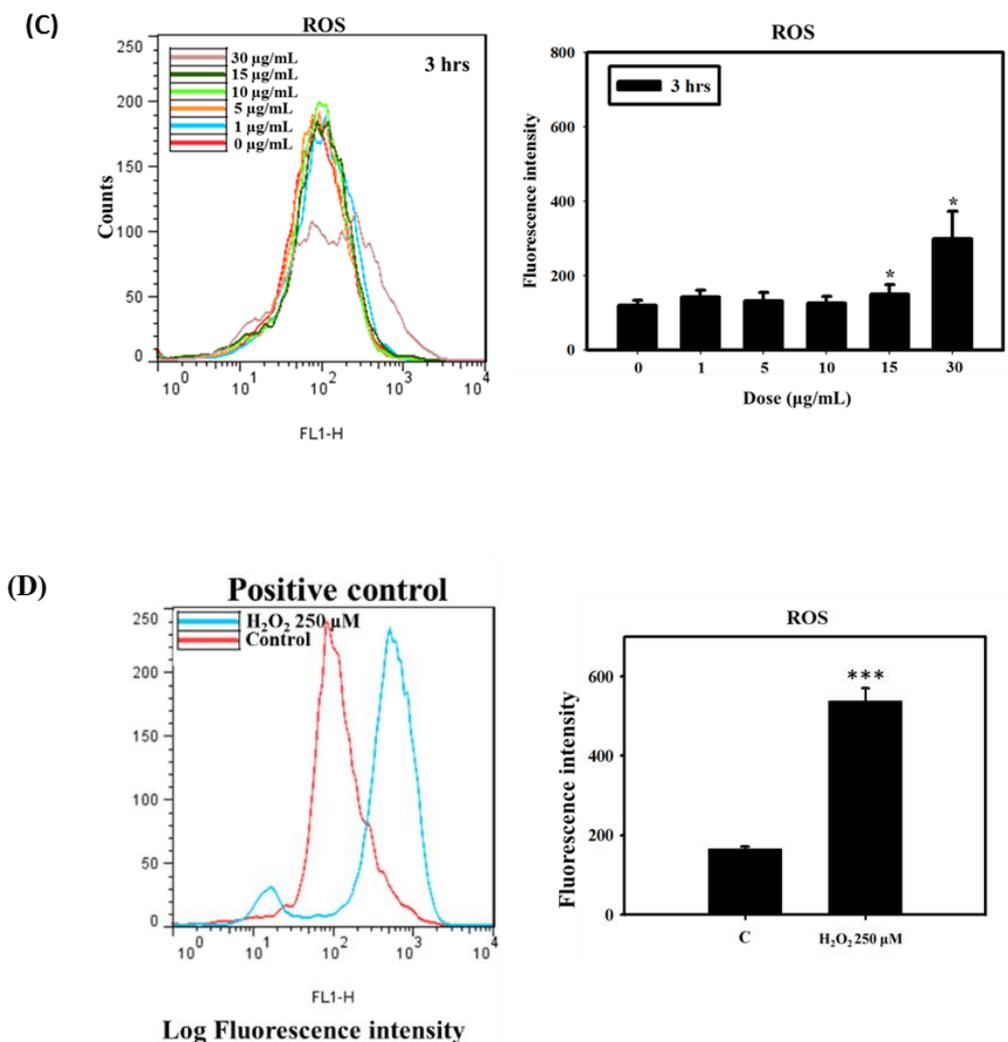
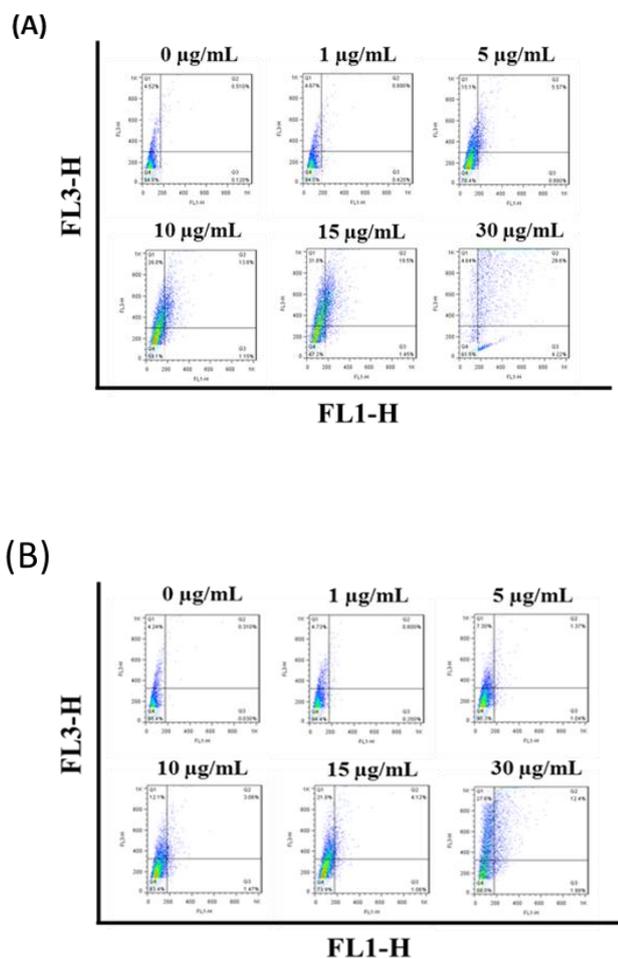


圖 4. 21 NIH-3T3 細胞暴露不同劑量之 AgNPs 造成 ROS 量上升。利用 DCFH-DA 染劑進行流式細胞儀之 ROS 分析 (每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。以過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (250 µM)作為 Positive Control。(A)暴露 AgNPs 0.5 小時後之分析結果。(B) 暴露 AgNPs 1 小時後之分析結果。(C) 暴露 AgNPs 3 小時後之分析結果。(D)暴露 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250 µM) 0.5 小時後之分析結果。\* $p < 0.05$  versus Control、\*\* $p < 0.01$  versus Control、\*\*\* $p < 0.001$  versus Control。

氧化壓力的產生是生物體面對外在壓力而產生的第一道保護防線，因此在本次計畫中，我們應用指標測定的方式，在短時間內暴露 AgNPs 皆能測出 ROS 的表現量上升，並且 ROS 指標可能於奈米微粒暴露後 0.5 至 1 小時便開始產生改變，雖然後續的表現量有下降的趨勢，然而 ROS 在體內的生成可能屬於一種動態平衡的狀態，然而一旦有大量的刺激物暴露到細胞，即會產生大量的 ROS 訊號進而啟動細胞機轉來對危害做出反應。

### e. 以流式細胞儀分析細胞自體吞噬之百分比

藉由不同染劑之偵測，我們利用流式細胞儀分析細胞自體吞噬之百分比。NIH-3T3 細胞暴露 1、5、10、15 及 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等濃度之 AgNPs，分別收取暴露 AgNPs 後 18 及 24 小時的細胞，以 Acridine orange (AO) 染色後，利用流式細胞儀分析細胞自體吞噬的百分比。其結果顯示，隨著暴露 AgNPs 的濃度及時間增加，誘發 NIH-3T3 細胞產生細胞自體吞噬的情形也隨著上升，尤其在處理 18 小時後，高濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  組別結果發現有明顯的細胞自體吞噬情形，約誘發 40% 的細胞自體吞噬(圖 4.22(A)(C))，另外，也發現 NIH-3T3 細胞在暴露 AgNPs 24 小時之後，在 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度處理下約誘發 50% 的細胞自體吞噬，而最高濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的組別則因為細胞死亡情形嚴重，因此染劑無法染上，無法偵測細胞自體吞噬情形 (圖 4.22(B)(C))。



(C)

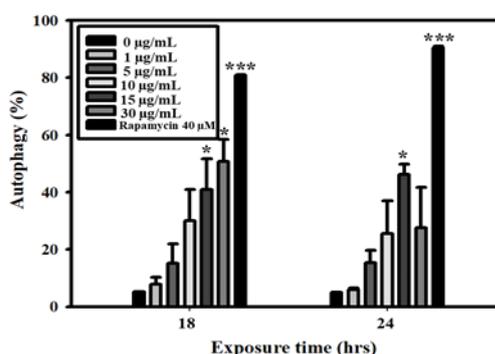


圖 4.22 NIH-3T3 細胞在經由不同濃度的合成 AgNPs 處理後 (A)18 及(B)24 小時，利用流式細胞儀分析細胞自體吞噬(Autophagy)的百分比(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。(C)將流式細胞儀分析的結果量化後，計算 NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs (1, 5, 10, 15, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 18 及 24 小時發生細胞自體吞噬之百分比，以 Rapamycin (40  $\mu\text{M}$ )作為 Positive Control。\* $p < 0.05$  versus Control、\*\*\* $p < 0.001$  versus Control。

#### f.以流式細胞儀測定細胞凋亡與細胞壞死之百分比

我們藉由 Annexin & PI 染劑之偵測，利用流式細胞儀分析細胞凋亡與細胞壞死之百分比。將合成 AgNPs 溶於含有 10%FBS 之 medium 中，在 AgNPs 的組別以 1、5、10、15 及 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  處理 NIH-3T3 細胞，分別收取曝露 18 及 24 小時的細胞，以 Annexin V(代表細胞凋亡)及 PI(代表細胞壞死)雙染後，以流式細胞儀分析細胞凋亡及細胞壞死的百分比。其中 NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs 後，會隨著濃度的上升而伴隨著細胞凋亡的現象產生(圖 4.23 (A, B))，在暴露高濃度 AgNPs (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 24 小時之後細胞呈現嚴重的細胞凋亡及壞死，其百分比超過 50%(圖 4.23 (C))，且細胞凋亡、壞死程度有隨時間增加而更趨明顯。

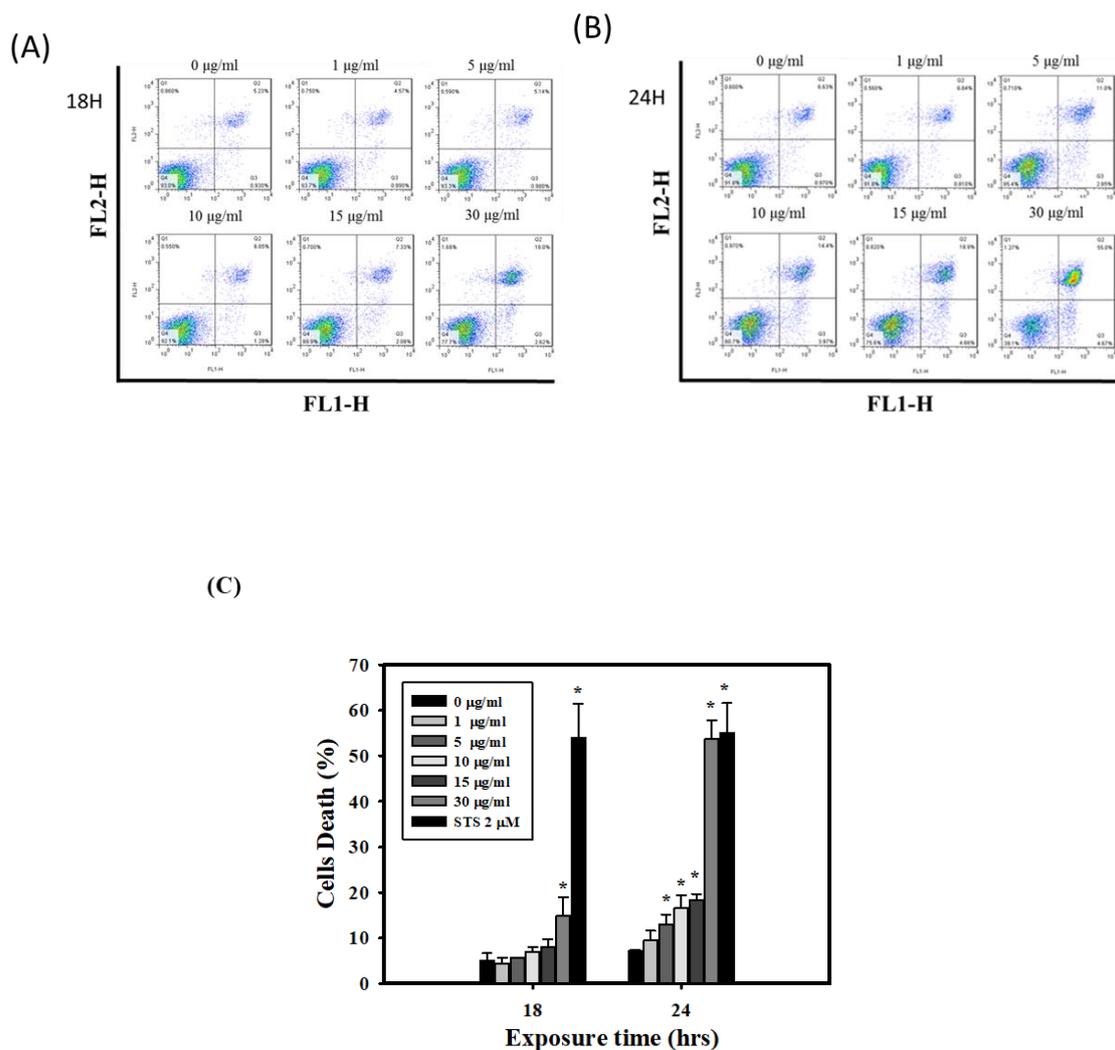


圖 4.23、NIH-3T3 細胞暴露 AgNPs 之後發生細胞凋亡及壞死現象。NIH-3T3 細胞在處理合成 AgNPs 後(A) 18、(B) 24 小時收取細胞，雙染 Annexin V (X-軸，代表細胞凋亡 apoptosis)及 PI (Y-軸，代表細胞壞死 necrosis)，以流式細胞儀分析(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。四個向限分別代表：左上：Annexin V-/PI+：細胞壞死。右上：Annexin V+/PI+：晚期細胞凋亡。右下：Annexin V+/PI-：早期細胞凋亡。左下：Annexin V-/PI-：活的正常細胞。將流式細胞儀分析的結果量化後，計算 NIH-3T3 曝露 AgNPs (1, 5, 10, 15, 30 µg/ml)18 及 24 小時之後，發生(C)細胞凋亡及細胞壞死總和之百分比 (Cell Death) (\* $p < 0.05$ , control v.s. ZnONPs)。以 Staurosporine (STS, 2 µM)作為 Positive Control。

總和以上實驗分析結果，NIH-3T3 細胞在曝露合成奈米銀 24 小時及 48 小時

之後，皆能觀察到隨著濃度的增加而產生之細胞存活率間的差異，在低劑量(1、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的處理下，在兩個時間點下細胞的存活沒有太大的差異，但在較高劑量(15、30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )就有較明顯的差異。奈米銀的暴露能夠快速誘發 ROS 的產生，且利用螢光染劑的染色，即可量測相對量的 ROS 生成情形；分析細胞自體吞噬的結果顯示，奈米銀具有大量誘發自體吞噬作用的能力，一般而言自體吞噬是細胞內維持恆定作用的重要機制反應，近期研究指出自體吞噬作用可以做為奈米物質造成細胞傷害的生物效應指標[183]。本計畫所提出的奈米微粒體外細胞毒性檢測標準方法草案，其應用於合成奈米銀之毒性效應測試皆可看出與未暴露奈米銀組別之間的差異性。

## (2) 利用不同測試方法與生物效應指標分析合成之奈米氧化鋅微粒與相對應之大分子材料對細胞造成的毒性效應

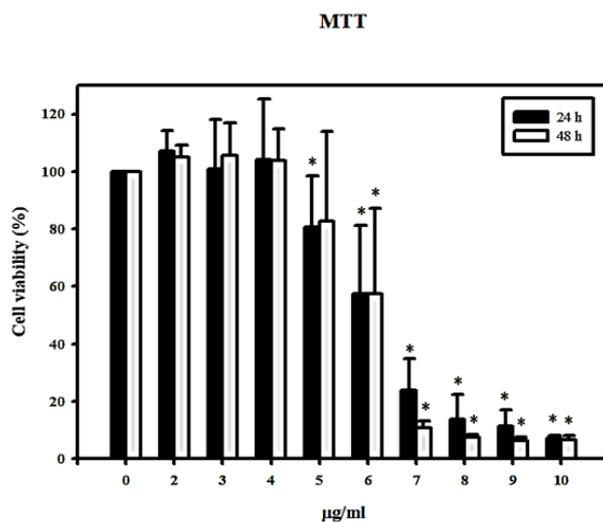
如同前述進行 AgNPs 和 Bulk Ag 的測試方法，本計畫另一個測試物質為奈米氧化鋅(ZnONPs)與其相對應之大分子材料氧化鋅粉末(Bulk ZnO)。同樣的在進行細胞毒性測試前，先以水浴超音波震盪 5 分鐘加以均散奈米微粒與氧化鋅粉末，並以含有 10%FBS 之培養液稀釋，以達到所需暴露之濃度。

### a.利用 MTT assay 測定細胞存活率

為量化合成之 ZnONPs 及 Bulk ZnO 對 NIH-3T3 細胞所造成細胞存活率之影響，我們先採用 MTT assay 進行實驗。NIH-3T3 細胞暴露合成 ZnONPs 及 Bulk ZnO 24 與 48 小時之後，暴露 ZnONPs 之 MTT 結果呈現出明顯的濃度效應，而其顯著的毒性發生於 5、7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，當濃度提高到 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，則僅剩下 10%的細胞存活率。不過此現象在 48 小時的暴露條件下並沒有更明顯細胞死亡現象(圖 4.24)。

而在 NIH-3T3 細胞暴露 Bulk ZnO 之 MTT 結果和暴露 ZnONPs 組別相比，需要暴露更高濃度之 Bulk ZnO 才會顯現明顯的細胞毒性，而在暴露 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，則僅剩下 10%的細胞存活率。此現象在 48 小時的暴露條件下並沒有更明顯細胞死亡現象(圖 4.24)。

(A)



(B)

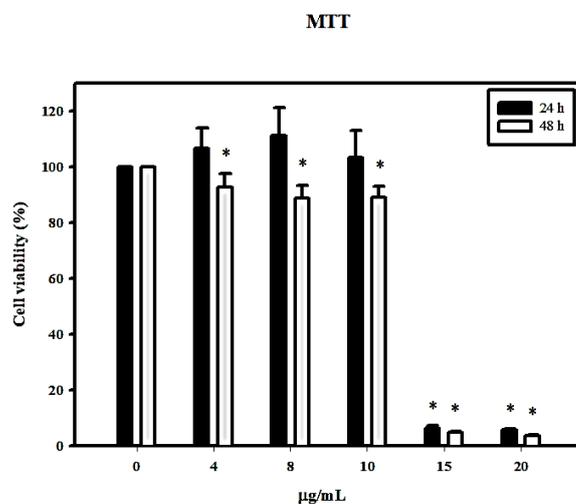


圖 4. 24 利用 MTT assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 ZnONPs 及 Bulk ZnO 曝露後之細胞存活率。(A) NIH-3T3 細胞暴露合成 ZnONPs 24 及 48 小時後細胞存活率。不論是 24 小時或 48 小時暴露，合成 ZnONPs 皆隨著濃度的上升而使細胞毒性增加。(\* $p < 0.05$ , control v.s. 合成 ZnONPs) (B) NIH-3T3 細胞暴露合成 Bulk ZnO 24 及 48 小時後細胞存活率。和 ZnONPs 相比，Bulk ZnO 在 15  $\mu\text{g/ml}$  才開始出現顯著的細胞毒性。(\* $p < 0.05$ , control v.s. Bulk ZnO)

#### b.利用 MTS assay 測定細胞存活率

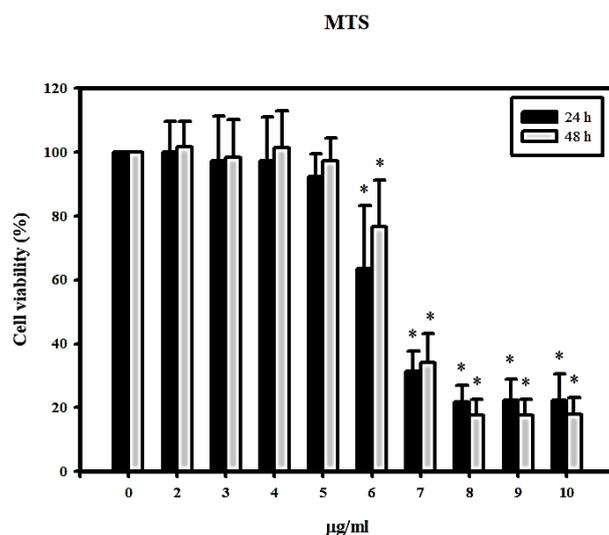
為確定合成之 ZnONPs 及 Bulk ZnO 對 NIH-3T3 細胞所造成細胞存活率影響之濃度我們再利用 MTS assay 進行分析。細胞暴露合成之 ZnONPs 及 Bulk ZnO 24 及 48 小時後，同樣的為了降低氧化鋅對 MTS 之干擾作用，我們經由離心  $1080\times g$ ，10 分鐘後，吸取培養盤內之細胞上清液，利用 ELISA reader 測定 490 nm 之吸光值並加以計算細胞存活率。在細胞暴露 ZnONPs 的部分，其結果呈現出明顯的濃度效應關係，而其顯著的毒性反應開始於  $6\ \mu g/ml$ (圖 4.25)。以此測試所得出的毒性反應濃度和使用 MTT assay 所得之數據雷同，能再次印證其毒性反應濃度。

在 Bulk ZnO 的部分，與暴露 ZnONPs 組別相比，需要暴露更高濃度之 Bulk ZnO 才會出現顯著的細胞毒性，而在暴露  $15\ \mu g/ml$  時，不論是 24 小時或 48 小時暴露的細胞存活率皆低於 50%，其結果也 MTT assay 所得之數據雷同(圖 4.25)。

### **c. Live/Dead cell viability assay**

以螢光顯微鏡觀察之細胞染色情形作為定性之依據。NIH-3T3 細胞暴露 ZnONPs 以及 Bulk ZnO 24 小時之後，同時雙染 calcein AM (使得活細胞產生綠色螢光) 和 ethidium homodimer (使得死細胞呈現紅色螢光) 兩種染劑，結果可以觀察到隨著濃度的增加，表現紅色螢光的細胞數量也有增加的趨勢 (圖 4.26、圖 4.27)。同時也可發現 ZnONPs 在較低濃度時就會誘導 NIH-3T3 細胞的死亡，此結果與 MTT/MTS 細胞存活率的數據雷同。

(A)



(B)

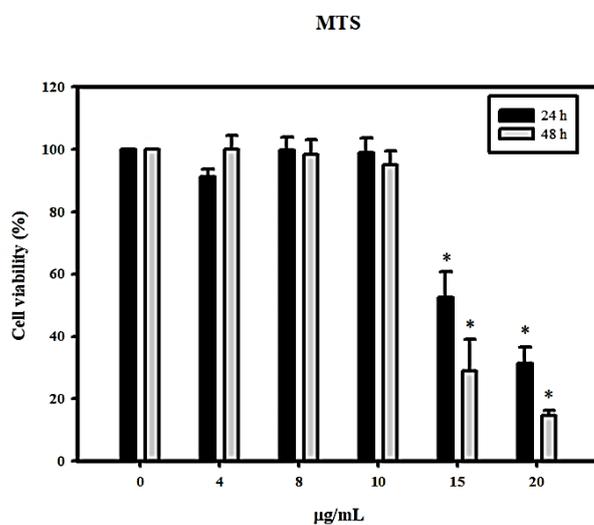


圖 4. 25、利用 MTS assay 之細胞毒性測試方法分析 NIH-3T3 經 ZnONPs 及 Bulk ZnO 暴露後之細胞存活率。(A) NIH-3T3 細胞暴露合成 ZnONPs 24 及 48 小時後細胞存活率。不論是 24 小時或 48 小時暴露，合成 ZnONPs 皆隨著濃度的上升而使細胞毒性增加。(\* $p < 0.05$ , control v.s. 合成 ZnONPs) (B) NIH-3T3 細胞暴露合成 Bulk ZnO 24 及 48 小時後細胞存活率。和 ZnONPs 相比，Bulk ZnO 在 15  $\mu\text{g/ml}$  有明顯細胞毒性增加。(\* $p < 0.05$ , control v.s. Bulk ZnO)

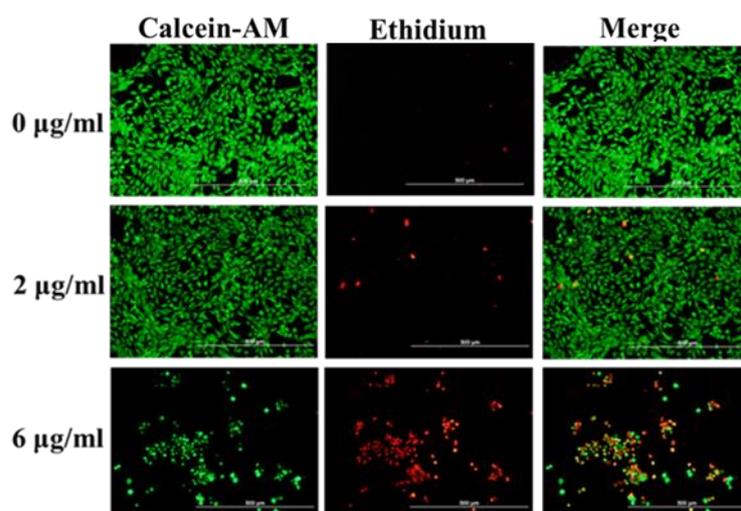


圖 4. 26、以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 經奈米氧化鋅(ZnONPs)暴露後之死亡情形。NIH-3T3 細胞暴露 ZnONPs 2 µg/ml 與 6 µg/ml，於 24 小時後放大 100 倍之觀察結果，可發現 NIH-3T3 細胞經奈米氧化鋅暴露後產生顯著之紅色螢光。

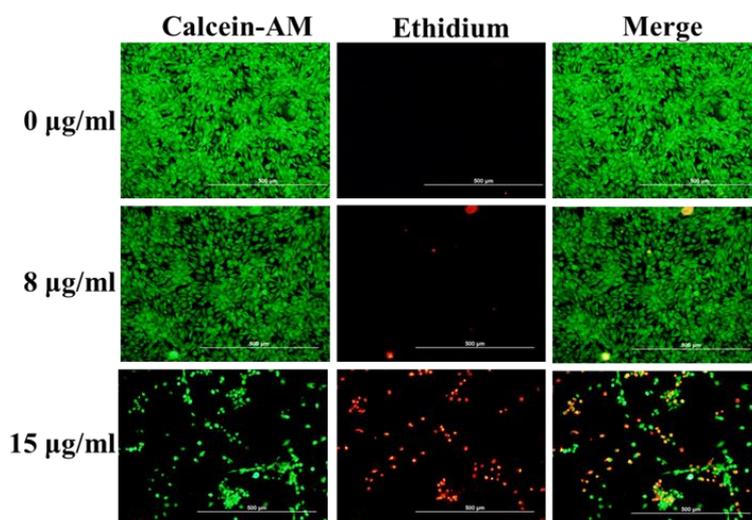


圖 4. 27、以 Live/Dead cell viability assay 合併使用螢光顯微鏡觀察 NIH-3T3 經塊材氧化鋅(Bulk ZnO)暴露後之死亡情形。NIH-3T3 細胞 Bulk ZnO 8 µg/ml 與 15 µg/ml，於 24 小時後放大 100 倍之觀察結果，可發現 NIH-3T3 細胞經 Bulk ZnO 暴露後產生顯著之紅色螢光。

隨後再以流式細胞儀分析細胞染色與細胞攝入奈米微粒之情形。NIH-3T3 細胞暴露 Bulk ZnO 以及 ZnONPs 24 及 48 小時之後，收集各組細胞並進行染色。

其結果顯示細胞在暴露 Bulk ZnO 24 小時後，於 15  $\mu\text{g/ml}$  的濃度下開始對細胞造成毒性，並且在 48 小時達到 73.7% 的死亡率(圖 4.28(A)、圖 4.29(A))。同時分析流式細胞儀中 FSC 與 SSC 的圖形後可以發現隨著 Bulk ZnO 的濃度上升，FSC 向左位移而 SSC 則有向上位移之情形(圖 4.28(B)、圖 4.29(B))，此結果證實 Bulk ZnO 的暴露會造成細胞型態的改變，其改變的原因可能是因為細胞凋亡變成碎屑而縮小以及細胞攝入 Bulk ZnO 而造成細胞內複雜度增加。

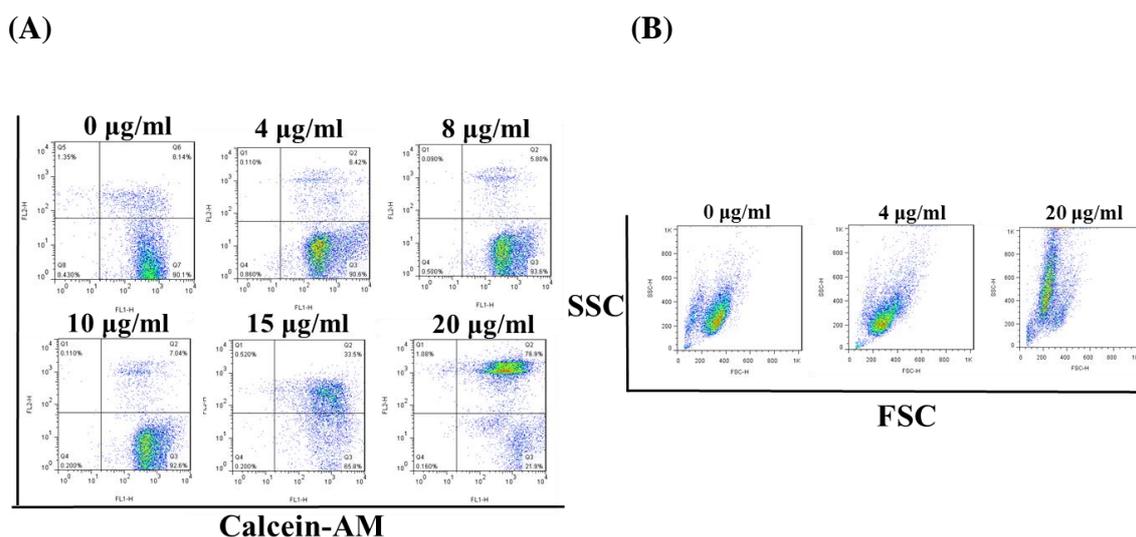


圖 4.28、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 Bulk ZnO 之現象。NIH-3T3 細胞暴露不同濃度之 Bulk ZnO，於 24 小時後以流式細胞儀分析(A)細胞死亡情形與(B)細胞攝入奈米微粒之情況(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。X 軸：Calcein-AM 表示活的細胞；Ethidium 表示死的細胞。FSC 表示細胞大小；SSC 表示細胞內顆粒。

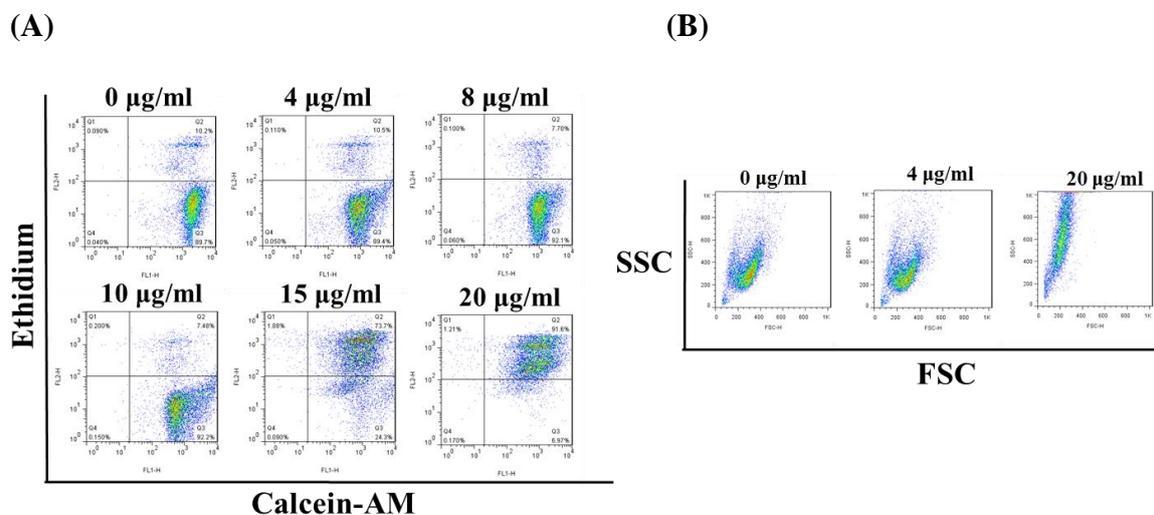


圖 4.29、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 Bulk ZnO 之現象。NIH-3T3 細胞暴露不同濃度之 Bulk ZnO，於 48 小時後以流式細胞儀分析 (A) 細胞死亡情形與 (B) 細胞攝入奈米微粒之情況(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。X 軸：Calcein-AM 表示活的細胞；Ethidium 表示死的細胞。FSC 表示細胞大小；SSC 表示細胞內顆粒。

而在 NIH-3T3 細胞暴露 ZnONPs 的結果方面，其結果顯示在暴露 ZnONPs 24 小時後，於 6 µg/ml 的濃度下開始對細胞造成明顯的死亡，並且在 48 小時達到 90% 以上(圖 4.30 (A)、圖 4.31))，毒性相較於 Bulk ZnO 高出了兩倍以上。同時分析式細胞儀中 FSC 與 SSC 的圖形後可以發現隨著 Bulk ZnO 的濃度上升，FSC 向左位移而 SSC 則有向上位移之情形(圖 4.30 (A)、圖 4.31))。

#### d.以流式細胞儀測量 ROS 之生成情形

NIH-3T3 細胞給予不同濃度暴露之後，分別在 0.5、1、3 小時進行 ROS 生成之測量，其結果顯示細胞在暴露 Bulk ZnO 0.5 及 1 小時等較短時間時，Bulk ZnO 並不會引起 ROS 明顯的生成，而在暴露 3 小時後，開始隨著 Bulk ZnO 暴露濃度的增加，ROS 呈現增加的現象 (圖 4.32)。

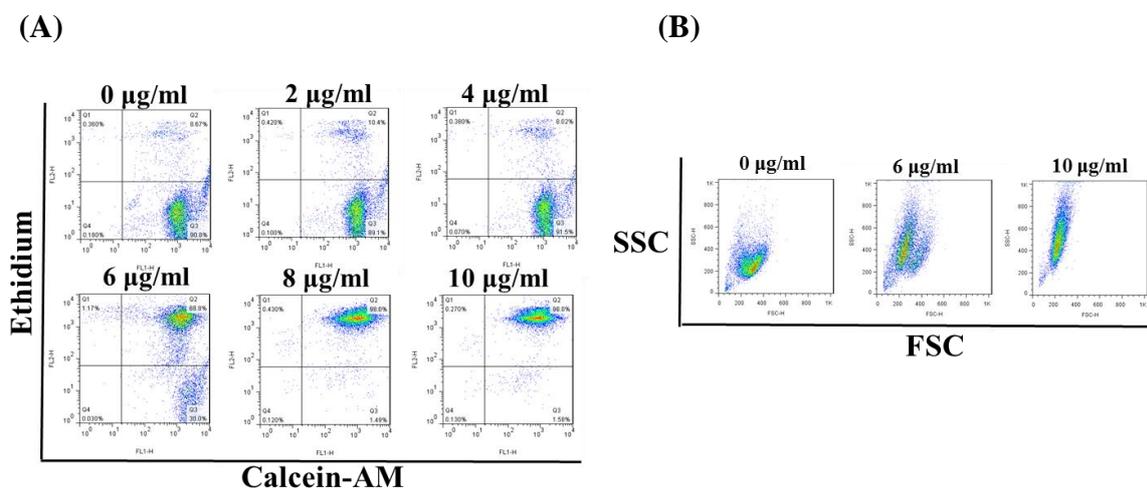


圖 4.30、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 ZnONPs 之現象。NIH-3T3 細胞暴露不同濃度之 ZnONPs，於 24 小時後以流式細胞儀分析(A) 細胞死亡情形與 (B) 細胞攝入奈米微粒之情況(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。X 軸：Calcein-AM 表示活的細胞；Ethidium 表示死的細胞。FSC 表示細胞大小；SSC 表示細胞內顆粒。

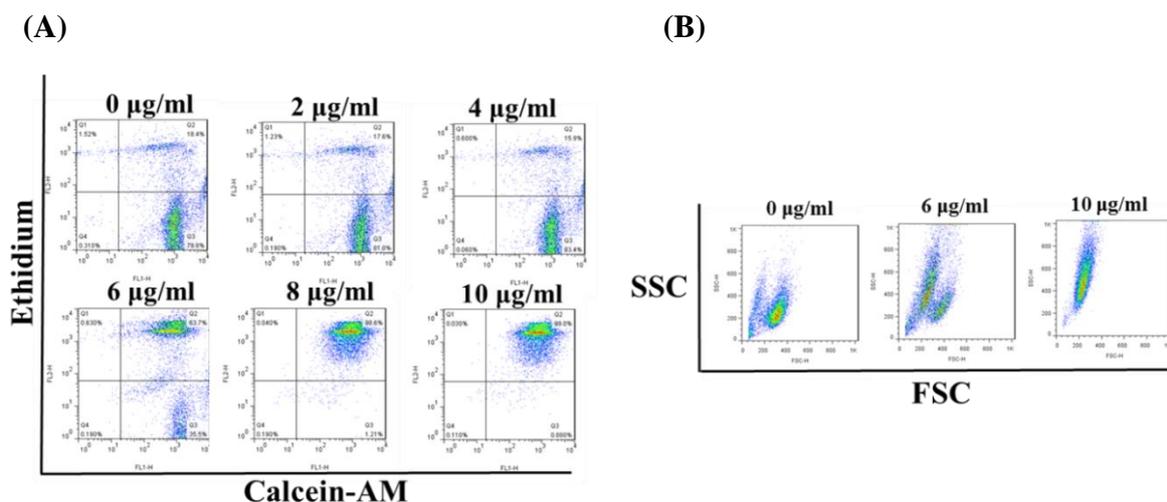


圖 4.31、以流式細胞儀合併使用 Live/Dead cell viability assay，分析細胞存活率及細胞攝入 ZnONPs 之現象。NIH-3T3 細胞暴露不同濃度之 ZnONPs，於 48 小時後以流式細胞儀分析(A)細胞死亡情形與(B)細胞攝入奈米微粒之情況(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。X 軸：Calcein-AM 表示活的細胞；Ethidium 表示死

的細胞。FSC 表示細胞大小；SSC 表示細胞內顆粒。

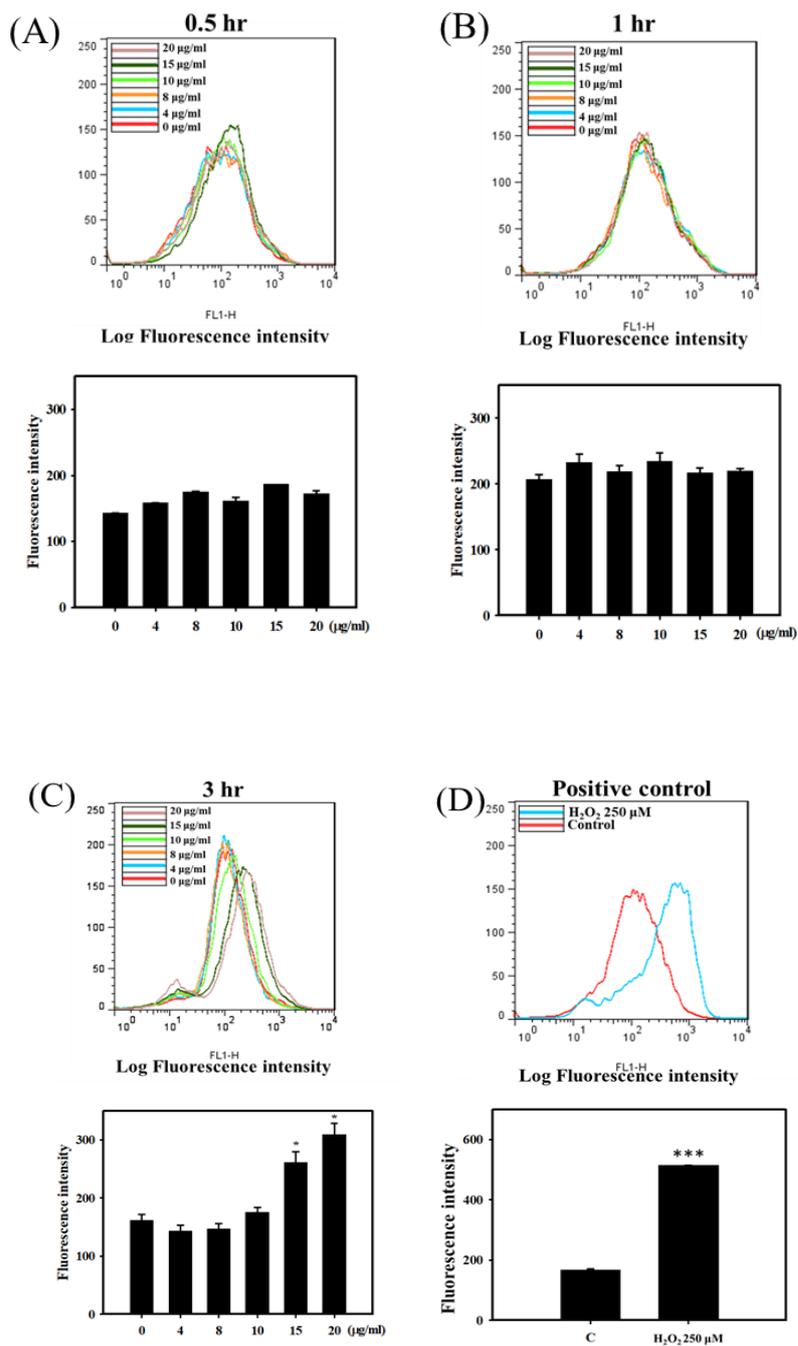
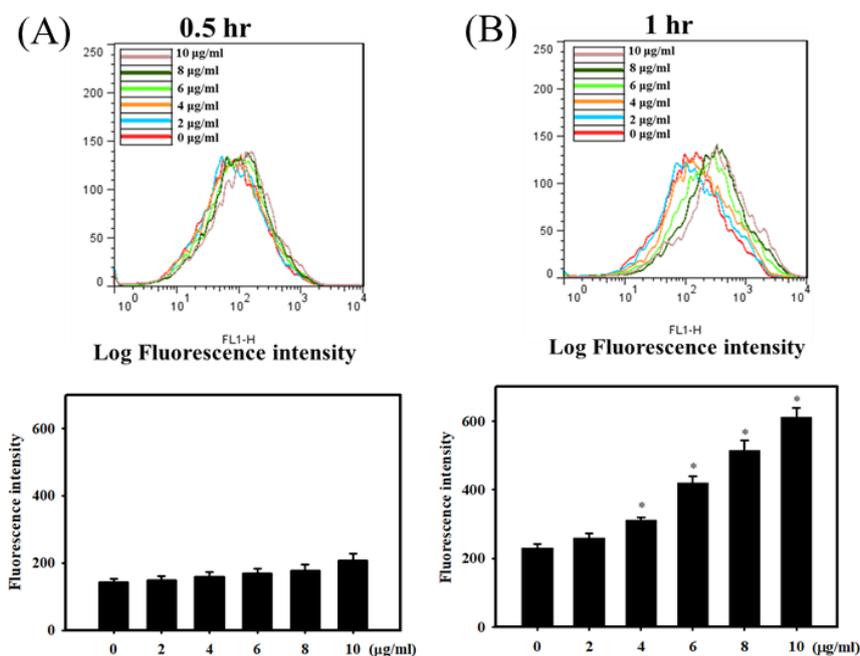


圖 4.32、NIH-3T3 細胞暴露不同濃度 Bulk ZnO 在不同時間點下所造成之 ROS 生成量。利用 DCFH-DA 染劑進行流式細胞儀之 ROS 分析 (每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。以過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (250 µM)作為 Positive Control。 (A)暴露 Bulk ZnO 0.5 小時後之分析結果。 (B) 暴露 Bulk ZnO 1 小時後之分析結果。 (C) 暴露

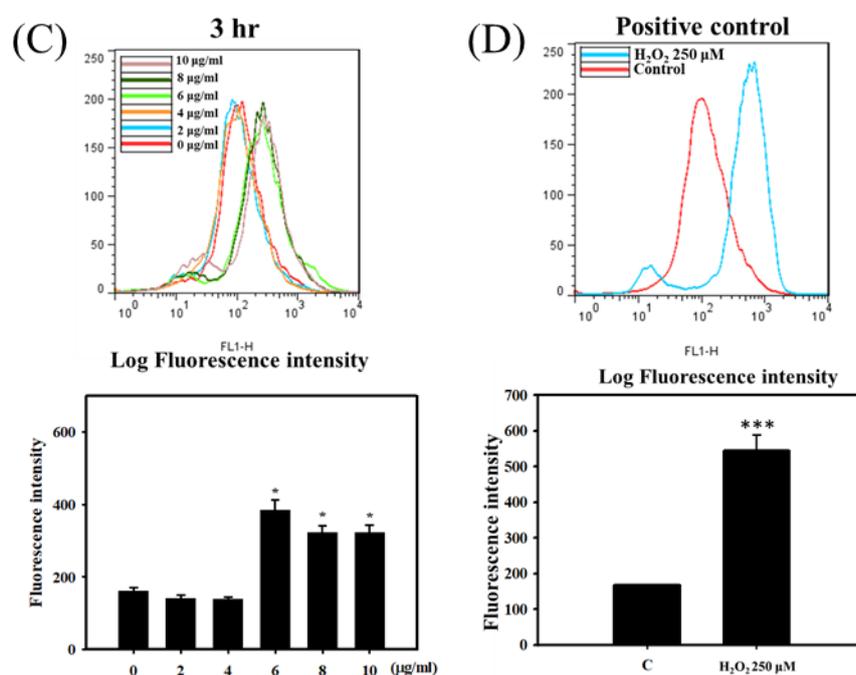
Bulk ZnO 3 小時後之分析結果。(D)暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ) 0.5 小時後之分析結果。  
 $*p < 0.05$  versus Control、 $**p < 0.01$  versus Control、 $***p < 0.001$  versus Control。

而在暴露 ZnONPs 方面，NIH-3T3 細胞給予不同濃度之暴露之後，同樣分別在 0.5、1、3 小時進行 ROS 生成之測量。其結果顯示細胞在暴露 ZnONPs 0.5 小時之較短時間時，暴露 ZnONPs 並不會引起 ROS 有明顯的生成，而在暴露 1 小時後，開始隨著 ZnONPs 暴露濃度的增加，ROS 呈現增加的現象，並且在暴露較高濃度之組別其 ROS 生成會持續至第 3 小時 (圖 4.33)。



**圖 4.33 NIH-3T3 細胞暴露不同濃度 ZnONPs 在不同時間點下所造成之 ROS 生成量。**利用 DCFH-DA 染劑進行流式細胞儀之 ROS 分析 (每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。以過氧化氫( $H_2O_2$ ) (250  $\mu M$ )作為 Positive Control。(A)暴露 ZnONPs 0.5 小時後之分析結果。(B)暴露 ZnONPs 1 小時後之分析結果。(C) 暴露 ZnONPs 3 小時後之分析結果。(D)暴露  $H_2O_2$  (250  $\mu M$ ) 0.5 小時後之分析結果。\* $p < 0.05$  versus Control、\*\* $p < 0.01$  versus Control、\*\*\* $p < 0.001$  versus Control。

本次計畫中，我們透過 ROS 生成量來比較 Bulk ZnO 與 ZnONPs 兩者對細胞影響之差異。在暴露 Bulk ZnO 的情形之下，NIH-3T3 細胞須等到暴露後 3 小時才能誘導較高的 ROS 表現，而 ZnONPs 則是暴露後 1 小時就有明顯的 ROS 產生，並且持續影響至第 3 小時，誘發時間較快。同時也能發現相較於 Bulk ZnO，在較低濃度的 ZnONPs 暴露下即會產生 ROS，此結果表示 ZnONPs 的毒性影響可能高於



Bulk ZnO。ROS 可以做為評估細胞危害的高靈敏度指標。

#### e.以流式細胞儀分析細胞自體吞噬

藉由不同染劑之偵測，我們利用流式細胞儀分析細胞自體吞噬、細胞凋亡與細胞壞死之百分比。將 Bulk ZnO 與 ZnONP 暴露 NIH-3T3 細胞之後，分別收取、18、24 小時的細胞，以 Acridine orange (AO)染色後，利用流式細胞儀分析細胞自體吞

噬的百分比。

在暴露 Bulk ZnO 之結果發現，細胞暴露 18 小時後，在較低濃度(4、8 及 10 $\mu$ g/ml)較無誘發細胞自體吞噬情形，而在 15 $\mu$ g/ml 之組別所誘發之自體吞噬最為明顯，可達到 26.5%。隨著暴露時間的增加，於細胞暴露 24 小時後即可發現 Bulk ZnO 對 10 $\mu$ g/ml 之組別逐漸造成影響而使自體吞噬情形上升，約可達到 15.5% (圖 4.34(A)、圖 4.34 (B))，以長條圖進行量化與統計分析後即可發現誘發自體吞噬情形產生之濃度組別皆達到顯著的統計意義(圖 4.34 (C))。

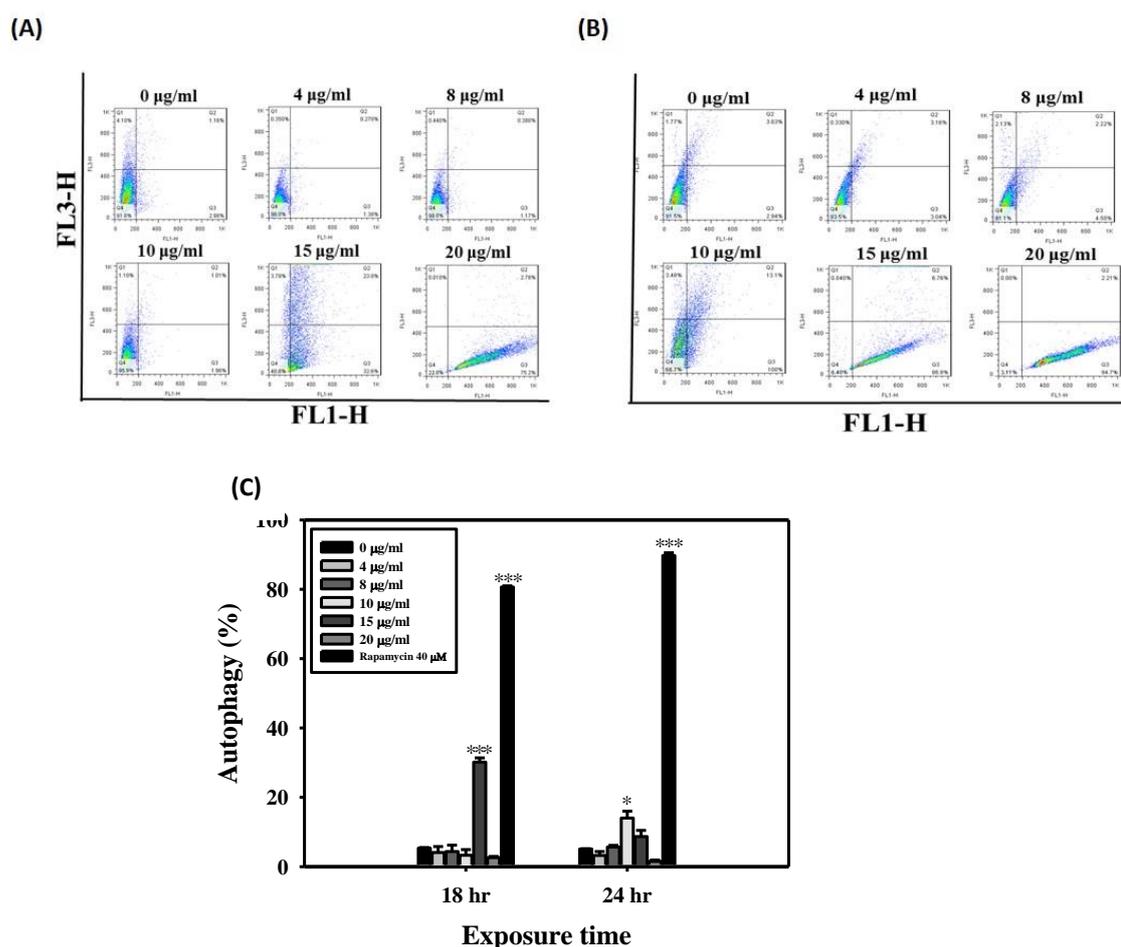


圖 4.34 NIH-3T3 細胞給予不同濃度 Bulk ZnO 處理後於 18 及 24 小時誘發之自體吞噬情形。(A)(B)利用流式細胞儀分析 Autophagy 的百分比(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)，並透過 Flow jo 軟體進行分析之 dot 分布圖。(C)將分析的結果量化成長條圖，並計算 NIH-3T3 細胞曝露 Bulk ZnO 18 及 24 小時之後，發生細胞自體吞噬之百分比，以 Rapamycin (40  $\mu$ M)作為 Positive Control。SCS (Small citrate silver NPs, AgNPs)為正向控制組。\*\*p < 0.05 versus Control, \*\*\*p < 0.01 versus

Control, \*\*\*p <0.001 versus Control。

而在暴露 ZnONPs 之結果發現，細胞暴露 18 小時後，在較低濃度(2 及 4  $\mu\text{g/ml}$ )較無誘發細胞自體吞噬情形，而 6  $\mu\text{g/ml}$  之組別在暴露 18 小時後開始受到 ZnONPs 之影響，自體吞噬情形略為上升。而隨著暴露時間的增加，於細胞暴露 24 小時後即可發現 ZnONPs 對 6  $\mu\text{g/ml}$  之組別造成明顯的自體吞噬上升，約可達到 28.7% (圖 4.35(A)、圖 4.35 (B))，以長條圖進行量化與統計分析後即可發現誘發自體吞噬情形產生之濃度組別皆達到顯著的統計意義(圖 4.35 (C))。

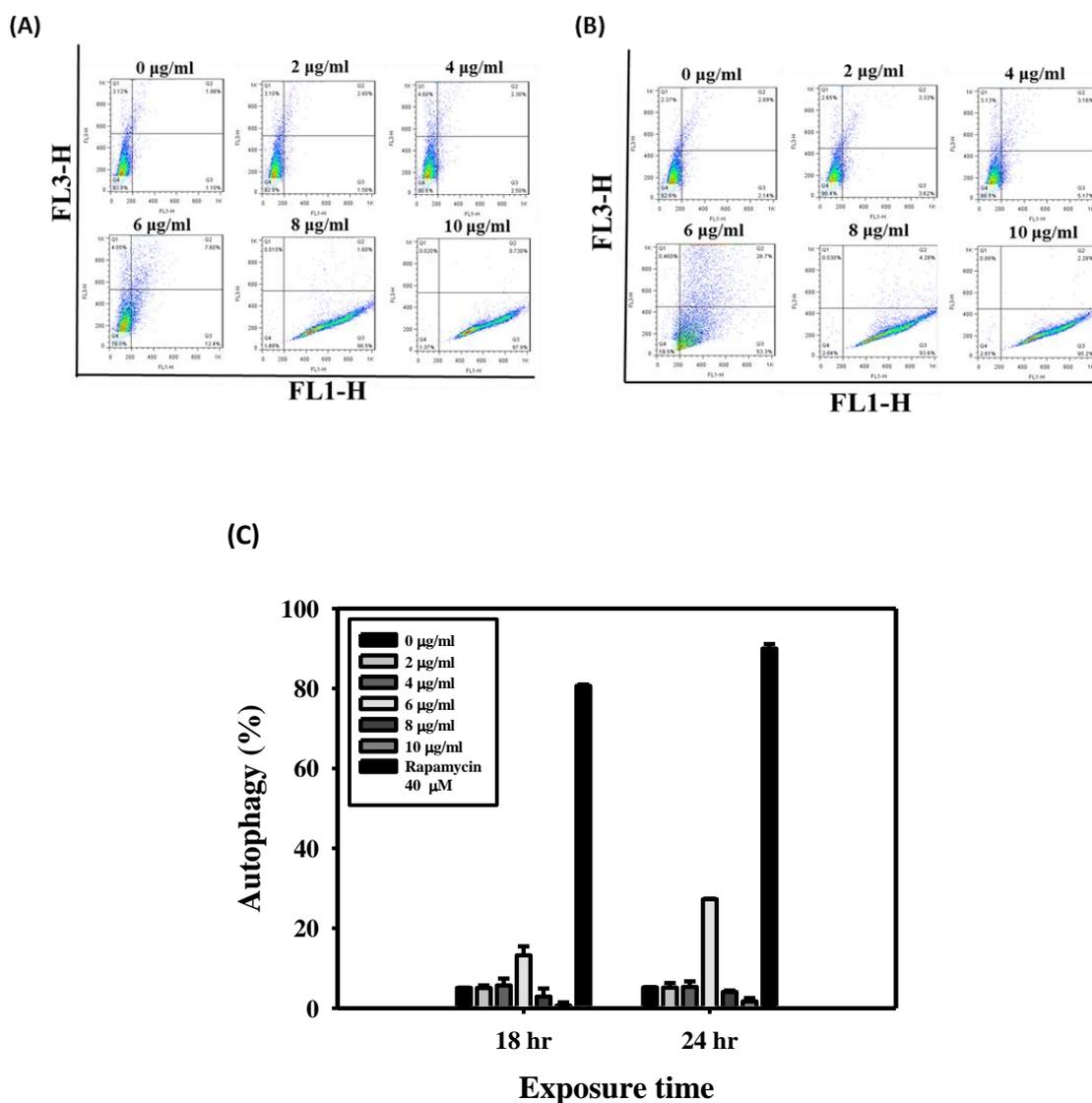


圖 4.35、NIH-3T3 細胞給予不同濃度 ZnONPs 處理後於 18 及 24 小時誘發之自體吞噬情形。(A)(B)利用流式細胞儀分析 Autophagy 的百分比(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)，並透過 Flow jo 軟體進行分析之 dot 分布圖。(C)將分析的結

果量化成長條圖，並計算 NIH-3T3 細胞曝露 ZnONPs 18 及 24 小時之後，發生細胞自體吞噬之百分比，以 Rapamycin (40  $\mu$ M)作為 Positive Control。  $**p < 0.05$  versus Control,  $**p < 0.01$  versus Control,  $***p < 0.001$  versus Control。

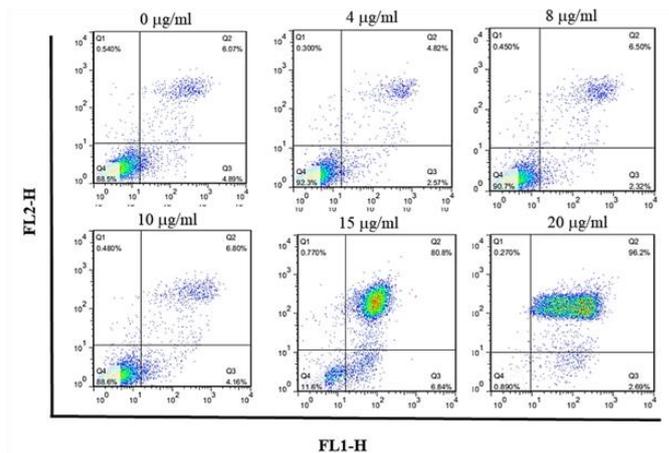
#### f.以流式細胞儀測定細胞凋亡與細胞壞死之百分比

將合成 ZnONPs 及 Bulk ZnO 溶於含有 10%FBS 之 medium 中，在 ZnONPs 的組別以 2、4、6、8 及 10  $\mu$ g/ml 處理 NIH-3T3 細胞；Bulk ZnO 的組別以 4、8、10、15 及 20  $\mu$ g/ml 處理 NIH-3T3 細胞之後，分別收取暴露 18 及 24 小時的細胞，以 Annexin V(代表細胞凋亡)及 PI(代表細胞壞死)雙染後，以流式細胞儀分析細胞凋亡及細胞壞死的百分比。

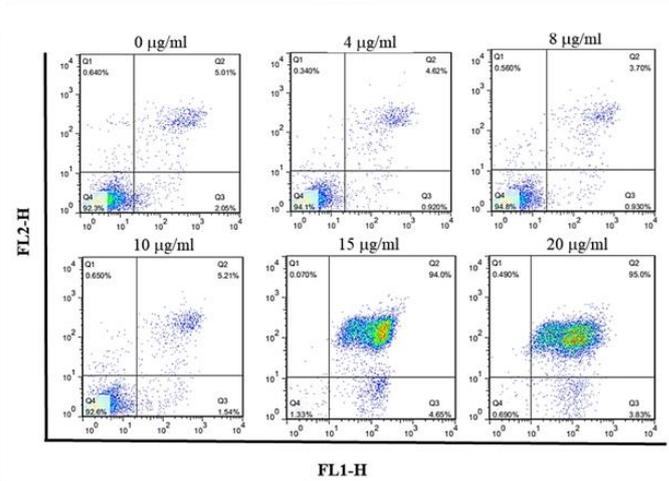
其中 NIH-3T3 細胞曝露 6  $\mu$ g/ml ZnONPs 後 18 及 24 小時分別誘發 20%及 15%左右的細胞凋亡(圖 4.36)，在暴露更高濃度 ZnONPs 下(8, 10  $\mu$ g/ml)細胞呈現嚴重的細胞凋亡及壞死。不過其細胞凋亡及壞死程度並沒有隨時間增加而更趨明顯。

然而在 Bulk ZnO 暴露的組別中，則濃度需要達到 15 及 20  $\mu$ g/ml 才會在 18 及 24 小時分別誘發嚴重的細胞凋亡及壞死現象(圖 4.37)，此結果和利用 MTT/MTS assay 所得到的細胞毒性結果十分雷同。在此測試我們也選用小粒徑奈米銀微粒 (Small citrate silver NPs, AgNPs) 15  $\mu$ g/ml 來做為正向控制組，15  $\mu$ g/ml AgNPs 在 18 及 24 小時均產生 40%左右的細胞凋亡。

(A) 18h



(B) 24h



(C)

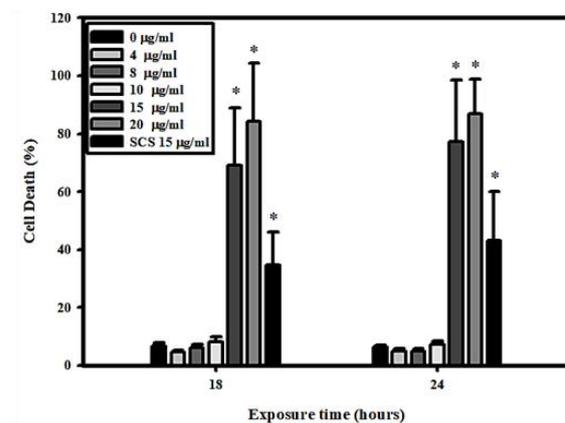
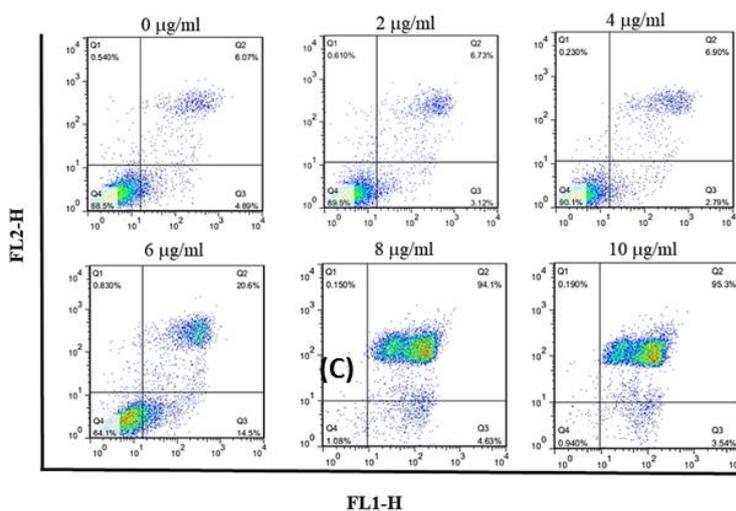
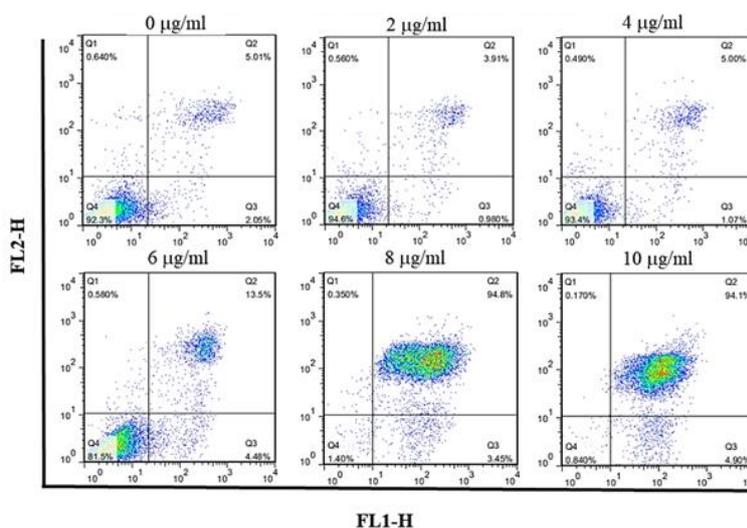


圖 4. 36、NIH-3T3 細胞暴露 Bulk ZnO 之後發生細胞凋亡及壞死現象。NIH-3T3 細胞在處理 Bulk ZnO 後 (A) 18、(B) 24 小時收取細胞，雙染 Annexin V (X-軸，代表細胞凋亡 apoptosis)及 PI (Y-軸，代表細胞壞死 necrosis)，以流式細胞儀分析(每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。四個向限分別代表：左上：Annexin V-/PI+：細胞壞死。右上：Annexin V+/PI+：晚期細胞凋亡。右下：Annexin V+/PI-：早期細胞凋亡。左下：Annexin V-/PI-：活的正常細胞。將流式細胞儀分析的結果量化後，計算 NIH-3T3 曝露 Bulk ZnO(2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g/ml}$ )18 及 24 小時之後，發生 (C) 細胞凋亡及細胞壞死總和之百分比 (Cell Death) ( $*p < 0.05$ , control v.s. Bulk ZnO)。以 Staurosporine (STS, 2  $\mu\text{M}$ )作為 Positive Control。

(A) 18 h



(B) 24 H



**圖 4.37、NIH-3T3 細胞暴露 ZnONPs 之後發生細胞凋亡及壞死現象。** NIH-3T3 細胞在處理合成 ZnONPs 後 (A) 18、(B) 24 小時收取細胞，雙染 Annexin V (X-軸，代表細胞凋亡 apoptosis) 及 PI (Y-軸，代表細胞壞死 necrosis)，以流式細胞儀分析 (每個數據以 10,000 顆細胞作為分析族群)。四個象限分別代表：左上：Annexin V-/PI+：細胞壞死。右上：Annexin V+/PI+：晚期細胞凋亡。右下：Annexin V+/PI-：早期細胞凋亡。左下：Annexin V-/PI-：活的正常細胞。將流式細胞儀分析的結果量化後，計算 NIH-3T3 曝露 ZnONPs (2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 18 及 24 小時之後，發生 (C) 細胞凋亡及細胞壞死總和之百分比 (Cell Death) ( $*p < 0.05$ , control v.s. ZnONPs)。以 Staurosporine (STS, 2  $\mu\text{M}$ ) 作為 Positive Control。

針對細胞之毒性效應影響，首先我們利用 MTT/MTS assay 測量其細胞存活率，我們也利用不同測試方式來測定不同細胞死亡形式，在對 NIH-3T3 細胞暴露合成 ZnONPs 及 Bulk ZnO 24 與 48 小時之後，暴露 ZnONPs 之細胞存活率結果呈現出明顯的濃度效應，而其顯著的毒性發生於 5  $\mu\text{g/ml}$  到 7  $\mu\text{g/ml}$ ，當濃度提高到 8  $\mu\text{g/ml}$  時，其存活率便下降至只有背景值的水平，即表示其大部分細胞皆死亡，然而在 48 小時的暴露條件下並沒有更明顯的細胞死亡現象，表示 ZnONPs 對 NIH-3T3 細胞的毒性並沒有隨著時間增加而加重，此現象和 Petra Kocbek 等人在探討 ZnONPs 對於皮膚角質層細胞毒性的結果雷同[184]。

而在 NIH-3T3 細胞暴露 Bulk ZnO 部分，其細胞毒性和 ZnONPs 相比需要暴露更高濃度之 Bulk ZnO 才會顯現明顯的細胞毒性，而在暴露 15  $\mu\text{g/ml}$  時，不論是 24 小時或 48 小時暴露的細胞存活率皆低於 50%。在細胞暴露 Bulk ZnO 組別，NIH-3T3 細胞曝露 15 及 20  $\mu\text{g/ml}$  Bulk ZnO 後 18 及 24 小時後分別誘發嚴重的細胞凋亡及壞死現象(圖 4.36)，此結果也與 MTT/MTS assay 所得到的細胞毒性結果十分雷同。

本計畫中所使用的塊材氧化鋅(Bulk ZnO)與奈米氧化鋅(ZnONPs)材料，在物化特性方面有很大程度的不同，尤其在奈米等級的型態時，其表面積及活性皆遠大於塊材氧化鋅，對細胞所造成的毒性影響及毒性機制很可能有所不同，進而造成不同細胞死亡型的先後順序與所誘導之百分比的改變。由 Live/Dead assay 分析結果得知於本研究中所選用的兩種物質皆會引發細胞毒性，但相較之下奈米氧化鋅在較低濃度之 6  $\mu\text{g/ml}$  時就會開始對細胞造成影響及死亡，而塊材氧化鋅則是在暴露 15  $\mu\text{g/ml}$  時會對細胞造成死亡。

進一步分析細胞 ROS 生成量，則發現奈米氧化鋅會在較短時間內就引起大量氧化壓力產生，相較之下塊材氧化鋅引起氧化壓力的時間較長，生成量也較少，其

原因可能就是由於奈米氧化鋅結構較小，溶解度也較高，因此奈米氧化鋅可在較短時間內進入細胞，並對細胞造成氧化壓力的影響[185]。而在自體吞噬的結果中同樣發現奈米氧化鋅在較低濃度時，即可導致自體吞噬的情形產生，此現象也證明奈米物質的確具有誘發自體吞噬作用之能力，可以做為奈米微粒生物毒性效應指標之一。本計畫所提出的奈米微粒體外細胞毒性檢測標準方法草案，由上述之奈米銀與奈米氧化鋅結果指出，確實可應用於測試奈米微粒的毒性危害效應。

### 4.3.3 奈米微粒斑馬魚胚胎模式檢測標準方法測試

#### 以 AgNPs 測試斑馬魚胚胎存活率

於本計畫中，為了建立並測試環境中奈米物質的斑馬魚胚胎模式毒性測驗方法，於計畫中將先以奈米銀 (AgNPs) 及大分子銀 (Bulk Ag) 進行測試其測驗方法之可行性，於存活率測驗方法中，斑馬魚胚胎會暴露 AgNPs 和 Bulk Ag，於暴露後每隔 24 小時記錄存活比例，實驗結果顯示於圖 4.38(A)，斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 後其存活率隨著濃度升高而下降，存在劑量效應關係，而當斑馬魚胚胎暴露 bulk Ag 後其存活率即使至 1000  $\mu\text{g/ml}$  的濃度下仍無法造成斑馬魚胚胎有明顯的死亡，因此相較於 bulk Ag 而言，奈米銀微粒之毒性較高。

於 bulk Ag 的實驗中，可發現 bulk Ag 本身難以溶解於水中，因此會快速沉降於底部，這使得我們沒有辦法進行一個精準的量化，這也使得我們難以探討其所誘發的毒性，也因此針對 bulk Ag 將於討論後再修正實驗方向，因此於接下來的實驗中都先暫緩 bulk Ag 的實驗。

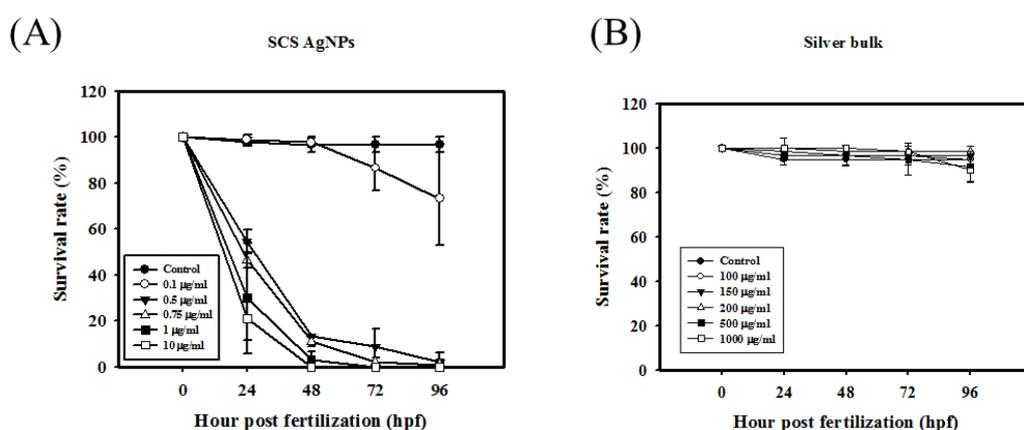


圖 4.38、斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 及 bulk Ag 之存活率。(A) 斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 之存活率 (B)斑馬魚胚胎暴露 bulk Ag 之存活率;每組實驗濃度各有 30 個胚胎進行暴露，並在暴露後(0, 24, 48, 72, 96 hpf) 進行胚胎存活率的紀錄。三重複試驗。橫

軸為斑馬魚胚胎的發育時間，受精後之小時數(hour post-fertilization,hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)

表 4.12、斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒之半致死濃度(LC<sub>50</sub>)。

Hours post fertilization (hpf)	LC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	AgNPs	Bulk AgNPs
24	0.3770 ± 0.235	-
48	0.1730 ± 0.057	-
72	0.1030 ± 0.062	-
96	0.0970 ± 0.078	-

#### 以 AgNPs 及 Bulk Ag 檢測斑馬魚胚胎畸形現象

為了得知是否斑馬魚胚胎在發育期間是否因為環境物質而影響其發育，因此於計畫中會探討斑馬魚胚胎孵化後是否有畸形發生，斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 後，可發現在低濃度 0.1 µg/ml 和 0.5 µg/ml 有較高的畸形率出現(圖 4.39)，不過在 0.1µg/ml 和 0.5µg/ml 的組別中，隨著暴露時間加長，大部分於 72 hpf 有畸形的斑馬魚胚胎都已死亡，這導致畸型的比率沒有隨著暴露時間增加而跟著增高。

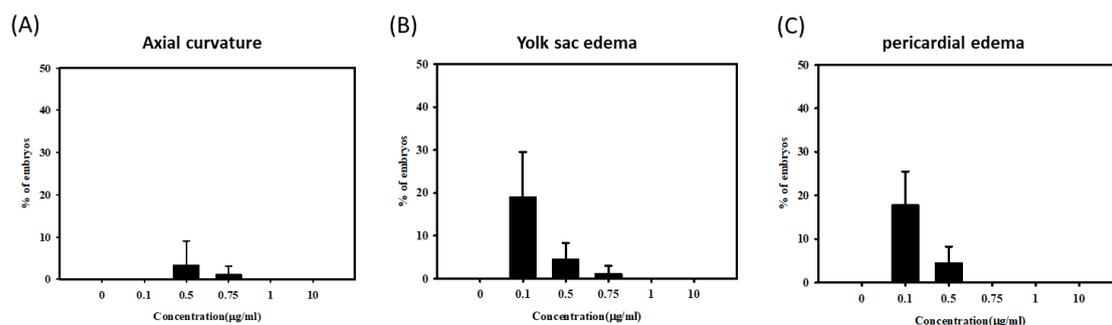


圖 4.39 為斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 各類型畸形比率。(A)斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 之體背軸畸形比率(B) 卵黃囊水腫畸形比率 (C)心包膜水腫畸形比率；每組實驗濃度各有 30 個胚胎進行暴露，並在暴露後 (0, 24, 48, 72, 96 hf) 進行胚胎畸形率的紀

錄。

### 斑馬魚體長量測方法

為了得知是否斑馬魚胚胎在發育期間是否因為環境之物質而影響其發育，斑馬魚胚胎之早期發育情形是可透過體長量測來探討相關議題，因此於計畫中也會探討並建立胚胎發育之體長量測方法，暴露 AgNPs 後，於暴露 72 小時之時間點進行魚體拍攝，並利用電腦軟體量測體長。結果發現(圖 4.40)，隨著 AgNPs 濃度上升，斑馬魚胚胎的體長也隨之遞減，濃度在 0.1 $\mu\text{g/ml}$  和 0.5 $\mu\text{g/ml}$  跟控制組相比有顯著上的差異，並在 0.75  $\mu\text{g/ml}$  的濃度下有最小的體長，因此證明，AgNPs 會導致斑馬魚胚胎的成長及發育的遲緩。

### 暴露 AgNPs 測試氧化壓力檢測方法

目前氧化壓力已被認為是奈米物質所造成的共同細胞毒性機轉[36]，也因此探討奈米所誘發之氧化壓力是必要的，而於本計畫中使用 H<sub>2</sub>DCF-DA 作為檢測斑馬魚胚胎模式之氧化壓力反應的方式，為了建立及測試斑馬魚檢測氧化壓力之方法草案，因此於本計畫中選用奈米銀及奈米氧化鋅及相對之大分子物質進行測驗，結果顯示，氧化壓力會隨著奈米銀之濃度增加而隨之升高(圖 4.41)，也因此結果顯示奈米銀會於斑馬魚胚胎暴露後，誘發氧化壓力增加進而導致細胞傷害。

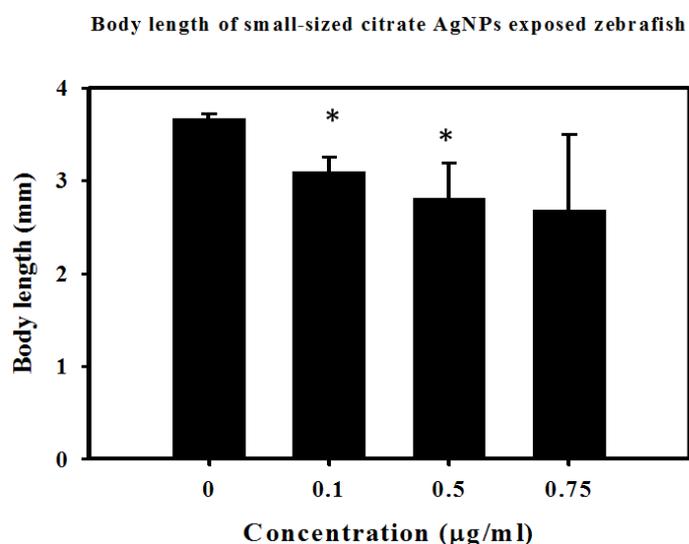


圖 4.40 為斑馬魚胚胎受精後 4 小時暴露 AgNPs 之體長變化。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的濃度不同劑量的 AgNPs (0、0.1、0.5、0.75  $\mu\text{g/ml}$ )，並於暴露 72 小時

進行體長的量測。

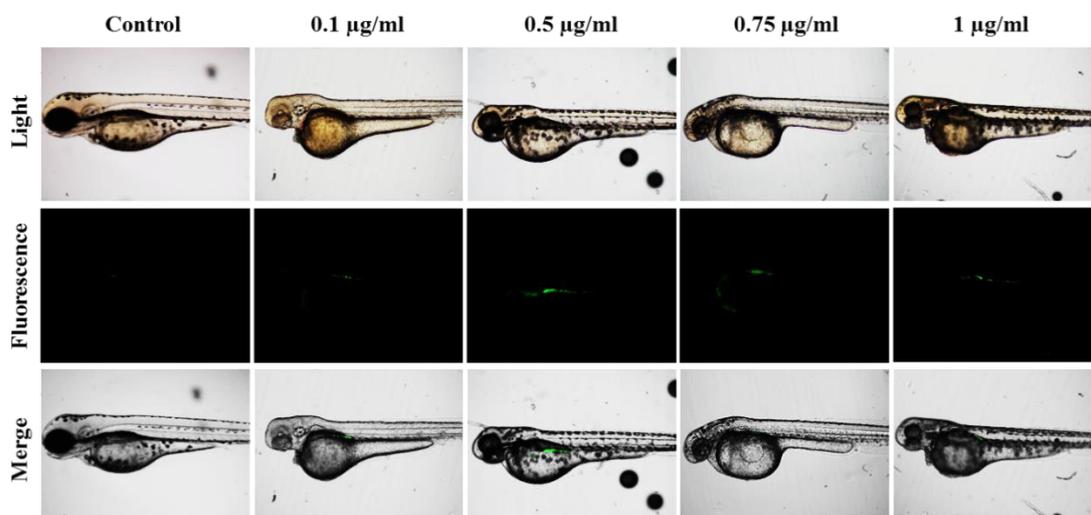


圖 4.41 受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 AgNPs 後之氧化壓力表現。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的 AgNPs ( 0 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 1 µg/ml )後，於受精後 72 小時測量氧化壓力的表現(綠色)，每組稚魚於測量前一小時以 10 µg/ml DCFHDA 螢光染劑進行染色分析。

#### 暴露 AgNPs 測試細胞凋亡測驗方法

為了建立及測試斑馬魚檢測細胞凋亡之方法草案，因此於本計畫中選用奈米銀及奈米氧化鋅及相對應之大分子物質進行測驗，於本計畫中是利用 TUNEL 試驗來測試斑馬魚胚胎之細胞凋亡，為了確保實驗流程無誤，實驗中以 DNase I 做為正向控制組，結果顯示，正向控制組的組別中可發現 TUNEL<sup>+</sup>之訊號，即證明於實驗流程中無誤，而於暴露奈米銀 0.1 µg/ml、0.5 µg/ml、1 µg/ml 的組別中可發現細胞凋亡的現象，但於控制組別則無，代表 AgNPs 會誘發細胞凋亡導致細胞走向死亡(圖 4.42)。

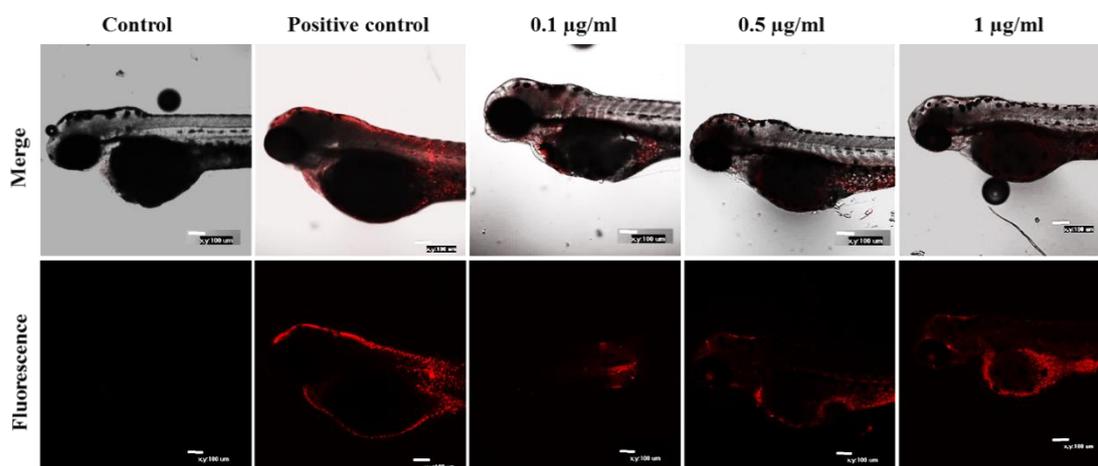


圖 4.42、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒後之細胞凋亡現象。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的奈米銀 (0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ ) 及 DNaseI 後，其細胞凋亡之現象(紅色螢光)。

#### 斑馬魚胚胎暴露 ZnONPs 與 Bulk Zn 的存活率與畸型率

本研究以時序性存活率(time-course survivorship)進行毒性試驗，結果如圖 4.43 所示，斑馬魚胚胎分別暴露奈米氧化鋅微粒(ZnO NPs)與塊材氧化鋅(Bulk ZnO)，結果皆隨著濃度增加斑馬魚胚胎存活率隨之下降，其呈現劑量效應關係。以 SPSS 統計軟體估算半致死劑量(LC<sub>50</sub>)如 4.12 所示，結果顯示在受精後 24 小時之後相同暴露時間下，ZnO NPs 之半致死劑量較 Bulk ZnO 低，即表示對於斑馬魚胚胎而言，奈米氧化鋅微粒相較於塊材氧化鋅之毒性效應較高，目前有相關研究指出，因奈米微粒粒徑比塊材微粒小，因此奈米微粒具有更大之表面反應性(surface reactivity)與滲透能力，使得奈米微粒更容易在生物體與細胞中累積，引發出更嚴重的毒性效應 [186]。

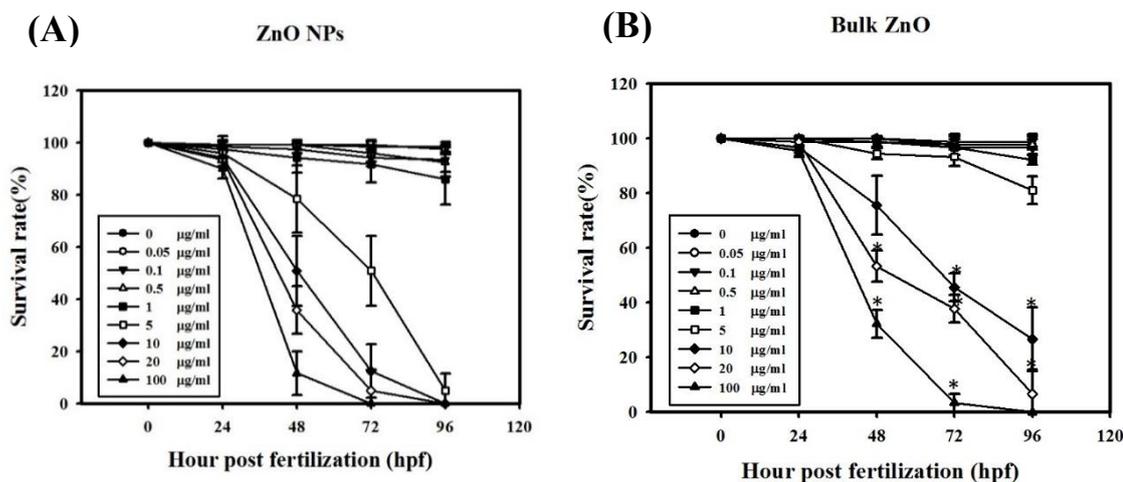


圖 4.43、斑馬魚胚胎暴露奈米氧化鋅微粒之存活率。(A)斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 之存活率；(B)斑馬魚胚胎暴露 Bulk ZnO 之存活率；每組測試濃度各有 30 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。皆進行三重複試驗。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)

表 4.13、斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 及 Bulk ZnO 之半致死劑量

Hour post fertilization (hpf)	LC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	ZnO NPs	Bulk ZnO
24	>100	>100
48	14.719 ± 9.066	32.376 ± 7.871
72	3.565 ± 1.144	12.406 ± 1.932
96	1.489 ± 0.265	5.726 ± 0.99

另外於本計畫中，會觀察斑馬魚胚胎於暴露 ZnO NPs 及 Bulk ZnO 72 小時胚胎之常見畸形現象，其包含體軸彎曲(Axial curvature)、心苞水腫(Pericardial edema)以及卵黃囊水腫(Yolk sac edema)，並依照統計比率進行統計如圖 4.44 所示，結果顯示，斑馬魚胚胎暴露 0.1、0.5、1、5、10 µg/ml 的 ZnO NPs 後，均發現體軸彎

曲、心苞水腫以及卵黃囊水腫(Yolk sac edema)之畸形現象，而在暴露濃度 5  $\mu\text{g/ml}$  中達顯著差異，相關研究也顯示出奈米氧化鋅微粒也會造成上述幾種畸形現象 [187]。此外觀察 Bulk ZnO 所產生之畸形現象，隨著暴露濃度的增加，三種畸形現象均有增加之趨勢，而將 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 比較後可發現，ZnO NPs 其畸形現象比率較 Bulk ZnO 高，因此由上述結果顯示，斑馬魚胚胎對於 ZnO NPs 的毒性反應較 Bulk ZnO 敏感。

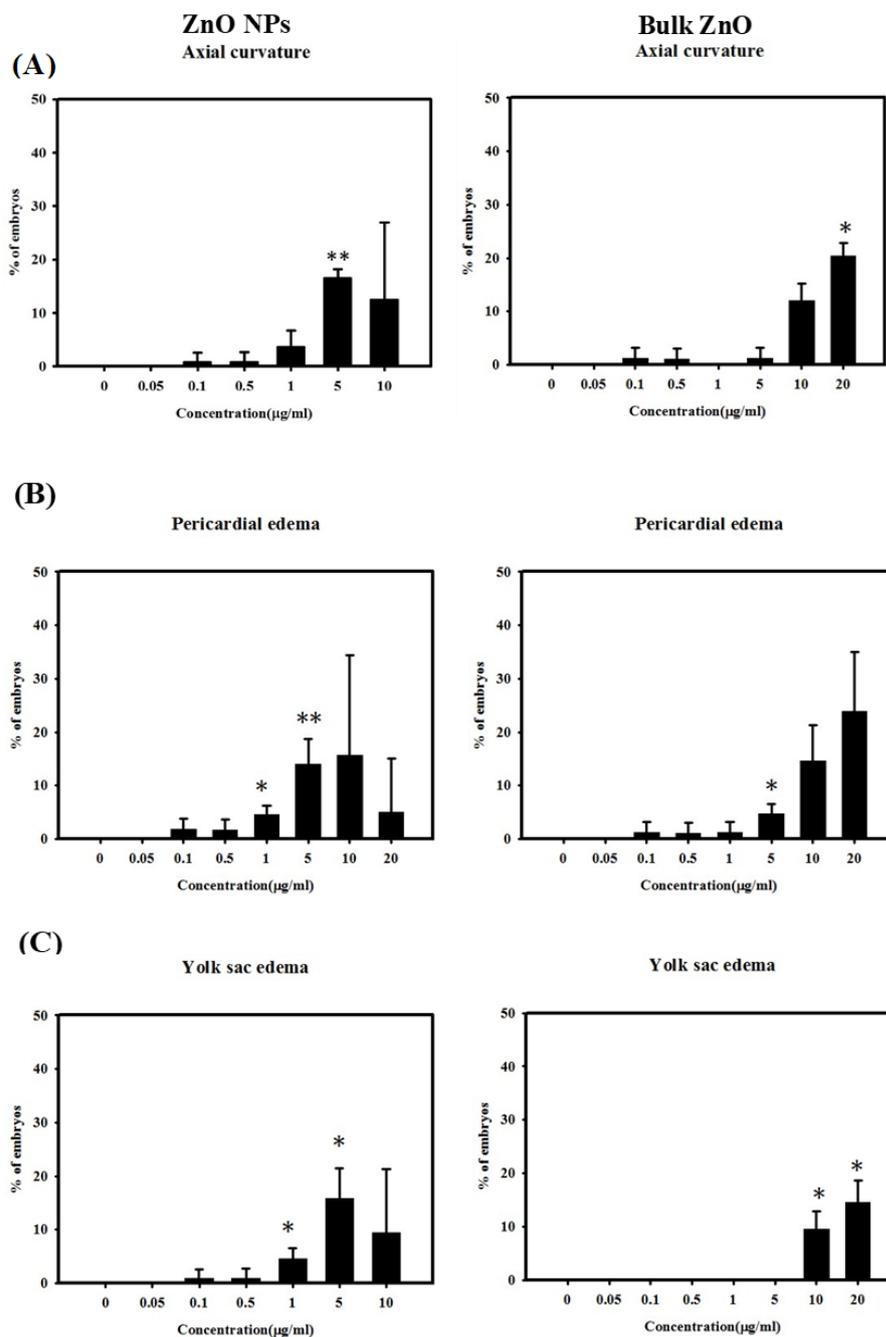


圖 4.44 斑馬魚胚胎暴露 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 之受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 心苞水腫；(C) 卵黃囊水腫。每組測試濃度各有 30 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。三重複試驗。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g/ml}$ ，縱軸為畸形分布情形 (percentages of embryos，單位為%)

為了得知是否斑馬魚胚胎在發育期間是否因為環境之物質而影響其發育，斑馬魚胚胎之早期發育情形可透過體長量測探討，結果顯示(圖 4.45)，ZnO NPs 與 Bulk ZnO 隨著暴露濃度增加皆呈現體長減少的趨勢，其中 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 分別在 5  $\mu\text{g/ml}$  與 20  $\mu\text{g/ml}$  的濃度會較控制組之體長短並具有顯著差異性，除此之外 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 相較而言，奈米微粒影響斑馬魚發育的情況較為嚴重。

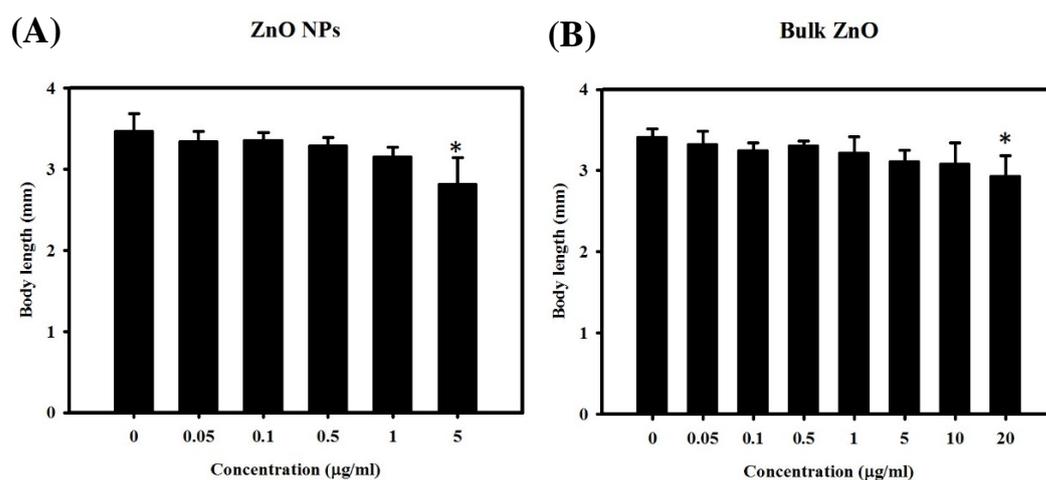


圖 4.45、斑馬魚在受精後 72 小時暴露 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 之體長。(A)斑馬魚在受精後 72 小時暴露 ZnO NPs 之體長；(B) 斑馬魚在受精後 72 小時暴露 Bulk ZnO 之體長；每組測試濃度各有 30 個胚胎，在受精後 72 小時進行體長的觀察。運用電腦軟體 View 7 將稚魚照片像素轉換為距離單位以量測體長。三重複試驗。橫軸為暴露濃度，縱軸為體長，單位為 mm。

於先前研究中，已證實ROS的生成是奈米微粒之共同會引發的細胞毒性機轉 [188]，因此於本計畫會針對奈米氧化鋅微粒 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 在不同劑量濃度下探討其造成ROS生成之情況，本研究將會利用DCFH-DA染劑進行分析。由圖4.46及圖4.47可以發現 ZnO NPs 與 Bulk ZnO 均會隨暴露濃度增加氧化壓力，其表現位置推測為腸管附近，另外於同濃度下 5  $\mu\text{g/ml}$ ZnO NPs 相較於Bulk ZnO 其氧化壓力較高，意味奈米氧化鋅微粒較塊材氧化鋅更容易產生ROS，因此由此證實，奈米氧化鋅會導致氧化壓力的增加，並且ZnO NPs 較 Bulk ZnO 更容易產生氧化壓力。

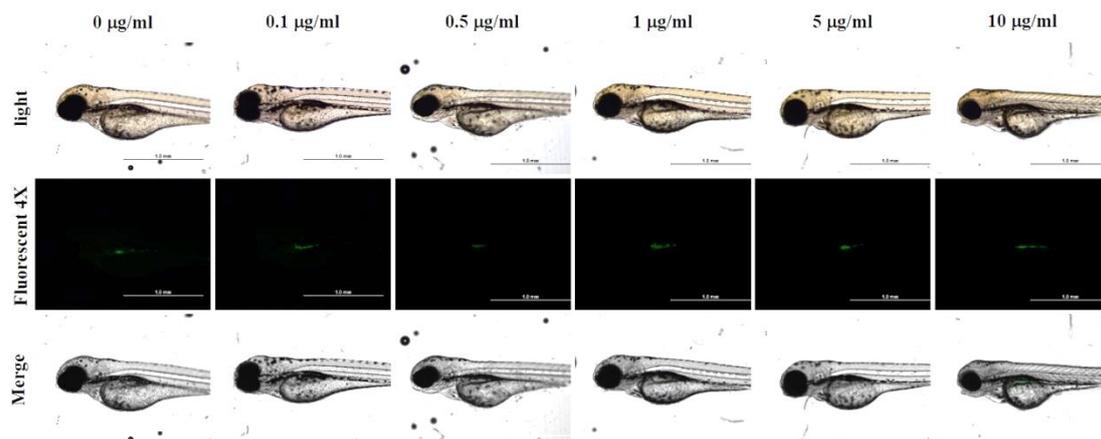


圖 4.46、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 ZnONPs 後體內氧化壓力表現。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的 ZnO NPs (0, 0.1、0.5、1、5、10 µg/ml) 後，於受精後 72 小時測量氧化壓力的表現。各組稚魚於測量前一小時暴露 10 µg/ml DCFHDA 螢光染劑，有氧化壓力表現的細胞在螢光顯微鏡下會表現出綠色螢光。

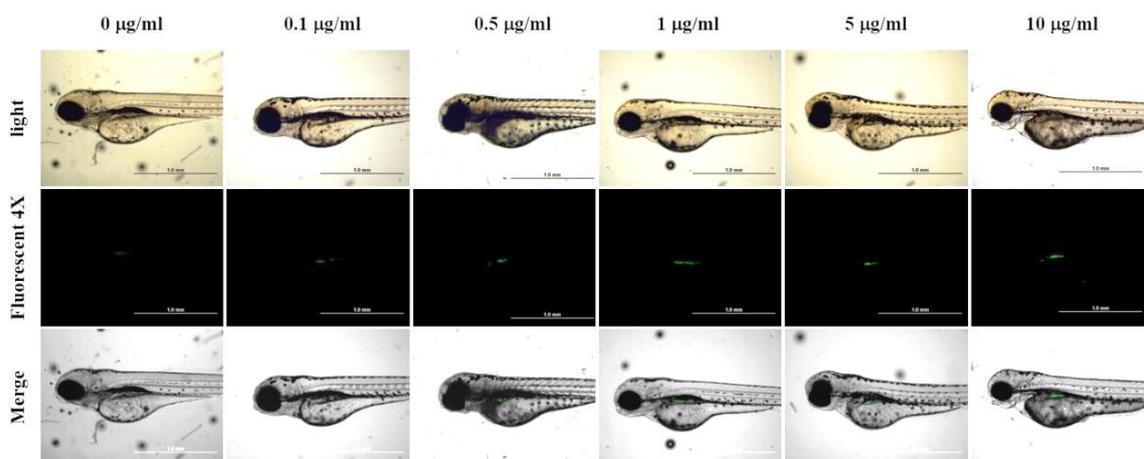


圖 4.47、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 Bulk ZnO 後體內氧化壓力表現。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的 Bulk ZnO (0、0.1、0.5、1、5、10 µg/ml) 後，於受精後 72 小時測量氧化壓力的表現。各組稚魚於測量前一小時暴露 10 µg/ml DCFHDA 螢光染劑，有氧化壓力表現的細胞在螢光顯微鏡下會呈現綠色螢光。

除此之外，目前研究指出斑馬魚胚胎暴露在奈米氧化鋅的環境中也會誘導的 ROS 進而引發粒線體的受損，最後導致細胞凋亡[188]，為了確認斑馬魚檢測細胞

凋亡之方法草案具可行性，因此透過 ZnONPs 探討是否可反應出奈米微粒之毒性，結果如圖 4.48 所示，結果顯示，隨著暴露奈米氧化鋅的濃度越高，TUNEL<sup>+</sup> 之訊號也越高，即代表細胞凋亡的程度越高，因此再次確認此方法草案確實具可行性。

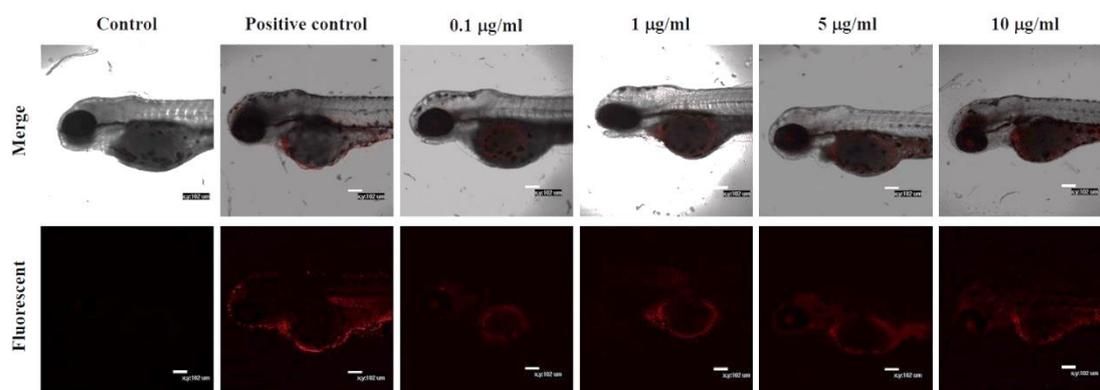


圖 4.36、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 ZnONPs 後之細胞凋亡現象。斑馬魚胚胎暴露於不同劑量的奈米氧化鋅 (0 µg/ml、0.1 µg/ml、1 µg/ml、5 µg/ml、10 µg/ml) 及 DNaseI 後，其細胞凋亡之現象(紅色螢光)。

另外，為了比較大分子及與奈米級的氧化鋅之毒性差異，亦進行大分子氧化鋅之斑馬魚胚胎細胞凋亡試驗，可在圖 4.49 觀察到在 5 µg/ml 濃度以下的大分子氧化鋅環境下細胞凋亡的現象較少，可發現其毒性小於奈米氧化鋅，這也與先前結果相符。

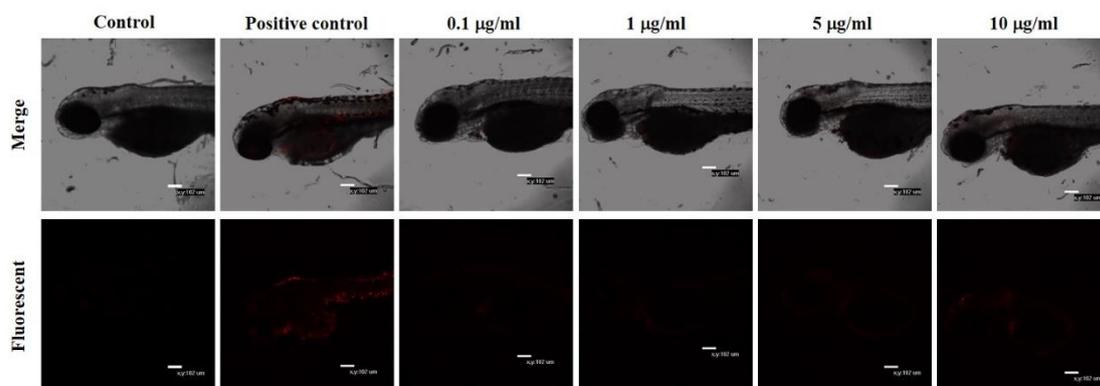


圖 4.37、受精後 72 小時斑馬魚胚胎暴露 Bulk ZnO 後細胞凋亡現象。斑馬魚胚胎

暴露於不同劑量的 bulk ZnO ( 0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ )及 DNaseI 後，其細胞凋亡之現象(紅色螢光)。

#### 4.4 第一季節及第二季節環境水體之奈米微粒毒性檢測

因於本計畫中，會利用斑馬魚胚胎進行毒性試驗，也因此進行實驗之前應考量環境水樣是否適合斑馬魚生存，以避免非毒性物質干擾實驗結果，測量之環境水體之水質整理於表 4.14、表 4.15，結果顯示，第一季節及第二季節之成功湖和曾文水庫各項數值檢測範圍大部分介於斑馬魚可存活的情況，而於二仁溪中，其導電度有些微偏高，另外二仁溪的  $\text{NO}_2$ 、 $\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4$  的濃度高於斑馬魚適合之標準，若實驗結果呈現毒性反應時，可能必須考量是過高的  $\text{NO}_2$ 、 $\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4$  所致，而二仁溪的溶氧量雖然有點偏低但仍是斑馬魚胚胎可以承受的範圍。

##### 4.4.1 環境水體之奈米微粒物化特性分析

於本計畫中，為了探討環境水體之奈米微粒所導致的毒性，因此首先將成功湖、曾文水庫、二仁溪三個水樣利用動態光散射儀及電子顯微鏡分析顆粒粒徑之分佈，進行三種環境水樣顆粒粒徑大小分析，結果如下圖所示(4.50)，二仁溪粒徑大小約莫在 300-400 nm 左右，其分散度約為 0.454，當分散度大於 0.3 時即代表分散性不佳，可能於湖水中大多的顆粒呈現聚集、團聚的狀況，而成功湖和曾文水庫則可能因水體所含之奈米微粒低於儀器偵測極限而無法測得，在此以 ND 表示。

表 4.14、第一季節之環境水體之水質分析

	成功湖	曾文水庫	曾文水庫三 (監測站)	二仁溪	崇德橋 (監測站)
水溫	29 °C	29 °C	30.1 °C	32 °C	31.2 °C
pH值	9.4	8.5	8.4	8.6	8.3
導電度 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	440	296	323	1042	1490
GH (ppm)	161.1	161.1	-	322.2	-
KH (ppm)	143.2	179	-	411.7	-
$\text{NO}_2$ (mg/L)	0.1	0.1	-	5	-
$\text{NO}_3$ (mg/L)	0	0	-	2	-
$\text{NH}_4$ (mg/L)	<0.01	<0.01	<0.01	5	30.9
溶氧量(mg/L)	9	5.5	7.9	4	14.6

表 4.15、第二季節之環境水體之水質分析

	成功湖	曾文水庫	曾文一橋 (監測站)	二仁溪	崇德橋(監 測站)
水溫	29°C	33°C	35.7°C	31°C	30.1
pH值	8.4	8.7	8.3	8.0	7.8
導電度 (μS/cm)	413	216	496	953	696
GH(ppm)	125.3	107.4	-	322.2	-
KH(ppm)	143.2	107.4	-	304.3	-
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.1	0.1	-	1	-
NO <sub>3</sub> (mg/L)	0	0	-	2	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	<0.01	<0.01	0.02	1	1.72
溶氧量(mg/L)	5.5	5.5	7.7	2.5	4

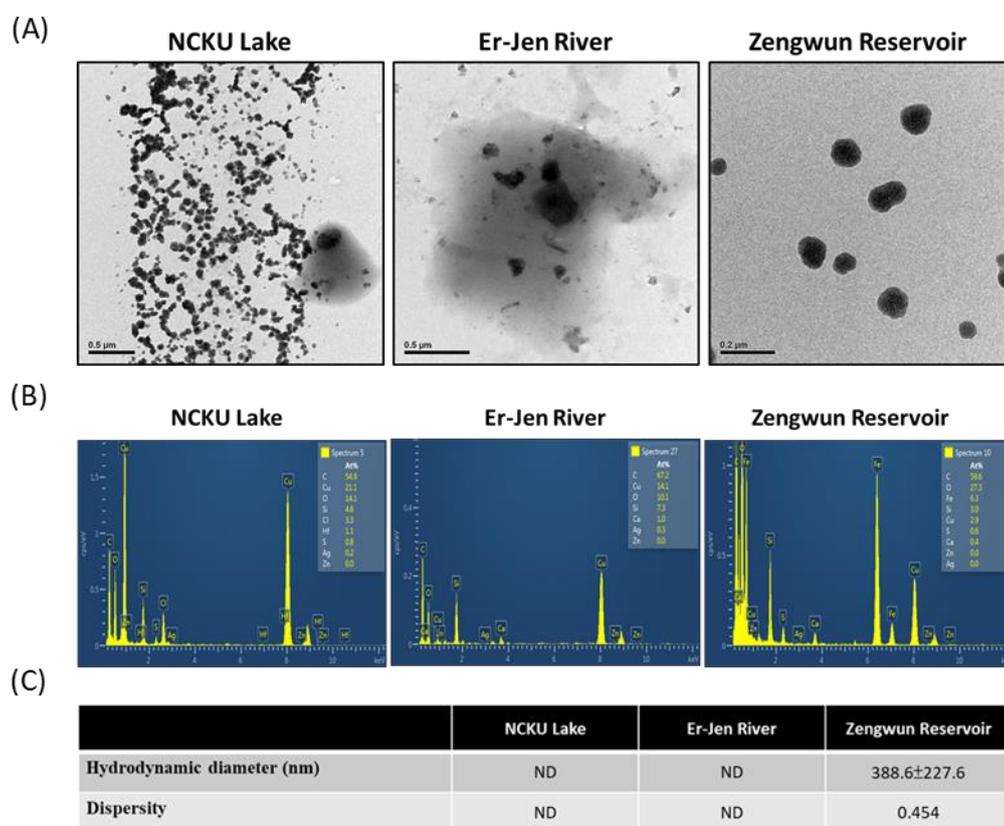


圖 4.50、第一季環境水體之奈米微粒物化特性分析。(A) 電子顯微鏡；(B) 能量色散 X 射線分析；(C) 動態光散射儀。ND 為未偵測到(undetected)。

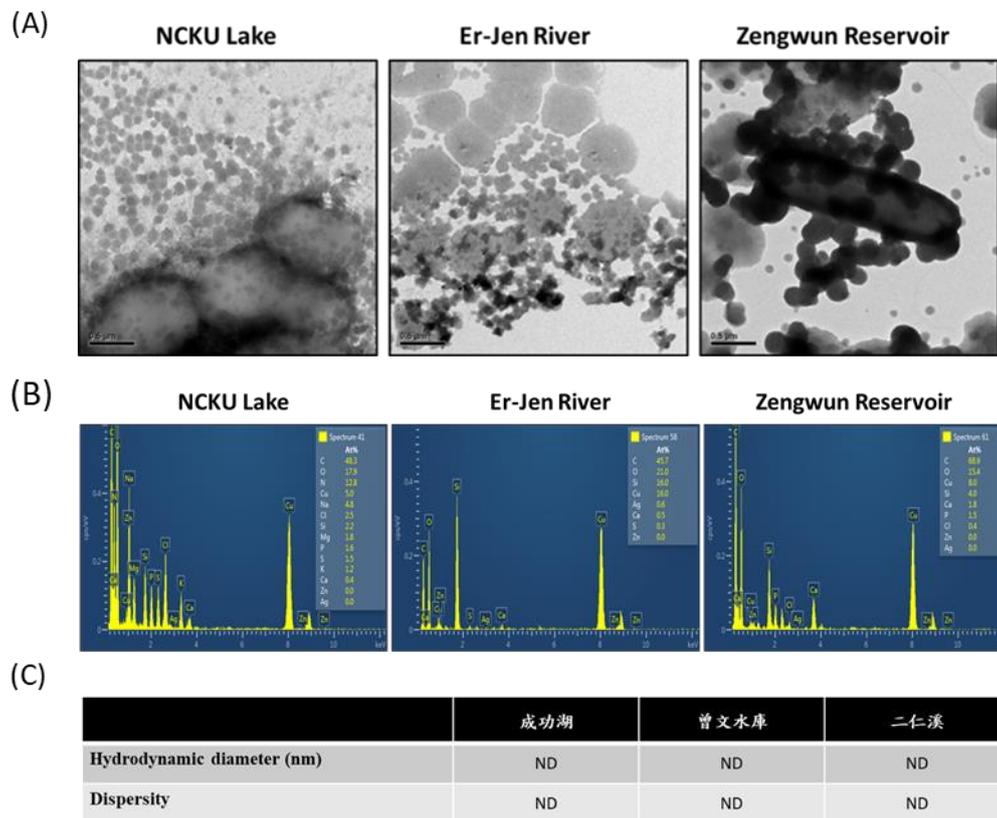


圖 4.51、第二季環境水體之奈米微粒物化特性分析。(A) 電子顯微鏡；(B) 能量色散 X 射線分析；(C) 動態光散射儀。ND 為未偵測到(undetected)。

#### 4.4.2 環境水體之奈米微粒對細胞培養模式於存活率以及生物效應指標之影響

##### 環境水體奈米物質之毒性研究

##### (1) 水體樣品體外細胞測試方法建立

本計畫將第一批所採集的水樣(包含二仁溪、成功湖和曾文水庫)，經由一系列初篩過濾到使用 0.45、0.22 以及 0.1  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾後，取得含有各種不同粒徑大小微粒之濾膜樣品以及濾液樣品進行後續的實驗測試。

在進行濾膜樣品的實驗過程中，為了蒐集濾膜上的微粒，本計畫嘗試將濾膜浸泡在細胞培養液中並進行超音波震盪來獲取水體內含的不同粒徑之微粒。測試流程如圖 4.52 所示：

### ● 濾膜處理流程



1. 剪切濾膜，將濾膜剪切為小碎片，以便後續放入Eppendorf 中
2. 1/2張濾膜放入1個1.5 ml Eppendorf，因此1張濾膜會分別放入2個1.5 ml Eppendorf
3. 加入細胞培養液 (medium + 10% FBS)，每個Eppendorf 加入 300  $\mu$ l medium進行震盪

註:空白濾膜1張(internal control)—亦分裝到2個Eppendorf，每個Eppendorf 加入 300  $\mu$ l medium進行震盪



4. 將各組Eppendorf放入超音波震盪機，震盪時間為連續15分鐘

5. 將各組Eppendorf拿起，利用桌上型離心機進行5~10 sec 離心，收集medium(將同組的medium混合成1管Eppendorf)

圖 4.52、濾膜樣品前處理流程。

### (2) 水體樣品細胞存活率分析

震盪時間終了，我們會將樣品瓶中的細胞培養液取出後，加入已種植好細胞的96孔盤中，每個孔盤分別加入含有10%與30%的濾膜震盪液，且實驗總體為150微毫升/孔盤。實驗中加入空白濾膜作為對照組，實驗暴露時間為24小時，實驗終

了以 MTT 試劑進行細胞存活率分析。結果顯示，第一季的 3 個水體樣品，在不同濃度的暴露之下皆無顯著的細胞毒性效應，不同的濾膜(0.1  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$ )所震盪下來的物質進行暴露後，也沒有明顯的細胞毒性差異。第二季的 3 個水體樣品測試結果亦同(圖 4.53)。細胞存活率的分析結果，雖然並沒有顯著的細胞毒性效應，然而不同季節所採樣的水體仍舊會有一些差異，以成功湖為例(圖 4.53 (A)(C))，暴露 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜震盪液後，第一季的水體樣品會有些微抑制細胞存活率的作用，然而第二季的水體樣品則會有些微促進細胞生長的現象，這可能是不同季節水體中生物、微生物的改變或環境中物質溶解於水體後的差異而導致，然而目前並沒有實驗數據可以來解釋，在相對複雜的環境水體系統中影響細胞毒性效應的確切原因。

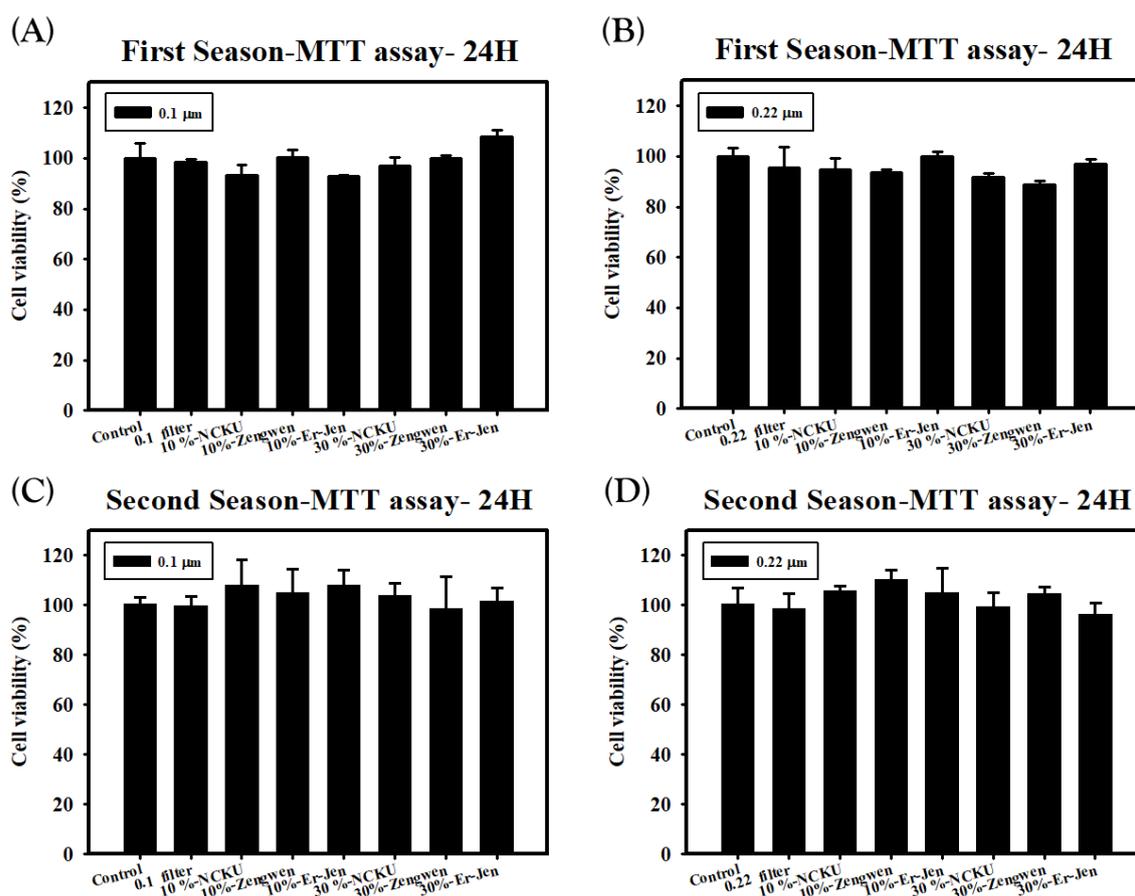


圖 4.53、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞存活率。細胞暴露於不同濃度(10%和 30%)與不同粒徑之微粒後，於 24 小時進行 MTT assay 分析。(A)第一季 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜震盪液之暴露 (B)第一季 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜震盪液之暴露 (C)第二季 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜震盪液之暴露 (D)第二季 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜震盪液之暴露。0.1 filter 為 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜

的對照組；0.22 filter 為 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

### (3) 水體樣品細胞內活性氧物種(ROS)之分析

雖然環境水體樣品的暴露並沒有導致明顯的細胞死亡，但是這些不同粒徑的微粒是否會導致其他生物效應指標的改變，仍需要進行實驗來確認。首先，為了瞭解水體樣品是否會造成細胞內 ROS 的增加，本計畫利用與先前奈米標準品暴露分析相同的方式，進行第一季與第二季各水體的測試，其結果顯示，暴露 30% 濾膜震盪液 30 分鐘後之細胞，並不會有明顯的 ROS 產生(圖 4.54)。不過有趣的是在第一季水樣暴露組別中，只有成功湖的水樣會導致細胞產生少量的 ROS，但第二季的成功湖水樣則沒有相同的情形產生。

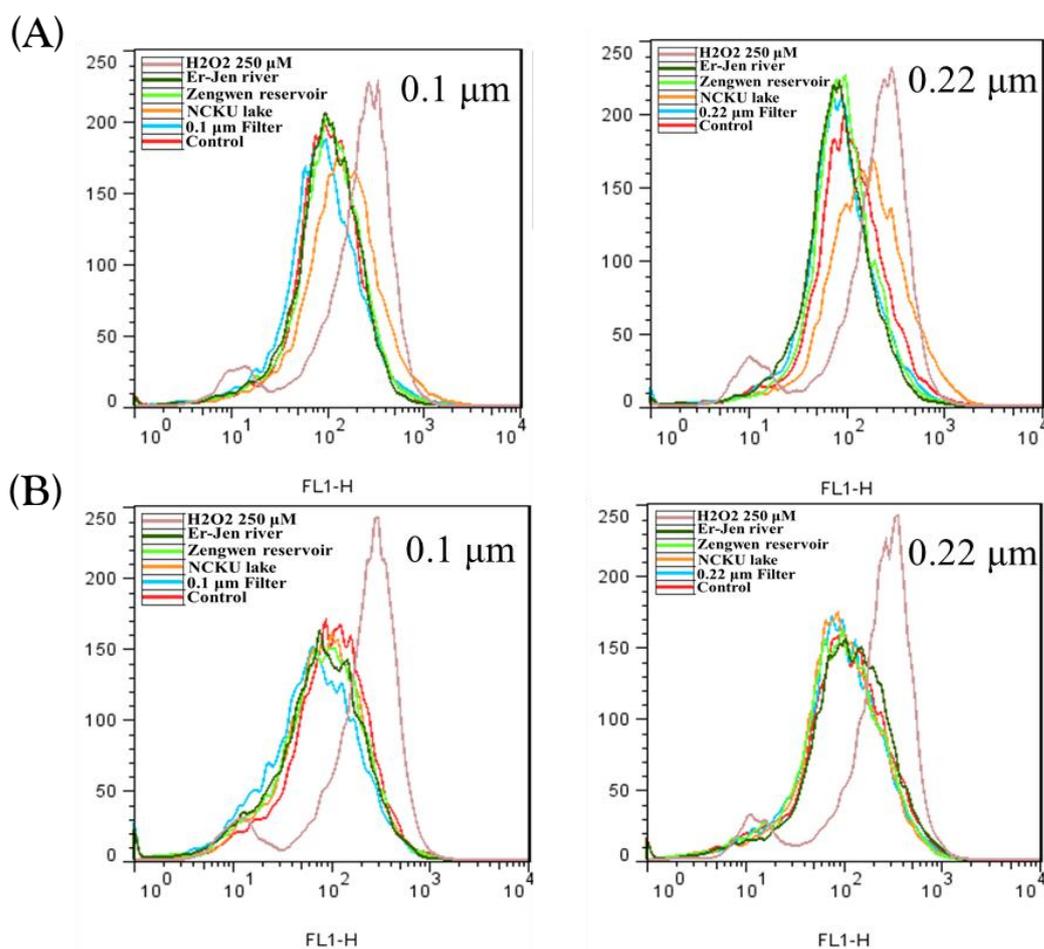


圖 4.54、水樣通過不同孔徑之濾紙後，分別收集 0.22 和 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞。(A) 第一季水體樣品 (B) 第二季水體樣品細胞暴露濃度為 30% 之濾膜震盪後所收集的溶液，細胞暴露溶液 30 min 後，以 10,000 顆細胞為分析族

群，利用 DCFH-DA 染劑進行流式細胞儀之 ROS 分析。以過氧化氫( $H_2O_2$ ) ( $250 \mu M$ ) 作為 Positive Control。0.1 filter 為  $0.1 \mu m$  濾膜的對照組；0.22 filter 為  $0.22 \mu m$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

#### (4) 水體樣品影響之生物效應指標分析

針對細胞自體吞噬與細胞凋亡的生物指標分析，本計畫分別利用 Acridine orange (AO) 以及 Annexin V/PI 來分析水體樣品暴露後所產生之相關生物指標，其結果與細胞存活率的數據雷同。不論是第一季或第二季的水體樣品皆不會誘導大量的細胞自體吞噬與細胞凋亡作用，如圖 4.55~圖 4.57。事實上從細胞存活率的實驗結果，我們便可預期在生物毒性效應指標上的偵測可能不會有改變，然而是否確實是因為濾膜上的微粒不具毒性或者是濃度過低，亦或者是因為本計畫在設計水體樣品過濾的前處理方式上有所影響而呈現目前的實驗結果，這些可能的原因在現階段皆無法排除。如何將水體樣品直接暴露到體外的細胞上，目前並沒有標準的處理方法，因此只能儘量以合理的方式來進行設計，未來也許可以利用不同的處理方式來確認實驗結果。

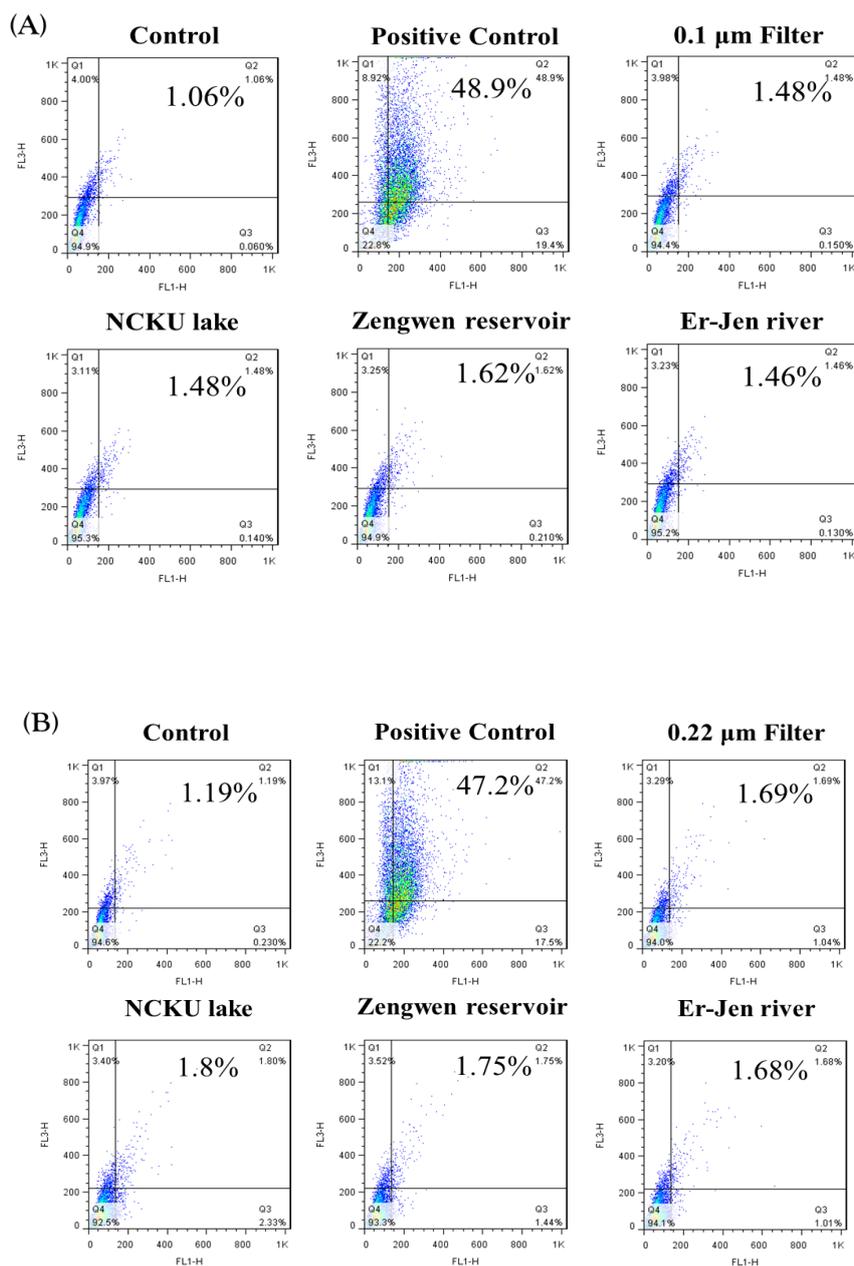


圖 4. 55、環境水體樣品暴露於細胞後之自體吞噬分析。第一季水樣通過不同孔徑之濾紙後，收集(A) 0.1  $\mu\text{m}$  與 (B) 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞。細胞暴露濃度為 30%之濾膜震盪後所收集的溶液，細胞暴露溶液 24 小時後，以 10,000 顆細胞為分析族群，利用 AO 染劑進行流式細胞儀之細胞自體吞噬分析。以 Rapamycin (40  $\mu\text{M}$ )作為 Positive Control。0.1 filter 為 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；0.22

filter 為 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

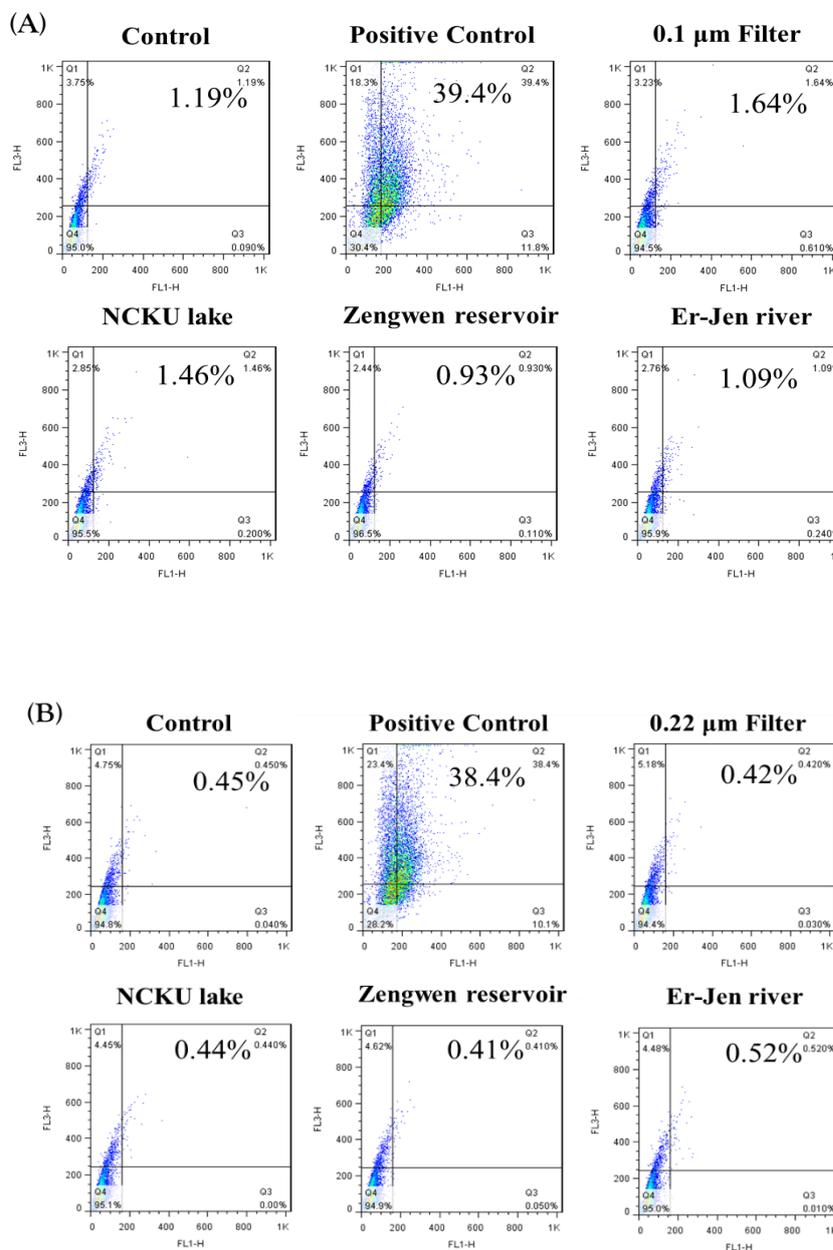


圖 4. 56、環境水體樣品暴露於細胞後之自體吞噬分析。第二季水樣通過不同孔徑之濾紙後，收集(A) 0.1  $\mu\text{m}$  與 (B) 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞。細胞暴露濃度為 30%之濾膜震盪後所收集的溶液，細胞暴露溶液 24 小時後，以 10,000 顆細胞為分析族群，利用 AO 染劑進行流式細胞儀之細胞自體吞噬分析。以

Rapamycin (40  $\mu\text{M}$ )作為 Positive Control。0.1 filter 為 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；0.22 filter 為 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

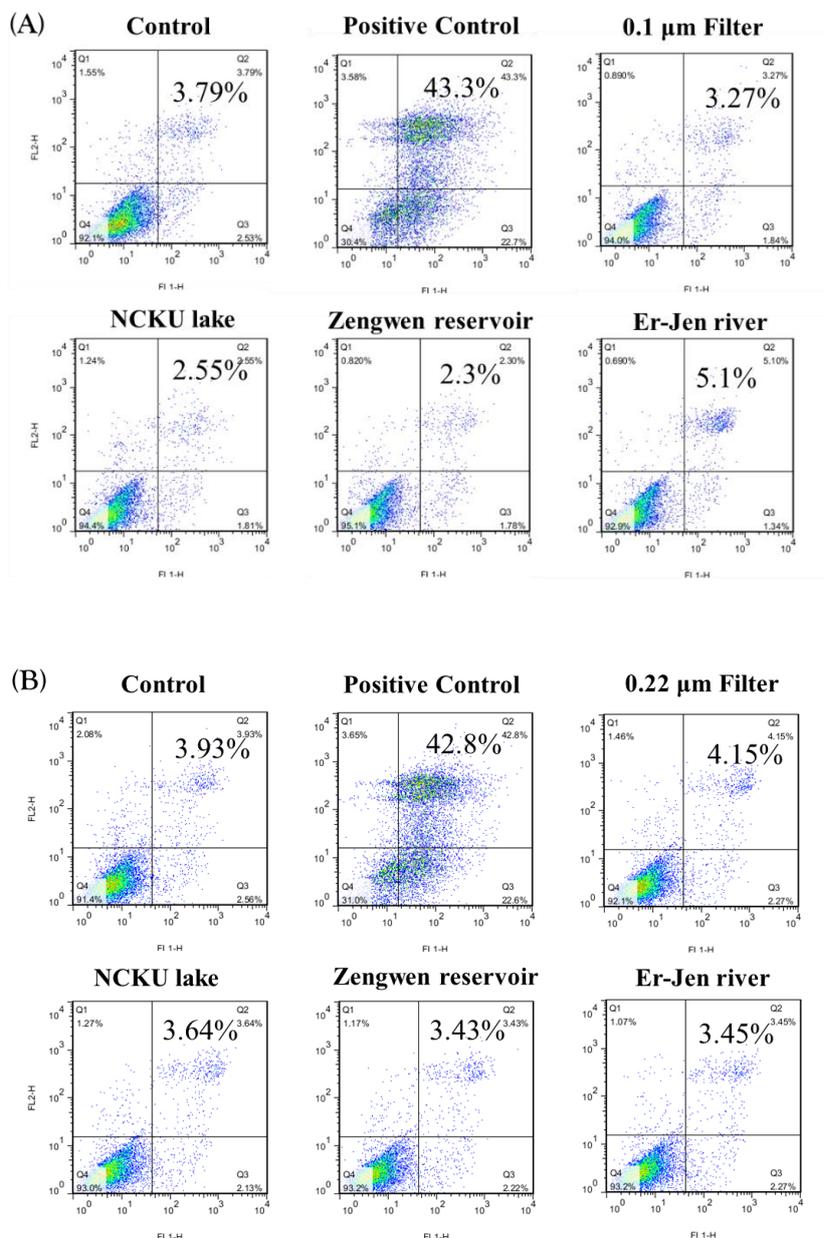


圖 4.57、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞凋亡分析。第一季水樣通過不同孔徑之濾紙後，收集(A) 0.1  $\mu\text{m}$  與 (B) 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞。細胞暴露濃度為 30%之濾膜震盪後所收集的溶液，細胞暴露溶液 24 小時後，以 10,000 顆細胞為分析族群，利用 PI & Annexin V Assay 進行流式細胞儀之細胞凋亡/壞死分析。以 Staurosporine (2  $\mu\text{M}$ )作為 Positive Control。0.1 filter 為 0.1  $\mu\text{m}$  濾

膜的對照組；0.22 filter 為 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

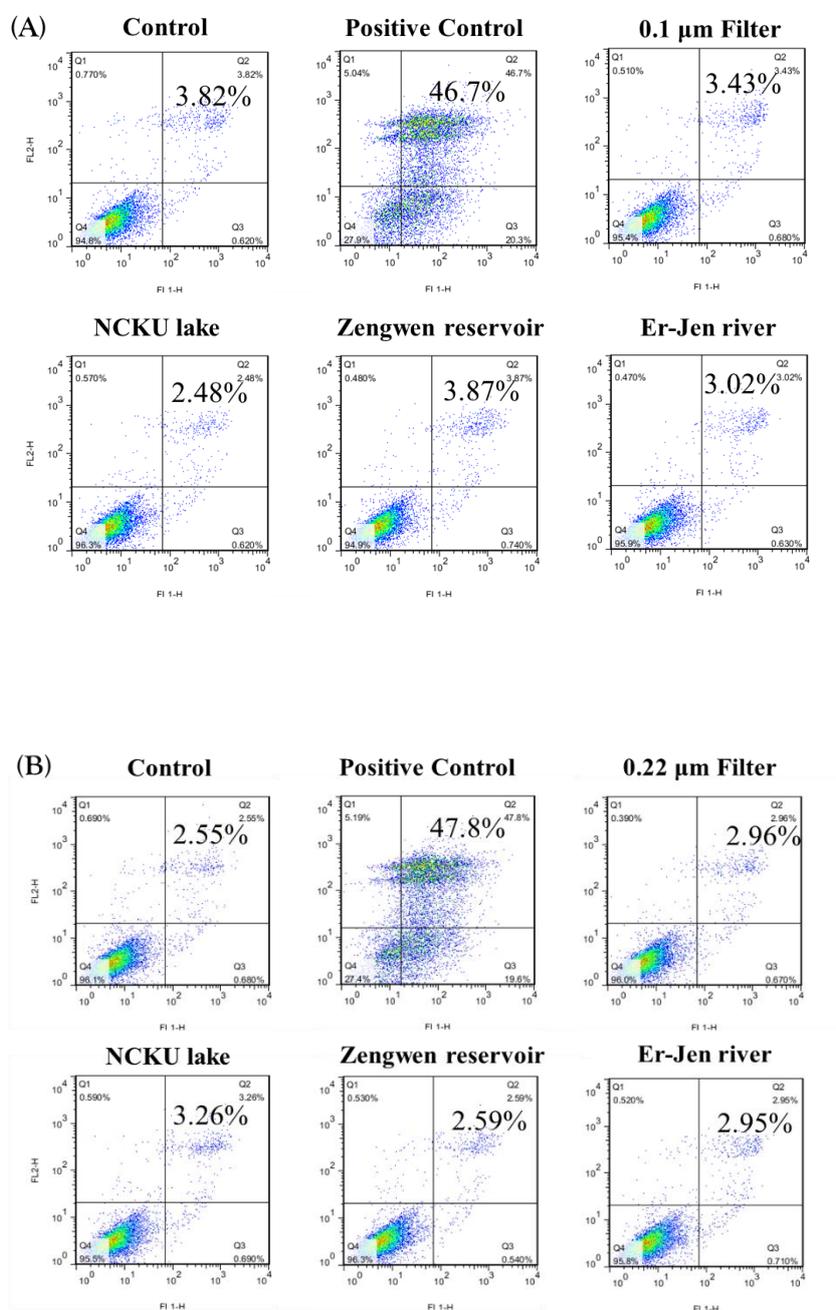


圖 4.58、環境水體樣品暴露於 NIH 3T3 細胞後之細胞凋亡分析。第二季水樣通過不同孔徑之濾紙後，收集(A) 0.1  $\mu\text{m}$  與 (B) 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜上之微粒暴露於 NIH 3T3 細胞。細胞暴露濃度為 30%之濾膜震盪後所收集的溶液，細胞暴露溶液 24 小時後，以 10,000 顆細胞為分析族群，利用 PI & Annexin V Assay 進行流式細胞儀之細胞

凋亡/壞死分析。以 Staurosporine ( $2 \mu\text{M}$ ) 作為 Positive Control。0.1 filter 為  $0.1 \mu\text{m}$  濾膜的對照組；0.22 filter 為  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜的對照組；NCKU 為成功湖；Zengwen 為曾文水庫；Er-Jen 為二仁溪。

#### 4.4.3 第一季節成功湖之奈米微粒對於斑馬魚胚胎存活率影響

為了探討環境水體中之奈米微粒對於斑馬魚胚胎之影響，於本計畫中採集第一季節之成功湖、二仁溪、及曾文水庫之環境水樣於粗過濾後( $63$ 、 $53$ 、 $1 \mu\text{m}$ )，再分別過濾  $0.45 \mu\text{m}$ 、 $0.22 \mu\text{m}$  以及  $0.1 \mu\text{m}$  的濾紙。針對成功湖的部分，結果顯示(圖 4.59)，成功湖不論於  $1$ 、 $0.45$ 、 $0.22$ 、 $0.1$  及  $0.1 \mu\text{m}$  以下皆不會影響斑馬魚胚胎之存活率。

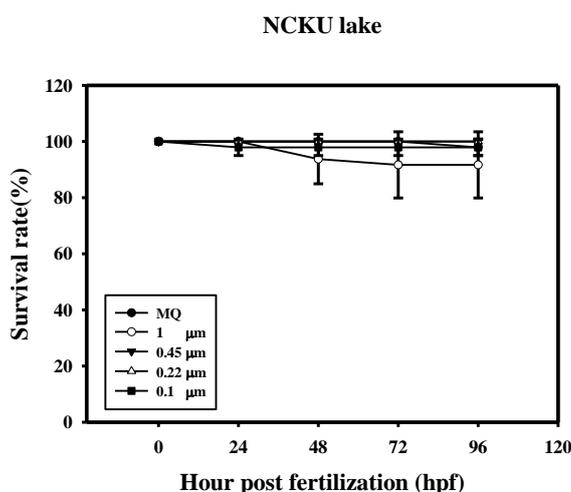


圖 4.59、斑馬魚胚胎暴露成功湖之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。皆進行三重複試驗。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

#### 第一季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬於存活率影響

於本計畫中為了建立並測試環境中奈米物質的斑馬魚胚胎毒性測驗方法，於計畫中採集曾文水庫水樣，依照  $1 \mu\text{m}$ 、 $0.45 \mu\text{m}$ 、 $0.22 \mu\text{m}$ 、 $0.1 \mu\text{m}$  孔徑之濾紙進行過濾，並利用過濾後的濾液進行暴露，探討濾液中不同粒徑微粒之毒性，於暴露後每隔 24 小時記錄存活比例，實驗結果顯示(圖 4.60)，斑馬魚胚胎暴露  $1 \mu\text{m}$  濾液存活率與控制組沒有顯著上差異，因此推測曾文水庫之奈米微粒對魚斑馬魚胚胎是沒有顯著的毒性效應。

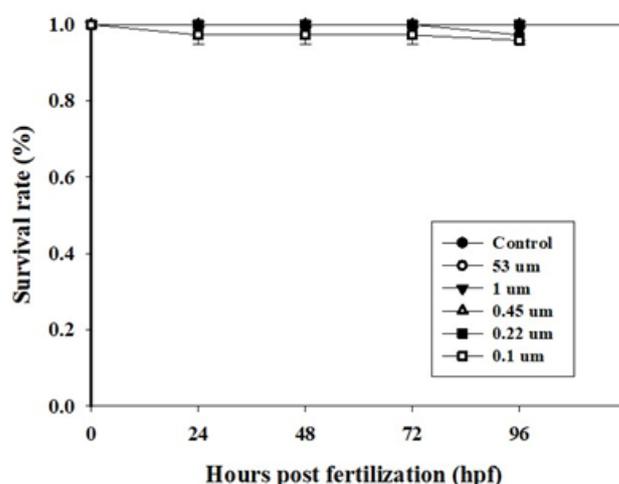


圖 4. 60、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

#### 第一季節二仁溪之奈米微粒對於斑馬魚存活率影響

為了探討第一季節二仁溪之環境水體奈米微粒之毒性影響，於採集二仁溪水樣後，依照上述方法經過過濾，並進行不同粒徑之奈米微粒暴露以探討奈米微粒對於斑馬魚胚胎之毒性，結果顯示如圖 4.61 所示，斑馬魚胚胎在暴露後 72 小時後，不論於 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下的組別皆不會顯著下降斑馬魚胚胎存活率，因此推測二仁溪之環境水體奈米微粒對於斑馬魚胚胎不會影響斑馬魚胚胎之死亡率，這也意味原水樣二仁溪主要導致斑馬魚胚胎死亡的原因可能由於生物性干擾所致。

#### 第一季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬於存活率影響

於本計畫中為了建立並測試環境中奈米物質的斑馬魚胚胎毒性測驗方法，於計畫中採集曾文水庫水樣，依照 1 $\mu\text{m}$ 、0.45 $\mu\text{m}$ 、0.22 $\mu\text{m}$ 、0.1 $\mu\text{m}$  孔徑之濾紙進行過濾，並利用過濾後的濾液進行暴露，探討濾液中不同粒徑微粒之毒性，於暴露後每隔 24 小時記錄存活比例，實驗結果顯示(圖 4.62)，斑馬魚胚胎暴露 1 $\mu\text{m}$  濾液存活率與控制組沒有顯著上差異，因此推測曾文水庫之奈米微粒對魚斑馬魚胚胎是沒

有顯著的毒性效應。

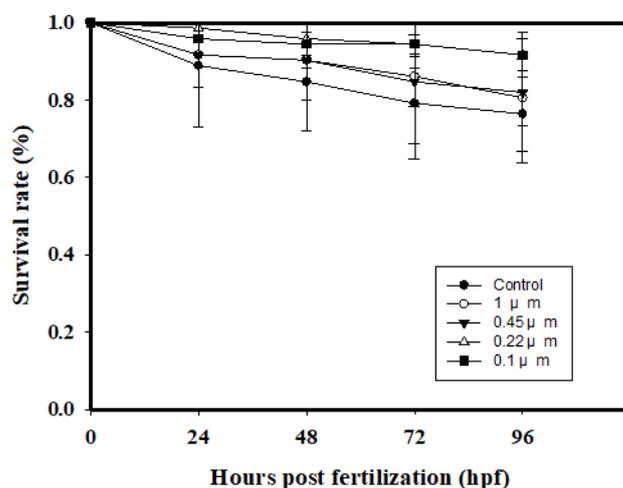


圖 4. 61、斑馬魚胚胎暴露過濾後二仁溪水體後體之存活率狀況。斑馬魚胚胎暴露於不同濾液 (0.1、0.2、0.45、1  $\mu$ m) 後，於實驗過程每 24 小時進行存活率觀察，並進行存活隻數統計。N=24

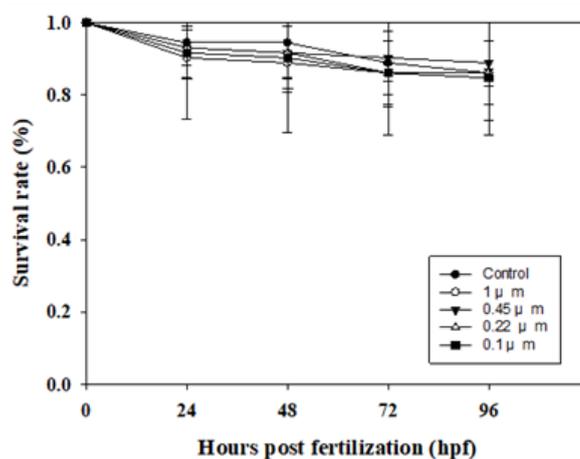


圖 4. 62、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

### 第一季節成功湖之奈米微粒對於斑馬魚胚胎畸形率影響

為了探討是否斑馬魚胚胎是否因第一季節成功湖之奈米微粒而導致畸形的情況，因此將觀察及記錄畸形的情況，結果顯示(圖 4.63)，不論是成功湖水 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下的組別皆不會導致體軸彎曲、心苞水腫或卵黃囊水腫等明顯畸型現象，因此成功湖水所含之奈米微粒並不會導致明顯畸形。

### 第一季節二仁溪之奈米微粒對於斑馬魚胚胎畸形率影響

為了探討是否斑馬魚胚胎是否因第一季節二仁溪之奈米微粒之畸形可能性，因此將觀察及記錄畸形的情況，結果顯示(圖 4.64)，不論是二仁溪 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下之濾液的組別皆不會導致體軸彎曲、心苞水腫或卵黃囊水腫等明顯畸型現象，因此第一季節之二仁溪之奈米微粒並不會引發明顯畸形的情况。

### 第一季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎畸形率影響

結果顯示(圖 4.65)，不論是曾文水庫 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下之的組別皆不會引發體軸彎曲、心苞水腫或卵黃囊水腫等明顯畸型現象，與控制組間無顯著差異，因此第一季節曾文水庫之奈米微粒不會誘發畸形現象。

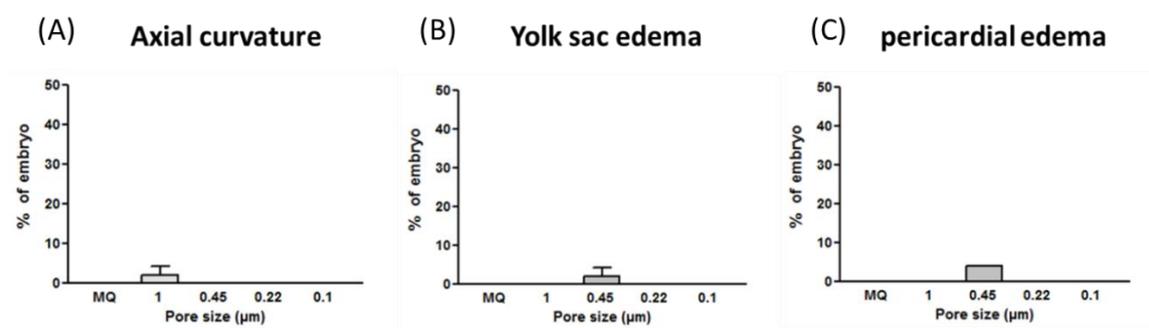


圖 4.63、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g/ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

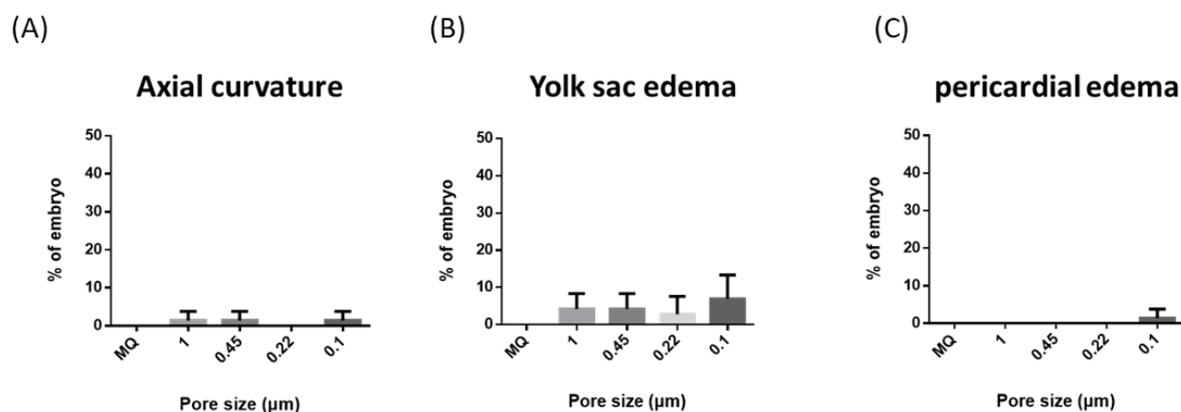


圖 4.64、斑馬魚胚胎暴露第一季節二仁溪之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

#### 第一季節環境湖水之斑馬魚胚胎 $\text{LC}_{50}$

透過圖 4.38-4. 可得知第一季節成功湖、二仁溪、曾文水庫以過濾後但未稀釋之溶液進行暴露斑馬魚胚胎，而實驗結果顯示，不論是成功湖、二仁溪、曾文水庫皆無法達到死亡率 50%，因此於環境水體之奈米微粒毒性試驗中無法進行  $\text{LC}_{50}$  的計算。

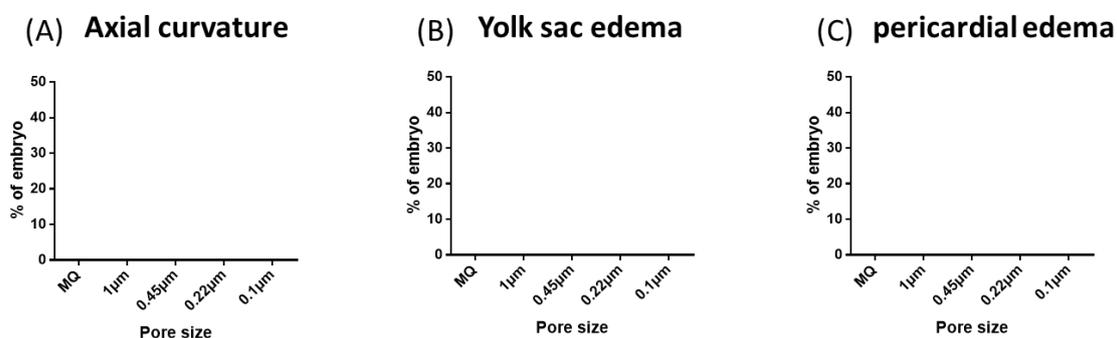


圖 4.65、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

### 第一季節成功湖、二仁溪、曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎體長之影響

為了探討斑馬魚胚胎在發育期間是否因為環境之物質而影響其發育，因此我們透過測量體長方式來探討早期發育情形與發育之關聯，結果顯示(圖 4.66)，暴露  $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$  之成功湖、二仁溪、曾文水庫濾液後，相較於控制組而言成功湖、二仁溪、曾文水庫奈米微粒濾液皆會使體長增長，但在濾液組間則無顯著差異，因此推測環境水體中可以使斑馬魚胚胎發育較為良好。

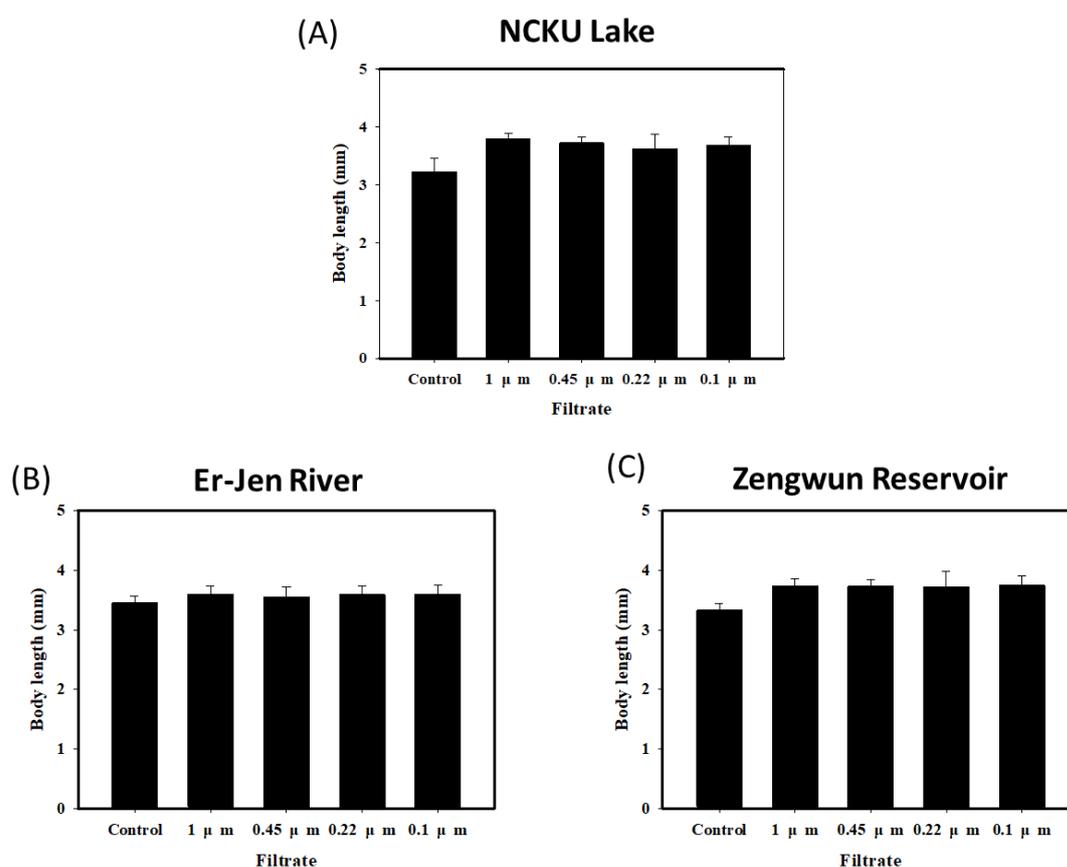


圖 4.66、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑濾液之體長。(A) 成功湖；(B) 二仁溪；(C) 曾文水庫。斑馬魚胚胎暴露於成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑之濾液，孔徑分別為  $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時進行體長的量測。

### 第一季節成功湖之奈米微粒對於斑馬魚胚胎氧化壓力之影響

為了探討斑馬魚在發育期間是否因為環境之奈米微粒而產生過量氧化壓力造成生物危害，因此我們將利用 DCFH-DA 染劑探討環境水體中不同孔徑過濾之濾

液所產生氧化壓力之情形，暴露成功湖 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$  之濾液後，於暴露 72 小時之時間點作為實驗終點，結果顯示(圖 4.67)，於正向控制組中，相較於控制組而言可產生明顯的氧化壓力，而過濾後的濾液不論哪個組別皆不會產生明顯的氧化壓力，結果證明，成功湖之奈米微粒後對於斑馬魚胚胎不會引發過多的氧化壓力。

#### 第一季節二仁溪之奈米微粒對於斑馬魚胚胎氧化壓力之影響

暴露二仁溪 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$  之濾液後，結果顯示(圖 4.68)，過濾後的二仁溪濾液不論哪個組別亦不會產生明顯的氧化壓力，結果證明，二仁溪之奈米微粒後對於斑馬魚胚胎亦不會引發過多的氧化壓力。

#### 第一季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎氧化壓力之影響

暴露曾文水庫 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$  之濾液後，結果顯示(圖 4.69)，過濾後的曾文水庫濾液亦不會產生過多的氧化壓力，結果證明，曾文水庫之奈米微粒後對於斑馬魚胚胎亦導致產生過多的氧化壓力。

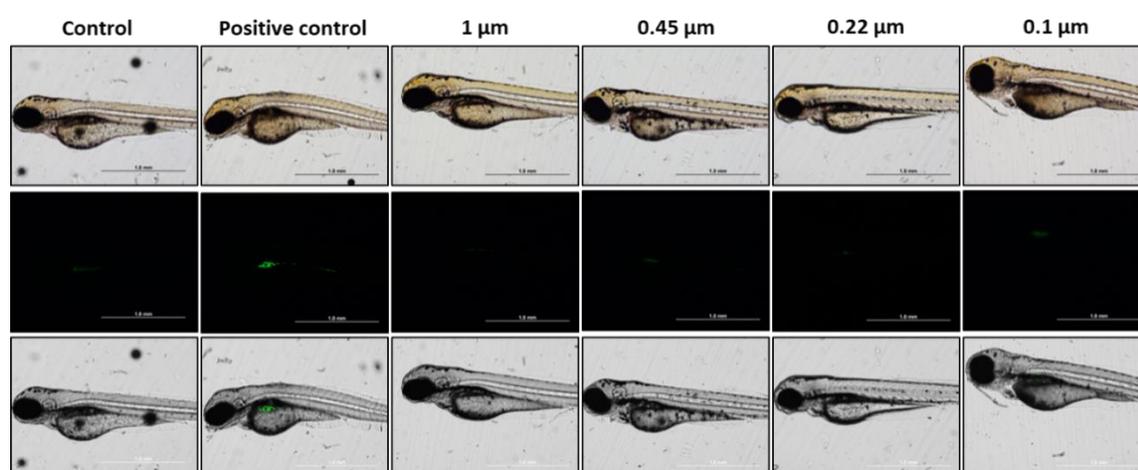


圖 4. 67、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於成功湖不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時進行 ROS 的量測，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

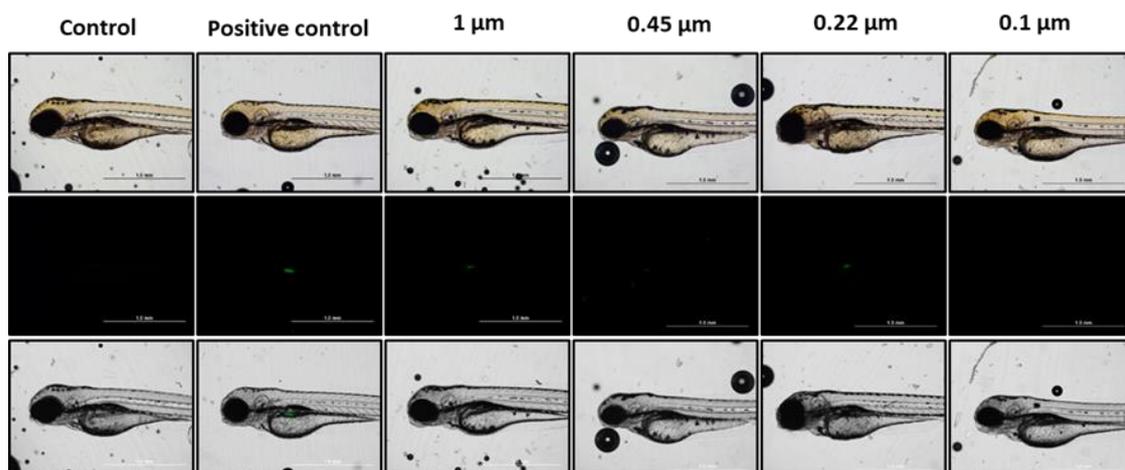


圖 4. 68、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於二仁溪不同孔徑之濾液，孔徑分別為  $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ，而正向控制組為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，於暴露 72 小時為實驗終點進行染色及拍攝，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

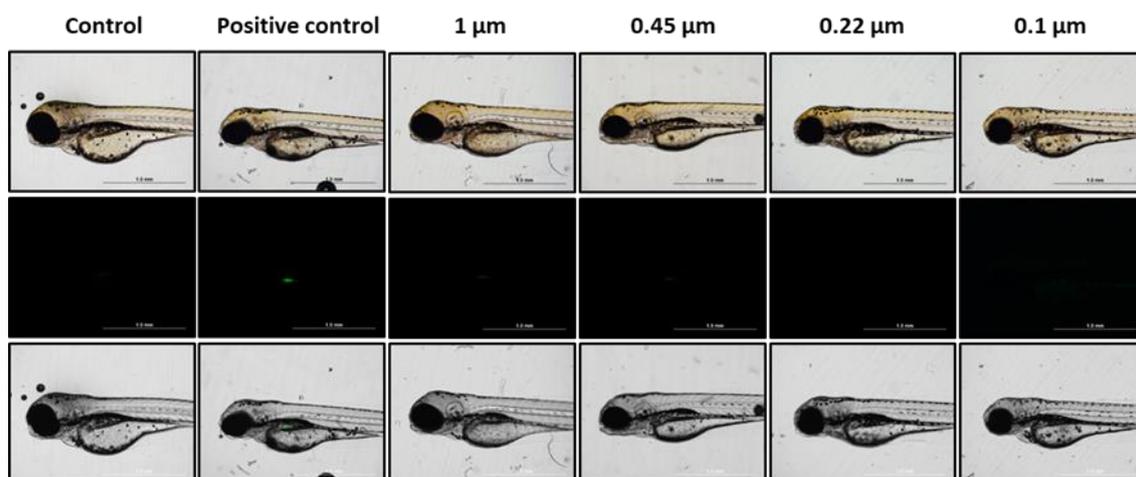


圖 4. 69、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露曾文水庫濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於二仁溪不同孔徑之濾液，孔徑分別為  $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ，而正向控制組為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，於暴露 72 小時為實驗終點進行染色及拍攝，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

#### 第一季節成功湖之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

為了探討斑馬魚胚胎是否因為環境水樣之奈米微粒而誘發細胞凋亡的產生，因此我們將利用 *In situ cell death detection kit* 探討成功湖水體之奈米微粒所引發之細胞凋亡現象，如上方所述，將湖水進行不同孔徑 ( $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ) 之濾膜後，於暴露 72 小時之時間點進行魚體拍攝，並利用共軛焦顯微鏡進行觀察。結果顯示(圖 4.70)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，而各組濾液與控制組比較無明顯細胞凋亡之訊號，因此由結果證實，成功湖水中之奈米微粒並不會導致細胞凋亡現象。

#### 第一季節二仁溪之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

結果顯示(圖 4.71)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，而二仁溪過濾後的  $1\ \mu\text{m}$  濾液在卵黃囊前端部位有些微細胞凋亡發生，但整體而言濾液各組間並沒有產生明顯的細胞凋亡現象，由此證實，第一季節之二仁溪奈米微粒對於斑馬魚胚胎並不會誘發明顯細胞凋亡現象。

#### 第一季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

為了探討斑馬魚胚胎是否因為曾文水庫環境水樣之奈米微粒而誘發細胞凋亡的產生，將湖水進行不同孔徑 ( $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ) 之濾膜後，於暴露 72 小時之時間點進行魚體拍攝。結果顯示(圖 4.72)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，而各組濾液與控制組比較亦無明顯細胞凋亡之訊號，因此由結果證實，曾文水庫水體之奈米微粒亦不會產生明顯細胞凋亡現象。

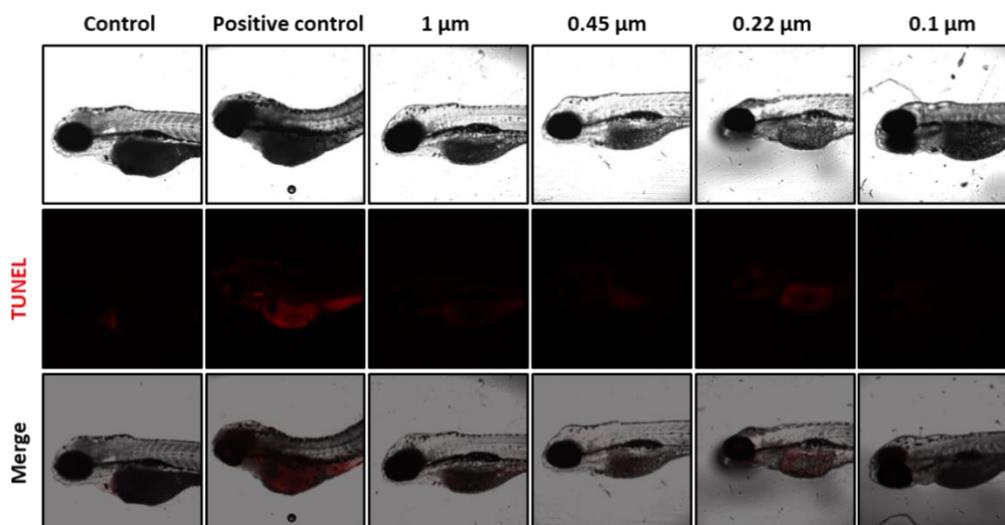


圖 4.70、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖不同孔徑濾液之細胞凋亡。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及成功湖不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

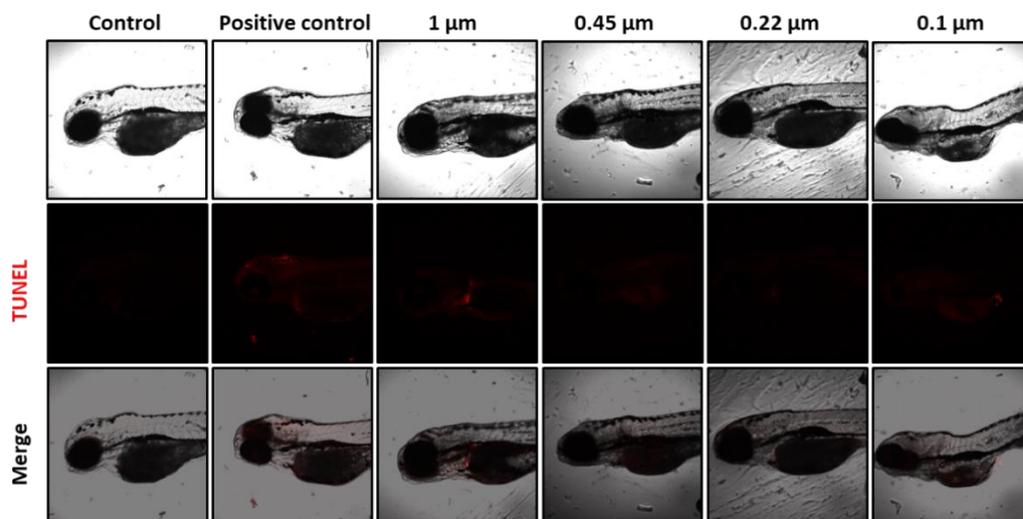


圖 4.71、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪不同孔徑濾液之細胞凋亡現象。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及成功湖不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

### 第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣之奈米微粒對於斑馬魚存活率影響

為了探討環境水體中之奈米微粒對於斑馬魚胚胎之影響，於本計畫中採集第二季節之成功湖、二仁溪、及曾文水庫之環境水樣，處理流程與第一季節相同，於粗過濾後(63、53、1  $\mu\text{m}$ )，再分別過濾 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$  以及 0.1  $\mu\text{m}$  的濾紙。結果顯示(圖 4.73-75)，成功湖、二仁溪及曾文水庫不論於 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下皆不會影響斑馬魚胚胎之存活率。

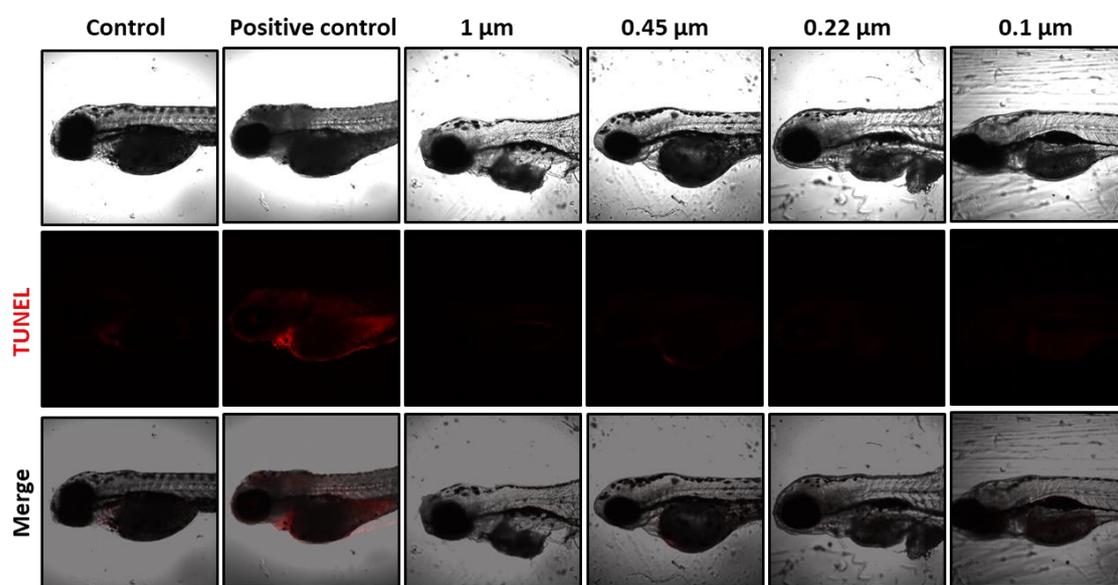


圖 4. 72、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露第一季節曾文水庫之細胞凋亡現象。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及曾文水庫不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

### 第二季節環境湖水之斑馬魚胚胎 LC<sub>50</sub>

圖 4. 76.結果顯示，第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫以過濾後但未稀釋之溶液進行暴露斑馬魚胚胎，不論是成功湖、二仁溪、曾文水庫皆無法達到死亡率 50%，因此於環境水體之奈米微粒毒性試驗中無法進行 LC<sub>50</sub> 的計算。

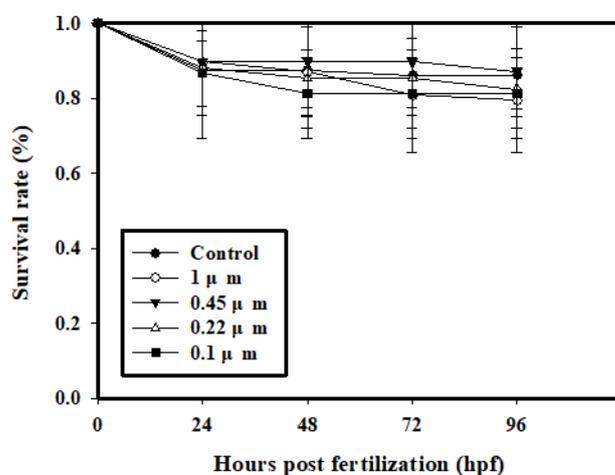


圖 4. 73、斑馬魚胚胎暴露第二季節成功湖之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

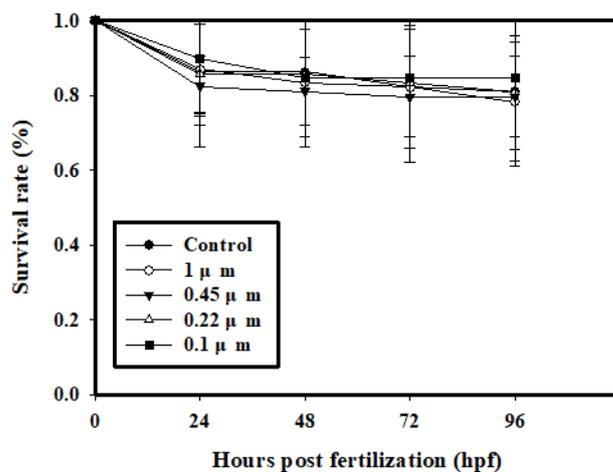


圖 4. 74、斑馬魚胚胎暴露第二季節二仁溪之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

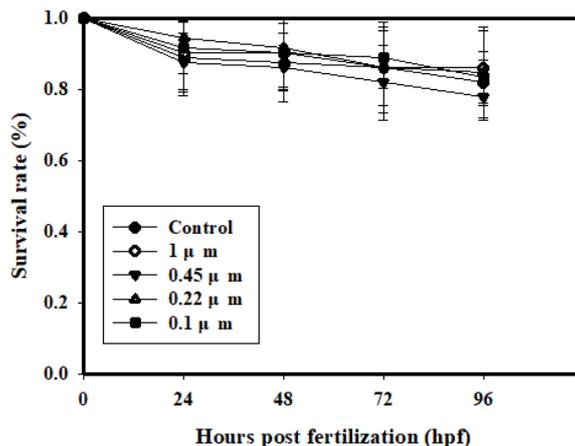


圖 4.75、斑馬魚胚胎暴露第二季節曾文水庫之不同過濾液存活率。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

#### 第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣之奈米微粒對於斑馬魚胚胎畸形率影響

為了探討是否斑馬魚胚胎是否因第二季節之成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣之奈米微粒導致畸形，因此將觀察及記錄畸形的情況，結果顯示(圖 4.76-79)，與第一節結果相似，不論是成功湖、二仁溪、曾文水庫 1、0.45、0.22、0.1 及 0.1 $\mu\text{m}$  以下之濾液的組別皆不會導致體軸彎曲、心苞水腫或卵黃囊水腫等明顯畸型現象，因此第二季節之水樣，不論是成功湖、二仁溪、曾文水庫之奈米微粒並不會引發明顯畸形的情況。

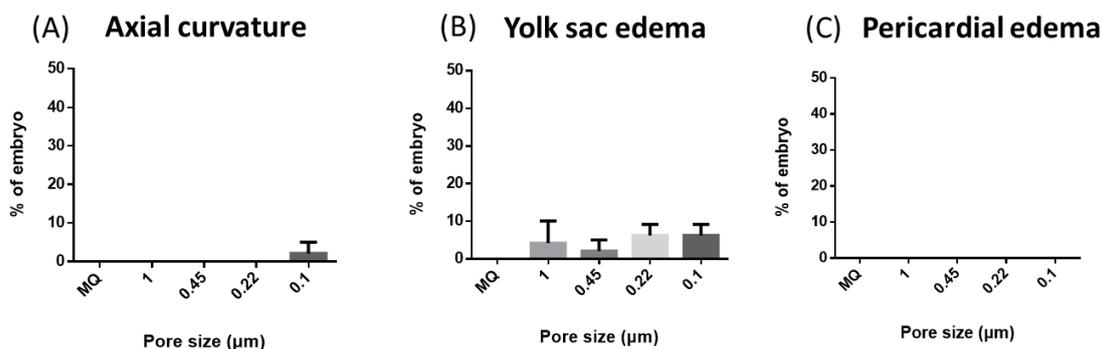


圖 4.76、斑馬魚胚胎暴露第一季節成功湖之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象

統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g/ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

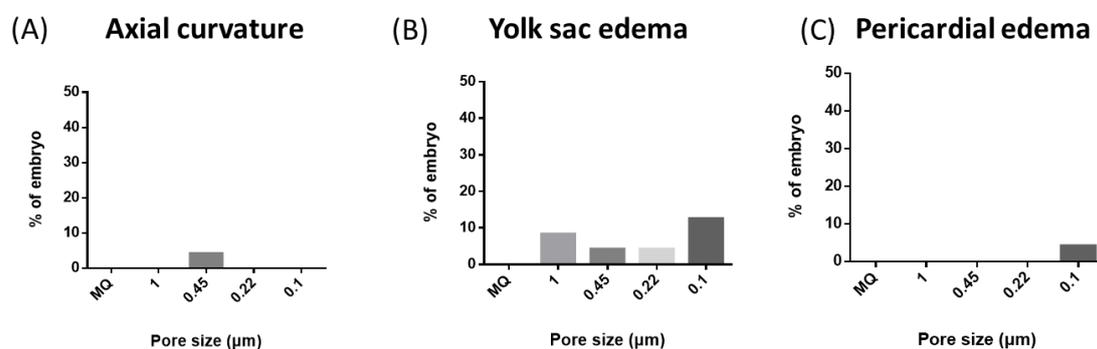


圖 4.77、斑馬魚胚胎暴露第一季節二仁溪之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g/ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

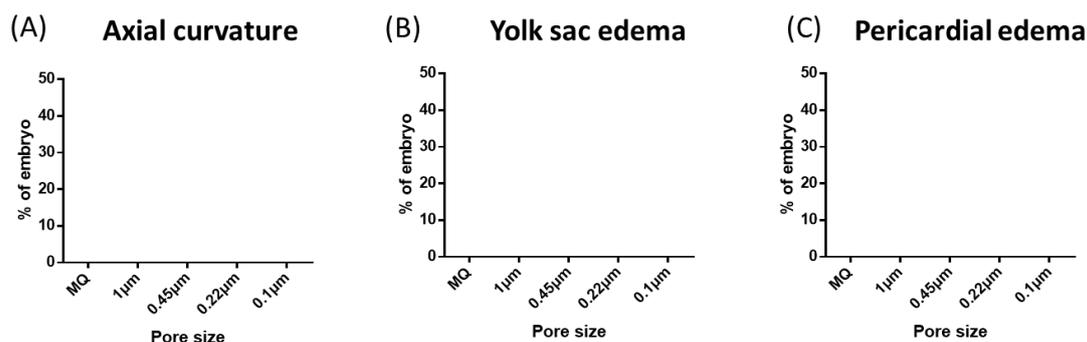


圖 4.78、斑馬魚胚胎暴露第一季節曾文水庫之不同過濾液於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C) 心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之劑量，單位  $\mu\text{g/ml}$ ，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣之奈米微粒對於斑馬魚胚胎體長發育影響

為了探討斑馬魚胚胎在發育期間是否因為環境之奈米微粒而影響發育，因此我們透過測量體長方式來探討早期發育情形與發育之關聯，結果顯示(圖 4.79)，暴露成功湖、二仁溪、曾文水庫濾液後之 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$  濾液後，

相較於控制組而言成功湖、二仁溪、曾文水庫奈米微粒濾液皆會使體長較長，但在濾液組間則無顯著差異，因此推測環境水體中並不會使斑馬魚胚胎發育遲緩。

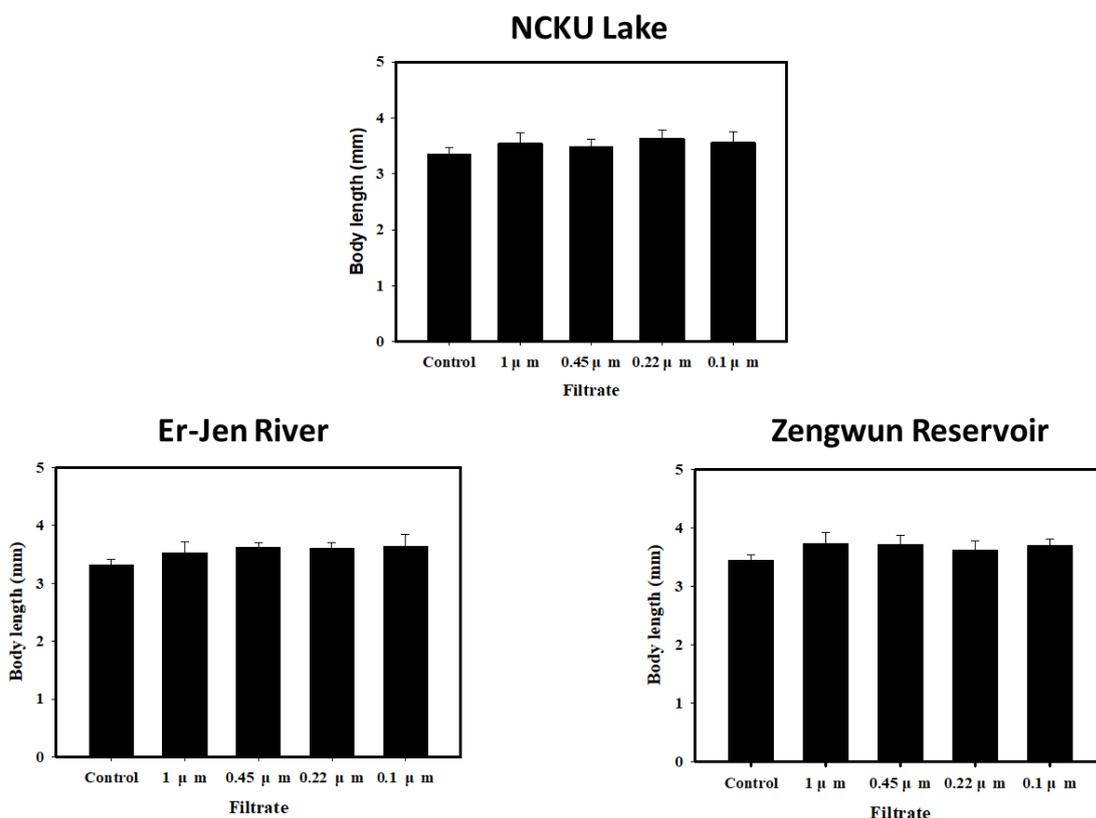


圖 4.79、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑濾液之體長。(A) 成功湖；(B) 二仁溪；(C) 曾文水庫。斑馬魚胚胎暴露於成功湖、二仁溪、曾文水庫不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu$ m、0.45  $\mu$ m、0.22  $\mu$ m、0.1  $\mu$ m，並於暴露 72 小時進行體長的量測。

#### 第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎氧化壓力之影響

為了探討第二季環境水樣之奈米微粒是否導致斑馬魚胚胎產生過量氧化壓力，因此我們以 DCFH-DA 染劑探討環境水體中不同孔徑過濾之濾液所產生氧化壓力之情形，暴露成功湖、二仁溪、及曾文水庫 1  $\mu$ m、0.45  $\mu$ m、0.22  $\mu$ m、0.1  $\mu$ m 之濾液後，結果顯示(圖 4.80-82)，正向控制組中相較於控制組而言可產生明顯的氧化壓力，而過濾後的濾液與第一季結果相似，不論哪個組別皆不會產生明顯的氧化壓力，結果證實，成功湖、二仁溪、曾文水庫之奈米微粒後對於斑馬魚胚胎不會引發過多的氧化壓力。

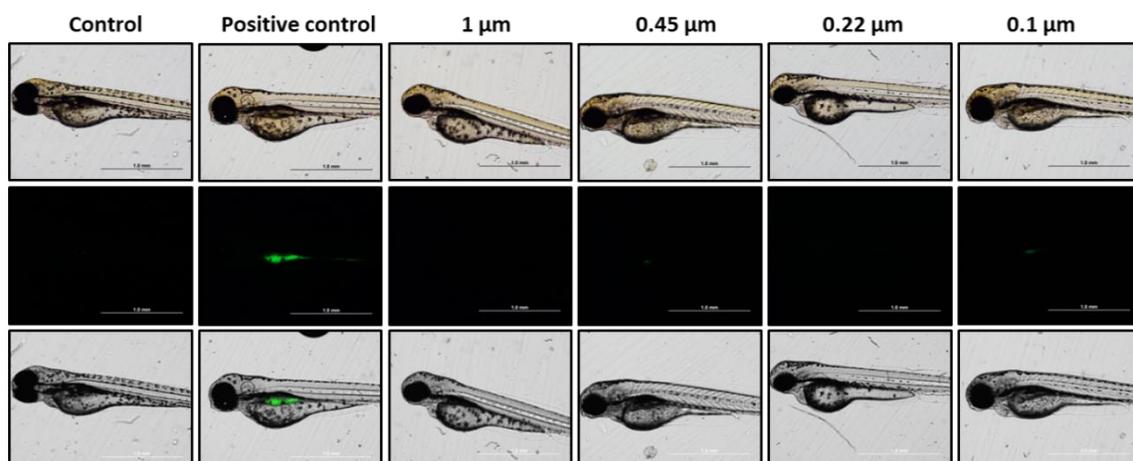


圖 4. 80、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於第二季成功湖不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，而正向控制組為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，於暴露 72 小時為實驗終點進行染色及拍攝，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

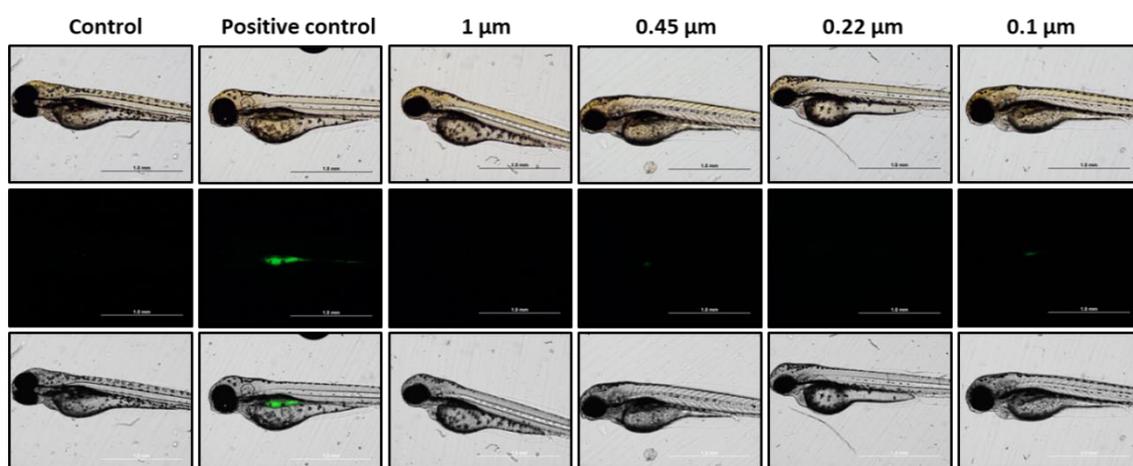


圖 4. 81、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於第二季二仁溪不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，而正向控制組為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，於暴露 72 小時為實驗終點進行染色及拍攝，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

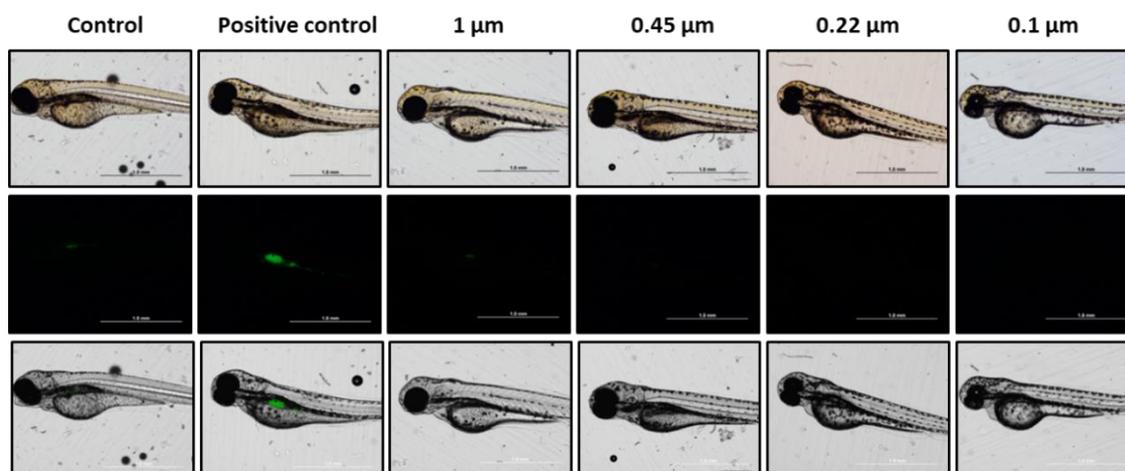


圖 4.82、為斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露曾文水庫濾液之氧化壓力影像。斑馬魚胚胎暴露於第二季曾文水庫不同孔徑之濾液，孔徑分別為  $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ，而正向控制組為暴露  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，於暴露 72 小時為實驗終點進行染色及拍攝，在此綠色螢光即代表氧化壓力的產生。

#### 第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

為了探討斑馬魚胚胎是否因為環境水樣之奈米微粒而誘發細胞凋亡的產生，因此我們將利用 *In situ cell death detection kit* 探討成功湖水體之奈米微粒所引發之細胞凋亡現象，如上方所述，將湖水進行不同孔徑 ( $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ ) 之濾膜後，於暴露 72 小時之時間點進行魚體拍攝，並利用共軛焦顯微鏡進行觀察。結果顯示(圖 4.83)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，而各組濾液與控制組比較無明顯細胞凋亡之訊號，因此由結果證實，成功湖水中之奈米微粒並不會導致細胞凋亡現象。

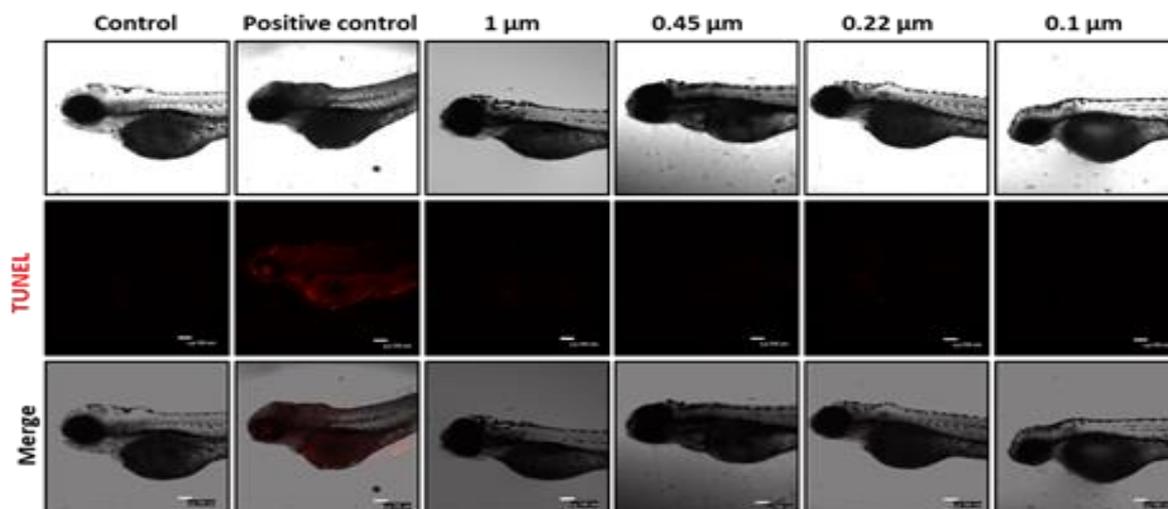


圖 4. 83、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露成功湖不同孔徑濾液之細胞凋亡。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及成功湖不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

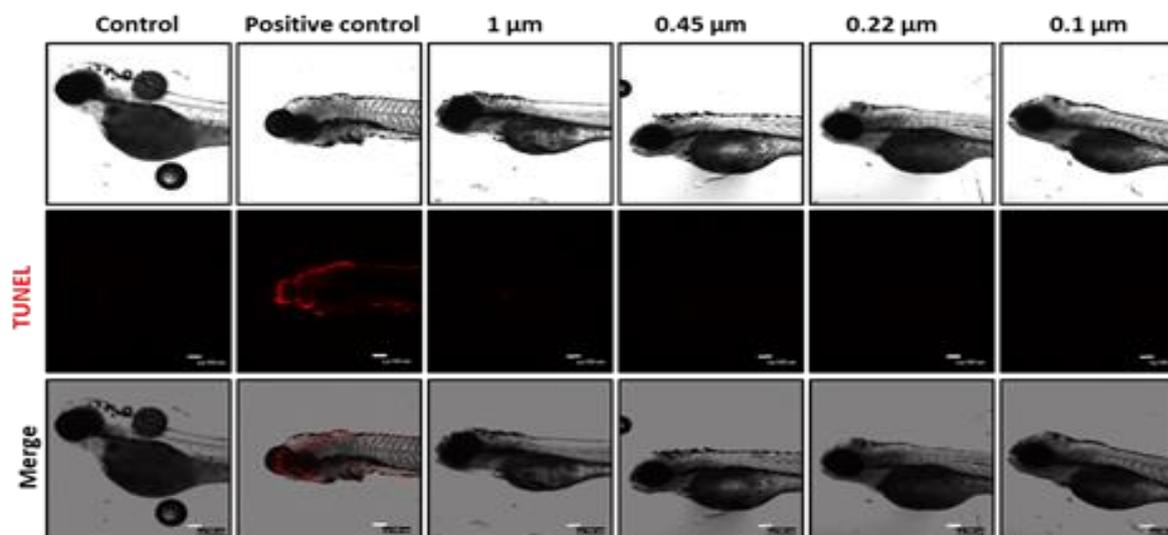


圖 4. 84、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露二仁溪不同孔徑濾液之細胞凋亡。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及二仁溪不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

### 第二季節二仁溪之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

結果顯示(圖 4.84)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，整體而言濾液各組間並沒有產生明顯的細胞凋亡現象，由此證實，第二季節之二仁溪奈米微粒對於斑馬魚胚胎並不會誘發明顯細胞凋亡現象。

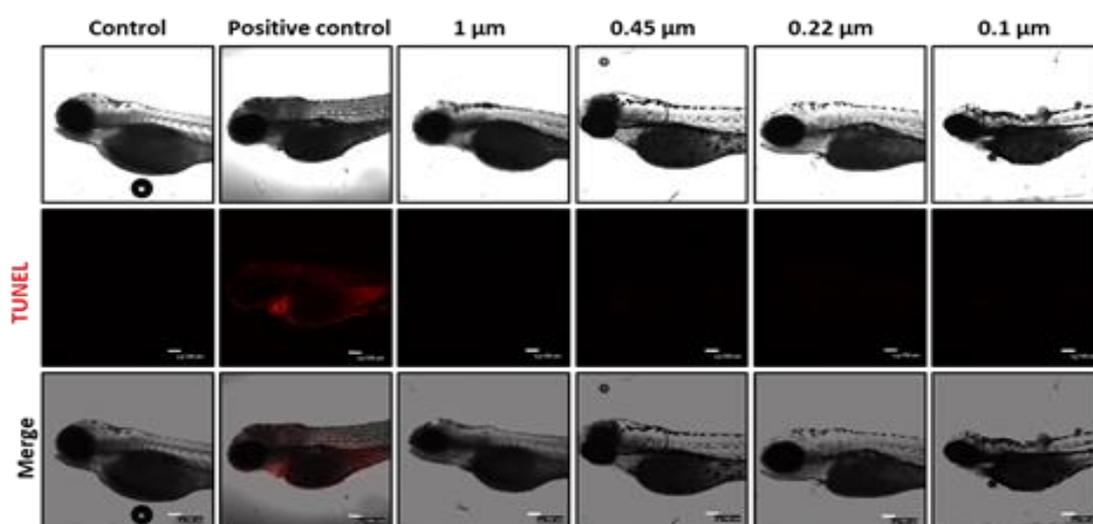


圖 4.85、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露曾文水庫不同孔徑濾液之細胞凋亡。斑馬魚胚胎暴露正向控制組 DNase I 及曾文水庫不同孔徑之濾液，孔徑分別為 1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ，並於暴露 72 小時後進行細胞凋亡的偵測，在此紅色螢光訊息即代表發生細胞凋亡之細胞。

### 第二季節曾文水庫之奈米微粒對於斑馬魚胚胎細胞凋亡之影響

為了探討斑馬魚胚胎是否因為曾文水庫環境水樣之奈米微粒而誘發細胞凋亡的產生，將湖水進行不同孔徑 (1  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$ ) 之濾膜後，於暴露 72 小時之時間點進行魚體拍攝。結果顯示(圖 4.85)，正向控制組 (DNase I) 相較於控制組而言會引發明顯的細胞凋亡，而各組濾液與控制組比較亦無明顯細胞凋亡之訊號，因此由結果證實，曾文水庫水體之奈米微粒亦不會產生明顯細胞凋亡現象。

### 環境水體額外添加奈米銀之斑馬魚胚胎死亡率之影響

為了探討奈米微粒在真實環境水體中，是否會影發斑馬魚胚胎死亡率，因此我們於第二季水體中添加奈米銀探討其毒性變化，我們分別添加奈米銀於 Mili-Q、成功湖、二仁溪、曾文水庫，並調整最終濃度為  $1 \mu\text{g/ml}$  及  $10 \mu\text{g/ml}$ ，加入奈米銀微粒後混和三十分鐘，最後在使用  $0.45 \mu\text{m}$  的濾紙將大部分的微生物進行過濾，結果顯示(圖 4.86)，奈米銀添加於 Mili-Q 的組別會隨著濃度增高胚胎死亡率增加，而相較於奈米銀添加於 Mili-Q 的組別而言， $1 \mu\text{g/ml}$  成功湖、二仁溪、曾文水庫 並不會導致明顯的死亡，而  $10 \mu\text{g/ml}$  的成功湖、曾文水庫會降低死亡率。

這有可能是因為當奈米物質進入複雜的環境水體時，改變其物化特性形成較大的顆粒，而這樣較大顆粒可能於過濾時便無法通過  $0.45 \mu\text{m}$  的濾膜，使得奈米銀微粒的毒性大幅下降。

另外為了探討是否因過濾而導致毒性下降，我們先將湖水進行  $0.45 \mu\text{m}$  濾膜的過濾後再進行添加奈米銀，結果顯示(圖 4.86)，相較於奈米銀添加於 Mili-Q 的組別而言， $10 \mu\text{g/ml}$  的成功湖、曾文水庫、二仁溪皆可減緩奈米銀的毒性效應，因此根據這些結果，奈米銀於真實環境水樣中，可能改變其化學組成，進而減緩毒性。

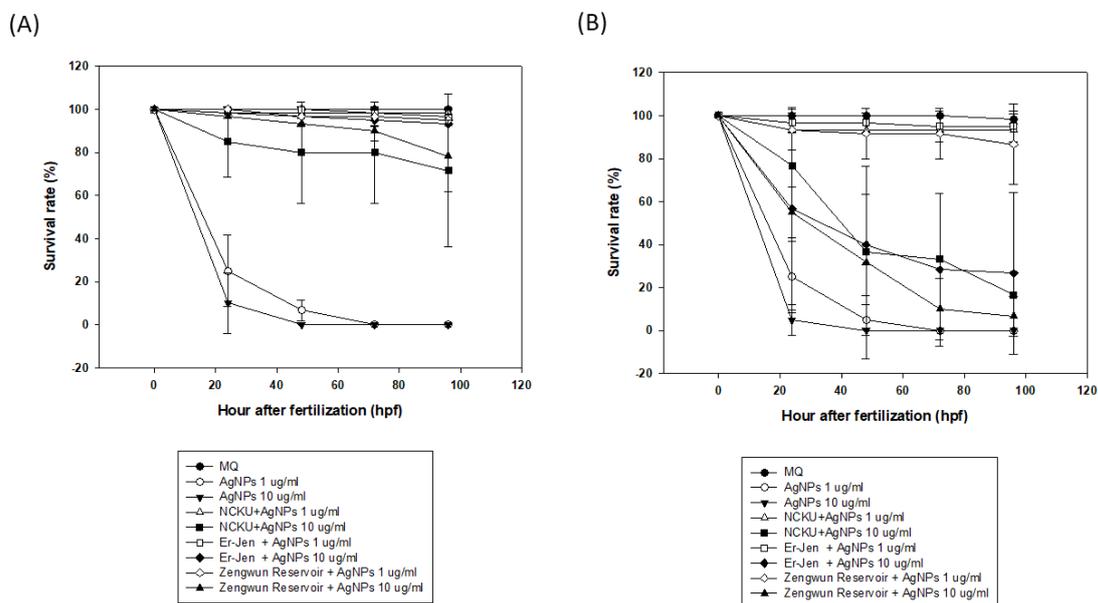


圖 4.86、斑馬魚胚胎暴露於環境湖水額外添加奈米銀之水樣。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在不同發育時期(0、24、48、72、96 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。橫軸為斑馬魚胚胎的發育時間，單位為受精後之小時數(hour post-fertilization, hpf)，縱軸為存活率(survival rate，單位為%)。

成功湖、曾文水庫、二仁溪之添加奈米銀微粒過濾後對於斑馬魚胚胎畸形率影響。

為了探討是否斑馬魚胚胎是否受到奈米銀微粒過濾後毒性之畸形可能性，因此將觀察及記錄畸形的情況，結果顯示(圖 4.87)，不論是成功湖、曾文水庫、二仁溪分別添加 1ppm、10ppm 奈米銀過濾後組別皆些微導致體軸彎曲、心苞水腫或卵黃囊水腫等明顯畸型現象，尤其在曾文水庫環境水體中添加奈米銀過濾後會些微增加畸形率之發生，但整體而言並不會引發明顯的畸形現象。

為了探討斑馬魚胚胎在發育期間在真實環境下暴露奈米銀之物質而影響其發育，因此我們透過測量體長方式來探討早期發育情形與奈米銀毒性之關聯，結果顯示(圖 4.88)，暴露 AgNPs 加入後過濾之成功湖、二仁溪、曾文水庫濾液後和過濾後加入 AgNPs，相較於控制組而言曾文水庫環境水體中不管在過濾前加入或是過濾後加入添加奈米銀會導致些微體長之降低，但成功湖、二仁溪則不明顯。

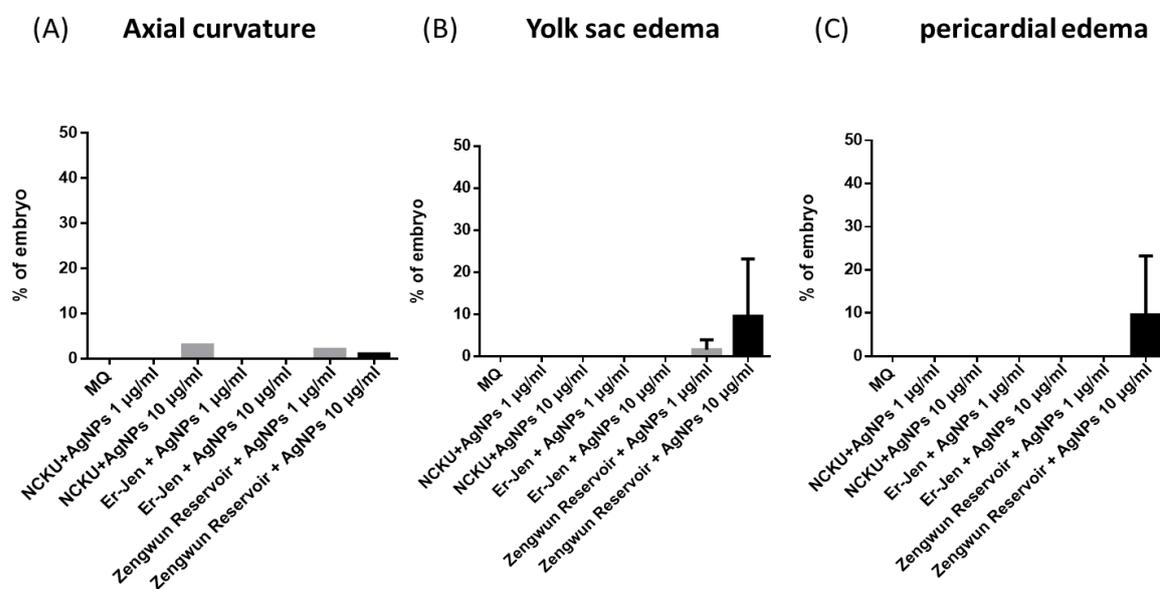


圖 4.87、斑馬魚胚胎暴露第二季節成功湖、曾文水庫、二仁溪之分別添加 1ppm 和 10 ppm 奈米銀過濾 0.45 µm 孔徑濾紙後暴露斑馬魚胚胎，於受精後 72 小時畸形現象統計比率。(A) 體軸彎曲；(B) 卵黃囊水腫；(C)心苞水腫。每組測試濃度各有 24 個胚胎，分別在受精後 72 小時進行胚胎畸形率的觀察。橫軸為暴露胚胎之濾液，單位 µg/ml，縱軸為畸形分布情形(percentages of embryos，單位為%)。

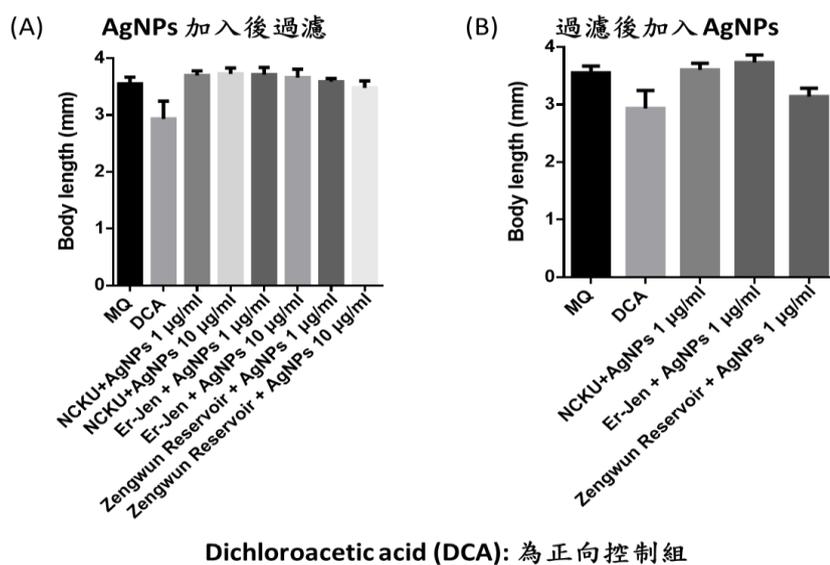


圖 4.88、斑馬魚胚胎受精後 3 小時暴露分別添加 1 ppm、10 ppm 奈米銀成功湖、二仁溪、曾文水庫過濾 0.45 µm 孔徑濾紙濾液之體長。(A) AgNPs 加入 1 ppm、10 ppm 奈米銀後過濾 0.45 µm 孔徑濾紙 (B)成功湖、曾文水庫、二仁溪過濾 0.45 µm 孔徑濾紙。為了探討奈米銀在真實水體狀況下暴露斑馬魚胚胎毒性影響，暴露於成功湖、二仁溪、曾文水庫分別添加 1 ppm、10 ppm 奈米銀過濾 0.45 µm 孔徑濾紙濾液，以及成功湖、二仁溪、曾文水庫過濾 0.45 µm 孔徑濾紙濾液再添加 1 ppm、10 ppm 奈米銀，並於暴露 72 小時進行體長的量測。

## 第五章、結論及建議意見

### 章節摘要：

此章節將總結三年計畫及探討目前所遭遇之困境及建議解決之方法，以供相關機構及研究單位做參考。

### 5.1 前兩期結案報告之摘錄及與本期研究目標之討論

#### 5.1.1 環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(1/3)-奈米微粒細胞毒性檢測系統在環境危害評估上之應用之結案報告摘要

【本計畫之受託單位是國立中興大學（闕斌如老師實驗室），其執行期為 104 年 4 月 16 日至民國 104 年 12 月 31 日】

該年度計畫由國立中興大學闕斌如老師團隊執行，利用他們開發之連續及時生長分析儀來作為細胞毒性篩選平台，以環檢所提供之環境監測取得的空氣中細懸浮粒子 PM2.5 作為樣品，透過檢測能反應細胞生理狀態之細胞電阻，來評估 PM2.5 對細胞（以人類肺腺癌細胞 A549 以及人類支氣管上皮細胞株 BEAS-2B 作為模式細胞株）之危害程度，然後搭配傳統的細胞增生試驗（即 WST-1 assay）、氧化壓力測試及細胞週期或細胞凋亡分析之結果，來作為 PM2.5 之細胞毒性的佐證。他們所收集到的 PM2.5 樣品，藉由細胞電阻之檢測，可發現其對兩株細胞之生長均有明顯的抑制效果，但藉由傳統的細胞存活分析，會發現較多數的 PM2.5 樣品只對 A549 細胞有比較明顯的抑制作用。此外，這些樣品都會誘發氧化壓力的生產。他們的報告書有特別指出收集樣品的石英薄膜，經過剪碎及震盪，即便沒有細懸浮微粒 PM2.5，也會影響細胞的生長，因而無法準確評估評估細懸浮微粒 PM2.5 的生物效果，所以建議可改為鐵氟龍薄膜。此外，環境污水純化與整治常會用到奈米物質（例如奈米級施威特曼石），闕老師團隊更進一步將他們所開發之細胞電阻檢測技術，應用在奈米材料的細胞毒性分析。他們的研究成果顯示奈米級施威特曼石並不會誘發氧化壓力的產生，以細胞電阻法、WST-1 分析法與細胞凋亡來評估其細胞毒性，也發現它對細胞生長不會產生明顯的抑制作用與細胞損傷，這些結果顯示奈米級施威特曼石於環境整治具有很高的應用潛力。

#### 5.1.2 環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(2/3)-環境整治用奈米微粒之細胞毒性研究成果之結案報告摘要

【本計畫之受託單位是國立中興大學（闕斌如老師實驗室），其執行期為 105 年 4 月 13 日至民國 105 年 12 月 31 日】

該年度計畫也是由國立中興大學關斌如老師團隊執行，他們持續開發符合 OECD 推薦以檢測細胞電阻為主之技術，來評估奈米材料對細胞之危害性。關老師團隊在 104 年度的研究成果中發現，奈米級施威特曼石本身對細胞並不會產生明顯的危害效應，然而在應用於環境整治（除去河川底泥中的化學物污染）時會搭配過氧化氫的使用，有可能產生類似 Fenton 反應的催化作用而產生對細胞有害的自由基，為釐清奈米級施威特曼石應用在污水整治時對可能產生的生物影響，關老師團隊延續以他們開發出來的細胞電阻檢測技術，針對三種不同製備法合成出來的奈米級施威特曼石以及河川底泥採集樣品，進行其細胞毒性（以人類肺腺癌細胞 A549 及大鼠表皮纖維母細胞 NIH-3T3 做為細胞模式）之評估，此外再以 WST-1 細胞增生分析、氧化壓力分析等結果作為佐證。他們的研究成果發現，合成方法的差異會影響奈米級施威特曼石的細胞光散射分析（細胞攝入與滯留）結果，且也會影響其在 A549 細胞氧化壓力產生的能力。但是相較下，在 NIH-3T3 細胞並不會產生顯著的氧化壓力，顯示奈米級施威特曼石促發氧化壓力的產生具有細胞特異性。細胞存活率的實驗顯示，A549 細胞處理這三種奈米級施威特曼石樣品後皆無明顯的細胞抑制現象，甚至達到一定濃度以上後，反倒有明顯增加細胞存活的現象；反觀，這三種樣品對正常細胞的生長卻會產生明顯的抑制作用，不過在高濃度下有一組樣本卻觀察到有增加細胞存活率的現象，他們推測這是高濃度的奈米級施威特曼石干擾吸光值檢測的緣故。若用細胞電阻作為毒性分析指標，他們發現 A549 相較於 NIH-3T3 細胞，對於奈米級施威特曼石的細胞生長抑制效果有比較高的耐受性。在他們的報告書中提出，針對以奈米級施威特曼石與過氧化氫處理過的河川底泥樣品，因為河川底泥成分的複雜度，所以初步的分析結果並無法有任何的結論。

### 5.1.3 三年成果總結論

關老師團隊所開發之細胞毒性檢測技術是針對細胞電阻的變化進行測量分析，未來可以進一步發展成自動化且高通量的檢測平台，對於奈米物質的毒性研究具有相當的創新性。

然而，於 105 年建議中，關老師團隊提出施威特曼石樣品在兩種細胞中所產生的影響，由於細胞的特質不同，對奈米施威特曼石的反應不盡相同，於本期研究中亦是認同這樣的概念，針對釐清奈米微粒的毒性可能需要建立不同的細胞株及更清楚的細胞生物學反應來釐清毒性的來源，因此本研究團隊根據我們過去執行相關奈米材料毒性機轉的研究經驗，建立適合應用在環境水體中奈米物質之物化特性分析與細胞培養模式與生物活體（斑馬魚胚胎）之毒性檢測之平台，提供多面向之生物毒性探討，希望能夠協助環檢所突破相關實驗技術實際應用於環境水體污染

物質之毒性檢測的瓶頸，並建立標準化的分析程序。

## 5.2 建議意見：

- ◆ **立即可行建議：**根據環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(1/3)-奈米微粒細胞毒性檢測系統在環境危害評估上之應用(EPA-104-E3S5-02-03)，於細胞模式上，石英薄膜經過剪碎及震盪處理後，可能容易游離出其成份內容物導致細胞毒性，另外於過去文獻中也指出玻璃纖維會導致細胞損傷[1]。而經實驗確認後已確認鐵氟龍濾膜不會導致明顯細胞毒性，因此建議可使用鐵氟龍濾膜進行實驗。
- ◆ **中長期建議：**經由測試細胞培養及斑馬魚胚胎模式後，雖環境水體水樣之實驗結果並不會誘發明顯的毒性效應，但於奈米銀、奈米氧化鋅、相對應之大分子物質及環境水體中額外添加奈米銀之實驗結果證實可反應出奈米毒性，因此建議未來可應用於檢測奈米微粒之毒性。

## 5.3 結論

- ◇ 目前我們已針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之細胞株培養與斑馬魚胚胎模式標準方法草案，其內容包含：細胞培養模式之存活率、自噬作用、氧化壓力與細胞凋亡之細胞毒性機轉及斑馬魚胚胎之胚胎存活率、胚胎畸形率、體長量測、氧化壓力和細胞凋亡測驗標準方法草案。
- ◇ 並且我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，測試結果可反應奈米微粒所引發之毒性效應。
- ◇ 我們已採集第一季和第二季之成功湖、二仁溪、曾文水庫環境水樣，共計六件水樣，並且六件水樣皆使用穿透式電子顯微鏡、動態光散射儀分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑範圍。
- ◇ 在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且僅在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成。
- ◇ 在斑馬魚胚胎模式中可發現不論第一季及第二季之成功湖、二仁溪及曾文水庫水體中之奈米微粒皆不會導致斑馬魚胚胎引發明顯毒性效應，其包含：降低存活率、氧化壓力及細胞凋亡現象。

表 5.1、預定進度及查核點:

預定進度(以甘特圖表示)											
工作內容項目	月次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10...
	年別	106	106	106	106	106	106	106	106	106	106
	月份	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 收集並整理文獻建議水體毒性測試技術之原理及其參考方法並擬定水體毒性測試草案。											
2. 建立環境水體之採集、水質檢測及細胞毒性和斑馬魚測試系統											
3. 採集第一季環境水體樣品及以環境水體進行細胞株危害測試											
4. 以第一季採集之環境水體樣品進行斑馬魚胚胎危害測試											
5. 以第一季採集之水體樣品加入人造奈米氧化鋅/銀進行細胞株和斑馬魚胚胎危害測試											
6. 採集第二季之環境水體樣品進行細胞株危害測試											
7. 以第二季採集之環境水體樣品進行斑馬魚胚胎危害測試											
8. 比較環境水體及環境水體添加人造奈米氧化鋅/銀之生物毒性，討論其影響因素並提出測試環境水體毒性可能方法及建議											
9. 整理實驗結果以及撰寫成果報告											
查核點	預定完成時間	查核點內容說明									
第一期工作報告	3/31(五)	收集並整理文獻建議水體毒性測試技術之原理及其參考方法並擬定水體毒性測試草案。									
期中報告	7/31(一)	建立環境水體之採集、水質檢測及細胞毒性和斑馬魚測試系統並完成第一季水體採集、細胞和斑馬魚毒性危害測試。									
期末報告	11/30(四)	完成第二季水體採集、細胞和斑馬魚毒性危害測試並探討環境水體及環境水體添加人造奈米氧化鋅/銀之生物毒性，討論其影響因素並提出測試環境水體毒性可能方法及建議，最後整理實驗結果以及撰寫成果報告									

表 5.2、預定進度及查核點:

契約書之預定進度累積百分比 (%)		實際執行進度 (%)					
工作內容項目	實際執行情形	差異分析 (打√)			落後原因	困難檢討及對策	預計改善完成日期
		符合	落後	超前			
1. 擬定水體毒性測試方法草案	已完成	√					
2. 以奈米微粒進行測試細胞及斑馬魚胚胎毒性檢測方法草案之可行性	已完成	√					
3. 第一季成功湖、二仁溪、曾文水庫之環境水體奈米微粒進行細胞株、斑馬魚胚胎危害測試	已完成	√					
4. 第二季成功湖、二仁溪、曾文水庫之環境水體奈米微粒進行細胞株、斑馬魚胚胎危害測試	大致完成	√					
查核點	預定完成時間		查核點內容說明				
期中報告	11/30		<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 收集國內外文獻並擬定環境水體奈米微粒之毒性測試草案。</li> <li>◆ 以奈米微粒及相對應之大分子物質進行測試細胞及斑馬魚胚胎毒性檢測方法草案。</li> </ul>				
期末報告	12/30		<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 採集第一季節成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣並進行細胞及斑馬魚胚胎毒性檢測。</li> <li>◆ 採集第二季節成功湖、二仁溪、曾文水庫水樣並進行細胞及斑馬魚胚胎毒性檢測。</li> <li>◆ 撰寫期末報告。</li> </ul>				

## 第六章、相關參考資料

1. Haugen, A., et al., *Cellular ingestion, toxic effects, and lesions observed in human bronchial epithelial tissue and cells cultured with asbestos and glass fibers*. Int J Cancer, 1982. **30**(3): p. 265-72.
2. Bernhardt, E.S., et al., *An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment*. J Environ Qual, 2010. **39**(6): p. 1954-65.
3. Klaine, S.J., et al., *Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects*. Environ Toxicol Chem, 2008. **27**(9): p. 1825-51.
4. Horst, A.M., et al., *Dispersion of TiO<sub>2</sub> nanoparticle agglomerates by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, 2010. **76**(21): p. 7292-7298.
5. Priester, J.H., et al., *Effects of soluble cadmium salts versus CdSe quantum dots on the growth of planktonic Pseudomonas aeruginosa*. Environmental science & technology, 2009. **43**(7): p. 2589-2594.
6. Werlin, R., et al., *Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain*. Nature nanotechnology, 2011. **6**(1): p. 65-71.
7. Ge, Y., J.P. Schimel, and P.A. Holden, *Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities*. Environmental science & technology, 2011. **45**(4): p. 1659-1664.
8. Ge, Y., J.P. Schimel, and P.A. Holden, *Identification of soil bacteria susceptible to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles*. Applied and environmental microbiology, 2012. **78**(18): p. 6749-6758.
9. Rico, C.M., et al., *Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(8): p. 3485-3498.
10. López-Moreno, M.L., et al., *Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soybean (Glycine max) plants*. Environmental science & technology, 2010. **44**(19): p. 7315-7320.
11. De La Rosa, G., et al., *Toxicity and biotransformation of ZnO nanoparticles in the desert plants Prosopis juliflora-velutina, Salsola tragus and Parkinsonia florida*. International Journal of Nanotechnology, 2011. **8**(6-7): p. 492-506.
12. Hernandez-Viezcas, J., et al., *Spectroscopic verification of zinc absorption and distribution in the desert plant Prosopis juliflora-velutina (velvet mesquite) treated with ZnO nanoparticles*. Chemical engineering journal, 2011. **170**(2): p.

- 346-352.
13. López-Moreno, M.L., et al., *X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO<sub>2</sub> nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(6): p. 3689-3693.
  14. Priester, J.H., et al., *Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(37): p. E2451-E2456.
  15. Holden, P.A., et al., *Ecological Nanotoxicology: Integrating Nanomaterial Hazard Considerations Across the Subcellular, Population, Community, and Ecosystems Levels*. Accounts of Chemical Research, 2013. **46**(3): p. 813-822.
  16. George, S., et al., *Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping*. ACS nano, 2009. **4**(1): p. 15-29.
  17. Fairbairn, E.A., et al., *Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development*. Journal of hazardous materials, 2011. **192**(3): p. 1565-1571.
  18. Xia, T., et al., *Decreased dissolution of ZnO by iron doping yields nanoparticles with reduced toxicity in the rodent lung and zebrafish embryos*. ACS nano, 2011. **5**(2): p. 1223-1235.
  19. Moore, M.N., et al., *Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: An in vitro study*. Nanotoxicology, 2009. **3**(1): p. 40-45.
  20. Canesi, L., et al., *Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes*. Environment international, 2008. **34**(8): p. 1114-1119.
  21. Gagné, F., et al., *Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity*. Aquatic toxicology, 2008. **86**(3): p. 333-340.
  22. Miller, R.J., et al., *Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton*. Environmental science & technology, 2010. **44**(19): p. 7329-7334.
  23. Miller, R.J., et al., *TiO<sub>2</sub> nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton*. PloS one, 2012. **7**(1): p. e30321.
  24. Yu, S.-j., Y.-g. Yin, and J.-f. Liu, *Silver nanoparticles in the environment*. Environmental Science: Processes & Impacts, 2013. **15**(1): p. 78-92.
  25. Geranio, L., M. Heuberger, and B. Nowack, *The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(21): p. 8113-

- 8118.
26. Mao, B.H., et al., *Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy*. *Nanotoxicology*, 2016: p. 1-20.
27. [https://www.researchgate.net/profile/Marcelo\\_Larramendy/publication/310605867\\_Toxicology\\_New\\_Aspects\\_to\\_this\\_Scientific\\_Conundrum/links/583336c208aef19cb81cac32.pdf#page=91](https://www.researchgate.net/profile/Marcelo_Larramendy/publication/310605867_Toxicology_New_Aspects_to_this_Scientific_Conundrum/links/583336c208aef19cb81cac32.pdf#page=91).
28. *Environmental Fate and Ecotoxicity of Engineered Nanoparticles: Current Trends and Future Perspective*, in *Advanced Nanomaterials for Wastewater Remediation*. 2016, CRC Press. p. 387-404.
29. Gimbert, L.J., et al., *Partitioning and stability of engineered ZnO nanoparticles in soil suspensions using flow field-flow fractionation*. *Environmental Chemistry*, 2007. **4**(1): p. 8-10.
30. Guzman, K.A., M.P. Finnegan, and J.F. Banfield, *Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles*. *Environ Sci Technol*, 2006. **40**(24): p. 7688-93.
31. Brant, J., H. Lecoanet, and M.R. Wiesner, *Aggregation and Deposition Characteristics of Fullerene Nanoparticles in Aqueous Systems*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2005. **7**(4): p. 545-553.
32. Huuskonen, J., *Prediction of soil sorption coefficient of a diverse set of organic chemicals from molecular structure*. *J Chem Inf Comput Sci*, 2003. **43**(5): p. 1457-62.
33. Wiesner, M.R., et al., *Assessing the risks of manufactured nanomaterials*. *Environ Sci Technol*, 2006. **40**(14): p. 4336-45.
34. Xu, M., et al., *Interparticle interactions in agglomerates of alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: influence of grinding*. *J Colloid Interface Sci*, 2004. **279**(1): p. 132-6.
35. (OECD), O.f.E.C.-o.a.D. *Testing Programme of Manufactured Nanomaterials - Overview*. 2015.
36. Shvedova, A.A., et al., *Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012. **261**(2): p. 121-33.
37. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic pathology*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
38. Tlili, A., et al., *Chronic exposure effects of silver nanoparticles on stream microbial decomposer communities and ecosystem functions*. *Environ Sci Technol*, 2017.
39. Jones, C. and D.W. Grainger, *In vitro assessments of nanomaterial toxicity*.

- Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(6): p. 438-456.
40. Hayashi, Y., *Designing in vitro assay systems for hazard characterization. basic strategies and related technical issues*. Exp Toxicol Pathol, 2005. **57 Suppl 1**: p. 227-32.
  41. Sutter, T.R., *Molecular and cellular approaches to extrapolation for risk assessment*. Environ Health Perspect, 1995. **103**(4): p. 386-9.
  42. Kroll, A., et al., *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **72**(2): p. 370-7.
  43. Sayes, C.M., K.L. Reed, and D.B. Warheit, *Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles*. Toxicol Sci, 2007. **97**(1): p. 163-80.
  44. Donaldson, K., et al., *Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region*. Inhal Toxicol, 2008. **20**(1): p. 53-62.
  45. Koh, J.Y. and D.W. Choi, *Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay*. J Neurosci Methods, 1987. **20**(1): p. 83-90.
  46. Borenfreund, E. and J.A. Puerner, *Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*. Toxicol Lett, 1985. **24**(2-3): p. 119-24.
  47. Nemes, Z., et al., *The pharmacological relevance of vital staining with neutral red*. Experientia, 1979. **35**(11): p. 1475-6.
  48. Ramires, P.A., et al., *The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour*. Biomaterials, 2001. **22**(12): p. 1467-74.
  49. Davoren, M., et al., *In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells*. Toxicology in Vitro, 2007. **21**(3): p. 438-448.
  50. Monteiro-Riviere, N.A. and A.O. Inman, *Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin*. Carbon, 2006. **44**(6): p. 1070-1078.
  51. Huang, M., E. Khor, and L.-Y. Lim, *Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 344-353.
  52. Hempel, S.L., et al., *Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 146-59.
  53. Jakubowski, W. and G. Bartosz, *2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?* Cell Biol Int, 2000. **24**(10): p. 757-60.

54. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R431-44.
55. Shen, B., J.C. Scaiano, and A.M. English, *Zeolite encapsulation decreases TiO<sub>2</sub>-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(1): p. 5-12.
56. Deshpande, A., P.K. Narayanan, and B.E. Lehnert, *Silica-induced generation of extracellular factor(s) increases reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells*. Toxicol Sci, 2002. **67**(2): p. 275-83.
57. Royall, J.A. and H. Ischiropoulos, *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells*. Arch Biochem Biophys, 1993. **302**(2): p. 348-55.
58. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
59. Trotter, P.J., M.A. Orchard, and J.H. Walker, *Ca<sup>2+</sup> concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes*. Biochem J, 1995. **308 ( Pt 2)**: p. 591-8.
60. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
61. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
62. Aubry, J.P., et al., *Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity*. Cytometry, 1999. **37**(3): p. 197-204.
63. Aljandali, A., et al., *Asbestos causes apoptosis in alveolar epithelial cells: role of iron-induced free radicals*. J Lab Clin Med, 2001. **137**(5): p. 330-9.
64. Isakovic, A., et al., *Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene*. Toxicol Sci, 2006. **91**(1): p. 173-83.
65. Chan, W.H. and N.H. Shiao, *Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(2): p. 259-66.
66. Li, J.J., et al., *Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(23): p. 5996-6003.
67. Lee, Y.H., et al., *Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts*. Biomaterials, 2014. **35**(16): p. 4706-15.

68. ISO and (International Organization for Standardization), *TECHNICAL REPORT ISO/TR 16197: Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials*. 2014.
69. Xia, T., et al., *Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties*. ACS Nano, 2008. **2**(10): p. 2121-34.
70. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
71. Xia, T., et al., *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. Nano Lett, 2006. **6**(8): p. 1794-807.
72. Lewicka, Z.A., et al., *Photochemical behavior of nanoscale TiO<sub>2</sub> and ZnO sunscreen ingredients*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2013. **263**: p. 24-33.
73. Locascio, L.E., et al., *Nanomaterial Toxicity: Emerging Standards and Efforts to Support Standards Development*, in *Nanotechnology Standards*, V. Murashov and J. Howard, Editors. 2011, Springer New York: New York, NY. p. 179-208.
74. OECD. No. 24 *Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured NMs*, available at <http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282010%2925&doclanguage=en>. 2010.
75. Oomen, A.G., et al., *Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment - report of the NanoSafety Cluster Working Group 10*. Nanotoxicology, 2014. **8**: p. 334-48.
76. Tiede, K., et al., *Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008. **25**(7): p. 795-821.
77. Card, J.W. and B.A. Magnuson, *A method to assess the quality of studies that examine the toxicity of engineered nanomaterials*. Int J Toxicol, 2010. **29**(4): p. 402-10.
78. Hasselov, M., et al., *Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles*. Ecotoxicology, 2008. **17**(5): p. 344-61.
79. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959, London, UK: Reprinted by UFAW, 1992, 238 pp.
80. Anon, *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*.

- 2010.
81. <http://aquagroup.weebly.com/photos--videos.html>.
  82. Fako, V.E. and D.Y. Furgeson, *Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(6): p. 478-86.
  83. George, S., et al., *Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebrafish embryo screening to develop hazard ranking for engineered nanomaterials*. *ACS Nano*, 2011. **5**(3): p. 1805-17.
  84. Spitsbergen, J.M. and M.L. Kent, *The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations*. *Toxicol Pathol*, 2003. **31 Suppl**: p. 62-87.
  85. Lin, S., et al., *Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies*. *Small*, 2013. **9**(9-10): p. 1608-18.
  86. Lele, Z. and P.H. Krone, *The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research*. *Biotechnol Adv*, 1996. **14**(1): p. 57-72.
  87. Langheinrich, U., *Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk*. *Bioessays*, 2003. **25**(9): p. 904-12.
  88. Scholz, S., et al., *The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2008. **15**(5): p. 394-404.
  89. Simmons, S.O., C.Y. Fan, and R. Ramabhadran, *Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening*. *Toxicol Sci*, 2009. **111**(2): p. 202-25.
  90. Yang, L., et al., *Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo*. *Genome Biol*, 2007. **8**(10): p. R227.
  91. Barut, B.A. and L.I. Zon, *Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease*. *Physiol Genomics*, 2000. **2**(2): p. 49-51.
  92. Amatruda, J.F., et al., *Zebrafish as a cancer model system*. *Cancer Cell*, 2002. **1**(3): p. 229-31.
  93. International Organization for Standardization. 1996. Water quality—  
Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, C.P.
  94. Dai, Y.J., et al., *Zebrafish as a model system to study toxicology*. *Environ Toxicol Chem*, 2014. **33**(1): p. 11-7.
  95. Lee, O., C.R. Tyler, and T. Kudoh, *Development of a transient expression assay for detecting environmental oestrogens in zebrafish and medaka embryos*. *BMC Biotechnol*, 2012. **12**: p. 32.
  96. Mizell, M. and E.S. Romig, *The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for*

- toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection*. Int J Dev Biol, 1997. **41**(2): p. 411-23.
97. Carvan, M.J., 3rd, et al., *Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants*. Arch Biochem Biophys, 2000. **376**(2): p. 320-7.
  98. Gao, J., et al., *Vascular toxicity of silver nanoparticles to developing zebrafish (Danio rerio)*. Nanotoxicology, 2016. **10**(9): p. 1363-72.
  99. Weber, G.E., et al., *Biodistribution and toxicological study of PEGylated single-wall carbon nanotubes in the zebrafish (Danio rerio) nervous system*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **280**(3): p. 484-92.
  100. Veldman, M.B. and S. Lin, *Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research*. Pediatr Res, 2008. **64**(5): p. 470-6.
  101. Wang, R.L., et al., *DNA microarray application in ecotoxicology: experimental design, microarray scanning, and factors affecting transcriptional profiles in a small fish species*. Environ Toxicol Chem, 2008. **27**(3): p. 652-63.
  102. économiques, O.d.c.e.d.d., *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. 2013: OECD Publishing.
  103. McCollum, C.W., et al., *Developmental toxicity screening in zebrafish*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2011. **93**(2): p. 67-114.
  104. de Esch, C., et al., *Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review*. Neurotoxicology and teratology, 2012. **34**(6): p. 545-553.
  105. W104.51C 河川、湖泊及水庫水質採樣通則，行政院環保署，環署檢字第 0930095744 號，民國 93 年。
  106. W109.51B 事業放流水採樣方法，行政院環保署，環署檢字第 0980040837 號，民國 98 年。
  107. NIEA PA102 環境樣品採集及保存作業指引，行政院環保署，環署檢字第 0930087470 號，民國 93 年。
  108. NIEA W102.51C 水質檢測方法總則，行政院環保署，署檢字第 094001591 號，民國 94 年。
  109. 水質分析與實習-操作查核篇，行政院環保署環境保護人員訓練所，民國 104 年。
  110. NIEA W223.52B 水中真色色度檢測方法－分光光度計法，行政院環保署，環署檢字第 0990084622 號，民國 99 年。
  111. NIEA W203.51B 水中導電度測定方法－導電度計法，行政院環保署，環署檢字第 70017 號，民國 89 年。
  112. NIEA W219.52C 水中濁度檢測方法－濁度計法，行政院環保署，署檢字第 0940034336 號，民國 94 年。

113. NIEA W223.52B 水之氫離子濃度指數(PH 值)測定方法-電極法，行政院環保署，環署檢字第 0990084622 號，民國 99 年。
114. Westerfield, M. "A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)." *The zebrafish book*. University of Oregon Press Eugene, 2000. 4-5.
115. NIEA W217.52A 水溫檢測方法，行政院環保署，署檢字第 44692 號，民國 88 年。
116. NIEA W422.52B 水中溶氧檢測方法—碘定量法，行政院環保署，環署檢字第 1000008812 號，民國 100 年。
117. <http://www.mcswiggen.com/TechNotes/WDSvsEDS.htm>.
118. Kang, S.J., et al., *Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle-mediated cytotoxicity*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012. **258**(1): p. 89-98.
119. Liu, S., et al., *Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells*. *Toxicology*, 2010. **267**(1-3): p. 172-7.
120. Vega-Avila, E. and M.K. Pugsley, *An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells*. *Proc West Pharmacol Soc*, 2011. **54**: p. 10-4.
121. Fisichella, M., et al., *Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes*. *Toxicol In Vitro*, 2009. **23**(4): p. 697-703.
122. Tasyriq, M., et al., *7alpha-Hydroxy-beta-Sitosterol from *Chisocheton tomentosus* Induces Apoptosis via Dysregulation of Cellular Bax/Bcl-2 Ratio and Cell Cycle Arrest by Downregulating ERK1/2 Activation*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. **2012**: p. 765316.
123. Sawai, H. and N. Domae, *Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **411**(3): p. 569-73.
124. Kanzawa, T., et al., *Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide*. *Cancer Res*, 2003. **63**(9): p. 2103-8.
125. Ahn, M.Y., et al., *Apicidin inhibits cell growth by downregulating IGF-1R in salivary mucoepidermoid carcinoma cells*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(4): p. 1899-907.
126. Webb, S.E. and A.L. Miller, *Ca<sup>2+</sup> signalling and early embryonic patterning during zebrafish development*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007. **34**(9): p. 897-904.
127. Liu, Xiong, et al. "Predictive modeling of nanomaterial exposure effects in biological systems." (2013).
128. Harper, B., et al., *Comparative hazard analysis and toxicological modeling of diverse nanomaterials using the embryonic zebrafish (EZ) metric of toxicity*. *J*

- Nanopart Res, 2015. **17**(6): p. 250.
129. Kim, M.S., et al., *Using citrate-functionalized TiO<sub>2</sub> nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity*. *Analyst*, 2014. **139**(5): p. 964-72.
130. Bai, W., et al., *Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010. **12**(5): p. 1645-1654.
131. Long, T.C., et al., *Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity*. *Environmental Science & Technology*, 2006. **40**(14): p. 4346-4352.
132. Brown, D.M., et al., *Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **286**(2): p. L344-53.
133. <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>.
134. Duan, J., et al., *Inflammatory response and blood hypercoagulable state induced by low level co-exposure with silica nanoparticles and benzo[a]pyrene in zebrafish (*Danio rerio*) embryos*. *Chemosphere*, 2016. **151**: p. 152-62.
135. Arora, S., et al., *Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **236**(3): p. 310-8.
136. Zhao, X., et al., *Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos*. *Aquat Toxicol*, 2016. **180**: p. 56-70.
137. Ma, D., et al., *Foxn1 maintains thymic epithelial cells to support T-cell development via mcm2 in zebrafish*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(51): p. 21040-5.
138. Bottini, A. A., Amcoff, P. and Hartung, T. (2007). *Food for thought ... on globalization of alternative methods*. *ALTEX* **24**, 255-261.
139. Chen, L., et al., *Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2008. **3**(4): p. 286-95.
140. Radziun, E., et al., *Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(8): p. 1694-700.
141. Alshatwi AA, Vaiyapuri Subbarayan P, Ramesh E, ALHazzaniAA, Alsaif MA, Alwarthan AA. *Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles induce mitochondria-mediated cell death and upregulate the expression of signaling genes in human mesenchymal*

- stem cells. Journal of biochemical and molecular toxicology* 2012; 26(11): 469-476.
142. Balasubramanyam, A., et al., *In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test*. *Mutagenesis*, 2009. **24**(3): p. 245-51.
  143. Kim YJ, C.H., Song MK, Youk DY, Kim JH, Ryu JC. Genotoxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle in mammalian cell lines. *Molecular and cellular toxicology* 2009; 5: 172-178.
  144. Ahamed, M., et al., *Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(2): p. 578-83.
  145. Magrez, A., et al., *Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials*. *Nano Lett*, 2006. **6**(6): p. 1121-5.
  146. Herzog, E., et al., *A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay*. *Toxicol Lett*, 2007. **174**(1-3): p. 49-60.
  147. Dhawan, A., et al., *Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity*. *Environ Sci Technol*, 2006. **40**(23): p. 7394-401.
  148. Lin, W., et al., *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **217**(3): p. 252-9.
  149. Sun, L., et al., *Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(8): p. 1619-29.
  150. Hussain, S.M., et al., *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. *Toxicol In Vitro*, 2005. **19**(7): p. 975-83.
  151. Foldbjerg, R., D.A. Dang, and H. Autrup, *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549*. *Arch Toxicol*, 2011. **85**(7): p. 743-50.
  152. Haase A, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Mantion A, Draude F, Plendl J, Goetz ME, Galla S, Masic A, *Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses*. *Journal of physics* 2011; 304(1): 012030.
  153. De Berardis, B., et al., *Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **246**(3): p. 116-27.
  154. Osman, I.F., et al., *Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells*. *Nanomedicine (Lond)*, 2010. **5**(8): p. 1193-203.
  155. Guan, R., et al., *Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles*. *Nanoscale Res Lett*, 2012. **7**(1): p. 602.

156. Huang, C.C., et al., *Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(1): p. 45-55.
157. Jeng, H.A. and J. Swanson, *Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2006. **41**(12): p. 2699-711.
158. Ge, Y., et al., *Fluorescence Modified Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for High-Efficient Cellular Imaging*. *Nanoscale Res Lett*, 2009. **4**(4): p. 287-295.
159. Delcroix, G.J., et al., *Mesenchymal and neural stem cells labeled with HEDP-coated SPIO nanoparticles: in vitro characterization and migration potential in rat brain*. *Brain Res*, 2009. **1255**: p. 18-31.
160. Bhattacharya, K., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells*. *Part Fibre Toxicol*, 2009. **6**: p. 17.
161. Fang, M., et al., *Effect-directed analysis of Elizabeth River porewater: Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*)*. *Environmental toxicology and chemistry*, 2014. **33**(12): p. 2767-2774.
162. Wu, L., et al., *Toxicity of urban highway runoff in Shanghai to Zebrafish (*Danio rerio*) embryos and luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis*. Q67)*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014. **21**(4): p. 2663-2676.
163. Vincze, K., et al., *Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos*. *Environmental Sciences Europe*, 2014. **26**(1): p. 3.
164. Chen, T.-H., et al., *Assessment of ichthyotoxicity and anthropogenic contamination in the surface waters of Kenting National Park, Taiwan*. *Environmental monitoring and assessment*, 2015. **187**(5): p. 265.
165. Zhang, L., et al., *Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* SP. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015. **112**: p. 137-143.
166. Wang, P., et al., *Toxicity of sediment cores from Yangtze River estuary to zebrafish (*Danio rerio*) embryos*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015. **22**(21): p. 16423-16433.
167. Novelli, A., et al., *Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles*. *Chemosphere*, 2016. **144**: p. 1408-1414.
168. Bui, T.-K.L., et al., *Copper toxicity and the influence of water quality of Dongnai River and Mekong River waters on copper bioavailability and toxicity to three*

- tropical species*. Chemosphere, 2016. **144**: p. 872-878.
169. Michiels, E.D., et al., *Evaluating Complex Mixtures in the Zebrafish Embryo by Reconstituting Field Water Samples: A Metal Pollution Case Study*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(3): p. 539.
170. Pradhan, A., et al., *Transcriptional responses of zebrafish to complex metal mixtures in laboratory studies overestimates the responses observed with environmental water*. Science of The Total Environment, 2017. **584**: p. 1138-1146.
171. Pavagadhi, S., M. Sathishkumar, and R. Balasubramanian, *Uptake of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles by zebrafish embryos in the presence of other contaminants in the aquatic environment*. Water research, 2014. **55**: p. 280-291.
172. Heinlaan, M., et al., *Natural water as the test medium for Ag and CuO nanoparticle hazard evaluation: An interlaboratory case study*. Environmental Pollution, 2016. **216**: p. 689-699.
173. Bruneau, A., et al., *Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 2016. **174**: p. 70-81.
174. Curtin, J.F., *Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis*. Journal of Immunological Methods, 2002.
175. Kang, H.S., *Inhibitory Phlorotannins from the Edible Brown Alga Ecklonia stolonifera on Total Reactive Oxygen Species (ROS) Generation*. Arch Pharm Res, 2004.
176. Daido, S., *Pivotal Role of the Cell Death Factor BNIP3 in Ceramide-Induced Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells*. CANCER RESEARCH, 2004.
177. Ren, Y., *Autophagy inhibition through PI3K/Akt increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells*. BMB reports 2009.
178. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
179. [https://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/](https://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/).
180. Thisse, C. and B. Thisse, *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. Nature protocols, 2008. **3**(1): p. 59-69.
181. Kim, M.-S., et al., *Using citrate-functionalized TiO<sub>2</sub> nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity*. Analyst, 2014. **139**(5): p. 964-972.
182. Lee, H.-C., et al., *Zebrafish transgenic line huORFZ is an effective living bioindicator for detecting environmental toxicants*. PloS one, 2014. **9**(3): p. e90160.
183. Mao, B.H., et al., *Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and*

- important role of autophagy*. *Nanotoxicology*, 2016. **10**(8): p. 1021-40.
184. Kocbek, P., *Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles*. *Nanoparticles toxicity*, 2010.
185. Fu, P.P., et al., *Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species*. *J Food Drug Anal*, 2014. **22**(1): p. 64-75.
186. Mironava, T., et al., *Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time*. *Nanotoxicology*, 2010. **4**(1): p. 120-137.
187. Zhao, X., et al., *Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish*. *Aquatic toxicology*, 2013. **136**: p. 49-59.
188. Zhao, X., et al., *Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos*. *Aquatic Toxicology*, 2016. **180**: p. 56-70.

## 第七章、附件

## 環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究評選會議廠商回覆審查意見表

陳委員家揚	廠商回覆(成功大學)
<p>1. 本研究以 Annexin V 染劑搭配流式細胞儀偵測細胞凋亡。對於凋亡晚期或是已死細胞，是否有方法區分死亡過程是 apoptosis 還是 necrosis? 類似地，ROS 在斑馬魚的測試，TUNEL assay 是否能明確排除細胞死亡皆經由 apoptosis，而非 necrosis?</p>	<p>感謝委員的提問。本研究除了以 Annexin V 染劑進行細胞 apoptosis 的分析之外，在測試過程中亦會同時雙染 PI 染劑來進行 necrosis 的偵測，進而了解細胞死亡的狀態；此外針對斑馬魚胚胎所進行的 apoptosis 分析，TUNEL assay 為分析 apoptosis 的主要方法之一，過去的研究曾指出，TUNEL assay 可能將 necrosis 的細胞標記成 apoptosis 細胞，然而經過染色前處理步驟的修正(例如加入 proteinase K 或者進行微波處理)，能夠提高 TUNEL assay 的專一性，且特別指的是產生後期的細胞凋亡。</p> <p>參考文獻：  Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996). "In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations". J Histochem Cytochem. 44 (9): 959–68.  Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F (1998). "Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL</p>

	<p>specificity". Biomed Pharmacother. 52 (6): 252–8.</p>
<p>2. 所選之二仁溪、成功湖、曾文水庫，除了一般污染之差異，可否補充說明水中奈米粒子之來源可能有何不同，以強化所選採樣地點之適用性？</p>	<p>感謝委員之建議。二仁溪、成功湖及曾文水庫除了一般汙染差異外，其中三者對於人類與自然環境的活動也不同，曾文水庫為天然自然環境與人類活動較少並不會有大量的交互影響，因此可做為潔淨之地表水源對照，而水中奈米微粒可能會較少，另外成功湖為成功大學內之水源，其為地下水體系且位於人類活動的環境中，其可能因人類活動而受汙染，最後二仁溪為嚴重之汙染環境水體，目前其汙染來源為上游之畜牧業廢水以及保安工業區及仁德工業區之排放工業廢水，而奈米微粒可能來自畜牧業之動物飼料，另外兩工業區內大部分以金屬加工業及紡織業居多，也因此奈米微粒可能為金屬製成類以及紡織類。</p>
<p>3. 服務建議書第 44 頁提及可根據水質狀況調整實驗。可否進一步闡述將調整 哪些重要水質參數、調整之依據等？</p>	<p>為了避免因水體水質不適合斑馬魚生存因而影響斑馬魚的毒性測試，因此我們必須適時於暴露前調整水體水質，我們將依據 OECD 斑馬魚胚胎毒性測驗規範調整水質參數，如：斑馬魚屬熱帶魚，因此需調整水溫在 28 度左右；pH 值在 6-8 之間為佳，其可參考建議書之 44 頁樣品水質檢測。</p>

<p>4. 服務建議書第 46 頁說明水溫量測之重要性。不過，細胞測試與斑馬魚測試的水溫是否會調整在採樣時量測的環境水體溫度進行？若否，環境水體之水溫與未來毒性測試結果間之關連性為何？</p>	<p>感謝委員的問題與建議。服務建議書第 46 頁所提及之環境水體之溫度測試，會在採集樣結束後立即搭配溶氧量之檢測。水溫與溶氧量為皆為飼養斑馬魚水質條件之重要參數，關係著魚兒本身的健康狀態，此外水溫也會影響溶氧量，當水溫越高，水分子的活動就越快，氧氣滯留在水中的時間就越短，亦即溶氧量會下降。一般來說，自然環境的水表溫度較高，卻容易隨陸地氣溫而產生波動，而較深之處的水溫雖然比較低，但相對穩定。在實驗室內飼育斑馬魚，水溫(約略 28°C)以及溶氧量(5.0 mg/L 以上)等條件都會進行嚴格地控管，以維持魚兒的健康基礎。所以，我們並不會以環境中的水溫做為進行測試的水溫條件。然而，溫度與溶氧量，有可能影響金屬奈米微粒的活性及其氧化還原的狀態，雖然現階段我們對於奈米微粒的物化特性變化跟其毒性的關聯性仍相當不清楚，所以在採樣與實驗過程中，記錄這些有可能影響奈米微粒物化特性的因子，可能有助於我們未來對此做進一步的釐清與探討。</p>
<p>5. 服務計畫書於背景和工作方法已對於細胞毒性測驗以及斑馬魚毒性試驗模式，有相當詳盡的說明，方法可行。另一方面，現有方法看似已建置甚為完整；本研究未來</p>	<p>謝謝委員的建議。目前於細胞毒性和斑馬魚胚胎毒性測驗我們將進一步測試是否適用於水體中之奈米毒性，如需調整水溫和 pH 值等，因此於未來中我們將針對細胞培養模式和斑馬魚胚</p>

<p>提出之標準方法草案，可能之主要差異或改進為何？</p>	<p>胎是否適合環境水體調整測驗方式。對於水體前處理方法之建立目前研究之文獻仍然不足，也因此於未來的標準方法草案可能將隨著實驗的進展調整為更適用於測驗奈米毒性的水體採樣方式。</p>
<p>6. 本研究使用諸多測試方法檢視不同之毒性表現或影響。請問可有綜整不同毒性參數之方式？</p>	<p>感謝委員之建議，目前在斑馬魚胚胎模式已經有諸多方法檢視毒性表現，此外美國俄勒岡州立大學(Oregon State University)已經發表出的Nanomaterial-Biological Interactions (NBI)資料庫中整理之斑馬魚胚胎實驗數據進行預測模式的模擬，將每次斑馬魚胚胎實驗數據，其包含：畸形以及存活狀況做為毒性表現之影響，並依據不同毒性測試項目做為綜合參數，並依照統計軟體的計算彙整出Effective concentration 50(EC<sub>50</sub>)之值做為其中一項綜合毒性指標。</p>
<p>7. 每期之細胞株與斑馬魚胚胎危害測試，需 5-6 個月。請問如何確保測試之水質在期間內之穩定性？</p>	<p>7. 謝謝委員的建議。因目前我們仍在建立水體奈米毒性之測驗方法，也因此仍需彈性時間進行作業，所以將時程調整為 5-6 個月，於未來我們確認建立好適當及合理的測驗方法時，將可以更明確的規劃時程所需之時間。水質之穩定性對於毒性測驗十分重要，我們將會將所有的前置步驟規劃完成後，於採集水樣後立即保存於 4°C，並儘快完成毒性測驗，盡量避免水樣品變質的問題。</p>

<p>8. 本計畫透過過濾和離心去除環境水樣中較大粒徑。不過，如何分辨所觀測到之毒性表現來自水中奈米粒子或是可溶性有機物？</p>	<p>8. 謝謝委員的建議與提問。目前於水體中之奈米毒性相關研究仍未能解決這樣的困境，而於我們的試驗設計中也無法確切得知其毒性是來自於奈米物質或可溶性有機物，但於計畫中透過測試奈米物質之物化特性，如：粒徑、外型、分散性...等，可進一步推測奈米毒性之可能性，並且再透過額外添加奈米物質之方法可交互比對找出可能的毒性來源。</p>
<p>9. 預期效益中提及評估台灣環境水體之奈米毒性的可能性。可否補充說明如何透過三個環境水體採樣測試結果加以推估？亦或有同時參考其他資料？</p>	<p>9. 我們所採集的三个地點分別具有不同的意義，成功湖代表的地下水樣；曾文水庫代表乾淨水體的樣本；而二仁溪代表排放汙水樣本，因二仁溪可能排放畜牧廢水與金屬加工業及紡織業所排放之工業廢水，因此我們推估可能含有較多的奈米微粒，而曾文水庫因鮮少有人群流動，可能其奈米微粒較少，另外若有測出奈米物質將會持續探討或參考文獻、環保署或跟相關單位詢問比對可能汙染來源。</p>
<p>10. 業務費中有編列專家諮詢會議，但是服務建議書本文並未提及召開專家諮詢會以及其目的。此外，學習型兼任助理似乎並不加勞保，但是編列了其勞保費用，請確認正確性</p>	<p>感謝委員的建議與提問。專家諮詢會議之出席費三萬元整會更改至其他項目。依據「國立成功大學學生兼任研究助理管理暫行要點」第九條規定，學習型兼任研究助理如擔任危險性工作，計畫主持人應為其投保相關保險。於本計畫執行須由學習型兼任助理出外採取水樣，因此會投保學生平安保險費用，會將編列學習型兼任助理之勞保費用更改。</p>

林委員一郎	廠商回覆(成功大學)
<p>1. 奈米微粒的選擇是否參考對台灣目前環境水體中奈米微粒?</p>	<p>現今台灣環境水體之奈米微粒主要可能來自污染水源中，而其污染廢水中根據統計工業廢水佔一半以上，而台灣工業產業之紡織業及金屬加工業佔大多數，因此本計畫所使用之奈米銀微粒也做為抗菌之奈米纖維材料以及半導體製程加工材料，另外奈米氧化鋅也做為金屬表面塗層以及一些金屬製成材料，因此奈米氧化鋅與奈米銀微粒將做為本計畫之材料使用。</p>
<p>2. 細胞毒性的分析與斑馬魚胚胎急毒性的分析方法應選擇適當與不適用，不需太多項。</p>	<p>細胞毒性之分析包含細胞存活、氧化壓力、細胞凋亡及自噬作用之不同的死亡型態，也因此毒性機轉也不同，又本計畫之細胞毒性分析方法也呼應美國國家癌症研究中心之下的奈米科技鑑定實驗室 (Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL)所發展出一系列的標準測試方法，因此本計畫之細胞毒性測試方法對於了解水體中奈米微粒之毒性影響是必須的。隨著斑馬魚胚胎發育階段的不同，奈米微粒所造成的毒性機制也因此不同，且於胚胎早期階段就衡量奈米微粒之毒性，有助於釐清造成毒性的原因，因此需使用如服務建議書所述之分析方法。。</p>

<p>3. 環境水體(目前台灣)那些是主要與次要奈米微粒，需參考台灣本身情況，做出以後環境水體採樣的依據。</p>	<p>感謝委員之提問，目前無第三方公家單位及官方公布台灣使用之主要與次要奈米微粒，因此在環境水體之主要與次要奈米微粒仍需探討，未來希望可以透過台灣環境水污染之產業來了解奈米微粒在台灣環境水體所造成的影響，並可以依照公家單位如：台灣奈米技術產業發展協會做為奈米微粒之統計，可做為環境水體採樣之依據。</p>
<p><b>巫委員月春</b></p>	<p><b>廠商回覆(成功大學)</b></p>
<p>1. 工作內容中請具體明確以動物細胞株及斑馬魚胚胎為主之 3 種以上奈米物質之生物毒性標準方法(包括 2 種細胞毒性測試方法及 1 種斑馬魚胚胎毒性方法)。</p>	<p>感謝委員的建議與提問。我們將使用 NIH3T3 小鼠纖維母細胞株進行細胞培養毒性測驗，而細胞培養之毒性測驗方法分別為：細胞存活、氧化壓力、細胞凋亡、自噬作用，因此我們涵蓋細胞培養毒性測驗方法 4 種。</p> <p>細胞培養之測驗方法使用之分析測驗：</p> <p>(1) 細胞存活：MTT assay、Live/Dead cell viability assay；(2) 細胞凋亡/細胞壞死：AnnexinV/PI 染色分析法；(3) 氧化壓力：DCFH-DA 分析法；(4) 自噬作用：西方墨點法分析細胞自體吞噬(LC3, p62)蛋白。</p> <p>而斑馬魚胚胎毒性測驗分別為：存活率/半致死濃度、外觀型態畸形、體長量測、氧化壓力、細胞凋亡，其包含 5 種斑馬魚胚胎測驗方法。</p> <p>斑馬魚胚胎之測驗方法使用之分析測驗：</p> <p>(1) 斑馬魚存活率與半致死濃度；(2) 體長量測；(3) 氧化壓力測試：DCFH-DA 染色分析；(4) 細胞凋亡：</p>

	<p>TUNEL assay。</p> <p>每種測驗方式可參考建議書 50 頁之毒性測驗方法。</p>
<p>2. 環境水體真實樣品奈米或化學物質是否對奈米物質造成干擾；外添加奈米物質，添加後是否仍奈米微粒物質一樣？</p>	<p>感謝委員的問題與建議。是的，環境水體會影響或干擾奈米物質，環境水體之水體水質，如：溫度、微生物、pH 值、所含化學物質...等都可能影響奈米物質的物化特性，如：奈米微粒若置於不同的環境水體當中，可能影響奈米微粒的穩定度，另外若水體中所含之化學物質與奈米微粒進行化學反應，進而更變奈米微粒之組成和表面電荷，最後可能影響奈米微粒之穩定性和其展現出之毒性。另外額外添加奈米物質於水體水樣時，奈米微粒也可能會和環境水體有交互作用，使得奈米微粒物化特性改變。</p>
<p>3. 真實樣品之化學成分用 EDX 是否可行？計畫書之採樣方法引用環保署公告方法，這些方法主要針對環境污染管制之物理化學性質，是否適用奈米物質之採樣。</p>	<p>感謝委員的問題與建議。我們從採集水體得到的奈米微粒樣本，會先藉由過濾排除水中浮游生物(藻類)以及大顆粒微粒，然後再以冷凍乾燥法將懸浮奈米微粒變成粉末狀態，再以定量之水進行再懸浮以得到濃縮之奈米微粒樣品，最後轉至鍍碳銅網上進行 TEM 的粒徑分析與 EDX 的元素成分分析(限定於我們欲探討的奈米銀與奈米氧化鋅之組成元素)。依此程序處理而得到的奈米微粒樣品，以 EDX 進行分析，理論上應該能做到檢測所需之靈敏度與專一性。目前並無針對水體奈米材料採集之標準方法，所以我們</p>

	暫時以環保署所公告之方法進行採樣，不過我們認為其採樣程序不至於會影響奈米微粒的物理化學性質。可能發生影響的步驟是在水樣採集後的保存過程，因此在進行冷凍乾燥前，會先避光保存於 4°C 的條件下，以維持奈米微粒的穩定性。
4. 本年為三年計畫之最後一年，建議將過去二年研究成果結論或建議回顧評析。	感謝委員的建議與提問。我們將整理過去二年研究成果結論或建議進行回顧，並將整理於後續報告中。
5. 計畫預計以斑馬魚胚胎進行研究，計畫書文字部分誤植為「斑馬魚」，後續如有報告宜修正。	感謝委員的建議。我們會將建議書中之斑馬魚更正為斑馬魚胚胎。
<b>楊委員喜男</b>	<b>廠商回覆(成功大學)</b>
1. 斑馬魚胚胎毒性試驗之急毒性判定方式是否可採用目前環保署公告中方法之項目，以利本技術建立。	目前環保署公告以魚類做為生物急毒性檢測方法共有三種魚種，分別為羅漢魚、鯉魚及廣鹽性青鱗魚，此三個魚種皆須計算 96 小時之半致死濃度 (lethal concentration 50%, LC <sub>50</sub> ) 以表示生物急毒性，其中羅漢魚及鯉魚是參照 OECD, Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.1992.，而廣鹽性青鱗魚之急毒性測試方法是參考 U.S. EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, 2002.，且此三類魚種之急毒性暴露方法為靜水式。而本計畫採用斑馬魚胚胎做為急毒性檢測

	<p>之物種，其檢測方法是參照 OECD. TG 236: Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 2013，其急毒性亦是需要計算 96 小時之 LC<sub>50</sub>，但其判定魚體死亡的標準與前述三種魚種不同，且暴露方式也不同，本計畫中為採用半靜水式之暴露方式。在環保署公告以魚類做為生物急毒性檢測方法皆是以幼魚做為檢測，但在本計畫是以胚胎，因此物種與發育階段的不同，其對於毒性的敏感度也不同，此外在本計畫中亦另外探討奈米微粒對於斑馬魚胚胎的畸形與毒性機轉，因此目前環保署公告中方法之項目無法完全被採用於本計畫中。</p>
<p>2. 本年度技術轉移預定執行方式，建議再說明。</p>	<p>我們將於計畫執行中陸續將建立之技術進行轉移，未來將會通知貴所技術轉移之時程。而技術轉移之方式為：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 統整國際文獻後將實驗方法根據步驟逐一寫成標準方法，完成後將提供於貴所。</li> <li>2. 貴所除可至成大進行技術轉外，我們亦可視需要至環檢所協助技術建立及轉移。</li> <li>3. 提供詢問管道可相互商討是否修改試驗方法。</li> </ol>
<p>3. 環境水體樣品選定二仁溪、成功湖及曾文水庫之原因為何，是否分析其中奈米含量？</p>	<p>選取二仁溪、成功湖及曾文水庫分別代表不同含意。二仁溪的選取是根據環保署資料判定為汙染最嚴重的河川，成功湖為地下水源當做取樣標準，曾文水庫則為乾淨的水庫樣本，其分</p>

	別代表地下水樣、水庫水樣、工業排放汙水水樣，採樣後我們將利用 TEM 分別測試其奈米物質之分布和含量，以探討環境水體之奈米物質。
<b>許委員明倫</b>	<b>廠商回覆(成功大學)</b>
1. 技轉程序及期程規劃如何?	我們將於計畫執行中陸續將已建立完成之技術進行轉移，未來將會通知貴所技術轉移之時程。
2. 環境水體奈米物質之細胞毒性研究與人體健康危害及環境安全性之關聯，本計畫是否有預期發現?	感謝委員的提問。除了傳統的哺乳類動物試驗之外，體外的細胞毒性測試在奈米物質的毒性危害評估方面已愈來愈受到重視，主要的原因為細胞毒性研究可以提供大量且快速的生物效應指標來進行奈米物質的危害效應評估，藉由毒性效應資料的累積與整理，可以瞭解且分類哪些種類的奈米物質具有較高的毒性效應，以長遠的角度來看，除了可以降低實驗成本、減少實驗動物的使用數量，亦可提供人體健康危害進一步的參考資訊。而針對本服務計畫所進行的環境水體奈米物質之細胞毒性研究，我們期望可以嘗試在不同的水體樣品中偵測到奈米物質，而奈米物質在不同水體中的特性改變是否會影響毒性的反應，則可以細胞的研究來進行測試，然而目前無法預期環境水體中奈米物質的濃度，因此無法確定其毒性效應。

<p>3. 奈米材料與自由基影響人體健康之機轉偵測方法（細胞毒性測驗方法）與腫瘤細胞關聯之專一性如何？</p>	<p>一般而言，針對細胞生物學與生物效應指標的實驗分析方法，不論在正常細胞或者是腫瘤細胞皆適用。本服務計畫主要是依據 ISO/TR16197 的測試技術報告來進行奈米材料的細胞生物效應指標測試，過去也有研究利用 A549 細胞（肺腺癌細胞株）模擬肺部細胞暴露奈米材料進行毒性的測試，其結果也顯示出許多生物效應指標的變化，不過腫瘤細胞的毒性研究，可能會出現耐受性差異的問題。</p>
<p>4. 標準方法約莫何時可產出？研發成果移轉至環檢所約需多少時間可完成？</p>	<p>感謝委員的提問。我們將於初期報告中提出標準方法，並於期中報告時提出測試結果，我們將於計畫執行中時隨著執行結果進行技術轉移，若我們已完成建立標準方法，將儘快通知貴所進行轉移。</p>
<p>5. 產業界及國內外專家對於檢測方法草案之意見？</p>	<p>感謝委員的提問。目前計畫仍於執行開發階段，因此尚且無法達到參考產業界及國內外專家之建議。</p>
<p>6. 環境水體檢體之選取產業別？對照組？</p>	<p>感謝委員之提問，本計畫選取之環境水體為二仁溪，其可能排放畜牧廢水與金屬加工業及紡織業所排放之工業廢水，另外我們以水庫做為對照組別，其是天然環境之潔淨水體，故做為對照組別。</p>

行政院環境保護署環境檢驗所「環境奈米評析與綠色化學  
檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究」  
專案研究計畫第1次工作進度報告會議紀錄

一、時間：106年5月5日上午10時30分

二、地點：本所4樓M411會議室

三、主席：楊組長喜男

記錄：許令宜

四、出(列)席單位及人員：

黃壬瑰、黃克莉、林哲雄

成功大學

王應然、陳姿羽、李宥萱

五、主席致詞：(略)

六、計畫工作進度簡報：(略)

七、結論：

1、本計畫各試驗法草案，請依本所公告格式撰寫方法草案，並依此進行測試。

2、依本計畫評選會委員意見，請於期中報告時提供前二年計畫研究成果結論或建議回顧評析。

3、第1次工作進度報告審查通過，同意辦理撥付第1期款手續。

九、散會：上午11時15分。

## 行政院環境保護署環境檢驗所會議紀錄

「環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究」專案研究計畫期中報告審查會議紀錄

一、時間：106年8月7日(星期一) 下午2時00分

二、地點：本所 M411 會議室

三、主席：翁委員英明

記錄：許令宜

四、出(列)席單位及人員：

審查委員	環境檢驗所	翁英明
	中原大學	陳中庸
	中臺科技大學	林一郎
	海洋大學	劉秀美
	環境檢驗所	楊喜男

第五組 林哲雄 許令宜

成功大學 王教授應然 陳姿羽 李宥萱 楊翊羣

五、主席致詞：(略)

六、委員審查意見：(依發言順序)

(一) 陳委員中庸

1. 細胞株的名稱請統一。
2. 流式細胞儀的結果請標示 even 數及量化結果。
3. MTT、MTS 等均只有 24hrs、48hrs，請增加時間點。
4. 請考慮增加不同細胞株來檢測。
5. 表 4.9、圖 4.11、4.12、4.13 及 4.14 缺乏說明。請補充。
6. 水樣檢體請補足 TEM、EDS 的分析。
7. 請比較細胞株與斑馬魚模式的檢測極限、精準度等。
8. 細胞株所用的奈米材料濃度請與斑馬魚一致。

## (二) 林委員一郎

1. MTT/MTS assay 時間點可增加。
2. 流式細胞儀結果可用數據顯示，重覆性的準確度增加以利以後標準程建立的再現性。
3. 斑馬魚的 TUNEL assay/圖看不出差異。
4. 斑馬魚胚胎 Axial curvature 畸型比較靈敏，但較高濃度時的 variation 太大(10ug/ml)。

## (三) 劉委員秀美

工作內容非常豐富，考慮也很周到，不過有些建議。

1. 以 cell line 進行各種毒性測試(MTT/MTS assay, 細胞存活率, Live/Dead cell viability assay, ROS 測試, 自體吞噬...) 未提及用何種毒性物質(nanoparticle)作為 positive control? 何種物質為 negative control? 斑馬魚胚胎毒性試驗也未提及用何種毒性物質作為 positive control, 將來若要做成標準方法, 須加添這些 control。
2. 測試 cell line 或是斑馬魚胚胎實驗時, 若能追蹤在測試時間內在 culture medium 內之  $Zn^{+2}$  離子、 $Ag^{+1}$  離子之濃度變化, 也許可以更能掌控造成毒性的成因或因子。
3. p.193 環境水體之水質分析結果顯示二仁溪的導電度, GH(ppm)、KH(ppm)都超過一般養魚的條件, 所以考慮自然水體的奈米毒性時, 須考慮水質。
4. 報告大綱中, 許多種名詞的英文如自噬作用(寫成 Acridine orange), p.3 掠食者(寫成 fisheries)須修正。

## (四) 楊委員喜男

1. 目前收集文獻以國外文獻為主, 建議也收集國內研究, 以供國內標準方法建立之參考。
2. 環境水體樣品測試之毒性, 如何證明與奈米物質之相關性。
3. 環保署已公告斑馬魚胚胎毒性測試標準方法, 建議計畫依此方法中毒性判定及  $LC_{50}$  等執行。

4. 文中撰寫格式及字體，請統一以利閱讀。
5. 建議計畫期末報告可提供毒性測試平台之 SOPs，以供未來毒性危害評估之參考。
6. 二仁溪採樣位置為何?建議可參考國內過去該測點研究資料加以評析。

(五) 翁委員英明：

1. 由環境水樣之添加奈米材料模擬測試，在本計畫執行之最適化程序為何?依據 OECD Guidance No.23 標準流程，相關之品管指標如何規範或建議。
  2. 暴露模式在 0.1um 以下之水樣是以暴露體積 30%來描述，如對細胞或胚胎之毒性測試時，其致死濃度或有效濃度如何計算。
- 七、結論：請執行單位參採本次會議意見做為後續執行計畫之參考，本次期中報告會議結論為審查通過，依契約規定辦理計畫經費撥付事宜。
- 八、散會：下午 3 時 15 分。

陳委員中庸意見	廠商回覆(成功大學)
1. 細胞株的名稱請統一。	感謝委員的問題與建議。於計畫中我們使用 NIH-3T3 細胞株進行實驗，我們已更正並統一細胞株的名稱為 NIH-3T3。
2. 流式細胞儀的結果請標示 even 數及量化結果。	感謝委員的問題與建議。我們將於第四章奈米微粒生物毒性檢測標準方法草案及於圖例中標示 even 數。 而關於量化結果的部分，如圖 4.39(C)、圖 4.40(C)...等，是將數據量化後製作之量化結果。
3. MTT、MTS 等均只有 24hrs、48hrs，請增加時間點。	感謝委員的提問。由於 MTT 與 MTS 的測試是針對存活率的部分進行分析，一般而言這類型的測試結果在國際間所提出的標準準則其實就是針對 24 小時的暴露結果進行記錄，本計畫在執行的過程中，為了要確認細胞毒性的反應，因此也已特意拉長到 48 小時再進行最終細胞毒性的確認。
4. 請考慮增加不同細胞株來檢測。	感謝委員的建議。進行奈米毒性測試可以根據不同的暴露途徑或者可能累積的標定器官細胞來選擇不同的細胞株，然而如果研究的目的是為了建立一種通用或者一般的奈米毒性測試方法，那麼初步選擇具有統一代表性的細胞來進行測試可能較為合適。因此本計畫先就能夠分化成各式各樣不同細胞型態的胚胎纖維母細胞作為標準的測試細胞，未來若有特殊的奈米材料暴露且可能對於特定器官系統造成傷害時，可再就個別案例進行不同細

	胞的測試與調整。
5. 表 4.9、圖 4.11、4.12、4.13 及 4.14 缺乏說明。請補充。	<p>感謝委員的問題與建議。我們補充表 4.9、圖 4.11、4.12、4.13 及 4.14 的說明。</p> <p>如：圖 4.41 斑馬魚胚胎暴露商品化奈米銀微粒膠體溶液之存活率。(A)斑馬魚胚胎暴露 AgNPs-1 之存活率；(B)斑馬魚胚胎暴露 AgNPs-2 之存活率。斑馬魚胚胎於兩種商品化奈米微粒中，皆隨著濃度增加而死亡率隨之提高。每組測試濃度各有 30 個胚胎，分別在不同發育時期 (0, 24, 48, 72, 96, 120 hpf) 進行胚胎存活率的觀察。</p>
6. 水樣檢體請補足 TEM、EDX 的分析。	感謝委員的問題與建議。我們將於期末報告中補足兩個季節之環境水樣 TEM、EDX 分析結果。
7. 請比較細胞株與斑馬魚模式的檢測極限、精準度等。	<p>感謝委員的提問，以本計畫中暴露奈米氧化鋅在細胞與斑馬魚胚胎模式為例，斑馬魚胚胎在暴露 5<math>\mu</math>g/ml 有顯著效應而細胞株則無，因此兩者顯著的毒性效應濃度也不同，同種暴露化學物質對於不同暴露生物模式其檢測極限也會不同。此外在兩者模式之精準度比較，細胞模式較斑馬魚模式精準度較高，由於細胞在寄代培養與分裂其不同個體表現差異性較低，以及斑馬魚胚胎在不同個體其差異性較高，因此在進行重複試驗時斑馬魚胚胎的實驗數據精準度仍較細胞低，然而斑馬魚模式相較於其他體內生物模式，其個體差異性仍較其他生物體來的低，因此精準度相對也較其他生物模式高。</p>

8. 細胞株所用的奈米材料濃度請與斑馬魚一致。	感謝委員提問及建議。細胞株與斑馬魚胚胎模式其於毒性測驗上分別具有不同的意義及層級，細胞株模式可快速探討細胞毒性機轉，而斑馬魚胚胎模式可探討具生物複雜性之毒性問題，因此這兩個模式所代表及引發之毒性濃度未必是介於同樣的濃度範圍，因此考量後仍認為使用引發特定毒性之濃度是較佳的方式。
<b>林委員一郎意見</b>	<b>廠商回覆(成功大學)</b>
1. MTT/MTS assay 時間點可增加。	感謝委員提問。目前針對細胞存活率所進行測試的時間點包含 24 與 48 小時，依照多數的國際標準測試準則，24 小時是較常見且必須進行觀察與分析的時間點，未來如果測試反應上有其他的時間點需求，我們再進行調整。
2. 流式細胞儀結果可用數據顯示，重覆性的準確度增加以利以後標準程建立的再現性。	感謝委員給的建議。流式細胞儀的結果在報告中除了以示意圖表示之外也以長條圖進行數值的量化。此外在 Live/Dead assay 的部分則是以數值標示於圖型的四個象限內，各實驗皆進行 3 重複以確認準確度。流式細胞儀的分析技術目前在許多的生物性分析上已具備相當多的實驗數據可以進行參考且儀器的普及率在台灣各實驗研究中心也是相當常見，因此如何讓流式細胞儀所分析的結果具有穩定性和準確度，操作人員的手法以及控制組的數值、時間點和暴露濃度的選擇都相當重要，若日後要將此技術列為標準方法，那麼我們除了實驗室內部會進行數據的驗證之外，亦會同時邀請其他實驗室的人員來進行結果的比

	對，藉此判定結果的誤差幅度範圍以及再現性。
3. 斑馬魚的 TUNEL assay 圖看不出差異。	感謝委員建議及提問。於原始圖檔中，可觀察到奈米銀及奈米氧化鋅會導致斑馬魚胚胎細胞凋亡，但可能因期中報告以黑白印刷，使得結果較不易觀察，所以於期末報告中，結果的部分會以彩色印刷改善這樣的問題。
4. 斑馬魚胚胎 Axial curvature 畸型比較靈敏，但較高濃度時的 variation 太大(10 µg/ml)。	感謝委員建議及提問。高濃度的組別之 variation 過大是因為計算畸型率時，是以發生畸型的隻數除以存活的隻數再乘以百分比，而高濃度的組別於實驗終點 72 hpf 時，其存活隻數不多，因此會導致 variation 較大的問題。
<b>劉委員秀美意見</b>	<b>廠商回覆(成功大學)</b>
<p>工作內容非常豐富，考慮也很周到，不過有些建議。</p> <p>1. 以 cell line 進行各種毒性測試 (MTT/MTS assay，細胞存活率，Live/Dead cell viability assay，ROS 測試，自體吞噬...)未提及用何種毒性物質(nanoparticle)作為 positive control? 何種物質為 negative control? 斑馬魚胚胎毒性試驗也未提及用何種毒性物質作為 positive control，將來若要做成標準方法，須加添這些 control。</p>	<p>謝謝委員的建議，關於細胞實驗部分，我們會將各種毒性測試方法加入相對應之 positive control 來做為實驗技術上的確認，針對細胞模式之 ROS 毒性檢測方法，已有相關文獻證實 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能夠誘發 ROS 產生，故以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作為 positive control，而 autophagy 是以文獻中常使用的 rapamycin 作為 positive control，另外細胞凋亡則是使用 staurosporine。另外在 negative control 的部分，在進行奈米物質暴露時，我們也會同時進行控制組的培養液更換，因此可以確認在相同的處理條件下，控制組的變化情形，一般而言實驗中的控制組就是 negative control。</p> <p>而關於斑馬魚胚胎的部分，針對斑馬魚胚胎 ROS 毒性檢測方法中，亦是以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作為 positive control；而 negative</p>

	<p>control 的部分則亦是以控制組作為 negative control，另外針對斑馬魚胚胎細胞凋亡部分，則使用 TUNEL assay kit 中所建議之 DNase I 作為 positive control，而 negative control 的部分則亦是以控制組作為 negative control。</p>
<p>2. 測試 cell line 或是斑馬魚胚胎實驗時，若能追蹤在測試時間內在 culture medium 內之 <math>Zn^{2+}</math> 離子、<math>Ag^+</math> 離子之濃度變化，也許可以更能掌控造成毒性的成因或因子。</p>	<p>感謝委員提供之意見，於我們先前研究中，曾經有探討過不同修飾的奈米銀微粒暴露在 culture medium 所釋放之銀離子含量，銀離子隨時間增加釋放出的銀離子會隨之而增加，但不同修飾會造成釋放量不同，另外相關文獻指出在斑馬魚胚胎的培養液(E3 medium)的環境中，奈米氧化鋅微粒會隨著時間增加其釋放出的鋅離子也會增加，而針對鋅離子先前已有文獻證實，鋅離子導致死亡的濃度遠低於奈米氧化鋅，因此鋅離子的釋放並非導致斑馬魚胚胎的主要死亡因素。</p>
<p>3. p.193 環境水體之水質分析結果顯示二仁溪的導電度，GH(PPM)、KH(PPM)都超過一般養魚的條件，所以考慮自然水體的奈米毒性時，須考慮水質。</p>	<p>導電度是測量水中所有溶解的離子及鹽類，當導電度過高或過低時，會導致胚胎滲透壓改變，進而使得卵的膨脹或皺縮，並降低卵的孵化，而我們於斑馬魚胚胎實驗中，並沒有觀察到明顯皺縮的現象，也並沒有明顯增加致死率。</p> <p>另一項水質的重要參考指標為硬度，硬度定義為二價鈣離子和鎂離子在水中的總濃度，而硬度又可分為永久硬度及暫時硬度，GH 值為反應永久硬度的數值，意指水中的鈣、鎂、硝酸鹽等等的含量；而 KH 值是暫時硬度，KH 主要以重碳酸根離子(<math>HCO_3^-</math>)及碳酸根</p>

	<p>離子(<math>\text{CO}_3^{2-}</math>)為主要參考標準; <math>\text{CO}_2</math> 在水中會以三個形式存在分別是 <math>\text{H}_2\text{CO}_3</math>(游離碳酸), <math>\text{HCO}_3^-</math>, <math>\text{CO}_3^{2-}</math>, 而 <math>\text{H}_2\text{CO}_3</math> 又可以解離成 <math>2\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}</math> 使水質變成酸性, 下列為兩項反應式,</p> $\text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + 2\text{HCO}_3^-;$ $\text{HCO}_3^- + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ <p>若 KH 過低(<math>\text{HCO}_3^-</math> 及 <math>\text{CO}_3^{2-}</math>), 就無法讓上述兩個方程式達到可逆反應平衡, 因此 pH 值就會容易在短時間內劇烈變化。</p> <p>於 OECD NO.236 的規範中, 僅建議碳酸鈣濃度為 30~300 mg/L, 這僅屬於 GH 其中一個項目, 不過因我們測得二仁溪 GH 為 322 mg/L, 因此我們認為是勉強可接受的。除此之外對於魚類來說鈣、鎂為重要生長元素, 因此魚體內具有維持其濃度平衡的機轉, 所以 GH 稍微偏高並不會對魚類有太大影響, 而關於 KH 為重碳酸鹽濃度指標, 如上方所述, KH 可幫助穩定水中 pH 值, 所以我們認為二仁溪高 KH 的情況不會導致改變 PH 值。因此綜合以上所述, 我們對硬度和導電度將不進行調整。</p>
<p>4. 報告大綱中, 許多種名詞的英文如自噬作用(寫成 Acridine orange), p.3 掠食者(寫成 fisheries)須修正。</p>	<p>感謝委員提供之意見。我們會更正其中英文寫法, 如報告大綱中已更改為: 針對細胞培養模式的部分, 將檢測存活率 (Survival rate)、自噬作用 (Autophagy)、氧化壓力 (Oxidative stress) 與細胞凋亡 (Apoptosis) 之細胞毒性機轉</p>
<p>楊委員喜男意見</p>	<p>廠商回覆(成功大學)</p>

<p>1. 目前收集文獻以國外文獻為主，建議也收集國內研究，以供國內標準方法建立之參考。</p>	<p>感謝委員提供之意見。我們會收集國內研究相關文獻，以供國內標準方法建立之參考。</p> <p>如：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 奈米微粒對細胞毒性及生物標記之篩選技術建立 - EPA-101-1605-02-01</li> <li>2. 高科技產業放流水中生物毒性成因之探討(1/4)- EPA-102-E3S5-02-01</li> </ol>
<p>2. 環境水體樣品測試之毒性，如何證明與奈米物質之相關性。</p>	<p>感謝委員的意見，環境水體樣品測試之毒性會先利用過濾的方式依照不同孔徑依序進行過濾(分別過濾 0.45、0.22、0.1 μm)，並會將濾紙上之物質暴露在細胞株模式，而過濾後之濾液暴露在斑馬魚胚胎模式中，進而探討環境水體樣品之毒性影響，針對細胞模式，因直接使用濾膜上的微粒進行實驗，所以可排除水中其他化學物質的干擾，因此可較直接建立奈米物質與細胞之毒性關聯，而斑馬魚模式因直接使用環境水體，所以並沒有辦法排除水體中之有機化學物質或其他無機化學物質的毒性干擾，因此斑馬魚胚胎測試方法並無法直接印證奈米物質之毒性相關性。</p>
<p>3. 環保署已公告斑馬魚胚胎毒性測試標準方法，建議計畫依此方法中毒性判定及 LC<sub>50</sub> 等執行。</p>	<p>感謝委員的意見及建議。我們將嘗試遵循「環保署公告之生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法」進行檢測。</p> <p>然而因我們所檢測的為奈米微粒之生物毒性或因人力問題須調整部分操作方法。</p> <p>以下為文中提及與目前使用方法之差異及可能需調整操作方法：</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 「將水樣或環境用藥以稀釋水至少稀釋為 5 個濃度」，因我們每個水樣會個別過濾 1、0.45、0.22、0.1 <math>\mu\text{m}</math>，再各自稀釋 5 濃度其操作時間將超過兩個小時，不利於實驗條件的品質掌控。另外因我們所探討的是奈米微粒，但可能因環境水樣本身所含奈米微粒就不多，因此再稀釋五個濃度可能意義不大。</li> <li>◆ 於確定試驗中，需含空白試驗、正控制試驗、內對照試驗，我們將嘗試加入確定實驗進行毒性檢測。</li> <li>◆ 「試驗前須先測量水樣之溫度、pH 與溶氧。若回溫後溶氧低於 3.0 mg/L，應對水樣溫和曝氣，使溶氧升至 3.0 mg/L 以上。」我們將再測試每個水樣之溶氧量，以確定適於胚胎之生存。</li> </ul>
4. 文中撰寫格式及字體，請統一以利閱讀。	感謝委員的意見，我們會統一撰寫格式以方便閱讀。
5. 建議計畫期末報告可提供毒性測試平台之 SOPs，以供未來毒性危害評估之參考。	感謝委員的意見，於本計畫中，可將斑馬魚胚胎模式利用觀察存活率的方式，並計算其半致死濃度(LC <sub>50</sub> )，並將其數值與行政院農委會所提供之魚類水生動物急毒性分類作為毒性危害評估的參考，可能可作為毒性測試平台之 SOPs 及毒性危害之參考。
6. 二仁溪採樣位置為何?建議可參考國內過去該測點研究資料加以評析。	感謝委員的意見及建議，二仁溪之採樣位置為崇德橋監測站之位點。我們會參考國內研究資料並評估二仁溪之

	可能毒性機轉。
翁委員英明意見	廠商回覆(成功大學)
<p>1. 由環境水樣之添加奈米材料模擬測試，在本計畫執行之最適化程序為何?依據 OECD Guidance No.236 標準流程，相關之品管指標如何規範或建議。</p>	<p>感謝委員的提問。於本計畫中我們是參考 OECD Guidance No.236 規範進行毒性測驗，此指南為斑馬魚毒性試驗的流程，這樣的流程及程序並不只侷限於一般化學物質也適用於奈米微粒的毒性測驗。目前國際上尚未有對於環境水樣添加奈米微粒之標準程序及作法，因此我們參考國際文獻作法，嘗試將原水樣添加自製奈米銀及奈米氧化鋅進行毒性試驗，目前我們進行的方式是先以 0.45 μm 的濾紙過濾水樣後，再加入奈米微粒混和三十分鐘以模擬自然水體波動，混和後就進行暴露。</p> <p>在 OECD Guidance No.236 規範建議，關於斑馬魚之品管可定期(一年兩次)使用 3,4-二氯苯胺來檢測毒性測驗的品質，以驗證技術完整性。</p>
<p>2. 暴露模式在 0.1um 以下之水樣是以暴露體積 30%來描述，如對細胞或胚胎之毒性測試時，其致死濃度或有效濃度如何計算。</p>	<p>對於暴露 0.1um 以下之水樣的細胞實驗設計，目前僅用於初步了解在含有多少百分比的水樣體積情況下，會對於細胞產生死亡的毒性，由於細胞的生長環境需要含有一定的營養成分(例如胺基酸、葡萄糖、血清等)，因此當置換成含有 30%的水體樣品時，其實對於細胞的生長也造成了一定程度的影響，此外要如何將水樣內物質暴露的百分比濃度換算出實際的濃度目前仍究是相當大的挑戰，其因來自於水體環境中的物質複雜性太高，無法用相對簡單的方式去加以釐清有哪些物</p>

	<p>質的存在及其濃度，因此可能無法在計畫執行的剩下幾個月中去完成相關的問題。接下來的實驗還是會以嘗試收集濾膜上的粒子進行暴露為主。</p>
--	--

## 行政院環境保護署環境檢驗所會議紀錄

「環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究」專案研究計畫期末報告審查會議紀錄

一、時間：106年12月6日(星期三) 上午9時30分

二、地點：本所M411會議室

三、主席：巫委員月春

記錄：許令宜

四、出(列)席單位及人員：

審查委員	環境檢驗所	巫月春
	海洋大學	劉秀美
	中原大學	陳中庸
	中臺科技大學	林一郎
	環境檢驗所	楊喜男
第五組	黃壬瑰 林哲雄	許令宜
成功大學	王教授應然	陳姿羽

五、主席致詞：(略)

六、委員審查意見：(依發言順序)

(一) 劉委員秀美

1. p.85 生物毒性檢測方法-小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)細胞培養(cell culture)，內容只是纖維母細胞的培養方法，與名稱不符。另外內文中有“範圍尋找試驗”與“確定試驗”，不適當，此方法敘述須修正。
2. 為了避免大顆粒污染物污染細胞培養基或干擾水樣分析，計畫主持人會進行過濾和離心方法先去除沈澱較大粒。因離心重力與時間會影響去除物的大小，所以這方面的資訊要詳實寫下。
3. p.90 生物毒性檢測方法細胞存活率分析 MTT 分析及 MTS assay 皆未說明如何判定細胞的“死”“活”，對“範圍尋找試驗”

與”確定試驗”對如何選擇奈米粒濃度，未做說明。這些方法適用於所有污染物應未針對奈米材料。

4. 台灣河川水，部分在感潮地段，河水會滲雜一些海水，導電度、鹽度較高，這些因子也許也會影響奈米粒的物化特性，因此自然水體的水質，須添附這些 data。
5. 未說明經過濾膜過濾後如何配製不同濃度之奈米粒。
6. 奈米粒子是否會吸附到自然水體的大顆粒污染物，因此也有可能經過食物鏈進入生態系。
7. 毒性測試的材料是奈米材料時，須對”奈米材料”為污染物時，應”注意”的 handle 方法，做一些說明。

#### (二) 陳委員中庸

1. 表 4.4~4.7 無標題欄位，請修正。
2. p.85, p.94 CRL1658™ 細胞株名稱請更正。
3. 二仁溪是污染嚴重的河川，而以斑馬魚胚胎並不會引起畸形，ROS 等也無異樣，故這套系統如何應用需評估。
4. p.91 副標題有格式問題，多了背景。
5. p.129 圖 4-2, 4-3 請加 A、B 等標題。
6. 表 4.9 似來自引用文獻，但無 reference。
7. 圖 4.26 少了 Calcein AM 等字樣。
8. 表 4.10 與 4.12 Ag 的 LC<sub>50</sub> 相差許多，為何?表 4.12 的 Data 請用 mean± SD。
9. 圖 4.12 請加 scale bar。
10. p.184~p.186 圖 4.44~4.40，圖的標題序號錯置。
11. 圖 4.50~4.51 動態光散射儀之結果”N.D.”，請註解是 not detected 或 not determined。

#### (三) 林委員一郎

1. 此次研究計畫案不管在細胞與斑馬魚胚胎模式都已建立檢測模式，但未能有效監測目前樣品水體的水質好壞。建議應以

AOD 值(濃縮倍數)評估目前水樣，亦可當成早期生態警報的監控。

2. 以透析取代過濾，留下奈米粒子與大粒子，再以細胞和斑馬魚胚胎毒性測試，是否可看出(偵測出)水樣毒性。
3. 結案報告的第 171 頁之圖 4.35 需修正，圖形與文字敘述有重疊。
4. 結案報告的第 217 頁之圖 4.80-1 成功湖和二仁溪濾液都有些微綠色螢光，顯示仍有反應，但 Detector 可能仍無法判讀。

#### (四) 楊委員喜男

1. 因本計畫為第 3 年研究計畫，委託單位已將前二年成果列入前言中，建議期末報告增加三年成果總結論。
2. 螢光強度定量以軟體定量，是否有確認螢光量測之方法？
3. 斑馬魚 72hpf 量測體長之意義或是否有國外文獻可參考？除人工以顯微鏡量測體長外，是或有軟體可協助量測？
4. 簡報內容及說明中有部份成果未列入期末報中，建議也納入報告中。

#### (五) 巫委員月春

1. 檢測方法草案中對於環境樣品奈米物質之細胞毒性檢測時水體樣品是否應有粒徑分離步驟以得到奈米物質才進行後續毒性試驗。
2. 研究中水體過濾得到 450 nm、220 nm、100 nm 三種奈米粒徑，進行後續毒性測試，選擇這三種奈米粒徑之根據或原因為何？這三種粒徑是否具有環境奈米物質之代表性？
3. 「結論」第五項與「建議意見」2 之文字似乎相左，請確認。
4. 斑馬魚胚胎暴露湖水添加奈米銀之存活率試驗中奈米銀添加於水樣時，過濾前與過濾後奈米銀添加濃度及其回收率如何？建議補充於期末報告。
5. 建議過濾濾膜使用鐵氟龍濾膜，建議本計畫研究使用其他濾膜導致細胞毒性之結果列入報告中。

#### 七、結論：

- (一) 本次期末報告會議結論為修正後通過，由環檢所內審修正稿後，再依契約規定辦理計畫結案事宜。
- (二) 未來訂定水體奈米毒性測試之標準方法，須先整合「不對稱流場場流 (AF4)」之前處理步驟，分離出不同粒徑奈米物質後，再分別進行毒性測試評估。

八、散會：上午 11 時 05 分。

劉委員秀美意見	廠商回覆(成功大學)
<p>1. p.85 生物毒性檢測方法-小鼠纖維母細胞(NIH-3T3)細胞培養(cell culture)，內容只是纖維母細胞的培養方法，與名稱不符。另外內文中有”範圍尋找試驗”與”確定試驗”，不適當，此方法敘述須修正。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，因不同的細胞培養方法或條件可能使得最終結果有所差異，因此於細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式皆於草案前放入培養細胞及操作斑馬魚的基本條件及方法，因此仍認為有其必要性應置於方法草案當中。</p> <p>範圍尋找試驗與確定試驗已修正。</p>
<p>2. 為了避免大顆粒污染物污染細胞培養基或干擾水樣分析，計畫執行時會進行過濾和離心方法先去除沈澱較大粒。因離心重力與時間會影響去除物的大小，所以這方面的資訊要詳實寫下。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，經反覆的確認及修正，目前環境水體之奈米微粒收集目前已修正為僅已濾膜過濾進行收集，不再使用離心的方式進行。</p> <p>目前已修正並去除奈米微粒之離心方法。</p>
<p>3. p.90 生物毒性檢測方法細胞存活率分析、MTT 分析;MTS assay 皆未說明如何判定細胞的”死””活”，對”範圍尋找試驗”與”確定試驗”對如何選擇奈米粒濃度，未做說明。這些方法適用於所有污染物應未針對奈米材料。</p>	<p>MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，經還原酶琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 的作用下，tetrazolium 環會裂開，產生 Formazan 紫色沉澱，利用 DMSO 將 Formazan 溶解後，因為 Formazan 在 570 nm 會有吸光值，可藉由 ELISA reader 測定 570 nm 的吸光值，便可得知活細胞的比例。</p>

	<p>MTS 是 MTT 的類似物，由於常規的 MTT 法最終產生的 MTT-formazan 不溶於培養基，故在檢測之前必須除去上清液，然後加入有機溶劑酸化異丙醇或 DMSO 等溶解 MTT-formazan 顆粒，這樣給操作帶來的不便，使實驗的重複性較差。活細胞粒線體中的呼吸鏈將 MTS 還原成水溶性的紅紫色產物，不須再利用 DMSO 溶解即可測定吸光值。</p> <p>結果處理及呈現是以實驗組的 O.D. 值除以對照組 O.D. 值所得百分比 (以對照組知吸光值作為存活率 100%)，以代表細胞在經過暴露後存活之比率。最後以圖呈現在不同濃度或時間暴露下細胞存活之比率。</p> <p>目前對於奈米微粒之測驗方法國際上認為並不需要使用一個嶄新的方法進行測定，僅需要針對所使用之奈米微粒進行調整即可。</p>
<p>4. 台灣河川水，部分在感潮地段，河水會滲雜一些海水，導電度、鹽度較高，這些因子也許也會影響奈米粒的物化特性，因此自然水體的水質，須添付這些 data。</p>	<p>感謝委員的意見與建議，本計畫有測定環境水體之導電度，並於期末報告之 177 頁中呈現，另外因測驗地點考量到斑馬魚胚胎之生存條件，故於本計畫中並未選擇感潮地段進行試驗，因此並未測定鹽度，不過鹽度及海水中之物質的確可能改變奈米微粒之性質，因此建議往後與奈米微粒相關計畫應進行測量。</p>

<p>5. 未說明經過濾膜過濾後如何配製不同濃度之奈米粒。</p>	<p>感謝委員的提問，針對細胞培養模式，濾膜上的奈米微粒經過震盪後收集於細胞培養液當中，而本實驗以此做為測試細胞毒性的暴露溶液。不同濃度是基於添加的暴露溶液體積為依據，例如細胞在 96 孔盤中所需培養液總體積為 150 微毫升/孔盤，那麼 10%的組別則是以 15 微毫升(暴露溶液)+135 微毫升(細胞培養液)來進行 24 小時的暴露實驗。</p> <p>而針對斑馬魚胚胎模式是將過濾後之濾液直接進行暴露斑馬魚胚胎，故並沒有進行配置不同濃度。此部分說明我們加入於內文 46 頁中，提供清楚的解釋。</p>
<p>6. 奈米粒子是否會吸附到自然水體的大顆粒污染物，因此也有可能經過食物鏈進入生態系。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，奈米微粒因具有獨特的物化特性，使得奈米微粒較易與週遭環境相互作用，進而吸附至某些大顆粒之分子，因此的確可能經由食物鏈進入生態系當中。</p>
<p>7. 毒性測試的材料是奈米材料時須對”奈米材料”為污染物時，應”注意”的 handle 方法，做一些說明。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，由於撰寫草案時，是以適於大部分之奈米微粒的方法進行撰寫，但由於每種奈米微粒其展現出之物化特性皆有所差異，所以應當考量所使用的奈米微粒特性再進行調整，而針對本計畫所選用之奈米銀及奈米氧化鋅操作方法將補充於草案之中。</p>

陳委員中庸意見	廠商回覆(成功大學)
1. 表 4.4~4.7 無標題欄位，請修正。	感謝委員的提問與建議，我們已增加標題欄位。
2. p.85, p.94 CRL1658 <sup>TM</sup> 細胞株名稱請更正。	感謝委員的提問與建議，我們已經更正細胞株名稱。
3. 二仁溪是污染嚴重的河川，而以斑馬魚胚胎並不會引起畸形，ROS 等也無異樣，故這套系統如何應用需評估。	<p>感謝委員的提問與建議，的確於環境水樣不會引發明顯的毒性效應，但於額外添加之奈米銀微粒及二次水添加奈米微粒的樣品中，使用之系統可反應奈米微粒之毒性效應，另外雖環境水樣不會引發明顯畸形，但我們仍然發現與控制相比有少量的畸形現象發生，因此我們認為系統仍可反應出奈米微粒之毒性效應。</p> <p>這或許有可能因我們所收集到之環境水體奈米微粒其含量不足或濃度不足以引發明顯的毒性效應，因此建議未來相關之計畫可使用透析或冷凍濃縮技術濃縮水樣以達到引發毒性效應之濃度。</p>
4. p.91 副標題有格式問題，多了背景。	感謝委員的提問與建議，我們已完成修改。
5. p.129 圖 4-2, 4-3 請加 A、B 等標題。	感謝委員的提問與建議，我們已經加上了 A、B 標題。

6. 表 4.9 似來自引用文獻，但無 reference。	感謝委員的提問與建議，我們已經查詢並標上引用文獻資料。
7. 圖 4.26 少了 Calcein AM 等字樣。	感謝委員的提問與建議，我們已補上缺少之字樣。
8. 表 4.10 與 4.12 Ag 的 LC <sub>50</sub> 相差許多，為何?表 4.12 的 Data 請用 mean± SD。	<p>感謝委員的提問與建議，表 4.10 為斑馬魚胚胎暴露商品化之奈米銀膠體溶液；表 4.12 為暴露我們自行合成之奈米銀微粒，由於奈米微粒之物化特性差異會影響其呈現出之毒性效應，而商品化及自行合成之奈米銀微粒可能是其呈現的物化特性不同才導致毒性有所差異，然而商品化之奈米銀是自市面上之公司購得，而我們無法得知其確切物化特性及表面修飾之物質，因此難以推測其毒性效應與自行合成之奈米微粒差異。</p> <p>感謝委員的建議，我們已修正表 4.12。</p>
9. 圖 4.12 請加 scale bar。	感謝委員的提問與建議，圖 4.12 是斑馬魚胚胎暴露奈米銀微粒之氧化壓力表現，因其為影像拍攝故無法加入 scale bar。
10. p.184~p.186 圖 4.44~4.40，圖的標題序號錯置。	感謝委員的提問與建議，我們已經改正標題序號問題。
11. 圖 4.50~4.51 動態光散射儀之結果”N.D.”，請註解是 not detected 或 not determineted。	感謝委員的提問與建議，我們已經補充註解為 not detected。

林委員一郎意見	廠商回覆(成功大學)
<p>1. 此次研究計畫案不管在細胞與斑馬魚胚胎模式都已建立檢測模式，但未能有效監測目前樣品水體的水質好壞。建議應以 AOD 值(濃縮倍數)評估目前水樣，亦可當成早期生態警報的監控。</p>	<p>AOD (Aquatic Organisms environment Diagnostics)是透過冷凍濃縮法技術，將低毒性水體樣品中的部分水分去除，藉此濃縮可能導致毒性之成分，並可作為監控生態的良好指標，雖此計畫中並未採用 AOD，但或許 AOD 是一個可行的方向，以避免環境中之奈米微粒濃度過低難以探討其毒性。</p>
<p>2. 以透析取代過濾，留下奈米粒子與大粒子，再以細胞和斑馬魚胚胎毒性測試，是否可看出(偵測出)水樣毒性。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，透析法的確可能具有可行性，或許於未來相關計畫可考慮使用透析技術來分離奈米粒子與大粒子。</p>
<p>3. 結案報告的第 171 頁之圖 4.35 需修正，圖形與文字敘述有重疊。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，我們已做修正。</p>
<p>4. 結案報告的第 217 頁之圖 4.80-1 成功湖和二仁溪濾液都有些微綠色螢光，顯示仍有反應，但 Detector 可能仍無法判讀。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，生物實驗間可能存在個體差異性，根據我們多次的實驗結果，多次實驗結果後並沒有顯著性增加，因此判定為無明顯增加氧化壓力。</p>

楊委員喜男意見	廠商回覆(成功大學)
1. 因本計畫為第 3 年研究計畫，委託單位已將前二年成果列入前言中，建議期末報告增加三年成果總結論。	感謝委員的提問與建議，已將前兩年成果放置於結論，另外我們已增加三年成果總結論之報告。
2. 螢光強度定量以軟體定量，是否有確認螢光量測之方法？	感謝委員的提問與建議，目前我們所使用之量測方法主要分為兩種，一種為拍攝螢光本身軟體定量程式，另一種為拍攝完後再使用 image J 軟體進行定量，但這樣的方法皆非自動化的方式進行。
3. 斑馬魚 72hpf 量測體長之意義或是否有國外文獻可參考？除以人工以顯微鏡量測體長外，是或有軟體可協助量測？	<p>感謝委員的提問與建議，72 hpf 之實驗終點為參考國外文獻使用之時間點，可參考下列文獻：</p> <p>Journal of Fish Biology, 2004, 64, 911-922.</p> <p>Aquatic Toxicology, 2013, 126, 30-41.</p> <p>另外 72 hpf 為大部分正常胚胎孵化時間，因此也是用來測驗胚胎毒性體長量測之最佳時間點。</p> <p>我們是先以顯微鏡進行拍攝，再輔用比例尺與放大倍率進行換算，本計畫使用 view 7 軟體輔助測量。</p>
4. 簡報內容及說明中有部份成果未列入期末報中，建議也納入報告中。	感謝委員的提問與建議，我們將成果列入期末報告 207-209 頁中。

巫委員月春意見	廠商回覆(成功大學)
<p>1. 檢測方法草案中對於環境樣品奈米物質之細胞毒性檢測時水體樣品是否應有粒徑分離步驟以得到奈米物質才進行後續毒性試驗。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，本計畫中用於分離粒徑之方法是透過過濾 450 nm、220nm、100 nm 三種孔徑之濾膜進行分離，於過濾後將檢體可分為濾膜及濾液兩個部分。</p> <p>我們將濾膜的部分進行超音波震盪後，將濾膜上之粒子震於溶液中，再進行後續細胞模式之毒性試驗。</p> <p>而濾液則於過濾後直接進行斑馬魚胚胎模式毒性試驗。</p>
<p>2. 研究中水體過濾得到 450nm、220nm、100nm 三種奈米粒徑，進行後續毒性測試，選擇這三奈米粒徑之根據或原因為何?這三種粒徑是否具有環境奈米物質之代表性?</p>	<p>根據先前研究文獻，他們利用奈米銀微粒添加至環境水體當中，並利用濾膜過濾後探討其回收率，於研究中作者選用 450、100、50、25、1.5 nm 的孔徑進行過濾，並發現過濾 450、100 nm 之回收率遠高於其他孔徑，因此於本研究選用 450、100 nm，並在其中間選擇 220 nm 的孔徑探討其差異。</p> <p><i>Aquatic Toxicology, 2016. 174: p. 70-81.</i></p> <p>另外正因考量到計畫目的是探討奈米微粒之毒性差異，因此選擇除 100 nm 的大小，也以 450、220 nm 較大的孔徑進行試驗，可進行探討主要導致毒性之奈米微粒為何種粒徑之粒子。</p>

<p>3. 「結論」第五項與「建議意見」之文字似乎相左，請確認。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，我們已做確認及更正。</p>
<p>4. 斑馬魚胚胎暴露湖水添加奈米銀之存活率試驗中奈米銀添加於水樣時，過濾前與過濾後奈米銀添加濃度及其回收率如何?建議補充於期末報告。</p>	<p>根據先前研究文獻，他們利用奈米銀微粒添加至環境水體當中，並利用濾膜過濾後探討其回收率，於研究中作者選用 450、100、50、25、1.5 nm 的孔徑進行過濾，並發現過濾 450、100 nm 之回收率各為 30% 左右，因此本計畫不再另行進行測定。</p> <p><i>Aquatic Toxicology, 2016. 174: p. 70-81.</i></p>
<p>5. 建議過濾濾膜使用鐵氟龍濾膜，建議本計畫研究使用其他濾膜導致細胞毒性之結果列入報告中。</p>	<p>感謝委員的提問與建議，我們根據環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(1/3)-奈米微粒細胞毒性檢測系統在環境危害評估上之應用(EPA-104-E3S5-02-03)，於細胞模式上，石英薄膜可能容易游離出其成份內容物導致細胞毒性，另外於過去文獻中也指出玻璃纖維會導致細胞損傷。而經我們實驗確認後已確認鐵氟龍濾膜不會導致明顯細胞毒性，實驗結果可參考內文 181 頁。</p>

## 106 年度科技計畫成果效益報告

國立成功大學編印

中華民國 106 年 12 月 17 日

## 106 年度科技計畫成果效益報告

- 一、年度科技計畫成果效益事實報告表 (表 1-1)
- 二、科技計畫成果效益自評表 (表 1-2)

表 1-1

**106 年度科技計畫成果效益事實報告表**  
(請由計畫主持人、執行人填寫)

壹、計畫基本資料

領域別：環境保護

計畫主持人 <u>王應然</u>
計畫名稱『 <u>環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究</u> 』
審議編號 <u>EPA-106-13S5-02-01</u>
計畫期程 <u>106</u> 年 <u>2</u> 月至 <u>106</u> 年 <u>12</u> 月
全程經費 <u>          </u> 億 <u>1500</u> 千元 <u>          </u> 年度經費 <u>          </u> 億 <u>          </u> 千元
執行機構 <u>國立成功大學</u>

貳、計畫目的與預期成效

奈米技術已應用在許多工業，因此人造奈米微粒有可能在工業廢水的排放過程中進入水系(河流與海洋)，不僅污染生態環境，且有可能經由食物鏈危害人體健康。然而當奈米微粒進入自然環境中，有可能發生化學轉化而改變其物理化學特性，進一步影響其生物效應。因此如何評估環境中奈米微粒之風險與危害效應是各國都在面對的重要議題。為了解決這個議題，本委託計畫案將嘗試建立水體奈米微粒毒性檢測的標準法，並依此測試環境水體中(包括二仁溪、曾文水庫與成功湖)採樣到的奈米物質的生物危害性。本計畫的第一個階段目標是要針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並探討我們所建立的細胞株培養模式與斑馬魚胚胎模式研究方法是否適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性，進而提出檢測奈米微粒之生物毒性指標(包括存活率、細胞凋亡、自噬作用與氧化壓力)之標準方法草案，同時會再利用人造奈米氧化鋅及奈米銀進行比對測試並提交技術測試報告，而第二階段我們會於採集環境水體後先以穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy, TEM)、動態光散射儀(Dynamic light scattering, DLS)及能量色散 X 射線分析(Energy dispersive X-ray analysis, EDX)分析水體中所含奈米物質及其分佈粒徑，再利用已建立好的細胞株培養模式和斑馬魚胚胎模式研究方法進行環境水體樣品/環境水體添加人造奈米氧化鋅或奈米銀之毒性測試，最後，我們會將學術文獻及國際單位發佈之奈米微粒毒性檢測方法與我們所建立的標準法進行整合，根據其可行性提出環境水體奈米微粒毒性檢驗方法草案，並將此進行技術轉移至環檢所。

參、計畫目的主要內容

## 肆、計畫經費與人力

計畫名稱	執行情形	總人力(人年)	研究員級	副研究員級	助理研究員級	助理
3 環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究	原訂	5	1	0	1	3
	實際	5	1	0	1	3
	差異	0	0	0	0	0

## 伍、計畫已獲得之主要成就與成果 (out put)

- 請就本計畫涉及之(1)學術成就(2)技術創新(3)經濟效益(4)社會影響(5)非研究類成就(6)其他效益方面說明重要之成果及重大之突破，以文字方式分列說明。

## (1)學術成就：

- 以細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式作為毒性測驗模式探討環境水體之毒性影響，藉以評估環境水體和奈米微粒對於生物體之危害程度，並且探討環境水體可能誘發的細胞毒性機轉，提供環境水體所含之奈米微粒更多面向思考與定位。
- 於實驗結果中可確認奈米銀及奈米氧化鋅會導致細胞及斑馬魚胚胎模式之危害，於細胞培養模式中，奈米銀及奈米氧化鋅會導致細胞死亡率增加及誘發過量氧化壓力、細胞凋亡、自噬作用，而於斑馬魚胚胎模式可發現奈米銀和奈米氧化鋅會導致斑馬魚胚胎死亡率增加、體長減短、畸形增加及細胞凋亡增加。
- 可評估台灣環境水體之奈米毒性的可能性，並探討其對環境及生物所引發的危害問題。細胞分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu\text{m}$  濾紙上之顆粒物質，其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且只有在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成。
- 在斑馬魚胚胎模式中可發現，不論是成功湖、二仁溪或曾文水庫的水體，經過 1、0.45、0.22 與 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜過濾之濾液都不會讓其存活率明顯下降，而於體長量測上可發現第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，並且環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加。
- 根據目前研究結果顯示，本團隊所建立之環境水體奈米微粒毒性標準草案具有潛力可應用於未來建立奈米快速篩選毒性平台。

- (2)技術創新：本研究團隊建立適於檢測奈米微粒之方法草案，可分為細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式兩大部分，細胞培養模式四種毒性試驗方法草案，其包括細胞存活、細胞凋亡、氧化壓力測試、自噬作用測試及5種斑馬魚胚胎毒性測驗方法，其包括斑馬魚胚胎存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡，綜合以上多樣檢測方法可提供全面性較完整的毒性機轉探討，並且可更有效且準確的建立毒性篩選平台及鑑定具有毒性之奈米微粒檢體。
- (3)經濟效益：本計畫中，建立細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式標準方法草案，可提供大量及非感知動物進行快速毒性篩選，並可早期快速確認可能的毒性樣品，符合3R原則減少動物之使用及避免因大量動物之高額花費，以未來的永續性而言，可有效提昇經濟效益。
- (4)社會影響：建立奈米微粒細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式之毒性檢測草案，可供未來建立檢測奈米微粒之快速毒性篩檢平台，並可建立風險評估相關資訊及增進奈米微粒之使用安全性，有效促進環境安全之永續發展。
- (5)非研究類成就：  
於本計畫執行期間，培育一位在生物醫學領域的博士生及一位碩士生
- (6)其他效益：  
無

2. 請依本計畫(涉及)設定之成果項目以量化績效指標方式及佐證資料格式填寫主要之量化成果(如學術成就代表性重要論文、技術移轉經費/項數、技術創新項數、技術服務項數、重大專利及項數、著作權項數等項目，含量化與質化部分)。

#### 陸、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻 (out come)

請依前述重要成果及重大突破說明其價值與貢獻度如：

1. 學術成就(科技基礎研究)(權重 30%)  
本團隊所建立之環境水體奈米微粒毒性標準草案具有潛力可應用於未來建立奈米快速篩選毒性平台。
2. 技術創新(科技整合創新)(權重 20%)  
本團隊多樣檢測方法可提供全面性較完整個毒性機轉探討，並且可更有效且準確的建立毒性篩選平台。
3. 經濟效益(產業經濟發展)(權重 20%)  
建立之細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式標準方法草案，可提供大量及非感知動物進行快速毒性篩選，可早期並快速確認可能的毒性樣品避免後續之費用支出。

## 4. 社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重 15%)

可供未來建立檢測奈米微粒之快速毒性篩檢平台，並可建立風險評估相關資訊及增進奈米微粒之使用安全性。

## 5. 非研究類成就(人才培育、法規制度、國際合作、推動輔導)(權重 15%)

培育兩位在生物醫學領域的博士生及一位碩士生

## 6. 其它效益(科技政策管理及其它)(權重 0%)

無

## 柒、與相關計畫之配合

無

## 捌、後續工作構想及重點

於本計畫中建立之奈米微粒檢測標準方法草案可適用於奈米微粒毒性之檢測，而於未來可將其用於建立奈米微粒之毒性篩選平台，透過建立這樣的平台可快速篩選並建立毒性資料庫，進而可應用於篩選具毒性之奈米微粒商品。而針對環境水樣的部分，雖於本計畫中環境水體之奈米微粒並無引發顯著之毒性效應，其原因可能是由於環境水體之奈米微粒其含量不足以誘發出毒性效應，因此建議於未來相關之研究可將環境水體進行濃縮後再進行毒性試驗。

## 玖、檢討會與建議

根據本團隊之結果顯示，環境水體之奈米微粒並未引發明顯之毒性效應，可能是因為於環境水體中其奈米微粒之含量不足以誘發毒性，因此建議於未來相關之研究可將環境水體進行濃縮後再進行毒性試驗，但依照奈米銀及奈米氧化鋅之試驗結果仍可證實於本計畫建立之毒性測驗草案方法可反應奈米微粒之毒性效應。

填表人：\_\_\_\_\_ 聯絡電話：\_\_\_\_\_ 傳真：\_\_\_\_\_

表 1-2

**106 年度科技計畫成果效益自評表**  
(請由計畫主持人、執行人填寫，再由主管部會署初核)

壹、計畫基本資料

領域別：環境保護

計畫主持人 <u>王應然</u>
計畫名稱『 <u>環境奈米評析與綠色化學檢測技術研究(3/3)-環境水體奈米物質之細胞毒性研究</u> 』
審議編號 <u>EPA-106-13S5-02-01</u>
計畫期程 <u>106</u> 年 <u>2</u> 月至 <u>106</u> 年 <u>12</u> 月
全程經費 <u>          </u> 億 <u>1500</u> 千元 <u>          </u> 年度經費 <u>          </u> 億 <u>          </u> 千元
執行機構 <u>國立成功大學</u>

貳、計畫目標與執行內容是否符合(如有差異，請說明)

計畫目標及執行內容符合。

我們已針對 ISO、OECD 與 NCL 等國際單位公告之奈米微粒毒性檢測方法學進行文獻回顧，並撰寫適於檢測環境水體之奈米微粒的毒性之細胞株培養與斑馬魚胚胎標準方法草案，其細胞培養包括存活率、細胞凋亡、自噬作用與氧化壓力；斑馬魚胚胎包含存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡，共計九種毒性測驗方法。我們也利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，並提出可行之標準方法草案，而第二階段我們已採集第一、第二季節之成功湖、二仁溪與曾文水庫共計六件環境水體，並且以穿透式電子顯微鏡檢及動態光散射分析

檢測奈米微粒之粒徑及分散情形，最後我們也已將環境水體之奈米微粒進行細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式進行上述之毒性測驗。透過奈米銀、奈米氧化鋅及環境水體之奈米微粒可證實所建立之檢測方法可反應奈米微粒之毒性效應。計畫目標及執行內容符合。

參、計畫已獲得之主要成就與成果

我們在第一階段利用人造奈米氧化鋅及奈米銀及相對應之大分子材料進行測試，並提出可行之標準方法草案，而第二階段我們分析成功湖、二仁溪與曾文水庫，共計六件環境水體，並且檢測奈米微粒之粒徑及分散情形，穿透式電子顯微鏡檢分析結果發現不論第一季及第二季之環境水樣皆有較小粒徑之微粒，但進行動態光散射分析時，卻發現除第一季二仁溪水樣以外，其餘樣本的微粒含量皆低於偵測極限。而在細胞暴露模式中，分別暴露 0.22 與 0.1 $\mu$ m 濾紙上之顆粒物質，

其結果顯示不論是第一季或者第二季的三個水體樣品皆無顯著的細胞毒性效應，且只有在成功湖的樣品中偵測到些許的 ROS 生成。此外在斑馬魚胚胎模式中可發現，不論是成功湖、二仁溪或曾文水庫的水體，經過 1、0.45、0.22 與 0.1  $\mu\text{m}$  濾膜過濾之濾液都不會讓其存活率明顯下降，而於體長量測上可發現第一、二季節之成功湖、二仁溪及曾文水庫皆會使體長增加，並且環境水樣中皆不會誘發氧化壓力及細胞凋亡之增加，綜上所述，我們藉由以超純水分別添加人造奈米氧化鋅及奈米銀的實驗建立可行之標準方法草案，而六件環境水體的分析結果顯示，其存在環境水體之奈米微粒並不足以對選定細胞株培與斑馬魚胚胎產生顯著毒性。

肆、計畫主要成就與成果之價值與貢獻度 (out put) (如論文篇數、技術移轉經費/項數、技術項數、技術創新項數、技術服務項數、專利權項數、著作權項數等)

請依前述重要成果及重大突破說明其價值與貢獻度如：

以細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式作為毒性測驗模式探討環境水體之毒性影響，藉以評估環境水體和奈米微粒對於生物體之危害程度，並且探討環境水體可能誘發的細胞毒性機轉，提供環境水體所含之奈米微粒更多面向思考與定位。本研究團隊建立適於檢測奈米微粒之方法草案，可分為細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式兩大部分，細胞培養模式四種毒性試驗方法草案，其包括細胞存活、細胞凋亡、氧化壓力測試、自噬作用測試及 5 種斑馬魚胚胎毒性方法，其包括斑馬魚存活率與半致死濃度、外觀型態畸形率、體長量測、氧化壓力測試和細胞凋亡，綜合以上多樣檢測方法可提供全面性較完整的毒性機轉探討，並且可更有效且準確的建立毒性篩選平台及鑑定具有毒性之奈米微粒檢體。

伍、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻 (out come)

1. 學術成就(科技基礎研究)(權重 30%)

本團隊所建立之環境水體奈米微粒毒性標準草案具有潛力可應用於未來建立奈米速篩選毒性平台。

2. 技術創新(科技整合創新)(權重 20%)

本團隊多樣檢測方法可提供全面性較完整個毒性機轉探討，並且可更有效且準確的建立毒性篩選平台。

3. 經濟效益(產業經濟發展)(權重 20%)

建立之細胞培養模式及斑馬魚胚胎模式標準方法草案，可提供大量及非感知動物進行快速毒性篩選，可早期並快速確認可能的毒性樣品避免後續之費用支出。

4. 社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重 15%)

可供未來建立檢測奈米微粒之快速毒性篩檢平台，並可建立風險評估相關資訊及增進奈米微粒之使用安全性。

5.非研究類成就(人才培育、法規制度、國際合作、推動輔導)(權重 15%)

培育一位在生物醫學領域的博士生及一位碩士生

6.其它效益(科技政策管理及其它)(權重 0%)

無

陸、與相關計畫之配合程度

無

柒、計畫經費的適足性與人力運用的適善性

原計畫規劃聘請碩士級專任助理一名並支領人事費月薪 39760 元，因國立成功大學年資採認嚴格，亦難以聘請符合該年資薪資標準之助理，故改以聘請碩士級第二年年資之專任助理擔任研究工作。除此之外，本計畫在人力運用上，皆符合原先計畫之規劃，由專長領域相應的博士班與碩士班學生擔任兼任助理之研究工作。因此，本計畫人事經費之適足性具有妥善運用，而人才分配與工作項目的適善性層面，亦使人才適性發揮。

捌、後續工作構想及重點之妥適性

於本計畫中建立之奈米微粒檢測標準方法草案可適用於奈米微粒之檢測，而於未來可將其用於建立奈米微粒之毒性篩選平台，透過建立這樣的平台可快速篩選並建立毒性資料資料庫，進而可早期篩選出不適用之奈米微粒商品。而針對環境水樣的部分，雖於本計畫中環境水體中其奈米微粒並無引發顯著之毒性效應，這可能是由於環境水體之奈米微粒其含量不足以誘發出毒性效應，因此建議於未來相關之研究可將環境水體進行濃縮後再進行毒性試驗。

玖、檢討會與建議

根據本團隊之結果顯示，環境水體之奈米微粒並未引發明顯之毒性效應，可能於環境水體中其奈米微粒之含量不足以誘發毒性，因此建議於未來相關之研究可將環境水體進行濃縮後再進行毒性試驗，但依照奈米銀及奈米氧化鋅之試驗結果仍可證實於本計畫建立之毒性測驗草案方法可反應奈米微粒之毒性效應。

計畫主持人簽名：

填表人：

聯絡電話：

主管部會評估意見：

主管簽名：

附件、細胞培養模式之奈米微粒MTT, MTS, Apoptosis

SCS-24H													MTT		
Control(10%FBS)															
1	0.519	0.55	0.566	0.557	0.563	0.557	0.485	0.461	0.469	0.457					
5	0.507	0.51	0.501	0.521	0.54	0.56	0.522	0.54	0.526	0.534					
10	0.353	0.36	0.364	0.363	0.387	0.398	0.44	0.516	0.514	0.527					
15	0.268	0.242	0.262	0.258	0.235	0.25	0.344	0.351	0.394	0.383					
30	0.197	0.174	0.18	0.17	0.183	0.161	0.177	0.152	0.202	0.193					
	0.082	0.116	0.128	0.102	0.146	0.123	0.084	0.074	0.084	0.095					
SCS-24H													MTT		
Control(10%FBS)															
1	0.976879	0.927273	0.885159	0.935368	0.959147	1.005386	1.076289	1.171367	1.121535	1.16849	102.2689	10.43955			
5	0.680154	0.654545	0.64311	0.651706	0.687389	0.714542	0.907216	1.119306	1.095949	1.153173	83.0709	21.56252			
10	0.516378	0.44	0.462898	0.463196	0.417407	0.448833	0.709278	0.761388	0.840085	0.838074	58.97537	17.56118			
15	0.379576	0.316364	0.318021	0.305206	0.325044	0.289048	0.364948	0.329718	0.430704	0.422319	34.8095	4.911984			
30	0.157996	0.210909	0.226148	0.183124	0.259325	0.220826	0.173196	0.160521	0.179104	0.207877	19.79027	3.255222			
SCS-48H													MTT		
Control(10%FBS)															
1	0.887	0.865	0.862	0.903	0.844	0.89	1.031	1.108	1.155	1.153					
5	0.854	0.862	0.886	0.841	0.833	0.86	1.056	1.074	1.113	1.096					
10	0.519	0.647	0.596	0.624	0.598	0.595	0.669	0.729	0.713	0.709					
15	0.258	0.329	0.274	0.388	0.374	0.303	0.37	0.405	0.538	0.48					
30	0.068	0.054	0.044	0.047	0.045	0.044	0.083	0.091	0.092	0.086					
	0.045	0.047	0.042	0.043	0.047	0.044	0.077	0.087	0.062	0.053					
SCS-48H													MTT		
Control(10%FBS)															
1	0.962796	0.996532	1.027842	0.93134	0.986967	0.966292	1.024248	0.969314	0.963636	0.950564	97.79531	3.096031			
5	0.585118	0.747977	0.691415	0.69103	0.708531	0.668539	0.648885	0.657942	0.617316	0.614918	66.31671	4.899768			
10	0.290868	0.380347	0.317865	0.429679	0.443128	0.340449	0.338875	0.365523	0.465801	0.416305	38.08841	5.691181			
15	0.076663	0.062428	0.051044	0.052049	0.053318	0.049438	0.080504	0.08213	0.079654	0.074588	6.618152	1.378532			
30	0.050733	0.054335	0.048724	0.047619	0.055687	0.049438	0.074685	0.07852	0.05368	0.045967	5.593877	1.134863			
SCS-48H													MTT		
Control(10%FBS)															
1	0.962796	0.996532	1.027842	0.93134	0.986967	0.966292	1.024248	0.969314	0.963636	0.950564	97.79531	3.096031			
5	0.585118	0.747977	0.691415	0.69103	0.708531	0.668539	0.648885	0.657942	0.617316	0.614918	66.31671	4.899768			
10	0.290868	0.380347	0.317865	0.429679	0.443128	0.340449	0.338875	0.365523	0.465801	0.416305	38.08841	5.691181			
15	0.076663	0.062428	0.051044	0.052049	0.053318	0.049438	0.080504	0.08213	0.079654	0.074588	6.618152	1.378532			
30	0.050733	0.054335	0.048724	0.047619	0.055687	0.049438	0.074685	0.07852	0.05368	0.045967	5.593877	1.134863			
													AVE		
													SD		

附件、細胞培養模式之奈米微粒MTT, MTS, Apoptosis

SCS-24H MTS																	
Control(10	0.694	0.761	0.773	0.82	0.835	0.827	0.668	0.686	0.703	0.707	0.719	0.651					
1	0.698	0.69	0.666	0.707	0.693	0.698	0.602	0.636	0.616	0.598	0.644	0.655					
5	0.453	0.52	0.493	0.544	0.48	0.525	0.493	0.537	0.528	0.559	0.558	0.543					
10	0.329	0.356	0.35	0.462	0.435	0.376	0.436	0.436	0.453	0.466	0.399	0.541					
15	0.309	0.295	0.331	0.328	0.298	0.323	0.364	0.33	0.37	0.346	0.289	0.381					
30	0.284	0.291	0.307	0.347	0.342	0.322	0.192	0.194	0.192	0.206	0.207	0.249					
SCS-24H MTS																	
Control(10																AVE	SD
1	1.005764	0.906702	0.861578	0.862195	0.82994	0.844015	0.901198	0.927114	0.876245	0.845827	0.895688	1.006144	80.3419	5.845131			
5	0.652738	0.683311	0.637775	0.663415	0.57485	0.634825	0.738024	0.782799	0.751067	0.790665	0.776078	0.834101	64.29608	7.939568			
10	0.474063	0.467806	0.452781	0.563415	0.520958	0.454655	0.652695	0.655569	0.644381	0.659123	0.554937	0.831029	51.45346	11.34948			
15	0.445245	0.387648	0.428202	0.4	0.356886	0.390568	0.54491	0.48105	0.526316	0.489392	0.401947	0.585253	40.22248	7.193532			
30	0.409222	0.382392	0.397154	0.423171	0.409581	0.389359	0.287425	0.282799	0.273115	0.291372	0.2879	0.382488	35.13315	6.022963			
SCS-48H MTS																	
Control(10																AVE	SD
1	0.978	0.985	0.955	1.044	0.975	0.996	0.697	0.694	0.684	0.693	0.677	0.682					
1	0.95	1.005	0.976	1.003	0.968	0.914	0.636	0.626	0.584	0.585	0.599	0.604					
5	0.323	0.34	0.35	0.426	0.426	0.456	0.498	0.491	0.47	0.489	0.509	0.52					
10	0.256	0.252	0.251	0.276	0.267	0.263	0.449	0.473	0.449	0.477	0.486	0.513					
15	0.247	0.266	0.251	0.263	0.258	0.27	0.197	0.143	0.138	0.143	0.273	0.173					
30	0.247	0.281	0.273	0.29	0.301	0.297	0.155	0.179	0.124	0.127	0.136	0.142					
SCS-48H MTS																	
Control(10																AVE	SD
1	0.97137	1.020305	1.02199	0.960728	0.992821	0.917671	0.912482	0.902017	0.853801	0.844156	0.884786	0.88563	93.06463	6.152935			
5	0.330266	0.345178	0.366492	0.408046	0.436923	0.457831	0.714491	0.707493	0.687135	0.705628	0.751846	0.762463	55.61493	17.72668			
10	0.261759	0.255838	0.262827	0.264368	0.273846	0.264056	0.255	0.257	0.225	0.245	0.239	0.258	25.51411	1.314727			
15	0.252556	0.270051	0.262827	0.251916	0.264615	0.271084	0.28264	0.206052	0.201754	0.206349	0.40325	0.253666	26.05634	5.276417			
30	0.252556	0.285279	0.285864	0.277778	0.308718	0.298193	0.222382	0.257925	0.181287	0.183261	0.200886	0.208211	24.68616	4.584637			

附件、細胞培養模式之奈米微粒MTT, MTS, Apoptosis

20170324 apoptosis 18H-1				20170617 apoptosis 18H-3				Final										
Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	18H	Total apoptosis %	1	2	3 AVE	SD	p		
0	1.77	5.18	6.95	0.74	5.92	0	0.93	5.23	6.16	0.86	6.09	0	6.95	4.67	6.16	5.920667	1.157771	0.969387
1	1.5	2.52	4.02	0.5	3.02	1	0.99	4.57	5.56	0.75	5.32	1	4.02	8.38	5.56	5.986667	2.211093	0.969387
5	2.74	4.91	7.65	0.6	5.51	5	0.98	5.14	6.12	0.59	5.73	5	7.65	9.11	6.12	7.620667	1.495137	0.198821
7.5	3.1	5.09	8.19	0.86	5.95	10	1.28	6.05	7.33	0.55	6.6	10	8.55	11.92	7.33	9.266667	2.377443	0.119654
10	3.37	5.18	8.55	0.77	5.95	15	2.08	7.33	9.41	0.7	8.03	15	11.05	11.92	11.13	11.36667	0.480867	0.007215
15	4.94	6.11	11.05	1.01	7.12	20	2.05	9.08	11.13	0.9	9.98	20	14	15.27	20.62	16.63	5.513303	0.024861
30	4.09	9.91	14	2.47	12.38	30	2.62	18	20.62	1.68	19.68	30	55.8	66.8	65.9	62.83333	6.107645	0.001545
20170324 apoptosis 18H-2				20170617 apoptosis 18H-4				Dead cell %										
Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	1	2	3 AVE	SD	p				
0	2.49	5.49	4.67	0.56	3.29	0	0.03	6.25	5.56	1.16	6.69	0	5.92	3.29	6.09	5.1	1.569809	
1	1.84	2.83	8.38	0.46	4.84	1	0.06	5.5	5.93	1.19	7.03	1	3.02	4.84	5.32	4.393333	1.213315	0.572667
5	4.06	4.32	9.11	0.52	5.42	5	0.04	5.89	7.73	1.14	8.6	5	5.51	5.42	5.73	5.553333	0.159478	0.667195
7.5	4.19	4.92	11.02	0.5	6.95	10	0.12	7.61	9.85	0.99	11.06	10	5.95	6.89	8.03	6.956667	1.041601	0.173722
10	4.96	6.06	11.92	0.89	6.89	15	0.12	9.73	10.61	1.33	11.96	15	7.12	6.89	9.98	7.996667	1.721463	0.098175
15	6.19	5.73	11.92	1.16	6.89	20	0.21	10.4	10.61	1.56	11.96	20	12.38	12.5	19.68	14.85333	4.180447	0.042656
30	4.97	10.3	15.27	2.2	12.5	30	0.1	20	20.1	1.87	21.87	30	45.43	58.28	58.35	54.02	7.439241	0.006294
NIH 3T3 Amine-Apoptosis & necrosis Data																		
20170321 apoptosis 24H-1				20170324 apoptosis 24H-3				Final				Dead cell %						
Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	0 <th>1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> <th>p</th> </th></th>	1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> <th>p</th> </th>	2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> <th>p</th>	3 AVE	SD	p			
0	1.54	7.26	8.8	0.5	7.76	0	0.72	5.9	6.62	0.98	6.88	0	6.88	7.14	7.4	7.4	7.14	0.26
1	1.57	7.52	9.09	0.92	8.44	1	0.69	7.75	8.44	1.49	9.24	1	9.24	7.71	11.71	9.553333	2.018324	0.172232
5	3.22	8.3	11.52	2.26	10.56	5	1.01	9.33	10.34	1.85	11.18	10	15.3	14.9	19.72	16.64	2.674846	0.024521
7.5	3.56	9.08	12.64	1.88	10.96	7.5	1.77	13.4	15.17	1.8	15.2	15	18.51	19.62	17.14	18.42333	1.242269	0.002923
10	3.36	10.2	13.56	3.36	13.56	10	1.55	12.3	13.85	3	15.3	30	48.9	55.78	56.27	53.65	4.12091	0.005222
15	2.08	13.9	15.98	6.5	20.4	15	2.37	15.2	17.57	3.31	18.51	30	49.7	62.4	53.19	55.09667	6.561176	0.003891
30	4.31	24.5	28.81	28.4	52.9	30	7.24	35	42.24	13.9	48.9	30						
20170321 apoptosis 24H-2				20170324 apoptosis 24H-4				Total apoptosis%				p						
Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	0 <th>1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> </th></th>	1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> </th>	2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th>	3 AVE	SD				
0	1.79	6.77	8.56	0.53	7.3	0	1.69	4.97	6.66	0.56	5.53	0	6.62	5.53	7.65	6.6	1.060141	
1	2.07	7.37	9.44	1.09	8.46	1	3.13	4.29	7.42	0.52	4.81	1	8.44	4.81	13.85	9.033333	4.569113	0.45401
5	3.48	7.78	11.26	2.5	10.28	5	5.21	6.67	11.88	0.71	7.38	10	13.85	11.14	23.56	16.18333	6.53905	0.122654
7.5	3.82	8.65	12.47	1.99	10.64	7.5	6.67	8.08	14.75	0.59	8.67	15	17.57	14.17	21.01	17.58333	3.420019	0.022817
10	3.55	9.65	13.2	3.91	13.56	10	7.14	9.72	16.86	1.42	11.14	30	42.24	46.7	59.67	49.53667	9.054625	0.013565
15	2.01	12.6	14.61	6.6	19.2	15	8.6	12.4	21	1.77	14.17	30	75.8	70.7	76.5	74.33333	3.165965	7.97E-05
30	4.1	22.6	26.7	29.4	52	30	18.1	35.5	53.6	11.2	46.7	30						
20170622 apoptosis 24H-5				20170622 apoptosis 24H-6				Final				Dead cell %						
Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	Early	Late	Total apopt	Necrosis	Dead cell	0 <th>1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> </th></th>	1 <th>2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th> </th>	2 <th>3 AVE</th> <th>SD</th>	3 AVE	SD				
0	1.15	6.59	7.74	0.55	7.14	0	0.97	6.63	7.65	0.6	7.4	0	6.63	7.65	7.65	6.63	1.060141	
1	0.91	7.18	8.09	0.53	7.71	1	0.81	6.84	13.85	0.56	11.71	1	8.44	4.81	13.85	9.033333	4.569113	0.45401
5	2.34	11.8	14.14	0.57	12.37	5	2.85	11	18.37	0.71	15.37	10	13.85	11.14	23.56	16.18333	6.53905	0.122654
10	2.99	14.2	17.19	0.7	14.9	10	3.97	14.4	23.56	0.97	19.72	15	17.57	14.17	21.01	17.58333	3.420019	0.022817
15	4.34	19.1	23.44	0.52	19.62	15	4.66	18.9	21.01	0.82	17.14	30	42.24	46.7	59.67	49.53667	9.054625	0.013565
30	4.82	54.6	59.42	1.18	55.78	30	4.91	16.1	21.01	1.04	17.14	30	45.43	58.28	58.35	54.02	7.439241	0.006294





附件、斑馬魚胚胎模式測試奈米銀之存活率、畸形率

AgNPs- Survival rate											
2017/3/6存活率 n=30			2017/3/6存活率 n=30			2017/3/6存活率 n=30			2017/3/6存活率 n=30		
SCS	24 hpf	加總	SCS	48 hpf	加總	SCS	72 hpf	加總	SCS	96 hpf	加總
C	10	96,66667	C	10	96,66667	C	10	96,66667	C	10	96,66667
0.1	10	100	0.1	10	96,66667	0.1	7	76,66667	0.1	7	60
0.5	7	53,33333	0.5	2	13,33333	0.5	2	13,33333	0.5	0	0
0.75	3	46,66667	0.75	1	13,33333	0.75	1	3,33333	0.75	0	0
1	3	36,66667	1	1	3,33333	1	0	0	1	0	0
10	2	26,66667	10	0	0	10	0	0	10	0	0
Ag Bulk- Survival rate											
2017/3/15存活率 n=30			2017/3/15存活率 n=30			2017/3/15存活率 n=30			2017/3/15存活率 n=30		
Ag bulk	24 hpf	加總	Ag bulk	48 hpf	加總	Ag bulk	72 hpf	加總	Ag bulk	96 hpf	加總
C	10	96,66667	C	10	96,66667	C	10	96,66667	C	10	96,66667
100	9	96,66667	100	9	96,66667	100	9	96,66667	100	9	96,66667
150	10	100	150	9	96,66667	150	9	96,66667	150	9	96,66667
200	10	100	200	10	96,66667	200	10	96,66667	200	10	96,66667
500	8	93,33333	500	8	93,33333	500	7	90	500	7	86,66667
1000	10	100	1000	10	100	1000	10	96,66667	1000	10	93,33333
AgNPs- Malformation											
2016/3/6 畸型率 n=30			2016/3/6 畸型率 n=30			2016/3/6 畸型率 n=30			2016/3/6 畸型率 n=30		
SCS	24 hpf	Heart axis	SCS	48 hpf	Heart axis	SCS	72 hpf	Heart axis	SCS	96 hpf	Heart axis
C	0	0	C	0	0	C	0	0	C	0	0
0.1	0	0	0.1	3,333333333	0	0.1	26,6666667	13,33333	0.1	16,6666667	23,33333
0.5	0	0	0.5	6,666666667	0	0.5	6,666666667	6,66667	0.5	0	0
0.75	0	0	0.75	3,333333333	3,333333	0.75	3,333333333	0	0.75	0	0
1	0	0	1	0	3,333333	1	0	0	1	0	0
10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
AgNPs- Body length											
Average			Average			Average			Average		
SCS	體長(mm)		SCS	體長(mm)		SCS	體長(mm)		SCS	體長(mm)	
C	3,68	3,64	C	3,61	3,67	C	3,64	3,63	C	3,61	3,67
0.1	3,25	3,08	0.1	2,99	3,27	0.1	3,08	3,33	0.1	2,99	3,27
0.5	3,18	2,77	0.5	2,85	2,71	0.5	2,77	2,85	0.5	2,77	2,85
0.75	2,64	3,38	0.75	3,29	2,77	0.75	3,10	3,33	0.75	2,77	3,10
*註：因 AgNPs bulk 無法完整溶解於溶液中，因此無法進行實驗											

附件、斑馬魚胚胎模式測試奈米氧化鋅之存活率、畸形率、體長

ZnONPs- Survival rate											
ZnO NPs 存活率 n=30 2017/04/15											
ZnO NPs	24 hpf	加總	ZnO NPs	48 hpf	加總	ZnO NPs	72 hpf	加總	ZnO NPs	96 hpf	加總
C	10	100									
0.05	10	100	0.05	10	100	0.05	10	100	0.05	10	100
0.1	9	96,66667	0.1	9	96,66667	0.1	9	96,66667	0.1	9	96,66667
0.5	10	100	0.5	10	100	0.5	10	96,66667	0.5	10	93,33333
1	10	100	1	10	93,33333	1	9	90	1	9	86,66667
5	10	100	5	7	83,33333	5	2	43,33333	5	0	0
10	10	96,66667	10	5	56,66667	10	0	3,33333	10	0	0
20	10	100	20	0	40	20	0	0	20	0	0
100	6	86,66667	100	0	3,33333	100	0	0	100	0	0
ZnO bulk- Survival rate											
ZnO bulk 存活率 n=30 2017/03/19			ZnO bulk 存活率 n=30 2017/03/19			ZnO bulk 存活率 n=30 2017/03/19			ZnO bulk 存活率 n=30 2017/03/19		
Bulk ZnO	24 hpf	加總	Bulk ZnO	48 hpf	加總	Bulk ZnO	72 hpf	加總	Bulk ZnO	96 hpf	加總
C	10	100									
0.05	10	100	0.05	10	100	0.05	10	100	0.05	10	100
0.1	10	100	0.1	10	100	0.1	10	96,66667	0.1	10	96,66667
0.5	10	100	0.5	10	100	0.5	10	100	0.5	10	100
1	10	100	1	10	100	1	10	96,66667	1	9	93,33333
5	10	100	5	10	93,33333	5	9	93,33333	5	7	76,66667
10	9	96,66667	10	5	63,33333	10	4	46,66667	10	1	13,33333
20	10	100	20	7	50	20	4	33,33333	20	0	0
100	10	93,33333	100	3	26,66667	100	0	3,33333	100	0	0

附件、斑馬魚胚胎模式測試奈米氧化鋅之存活率、畸形率、體長

AgNPs- Maformation

ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/01				ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/12				ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/15			
ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis	ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis	ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis
	yolk edema				yolk edema				yolk edema		
C	0	0	0	C	0	0	0	C	0	0	0
0.05	0	0	0	0.05	0	0	0	0.05	0	0	0
0.1	0	3.703704	0	0.1	0	0	3.448276	0.1	3.448275862	3.448276	0
0.5	3.571428571	0	3.571429	0.5	0	3.333333	0	0.5	0	0	0
1	4	4	4	1	3.571428571	7.142857	0	1	7.407407407	3.703704	7.407407
5	17.64705882	11.76471	17.64706	5	18.18181818	9.090909	18.18182	5	7.692307692	15.38462	15.38462
10	25	25	25	10	0	0	0	10	0	0	0
20	0	0	0	20	0	0	0	20	0	0	0
100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0

ZnO Bulk- Maformation

ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/01				ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/12				ZnO NPs 畸形率 n=30 2017/04/15			
ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis	ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis	ZnO NPs	72 hpf	Heart	axis
	yolk edema				yolk edema				yolk edema		
C	0	0	0	C	0	0	0	C	0	0	0
0.05	0	0	0	0.05	0	0	0	0.05	0	0	0
0.1	0	0	0	0.1	3.448276	3.448276	0	0.1	0	0	0
0.5	0	3.333333	3.333333	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0
1	0	0	0	1	0	0	0	1	3.448276	3.448276	0
5	0	3.703704	0	5	3.571429	3.571429	0	5	6.896552	6.896552	0
10	13.33333333	20	13.33333	10	7.142857143	7.142857	14.28571	10	8.333333333	16.66667	8.3333333
20	15.38461538	15.38462	23.07692	20	0	0	0	20	0	0	0
100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0

附件、斑馬魚胚胎模式測試奈米氧化鋅之存活率、畸形率、體長

Zn ONPs- Body length										
體長 (mm)										
c	3.41	3.55	3.69	3.68	3.54	3.12	3.23	3.6	Average	STDEV
0.05	3.34	3.56	3.33	3.21	3.33	3.47	3.32	3.22	3.3475	0.117565
0.1	3.41	3.32	3.53	3.36	3.38	3.33	3.34	3.22	3.36125	0.088065
0.5	3.2	3.32	3.28	3.41	3.21	3.47	3.23	3.21	3.29125	0.101621
1	3.06	3.11	3.31	3.23	2.97	3.25	3.12	3.22	3.15875	0.11294
5	2.96	3.14	3.05	2.41	2.53				2.818	0.326757
Zn O bulk- Body length										
體長 (mm)										
c	3.31	3.48	3.49	3.42	3.31	3.55	3.47	3.31	Average	STDEV
0.05	3.4	3.34	3.19	3.21	3.26	3.68	3.25	3.26	3.32375	0.159189
0.1	3.11	3.36	3.25	3.19	3.32	3.23	3.21	3.35	3.2525	0.086313
0.5	3.38	3.35	3.24	3.38	3.28	3.29	3.28	3.27	3.30875	0.053569
1	3.23	3.23	3.3	3.45	3.25	3.35	3.17	2.79	3.22125	0.194454
5	3.17	2.93	3.29	3.01	3.01	3.28	3.08	3.17	3.1175	0.131665
10	3.16	3.2	2.56	3.16	3.21	3.21			3.083333	0.257423
20	3.03	2.56	3.13	3.01					2.9325	0.253821

附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第一季節成功湖 - Survival rate

2017620, 成功湖, N=24 (%)				2017623, 成功湖, N=24 (%)				2017623, 成功湖, N=24 (%)			
24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr
MQ	100.00	100.00	100.00	MQ	100.00	100.00	95.83	MQ	100.00	100.00	100.00
53 um	100.00	100.00	100.00	53 um	100.00	100.00	100.00	53 um	100.00	100.00	100.00
1 um	100.00	100.00	100.00	1 um	100.00	100.00	100.00	1 um	100.00	100.00	100.00
0.45 um	100.00	100.00	100.00	0.45 um	100.00	100.00	100.00	0.45 um	100.00	100.00	100.00
0.22 um	100.00	100.00	100.00	0.22 um	100.00	100.00	100.00	0.22 um	100.00	100.00	100.00
0.1 um	95.83	95.83	95.83	0.1 um	95.83	95.83	95.83	0.1 um	100.00	100.00	95.83

第一季節二仁溪 - Survival rate

20170822, 二仁 N=24 (%)				20170823, 二仁 N=24 (%)				20170904, 二仁 N=24 (%)			
24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr
MQ	100.00	87.50	70.83	MQ	70.83	70.83	70.83	MQ	95.83	95.83	95.83
1 um	100.00	100.00	100.00	1 um	83.33	79.17	66.67	1 um	91.67	91.67	91.67
0.45 um	100.00	100.00	83.33	0.45 um	91.67	91.67	91.67	0.45 um	83.33	79.17	79.17
0.22 um	100.00	100.00	95.83	0.22 um	95.83	95.83	95.83	0.22 um	100.00	91.67	91.67
0.1 um	100.00	100.00	100.00	0.1 um	95.83	95.83	95.83	0.1 um	91.67	87.50	87.50

第一季節曾文水庫 - Survival rate

20170815, 曾文 N=24 (%)				20170822, 曾文 N=24 (%)				20170904, 曾文 N=24 (%)			
24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr
MQ	83.33	83.33	79.17	MQ	100.00	100.00	91.67	MQ	100.00	100.00	95.83
1 um	70.83	66.67	66.67	1 um	100.00	100.00	91.67	1 um	100.00	100.00	100.00
0.45 um	83.33	79.17	75.00	0.45 um	100.00	100.00	100.00	0.45 um	95.83	95.83	95.83
0.22 um	87.50	83.33	83.33	0.22 um	95.83	95.83	79.17	0.22 um	95.83	95.83	95.83
0.1 um	87.50	83.33	83.33	0.1 um	100.00	100.00	87.50	0.1 um	87.50	87.50	87.50

附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第一季節成功湖 - Malformation

2016/0620 成功湖, 畸型率 n=24				2016/0822 成功湖, 畸型率 n=24				2016/0815 成功湖, 畸型率 n=24			
24 hpf				24 hpf				24 hpf			
	yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis
MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00
1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00
0.45 um	0.00	0.00	4.17	0.45 um	4.17	0.00	0.00	0.45 um	4.17	0.00	0.00
0.22 um	4.17	0.00	0.00	0.22 um	8.33	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00
0.1 um	8.33	0.00	0.00	0.1 um	4.17	0.00	4.17	0.1 um	0.00	0.00	4.17

第一季節二仁溪 - Malformation

2016/0822 二仁溪, 畸型率 n=24				2016/0823 二仁溪, 畸型率 n=24				2016/0904 二仁溪, 畸型率 n=24			
24 hpf				24 hpf				24 hpf			
	yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis
MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00
1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00
0.45 um	0.00	0.00	4.17	0.45 um	4.17	0.00	0.00	0.45 um	4.17	0.00	0.00
0.22 um	4.17	0.00	0.00	0.22 um	8.33	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00
0.1 um	8.33	0.00	0.00	0.1 um	4.17	0.00	4.17	0.1 um	0.00	0.00	4.17

第一季節曾文水庫 - Malformation

2016/0815 曾文水庫, 畸型率 n=24				2016/0822 曾文水庫, 畸型率 n=24				2016/0904 曾文水庫, 畸型率 n=24			
24 hpf				24 hpf				24 hpf			
	yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis		yolk edema	Heart	axis
MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00
1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00
0.45 um	0.00	0.00	0.00	0.45 um	0.00	0.00	0.00	0.45 um	0.00	0.00	0.00
0.22 um	0.00	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00
0.1 um	0.00	0.00	0.00	0.1 um	0.00	0.00	0.00	0.1 um	0.00	0.00	0.00

## 附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第一季節成功湖- Body length												
	體長 (mm)											
											Average	STDEV
<b>MQ</b>	3.24	3.34	3.46	3.37	2.33	3.13	3.42	3.12	3.17625	0.364454		
<b>1 um</b>	3.93	3.92	3.67	3.56	3.83	3.83	3.82	3.89	3.80625	0.128612		
<b>0.45 um</b>	3.7	3.66	3.72	3.67	3.69	3.7	3.74	3.6	3.685	0.042762		
<b>0.22 um</b>	3.61	3.69	3.66	3.7	3.65	3.62	3.74	3.7	3.67125	0.044219		
<b>0.1 um</b>	3.57	3.76	3.75	3.87	3.84	3.87	3.82	3.84	3.79	0.099714		
第一季節二仁溪- Body length												
	體長 (mm)											
											Average	STDEV
<b>MQ</b>	3.44	3.52	3.45	3.5	3.65	3.44	3.45	3.44	3.48625	0.072887		
<b>1 um</b>	3.62	3.58	3.72	3.22	3.55	3.79	3.47	3.63	3.5725	0.173184		
<b>0.45 um</b>	3.66	3.65	3.71	2.98	3.65	3.68	3.7	3.62	3.58125	0.244683		
<b>0.22 um</b>	3.62	3.52	3.7	3.21	3.6	3.59	3.45	3.62	3.53875	0.152075		
<b>0.1 um</b>	3.61	3.62	3.42	3.59	3.38	3.42	3.55	3.57	3.52	0.097101		
第一季節曾文水庫- Body length												
	體長 (mm)											
											Average	STDEV
<b>MQ</b>	3.41	3.19	3.2	3.25	3.35	3.32	3.34	3.37	3.30375	0.081053		
<b>1 um</b>	3.78	3.36	3.68	3.84	3.82	3.69	3.97	3.88	3.7525	0.185068		
<b>0.45 um</b>	3.53	3.89	3.7	3.88	3.59	3.83	3.91	3.86	3.77375	0.147642		
<b>0.22 um</b>	3.67	3.87	3.66	3.97	3.78	4.01	3.99	3.93	3.86	0.140915		
<b>0.1 um</b>	3.28	3.88	3.72	3.75	3.97	3.66	3.76	3.79	3.72625	0.204376		

附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第二季節成功湖 - Survival rate											
20170904, 成功湖, N=24 (%)			20170911, 成功湖, N=24 (%)			20170918, 成功湖, N=24 (%)					
24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr
MQ	100.00	100.00	95.83	95.83	95.83	MQ	83.33	83.33	83.33	83.33	83.33
1 um	100.00	91.67	87.50	87.50	87.50	1 um	91.67	91.67	91.67	79.17	79.17
0.45 um	95.83	95.83	95.83	91.67	91.67	0.45 um	91.67	91.67	91.67	91.67	91.67
0.22 um	91.67	87.50	87.50	87.50	87.50	0.22 um	95.83	95.83	95.83	95.83	95.83
0.1 um	91.67	91.67	91.67	91.67	91.67	0.1 um	95.83	91.67	91.67	91.67	91.67
第二季節二仁溪 - Survival rate											
20170910, 二仁 N=24 (%)			20170911, 二仁 N=24 (%)			20170912, 二仁 N=24 (%)					
24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr
MQ	95.83333	95.83333	87.5	83.33333	87.5	MQ	79.17	79.17	75.00	75.00	75.00
1 um	91.66667	91.66667	91.66667	87.5	87.5	1 um	91.67	91.67	83.33	79.17	75.00
0.45 um	91.66667	91.66667	91.66667	91.66667	87.5	0.45 um	95.83	95.83	95.83	95.83	95.83
0.22 um	91.66667	91.66667	91.66667	87.5	87.5	0.22 um	87.50	87.50	83.33	83.33	79.17
0.1 um	100	95.83333	95.83333	95.83333	87.5	0.1 um	91.67	91.67	83.33	83.33	83.33
第二季節曾文水庫 - Survival rate											
20170725, 曾文 N=24 (%)			20170801, 曾文 N=24 (%)			20170806, 曾文 N=24 (%)					
24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr	24 Hr	48 Hr	72 Hr
MQ	87.50	83.33	83.33	83.33	83.33	MQ	100.00	100.00	100.00	100.00	87.50
1 um	91.67	91.67	87.50	87.50	87.50	1 um	100.00	100.00	100.00	95.83	95.83
0.45 um	87.50	87.50	83.33	83.33	83.33	0.45 um	95.83	91.67	91.67	91.67	79.17
0.22 um	95.83	95.83	95.83	95.83	95.83	0.22 um	100.00	91.67	91.67	75.00	70.83
0.1 um	83.33	79.17	79.17	79.17	79.17	0.1 um	95.83	95.83	95.83	95.83	79.17

附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第二季節成功湖 - Malformation											
2016/0904 成功湖, 畸型率 n=24				2016/0911 成功湖, 畸型率 n=24							
24 hpf				24 hpf							
yolk edema		Heart	axis	yolk edem		Heart	axis				
MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00				
1 um	0	0.00	0	1 um	8.333333	0.00	0				
0.45 um	0	0.00	0	0.45 um	4.166667	0.00	0				
0.22 um	4.166667	0.00	0	0.22 um	8.333333	0.00	0				
0.1 um	8.333333	0.00	0	0.1 um	4.166667	0.00	4.166667				
第二季節二仁溪 - Malformation											
2016/0910二仁溪, 畸型率 n=24											
24 hpf											
yolk edema		Heart	axis								
MQ	0.00	0.00	0.00								
1 um	8.33	0.00	0.00								
0.45 um	4.17	0.00	4.17								
0.22 um	4.17	0.00	0.00								
0.1 um	12.50	4.17	0.00								
第二季節曾文水庫 - Malformation											
2016/0725 曾文水庫, 畸型率 n=24											
24 hpf											
yolk edema		Heart	axis	yolk edem		Heart	axis	yolk edem		Heart	axis
MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00	MQ	0.00	0.00	0.00
1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00	1 um	0.00	0.00	0.00
0.45 um	0.00	0.00	0.00	0.45 um	0.00	0.00	0.00	0.45 um	0.00	0.00	0.00
0.22 um	0.00	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00	0.22 um	0.00	0.00	0.00
0.1 um	0.00	0.00	0.00	0.1 um	0.00	0.00	0.00	0.1 um	0.00	0.00	0.00



附件、斑馬魚胚胎模式測試第一季節環境水體之奈米微粒其存活率、畸形率、體長

第二季湖水 spike AgNPs - Survival rate									
20171001, 添加奈米銀後過濾, N=30 (%)					20171001, 過濾後添加奈米銀, N=30 (%)				
MQ	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	MQ	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr
AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	96.67
AgNPs 10 µg/ml	13.33	10.00	0.00	0.00	AgNPs 10 µg/ml	13.33	10.00	0.00	0.00
NCKU+AgNPs 1 µg/ml	0.00	0.00	0.00	0.00	NCKU+AgNPs 1 µg/ml	0.00	0.00	0.00	0.00
NCKU+AgNPs 10 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	NCKU+AgNPs 10 µg/ml	93.33	93.33	93.33	93.33
NCKU+AgNPs 1 µg/ml	73.33	63.33	63.33	46.67	NCKU+AgNPs 10 µg/ml	76.67	36.67	33.33	16.67
Er-Jen + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	96.67	96.67	Er-Jen + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00
Er-Jen + AgNPs 10 µg/ml	96.67	96.67	96.67	93.33	Er-Jen + AgNPs 10 µg/ml	23.33	23.33	3.33	0.00
Zengyun Reservoir + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	Zengyun Reservoir + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00
Zengyun Reservoir + AgNPs 10 µg/ml	96.67	26.67	20.00	10.00	Zengyun Reservoir + AgNPs 10 µg/ml	63.33	63.33	20.00	13.33
第二季湖水 spike AgNPs - Survival rate									
20170901, 添加奈米銀後過濾, N=30 (%)					20170901, 過濾後添加奈米銀, N=30 (%)				
MQ	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr	MQ	24 Hr	48 Hr	72 Hr	96 Hr
AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00	AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	100.00
AgNPs 10 µg/ml	36.67	3.33	0.00	0.00	AgNPs 10 µg/ml	36.67	0.00	0.00	0.00
NCKU+AgNPs 1 µg/ml	20.00	0.00	0.00	0.00	NCKU+AgNPs 1 µg/ml	10.00	0.00	0.00	0.00
NCKU+AgNPs 10 µg/ml	96.67	96.67	96.67	96.67	NCKU+AgNPs 10 µg/ml	93.33	93.33	93.33	93.33
NCKU+AgNPs 1 µg/ml	96.67	96.67	96.67	96.67	NCKU+AgNPs 10 µg/ml	76.67	36.67	33.33	16.67
Er-Jen + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	96.67	Er-Jen + AgNPs 1 µg/ml	93.33	93.33	90.00	90.00
Er-Jen + AgNPs 10 µg/ml	100.00	96.67	93.33	93.33	Er-Jen + AgNPs 10 µg/ml	90.00	56.67	53.33	53.33
Zengyun Reservoir + AgNPs 1 µg/ml	100.00	100.00	100.00	96.67	Zengyun Reservoir + AgNPs 1 µg/ml	86.67	83.33	83.33	73.33
Zengyun Reservoir + AgNPs 10 µg/ml	96.67	93.33	86.67	66.67	Zengyun Reservoir + AgNPs 10 µg/ml	46.67	0.00	0.00	0.00

第一季採集水樣物品確認表

採樣用具	數量	採樣前	採樣後	備註
(A)採樣設備				
冰塊	3 桶	√	√	
冰桶	3 桶	√	√	
乳膠手套	1 盒	√	√	
麻布手套	1 雙	√	√	
原子筆	5 支	√	√	
奇異筆	4 支	√	√	
面紙	1 盒	√	√	
MQ 試劑水	1 罐	√	√	
樣品標籤紙	3 包	√	√	
樣品封條	1 盒	√	√	
相機及衛星定位儀 (含電池)	1 組	√	√	
滅菌袋	50 個	√	√	
黑色塑膠袋	1 組	√	√	
丟棄式滴管	1 盒	√	√	
摺疊桌	1 個	√	√	
GH、KH 試劑組	1 組	√	√	
pH 偵測儀	1 組	√	√	
導電度偵測儀	1 組	√	√	
溶氧試劑	1 組	√	√	
NO <sub>2</sub> 、NO <sub>3</sub> 、NH <sub>4</sub> 試 劑組	各 1 組	√	√	
溫度計	2 個	√	√	
餐巾紙	1 包	√	√	
拭鏡紙	1 盒	√	√	
100 mL 燒杯	2 個	√	√	
廢液桶	2 個	√	√	
70%濃硫酸	300 mL	√	√	放在冰桶用

				石臘膜封緊
<b>(B) 採樣容器</b>				
500 mL 血清瓶	5 個	V	V	
滅菌採水袋	50 個	V	V	
<b>(C) 文件及紀錄表</b>				
現場採樣紀錄表	6 張	V	V	
採樣計畫書	1 本	V	V	
<b>(D) 儀器</b>				
Cond 6022 導電度計	1 組	V	V	
GB-5011 酸鹼度測定器	1 組	V	V	
<b>(E) 安全防護裝備</b>				
活性炭防護口罩	1 盒	V	V	
抗酸防護手套	1 盒	V	V	
清點人	施詠笙	OK		
清點時間日期	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 2017.5.7 第一季成功湖</li> <li>◆ 2017.5.8 第一季曾文水庫</li> <li>◆ 2017.5.9 第一季二仁溪</li> </ul>			

第二季採集水樣物品確認表

採樣用具	數量	採樣前	採樣後	備註
(A)採樣設備				
冰塊	3 桶	√	√	
冰桶	3 桶	√	√	
乳膠手套	1 盒	√	√	
麻布手套	1 雙	√	√	
原子筆	5 支	√	√	
奇異筆	4 支	√	√	
面紙	1 盒	√	√	
MQ 試劑水	1 罐	√	√	
樣品標籤紙	3 包	√	√	
樣品封條	1 盒	√	√	
相機及衛星定位儀 (含電池)	1 組	√	√	
滅菌袋	50 個	√	√	
知本委託血清瓶	4 個	√	√	
黑色塑膠袋	1 組	√	√	
丟棄式滴管	1 盒	√	√	
摺疊桌	1 個	√	√	
GH、KH 試劑組	1 組	√	√	
pH 偵測儀	1 組	√	√	
導電度偵測儀	1 組	√	√	
溶氧試劑	1 組	√	√	
NO <sub>2</sub> 、NO <sub>3</sub> 、NH <sub>4</sub> 試 劑組	各 1 組	√	√	
溫度計	2 個	√	√	
餐巾紙	1 包	√	√	
拭鏡紙	1 盒	√	√	
100 mL 燒杯	2 個	√	√	

廢液桶	2 個	V	V	
70%濃硫酸	300 mL	V	V	放在冰桶用石臘膜封緊
<b>(B) 採樣容器</b>				
500 mL 血清瓶	5 個	V	V	
滅菌採水袋	50 個	V	V	
<b>(C) 文件及紀錄表</b>				
現場採樣紀錄表	6 張	V	V	
採樣計畫書	1 本	V	V	
<b>(D) 儀器</b>				
Cond 6022 導電度計	1 組	V	V	
GB-5011 酸鹼度測定器	1 組	V	V	
<b>(E) 安全防護裝備</b>				
活性炭防護口罩	1 盒	V	V	
抗酸防護手套	1 盒	V	V	
清點人	施詠笙	OK		
清點時間日期	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 2017.7.17 第二季成功湖</li> <li>◆ 2017.7.17 第二季曾文水庫</li> <li>◆ 2017.7.17 第二季二仁溪</li> </ul>			

### 河川、湖泊及水庫樣品現場檢測紀錄表

採樣點名稱	採樣位置 (衛星定位座標)	採樣時間	樣品編號	pH			水溫 (°C)	溶氧 (mg/L)	導電度 (µS/cm)
				第1次	第2次	平均			
<b>第一季檢測紀錄</b>									
第一季成功湖	經度:120.217133 緯度:23.000240	2017.5.8 10:23	第一季成功湖	9.3	9.5	9.4	27	9	440
第二季成功湖	經度:120.217133 緯度:23.000240	2017.7.18 7:34	第二季成功湖	8.4	8.4	8.4	29.5	5.5	413
台灣嘉義市大埔 鄉(第一季文水庫)	經度:120.5391 緯度:23.2508	2017.5.9 11:30	第一季文水庫	8.5	8.6	8.5	29	5	296
<b>第二季檢測紀錄</b>									
台灣嘉義市大埔 鄉(第二季文水庫)	經度:120.5391 緯度:23.2508	2017.7.18 11:33	第二季文水庫	8.7	8.7	8.7	33	5.5	216
第一季二仁溪	經度:120.3609 緯度:22.8769	2017.5.10 11:32	第一季二仁溪	8.6	8.6	8.6	30	2	1042
第二季二仁溪(崇 德橋)	經度:120.3618470 緯度:22.8756770	2017.7.18 16:40	第二季二仁溪	8.0	8.0	8.0	31	2.5	953

記錄人： \_\_\_\_\_ 施詠笙 \_\_\_\_\_

採樣小組負責人： \_\_\_\_\_ 施詠笙 \_\_\_\_\_

組長： \_\_\_\_\_ 陳姿羽 \_\_\_\_\_