

行政院環境保護署

103 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究模場試驗專案

應用雙色冷光提升戴奧辛生物快速篩選技術於土壤污染模場

試驗先行評估計畫

期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：國立屏東科技大學／環境工程與科學系

計畫主持人：趙浩然 教授

計畫執行期間：102年11月25日起至

103年11月24日

中 華 民 國 103 年 11 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

計畫成果自評表

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐ 已發表____篇； ☐ 未發表之文稿____篇； ☒ 撰寫中__1__篇； ☐ 無

專利：☐ 已獲得____件； ☐ 申請中____件； ☒ 無

技轉：☐ 已技轉； ☐ 洽談中； ☒ 無

其他：(100 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500 字為限）

本年度計畫開發之新型 Ad-(dual)DR bioassay 成果符合本團隊預期之效益。在液態標準品、CRM 環境基質標準品與真實土壤與底泥樣品測試，均能準確地偵測戴奧辛化合物。Ad-(dual)DR bioassay 僅需低病毒消耗量(MOI=2)，在整體穩定度與回推能力即可相似於 Ad-(6X)DR bioassay，降低操作人員種殖細胞與感染病毒之不穩定性，推廣至民間實驗室更為便利與快速。本研究數據雖然在低濃度樣本 RSD 值仍未達到我國制訂之 NIEA S901.60B 規範，但已符合美國 USEPA 4425(RSD < 20%)與日本環保署國家標準法之標準(RSD < 30%)。未來，也會以此研究成果為基礎，發展第五代細胞株將 renilla luciferase gene 更接近下游基因(down-stream)，使戴奧辛誘導產生之干擾降至最低，預期將比第四代 Ad-(dual)DR bioassay 更靈敏與穩定，大幅度提升本土化生物快速篩檢戴奧辛技術。

中文摘要

本計畫以多方合作的方式進行土壤污染模場試驗前的評估，在本團隊開發之 Ad-(6X)DR bioassay (DRE-H4IIE 細胞)的基礎上，由國家衛生研究院開發雙色冷光 Ad-(dual)DR bioassay，屏東科技大學負責雙色冷光 Ad-(dual)DR bioassay 之生物快篩檢測戴奧辛標準品與環境樣品，以及後續的修正與改進工作，藉此增進雙色冷光 DRE-(dual)H4IIE 細胞的穩定性與敏感度，以開發快速、有效而低成本的本土戴奧辛生物篩檢技術。目前的研究成果顯示，Ad-(dual)DR bioassay 病毒的 multiplicity of infection (MOI)為 2 時為本研究最佳實驗條件，2,3,7,8-TCDD 檢量線最佳回推區間為 4 ~ 120 pM (RSD = 4 - 22%)，EC₅₀ 為 54.3 至 55.8 pM。Ad-(dual)DR bioassay 測試 25 件次環境基質標準品 (Certified Reference Materials, CRM)，其測值與 CRM 濃度 (466 pg-WHO₁₉₉₈-TEQ/g d.w.) 值相比時高了 1.25-1.61 倍。19 件次真實土壤與底泥樣本測試與 HRGC/HRMS 平均比值為 2.59 倍，兩者具有良好之關聯性 ($R^2=0.957$, $p<0.001$) 且無偽陽性之問題。40 件次樣本與 XDS-CALUX 比對平均比值為 0.974 倍，參照國際文獻 XDS-CALUX 與 HRGC/HRMS 平均比值約為 1.5-2.6 倍，顯示本研究樣本回推濃度與 HRGC/HRMS 相似。本研究所開發之 Ad-(dual)DR bioassay 病毒使用量低，在中、高濃度樣本穩定度與回推能力之表現良好，雖無法完全改善低濃度樣本穩定度表現，但比照現行規範濃度 1000 ng TEQ/kg d.w. 是非常適合推廣與應用的。

Abstract

This project is a multi-collaborated work to evaluate soil dioxins contamination before the pilot study. According to the basis of previously establishing Ad-(6X)DR bioassay (DRE-H4IIE cells) by our research team, the National Health Research Institutes develops dual luciferase detection system for detecting dioxin like compounds, namely Ad-(dual)DR bioassay, and the team members in National Pingtung University of Science and Technology test the dual system for application in detection of soil dioxins contamination and modify this system for the future dioxins survey studies. We hope our collaboration elevate the stability and sensitivity of dioxins measurements in Ad-(dual)DR bioassay to accesses a fast-screen, efficient, low-cost, and local biotechnique for AhR reporter gene assay. The current result show that the optimum multiplicity of infection (MOI) for Ad-(dual)DR bioassay is 2. The best period of the 2,3,7,8-TCDD standard curve for the Ad-(dual)DR bioassay is between 4 and 120 pM (relative standard deviation (RSD) =4-22%. The values of EC₅₀ in Ad-(dual)DR bioassay with MOI of 2 are ranged from 54.3 to 55.8 pM. Twenty five Certified Reference Materials (CRM) samples are examined by Ad-(dual)DR bioassay and their measurements have 1.25-1.61 folds higher than those are measured by HRGC/HRMS (466 pg-WHO₁₉₉₈-TEQ/g d.w.). The mean value measured by Ad-(dual)DR bioassay was 2.59 times higher than that by HRGC/HRMS in soil samples. The good correlation ($R^2= 0.957$, $p<0.001$) was found between Ad-(dual)DR bioassay and HRGC/HRMS without false negative results. Our ratio of Ad-(dual)DR bioassay v.s. HRGC/HRMS was similar to those of XDS-CALUX v.s. HRGC/HRMS in the previous studies (Ratio=1.5-2.6). Although the small amounts of the recombinant adenovirus were used in the present study, the performance of the TCDD standard curves was robust and stable in the higher dioxin contaminated soil samples. The stability of low dioxin concentrations in soil samples was varied. It is suitable for application and development of Ad-(dual)DR bioassay in soil surveillance based on the current dioxins standard (1000 ng TEQ/kg d.w.) for the dioxin contaminated soils.

1. 前言

1.1 研究背景

近年國內土壤遭戴奧辛污染的環境議題，影響國人日常生活甚深。彙整歷年戴奧辛污染事件，有逐年擴大的趨勢，且當戴奧辛污染問題發生時，往往產生數量龐大且無法即時由傳統化學分析方法-高解析氣相層析質譜儀(high resolution gas chromatography/ high resolution mass spectrometry, HRGC/HRMS)分析完成；再者HRGC/HRMS分析所耗的時間及經濟成本相當巨大，若遭遇污染程度嚴重之樣品，可能對HRGC/HRMS造成嚴重的記憶效應。戴奧辛造成的人體生理毒性範圍相當廣泛，大致上可分為皮膚毒性、肝臟毒性、免疫毒性、生殖毒性與致癌性等。當戴奧辛可透過食物鏈由土壤進入人體中，會產生類似荷爾蒙的作用而形成「假性荷爾蒙」效應，由此干擾內分泌系統的調控；一般而言，檢測戴奧辛的方法以HRGC/HRMS為主，由於此項化學分析技術所需之成本甚高且耗時過長，在分析樣品日益增加的今日，建立快速、有效且低成本的檢測方法(如生物檢測)有其迫切性與需求性。

本研究團隊積極參與建立國內本土戴奧辛生物快速篩選系統已經超過七年，經過環檢所與土基會大力的支持下已有明確的成果，首先為了規避國外生技公司如BioDetection System b.v..(BDS)與Xenobiotic Detection System Inc.(XDS)所建立的採用螢火蟲冷光基因的穩定細胞株偵測系統(Chemically Activated Luciferase gene eXpress, CALUX)，本團隊國家衛生研究院環境衛生與職業醫學組鄒粹軍(博士)研究員採用腺病毒螢火蟲冷光基因感染肝腫瘤細胞系統(DRE-H4IIE cells, Ad-DR bioassay)，除了Ad-DR bioassay偵測戴奧辛的能力已經接近商化DR-CALUX[®] (荷蘭BDS)或XDS-CALUX[®](美國XDS)的系統外，同時也在2011年9月22日獲得美國專利(Patent number: US 2011/0229904 A1)。雖然2011年時環檢所已經公告「土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法—冷光酵素報導基因法(NIEA S901.60B)」，然而DR-CALUX[®]或XDS-CALUX[®]專利費用高，在成本考量與經濟效益上皆無法推廣至檢測業使用，本土化生物篩檢技術(如Ad-DR bioassay)能降低業者的營運成本且能帶動另一波環境綠色檢測技術的發展，創造檢測業者雙贏的契機。

雖然Ad-DR bioassay已獲得美國專利，但仍有不足之處。表3-1為本團隊歷年所開發的細胞株名稱。由最初的人類肝腫瘤細胞株，但因感度不足以應付低濃度的環境檢體，而進入以大鼠肝腫瘤細胞株為主的第2代後，在以較

低的二氧化碳培養箱暴露溫度與添加促癌劑PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate)，皆可有效增進各代細胞株的性能(Chao et al., 2012)。

表1-1、國家衛生研究院開發之本土冷光酵素戴奧辛快速篩檢法歷代名稱

	名稱 (細胞株)
第 1 代	Huh7-DRE-Luc bioassay (Huh7-DRE-Luc cells, 人類肝腫瘤細胞株)
第 2 代	Ad-DR bioassay (DRE-H4IIE cells, 大鼠肝腫瘤細胞株)
第 3 代	Ad-(6X)DRbioassay (DRE-(6X)H4IIE cells, 大鼠肝腫瘤細胞株)
第 4 代	Ad-(dual)DR bioassay (DRE-(dual)H4IIE cells, 大鼠肝腫瘤細胞株)

以下將介紹本團隊於過去執行土基會委託環檢所代管計畫之簡略成果。98年度利用經轉殖戴奧辛冷光反應單元進入日本52歲男性肝腫瘤細胞株：Huh7-DRE-Luc細胞株，進行國內AhR reporter gene assay相關技術之研發，此法稱為Huh7-DRE-Luc bioassay，屬於本團隊所開發出之第一代細胞株，並進行2,3,7,8-TCDD標準品、Certificate Reference Materials (CRM)粉末、混合標準品和土壤、底泥、煙道氣實際樣品測試，研究結果為Huh7-DRE-Luc細胞株適用於高污染場址的快速篩選，並且對高毒性當量的類戴奧辛化合物擁有高於啮齒類動物細胞株的戴奧辛毒性耐受度，其與HRGC/HRMS測值之決定係數(R^2)為0.6~0.9之間(Chao et al., 2011)。

本團隊於99年度以Huh7-DRE-Luc bioassay為基礎，利用腺病毒載體(Ad-(4X)DRE-Luc)感染大鼠肝腫瘤細胞株細胞株(H4IIE)，成功創建Ad-DR bioassay戴奧辛生物快篩系統，本系統是為第二代細胞，該細胞暴露於較低戴奧辛毒性當量濃度時，仍擁有較Huh-7-DRE-Luc細胞株更加敏感的戴奧辛偵測能力，唯獨在穩定性的評估結果仍未達完善，但對以快篩需求所建置的AhR reporter gene assay相關技術來說，已成為戴奧辛快篩選項之一。該年度計畫結果如下：(1)以Hill equation公式配適2,3,7,8-TCDD檢量線的 R^2 均可達到0.995以上；(2)檢測環境基質CRM參考標準品、土壤底泥樣品、生物樣品，除了在環境樣品擁有較大偽陽性的比值之外，在CRM和生物樣品僅以2倍與8倍高於HRGC/HRMS測值，因此若以「篩檢樣品」的定位來看，Ad-DR bioassay仍可準確評估樣品中類戴奧辛化合物之濃度高低排序。(Lin et al.,

2013)

100年度本團隊重新改殖載體內的戴奧辛冷光反應單元為6倍(Ad-6XDRE-TATA-Luc)，並感染H4IIE大鼠肝腫瘤細胞株，以求建立第三代的高感度戴奧辛生物偵測細胞。第三代細胞是目前最穩定的細胞，經本研究室與環境檢驗所的測試後，得知Ad-(6X)DR bioassay對於戴奧辛的偵測效果並不遜於DR-CALUX[®]或XDS-CALUX[®]，已經開始進行商品化與技術轉移的工作，Ad-(6X)DR bioassay雖有商化的機會與可能性，但Ad-(6X)DR bioassay所面臨最大的問題是操作者的熟練度，操作者的技術容易影響Ad-(6X)DR bioassay偵測戴奧辛化合物的成敗。另一方面，本研究團隊改變第一代細胞暴露戴奧辛物質時的二氧化碳培養箱溫度(從37°C降至35 °C)與添加促癌劑PMA藥物進入細胞培養液中，可提高相對於控制組(37°C且不添加任何藥物)的相對冷光數值(relative luciferase units, RLU)，並已發表於期刊論文上。使得本土戴奧辛快篩系統，朝定量性能更加邁進一步(Chao et al., 2012)。

雖然在每年的執行過程皆可增進本土生物快篩戴奧辛系統的性能，但在穩定性與敏感度，都面臨極大的挑戰，雖然第三代細胞Ad-(6X)DR bioassay已達商業化的水準，但是在友善使用的方面仍有很大的改善空間，因此本團隊將藉由開發雙色冷光系統建構新的偵測方法(Ad-(dual)DR bioassay)，期待這個Ad-(dual)DR bioassay能建立有效、容易的操作系統，也能準確地偵測戴奧辛化合物。

1.2 研究目的

技術升級，提高附加價值是本研究主要目的。Ad-DR bioassay經過兩年多的測試，證實可快速篩檢環境樣品。它相對於化學分析方法，具有快速且廉價的優點。然而目前民間的戴奧辛檢測大部是化學背景的專業人士進行，因此在推廣Ad-DR bioassay時，生物技術的操作成為必須重新學習的門檻。為了增加Ad-DR bioassay的操作便利性，本研究目的將雙色冷光技術融入Ad-DR bioassay中(Ad-(dual)DR bioassay)，期望操作者在生澀的實驗操作技術下，Ad-(dual)DR bioassay仍可表現出快篩應有的穩定性與敏感度。計畫擬以多方合作的方式，以本團隊開發之Ad-(6X)DR bioassay (DRE-(6X)H4IIE細胞)為基礎，由國家衛生研究院環境衛生與職業醫學研究組(鄒粹軍博士)開發雙色冷光Ad-(dual)DR bioassay，屏東科技大學環境工程與科學系(趙浩然博

士)負責Ad-(dual)DR bioassay之生物快篩檢測戴奧辛標準品與環境樣品，屏東科技大學國際學院(林雅芳博士)負責Ad-(dual)DR bioassay的修正與顧問工作，藉此增進DRE-(dual)H4IIE細胞的穩定性與敏感度，以開發快速、有效而低成本的本土戴奧辛生物篩檢技術，並推廣至環境檢測機構及學術單位。此研究結果將有效降低執行戴奧辛監測之時間及經濟成本。除了戴奧辛標準品與品保品管測試之外，本計畫亦將使用此系統進行真實土壤污染樣品篩測，針對不同濃度的土壤進行分析，更全面性的評估Ad-(dual)DR bioassay於土壤污染模場之適用性。

應用雙色冷光提升戴奧辛生物快速篩選技術
於土壤污染模場試驗先行評估計畫

2. 文獻回顧

國內污染場址中戴奧辛污染是國人極為關切之環境議題且戴奧辛對於自然環境及人類健康之毒害日益受到重視，戴奧辛造成的毒性反應範圍相當廣泛，大致上可分為皮膚毒性、肝臟毒性、免疫毒性、生殖毒性與致癌性等，當戴奧辛透過食物鏈進入人體中，會產生類似荷爾蒙的作用而形成「假性荷爾蒙」效應，由此干擾內分泌系統的調控。當環保單位進行稽查工作時，化學分析所耗的時間長及經濟成本龐大。在過去十多年來，檢測戴奧辛的方法以化學分析為主，一般而言，以HRGC/HRMS來進行分析，由於此項化學分析技術所需之成本甚高且耗時過長，在分析樣品日益增加的現代必需建立先篩後檢的制度，在此觀念下，低成本的篩檢技術可協助減少HRGC/HRMS檢測量。本土生物快速篩檢戴奧辛技術已於2010年合乎生物篩檢戴奧辛之規範，2013年證實敏感度與穩定度仍與商業化細胞株(BDS-與XDS-CALUX細胞株)相同，但生物實驗技巧上的失誤常導致Ad-DR bioassay穩定度與敏感度不足，無法表現最佳篩檢效率達成節約檢測成本的效果，故再次提升本土戴奧辛生物快速篩選技術有必要性。本團隊將參照國、內外相關文獻，整理較可行之改善方式，期望提升本土化戴奧辛生物快速篩選技術之效能。

2.1 戴奧辛的物理化學性質

戴奧辛是一個或兩個氧原子聯結一對苯環類化合物，其化學結構如圖2-1所示，為約210種不同的化合物之總稱，包括75種多氯二聯苯戴奧辛(polychlormated dibenzo-p-dioxin, PCDDs)及135種多氯二聯苯呋喃(polychlormated dibenzofuran, PCDFs)。表2-1列出PCDD/Fs之物化性質。由其化學結構與物化性質，可知PCDD/Fs是非常穩定的化合物，親脂性(lipophilic)，極難溶於水，在25℃水中之溶解度約為 $7.4 \times 10^{-8} \sim 4.2 \times 10^{-4}$ mg/L，水溶性隨鍵結氯個數的增加而減少。PCDD/Fs在常溫下為無色固體，熔點隨所含氯原子數的不同從110℃至330℃不等。低結合氯(三氯以下)之PCDD/Fs揮發性較高，但揮發性亦隨鍵結的氯數增加而降低。由於PCDD/Fs具有高親脂性，進入人體後即積存於脂肪當中，此外，與泥土或其他顆粒物質之間也容易形成強鍵，一旦造成污染，極不容易清除。在化學穩定性方面，由於PCDD/Fs之化學性質相當穩定，且其生成屬放熱反應，因此即使在700℃之焚化爐內，僅能對其做有限度的破壞。其他相關性質包括：1. PCDD/Fs對酸

鹼的穩定性極高。2.低結合氯數的PCDD/Fs性質較不穩定，當其暴露於紫外光照射下，會吸收輻射能進行光分解。3.存在於土壤中的PCDD/Fs，其分解速率是以一階反應的型態進行。

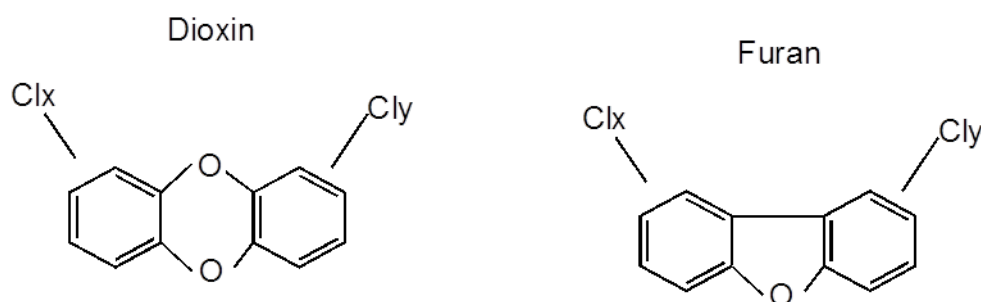


圖 2-1、戴奧辛結構

表2-1、戴奧辛之物化性質

PCDD/Fs	蒸汽壓 (mmHg at 25°C)	Log Kow	溶解度 (mg/L at 25°C)	Henry 常數
TCDD	8.1×10^{-7}	6.4	3.5×10^{-4}	1.35×10^{-3}
PeCDD	7.3×10^{-10}	6.6	1.2×10^{-4}	1.07×10^{-4}
HxCDD	5.9×10^{-11}	7.3	4.4×10^{-6}	1.83×10^{-3}
HpCDD	3.2×10^{-11}	8.0	2.4×10^{-6}	5.14×10^{-4}
OCDD	8.3×10^{-13}	8.2	7.4×10^{-8}	2.76×10^{-4}
TCDF	2.5×10^{-8}	6.2	4.2×10^{-4}	6.06×10^{-4}
PeCDF	2.7×10^{-9}	6.4	2.4×10^{-4}	2.04×10^{-4}
HxCDF	2.8×10^{-10}	7.0	1.3×10^{-5}	5.87×10^{-4}
HpCDF	9.9×10^{-11}	7.9	1.4×10^{-6}	5.76×10^{-4}
OCDF	3.8×10^{-12}	8.8	1.4×10^{-6}	4.04×10^{-4}

2.2 戴奧辛於環境流佈

2.2.1 土壤

土壤環境中現有的戴奧辛含量，可直接反應大氣落塵及乾、溼沉降，及

過去是否有施用有機氯農藥等造成的累積，更可以了解近年來受各種可能散佈戴奧辛的污染源(如焚化爐、集塵灰等)。台灣南部地區如二仁溪畔自50年代後期起即有廢五金回收業者以露天燃燒方式回收金屬，至今當地之土壤、空氣及水體仍受到多氯聯苯及戴奧辛之污染。土壤中之戴奧辛不易受微生物分解，且極難溶於水，估計其半衰期約為25年到100年。在土壤表面3 mm的戴奧辛會慢慢地被陽光分解掉，但是在這表面下的土壤會被緊密吸附在土壤層中，不容易轉移它處(Paustenbach et al., 1992)。依據環檢所民國89年完成本省中部某土壤剖面中戴奧辛含量變化，得到土中戴奧辛之分佈：約在0~20公分約占總含量的80%以上，其中50~80%的含量均集中在1~10公分內，更確認土壤戴奧辛大部份集中在表土範圍內的假設，我國在2001年11月21日公告土壤戴奧辛類化合物的管制標準為1000 pg I-TEQ/g d.w. (環保署，2011)。台灣各採樣位置之土壤中戴奧辛濃度值，依性質可分為焚化爐周界、農田水利會工作站、煉鋼廠周界、植物園保留區及水利會工作站。台灣自2000年起即開始針對各地區土壤中戴奧辛濃度進行調查，2000年至2001年間台北縣樹林、宜蘭、北基、桃園、石門、新竹、南投、彰化等採樣站土壤中戴奧辛濃度值，其範圍0.28~15.2 pg I-TEQ/g d.w.，平均值為3.87 pg I-TEQ/g d.w.；2002年從高雄市小港區、台東市、台中市、嘉義市、高雄市中區、高雄市南區、台北新莊、桃園觀音、嘉義市等採樣站得到土壤中戴奧辛濃度範圍值為0.154~180 pg I-TEQ/g d.w.，平均值為6.64 pg I-TEQ/g d.w.；2003至2005年間從新竹市、高雄縣仁武、台中縣后里、台中縣烏日、高雄市小港區、雲林縣林內、台東市、基隆市、宜蘭縣利澤、高雄縣岡山、屏東縣崁頂等採樣站得到土壤中戴奧辛濃度值，其範圍是0.137~10.6 pg I-TEQ/g d.w.，平均值為2.46 pg I-TEQ/g d.w. (鍾仁棋，2002)。比較不同地區及其年份調查報告，顯示台灣南部地區檢測出之戴奧辛濃度較高於民國2001年對中北部檢測46個樣品之平均值3.87 pg I-TEQ/g d.w.(鍾仁棋、潘復華，2002)。

2.2.2 底泥

湖泊、河川和海洋底部的底泥是另一個環境中主要的戴奧辛儲存場。戴奧辛自空氣中沉降或經雨水沖洗下來進入水體，像紙漿和造紙廠等工業浸漏或直接排入水體。因戴奧辛不易由水中揮發到空氣中，而且戴奧辛光解緩慢，所以戴奧辛進入水體，就會附著在脂溶性物質和有機物上，而最終沉入水底。人為活動有可能擾動這些底泥會使戴奧辛再次進入環境中，譬如疏濬港灣。戴奧辛在其沉降的底泥中，會被生物所吸食而進入食物鏈，因此水系

食物鏈的戴奧辛濃度就愈來愈高(Gibbs, 1995)。目前國內、外河川底泥戴奧辛調查數據亦相當缺乏，僅有日本進行有系統的監測。日本1998年全國河川底泥調查205處的數值其平均值為6.8 pg I-TEQ/g d.w. (範圍由未檢出至230 pg I-TEQ/g d.w.)；隔年日本環境廳再對十條污染較嚴重河川底泥戴奧辛進行調查，其110個樣品的平均濃度達到21 pg I-TEQ/g d.w.，平均值高於10 pg I-TEQ/g d.w.的有四條，其中又以埼玉縣綾瀨川為最高，底泥戴奧辛平均濃度94 pg I-TEQ/g d.w.(9.0~720 pg I-TEQ/g d.w.)；美國1996年全國平均值為5.3 pg I-TEQ/g d.w. (範圍自小於1~20 pg I-TEQ/g d.w.)，瑞典河、湖底泥平均值為19.5 pg I-TEQ/g d.w. (範圍由11.0至207 pg I-TEQ/g d.w.)，歐盟國家河川底泥的代表性測值由小於1至200 pg I-TEQ/g d.w.不等。台灣環境檢驗所調查台灣南部地區兩條主要河川(高屏溪與二仁溪)底泥樣本中戴奧辛總毒性當量，高屏溪底泥樣本總毒性當量範圍為0.502~1.69 pg-TEQ/g d.w.二仁溪的部分則為0.39~77.4 pg-TEQ/g d.w.，該結果也顯示高屏溪污染情況應屬農業污染為主，其產生之戴奧辛得主因可能來自於使用有機氯農藥、燃燒含氯的有機廢棄物等，而二仁溪中上游與傳統農業污染程度差不多，但在下游部分濃度偏高主要與早期廢五金工廠處理廢電纜，未經適當的處理程序長期累積所導致(潘復華，2002)；紀凱獻博士於97年度專案計畫調查2008年翡翠水庫上、中、下游四季(春、夏、秋、冬季)表層底泥中戴奧辛濃度，顯示翡翠水庫上游(黃檗皮寮、灣潭)與中游(永安)戴奧辛濃度分佈趨勢為春季>夏季>秋季>冬季，但在下游(火燒樟)水域表層戴奧辛濃度則為冬季>春季>秋季>夏季。三個流域底泥濃度範圍介於143~1098 ng/kg d.w.戴奧辛含量均遠低於環保署所公告之底泥戴奧辛含量(草案)(6.8 pg I-TEQ/g d.w.)。台灣地區各河川的背景濃度顯示環境中雖普遍存有戴奧辛，惟與各國比較屬較低者，此亦反應各國工業活動的相對強度(行政院環境保護署檢驗所，2001)。

2.2.3 廢棄物

2006年台灣地區廢水戴奧辛排放量為0.447 g I-TEQ/year (杜敬民，2008)，針對特定事業廢水處理場中戴奧辛移跡變化與質量平衡研究，發現同一家工廠廢水處理過程中廢水戴奧辛同源物濃度的分布型態無明顯變化，與污泥戴奧辛同源物濃度的分布極為相似，顯示戴奧辛自水體移轉至污泥中(杜敬民，2008)。70年代初期，台灣各地普遍發生垃圾問題，政府遂訂定以焚化處理為主的垃圾處理政策，陸續興建大型焚化廠。根據相關文獻顯示焚化爐為空氣中戴奧辛的主要來源，因此自民國88年底，行政院環境保護

署為建立垃圾焚化廠對周圍環境之影響，對各廠附近14個環境土壤樣品所做的監測結果：木柵焚化爐0.020~2.72（平均值=0.546）pg WHO-TEQ/g、新店焚化爐0.003~58.9（平均值=11.9）pg WHO-TEQ/g和桃南焚化爐0.168~12.7（平均值=3.15）pg WHO-TEQ/g（鍾仁棋，2002）。

2.2.4 生物體

依據衛生署於民國92年所公佈之食品中戴奧辛背景值調查報告結果，顯示在台灣地區生物體內的戴奧辛含量以魚貝類的濃度較高，其平均值為0.184 pg WHO-TEQ/g fresh weight（不含PCBs），次高濃度為肉類，其平均值為1.03 pg WHO-TEQ/g fat（含PCBs）。魚貝類以海水魚（平均值=0.276 pg WHO-TEQ/g fresh weight）（不含PCBs）及淡水魚（平均值=0.205 pg WHO-TEQ/g fresh weight）的戴奧辛數值（不含PCBs）較高，肉類則以鵝肉較高（平均值=2.98 pg WHO-TEQ/g fat）。上述結果顯示，鵝肉濃度超過95年3月1日起開始適用之食品中戴奧辛預警值之標準（2 pg WHO-TEQ/g fat），但魚貝類未超過該法規標準值4 pg WHO-TEQ/g fresh weight。Wang et al., (2009)調查台灣南部傳統市場59種食物中戴奧辛濃度，其中高於規範預警濃度以魚貝類為主，石斑魚、蝦、牡蠣與蛤濃度分別為3.6、9.19、10.7、9.77 pg WHO-TEQ/g，其餘55種食物均低於規範標準。Lin et al., (2012)分析台灣地區不同飼養環境生產之雞蛋中戴奧辛濃度，放養雞蛋（free-range eggs）濃度為1.53 pg WHO₂₀₀₅-TEQ/g lipid 高於籠養雞蛋（caged eggs）0.274pg WHO₂₀₀₅-TEQ/g lipid。雖然蛋類濃度並未高於規範標準，但Chen et al., (2010)調查文獻指出，每個月食用鴨蛋頻率(>18 duck egg/month)較高者血液中戴奧辛濃度為32.6 ± 13.9pg WHO₂₀₀₅-TEQ/g lipid高於一般族群(18.6 ± 8.40pg WHO₂₀₀₅-TEQ/g lipid)，部分戴奧辛同構物達到顯著差異，仍是不可忽視之問題。台灣地區孕婦體內戴奧辛濃度也受到了關注，Chao et al., (2004)調查了台灣中部地區36件次母乳中戴奧辛濃度，母親年齡高於29歲之族群母乳中平均濃度為14.5 pg-TEQ/g lipid高於小於29歲母親(10.5 pg-TEQ/g lipid)；Chao et al., (2007)分析119位孕婦胎盤內戴奧辛濃度中位數為10.2 pg WHO-TEQ/g lipid，該研究也表明了胎盤內較高的戴奧辛濃度可能會改變孕婦月經週期之特性。

2.2.5 植物

半揮發性有機物質 (Semi-volatile organic chemicals, SVOCs)(例如

PCDD/Fs、PAHs、PCBs 等)在環境傳輸途徑中，從排放源經空氣傳輸進入環境後，最終均可能累積在人體內，而中間媒介的主要途徑即是透過植物體或動物體的吸附或吸收作用(Lorber et al., 1998；Welsch-Pausch et al.,1995；Wagrowski and Hites, 1997)。植物暴露戴奧辛的途徑可經由氣相或固相含戴奧辛之顆粒吸收或吸附於植物葉片內，也可能會經由含戴奧辛之土壤及地下水透過根部吸收作用進入植物體內。

對於植物中PCDD/Fs 分布情況方面，在歐洲地區由於所在位置及氣候之差異使植物分布上以草類植物最為廣泛，因此針對草類植物所含PCDD/Fs進行較多相關研究，在西班牙之Schuhmacher 等人所做的研究顯示焚化廠周界地區之草類PCDD/Fs 分布多以HpCDD 及OCDD 為主(Schuhmacher et al., 2002)，而在英國對 Welsh ray grass所調查之PCDD/Fs含量分布則亦有相似之情形，以HpCDD/Fs及OCDD為其主要之PCDD/Fs同族物(Kjeller et al., 1996; Jones et al., 1997)；若在亞洲地區之韓國及日本則因其地處緯度較高之地區，分布較為廣泛的植物以針葉類植物如松樹、杉樹為主，因此若要對焚化廠周界進行植物內 PCDD/Fs濃度調查則多以針葉進行研究，在日本所做的研究顯示其所採集之針葉內所含PCDD/Fs 以TCDD/Fs 及PeCDD/Fs 等低氯數鍵結之PCDD/Fs為主(Nakao et al., 1998)，而1999年在韓國所做之針葉內PCDD/Fs 濃度調查研究則發現以HxCDD、PeCDF、HxCDF及HpCDF等同族物佔較高之比例，與當地採集之空氣比較則顯示出類似之分布情形(Ok et al., 2002)。

國內不同地區(木柵、內湖、北投)焚化廠周界榕樹葉片中PCDD/Fs毒性當量含量比較如下：木柵焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為10個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為0.656 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為83.3%、木柵焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為20個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為1.19 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為39.6%；內湖焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為9個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為0.971 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為47.9%、內湖焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為14個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為1.41 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為40.8%；北投焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為9個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為1.50 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為49.7%、北投焚化廠周界榕樹葉片(樣品數為14個)中PCDD/Fs之毒性當量含量為1.69 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD值為44.4%；2005年到2006年由環保署檢測竹南、利澤、永康、桃南、崁頂、岡山等焚化廠周界榕樹葉片中PCDD/Fs毒性當量含量如下：竹

南、利澤、永康、桃南等焚化廠周界榕樹葉片(8個樣品數)中PCDD/Fs毒性當量含量分別為1.69、1.75、2.41、8.04 pg I-TEQ/g d.w.；而崁頂及岡山焚化廠周界榕樹葉片(14個樣本數)中PCDD/Fs毒性當量含量分別為2.07、3.91 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD為125%、58.8%；2009年由嘉義市環保局檢測焚化廠周界榕樹葉片中PCDD/Fs毒性當量含量為2.18 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD為44.5%；2009年由台中縣環保局檢測其焚化廠周界榕樹葉片中PCDD/Fs毒性當量含量為2.65 pg I-TEQ/g d.w.，其RSD為47.4%。

2.3 戴奧辛的毒性效應

PCDD/Fs為已知毒性最強化合物之一，美國環保署於1994年（US EPA, 1994a; 1994b）所發表之報告即明白指出PCDD/Fs對大眾健康為一嚴重威脅。美國環保署之報告亦證實PCDD/Fs為對人類致癌之物質，PCDD/Fs依氯原子數目之不同而有不同之毒性強度，其中具有1至3個氯原子者較不具毒性，剩餘具4至8個氯原子之136種同質化合物中，僅2,3,7,8-TCDD於1997年被世界衛生組織（WHO）列為對人類之致癌性物質，其證據來自動物實驗（WHO, 1987）。

一般表示PCDD/Fs的毒性時經常引用毒性當量(Toxic Equivalency, TEQ)的觀念，根據芳香族碳氫化合物接受器(Aryl-hydrocarbon receptor, AhR)對各單一化合物的鍵結力大小，並加入細胞、動物實驗且考慮人體非受迫性暴露戴奧辛而產生的毒性反應等研究，而給各戴奧辛化合物定一個毒性當量係數，並以此方法來評估其總毒性。毒性大小通常以毒性當量因子(Toxic Equivalent Factor, TEF)來表示，即將每一種PCDDs及PCDFs與2,3,7,8-TCDD毒性(TEF=1.0)相比，得到之比值即為該戴奧辛的TEF值，TEF值為假設(1)所有戴奧辛類化合物都只經由芳香族碳氫化合物接受器而造成毒性作用(2)化合物之毒性總合為各別化合物毒性相加成的結果(3)只使用TEF來推測大部分之毒性作用(許菁芳，2000)。表2-2為常採用之PCDD/Fs毒性當量因子(Bhavsar et al., 2008)。在分析測定個別的PCDD及PCDF濃度後與TEF相乘，得出之值稱為TEQ，樣品的毒性大小即為樣品中所有TEQs之總和。但因其他的PCDD/Fs毒性遠小於2,3,7,8-TCDD，所以國際癌症研究局將其歸類為第三類，即不可歸類為其人類致癌性（陳建民，1996；李俊賢，1999）。世界衛生組織建議每日可接受的PCDD/Fs濃度(Tolerable Daily Intake)為1~4 pg

WHO-TEQ/kg body weight/day (Leeuwen et al., 2000) 。

表2-2、戴奧辛的毒性當量因子(Toxic Equivalent Factor, TEF)

化合物	FQO (德國衛生部採用)	Nordie (北歐各國採用)	I-TEF ^a (International TEF)	WHO-2005 ^b (世界衛生組織採用)
2,3,7,8-TeCDD	1.0	1.0	1.0	1.0
1,2,3,7,8-PeCDD	0.1	0.5	0.5	1.0
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01	0.01	0.01
OCDD	0.001	0.001	0.001	0.0003
2,3,7,8-TeCDF	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.1	0.01	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.1	0.5	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01	0.01	0.01
OCDF	0.001	0.001	0.001	0.0003

^aWittsiepe et al., 2007

^bVan der Berg et al., 2006

2.4 戴奧辛對人體健康及環境的可能影響

人類受到戴奧辛的暴露主要有食入、吸入、皮膚接觸，但除了職業暴露以外超過95%的暴露來源為經由食物鏈攝入(Parzefall, 2002)，僅有約2.2%透過空氣經呼吸而進入人體(US EPA, 2000)，大部分的戴奧辛類化合物皆儲存於脂肪中，如2,3,7,8-TCDD人體內之含量大約有90%儲存在脂肪組織中(Poiger et al., 1986)，在人體中不易被代謝，曾有學者研究觀察2000~2003年人體血液與母乳中戴奧辛的濃度，發現人體中戴奧辛的濃度在這三年間無衰減情形(Wittsiepe et al., 2007)；長時間分析食物及母乳中戴奧辛與類戴奧辛化合物的衰減情形，發現食物的半衰期為7.1年，母乳的半衰期為7.9年(De Mul et al., 2008)。

戴奧辛造成的毒性反應範圍很廣泛，大致上可分為皮膚毒性、肝臟毒性、免疫毒性、生殖毒性與致癌性等。就生殖毒性而言，當戴奧辛透過食物鏈進入人體中，一方面會形成「假性荷爾蒙」作用，另一方面影響本身身體內荷爾蒙的量，其兩者皆會干擾內分泌系統的機制，特別是生殖功能(Gregoraszczuk, 2002)。對肝臟毒性則會造成肝細胞增生、肝腫大、肝硬化與肝功能異常等 (Maronpot et al., 1993)。某些因意外事故而導致人體暴露於高劑量戴奧辛的事件，其流行病學研究亦發現，高劑量戴奧辛暴露與心血管疾病、惡性淋巴瘤與某些癌症的發生有相關，但致癌機轉仍不清楚 (Puga et al., 2000)。在動物實驗所做出來的PCDD/Fs致癌性是確實可信的，而在人類的流行病學研究上，則尚未有完全可信的證據(National Cancer Institute, 1987)，在老鼠與人類細胞中，戴奧辛為內分泌干擾物質，會抑制雌激素誘發的反應，如抑制人類乳腺細胞的生長與發育等(Safe et al., 1998)。

2.5 快速檢驗之迫切性

為了能夠快速及有效地確認戴奧辛高暴露區域，以便進一步作隔離及後續整治工作，建立快速而有效的檢測方法有其迫切性。過去傳統的戴奧辛檢測大都藉由如高解析氣相層析質譜儀(HRGC/HRMS)等化學方法進行，其分析雖相當準確，但相對成本卻非常昂貴且耗時，若欲了解國內環境介質是否受戴奧辛污染，針對懷疑被污染地區，利用生物檢測進行大量環境樣本之初步篩檢，則可降低檢測之成本，且可迅速了解環境被污染的程度。目前全球

使用CALUX(chemical activated luciferase expression)技術大致上有兩大系統BDS和XDS，近年來國內外使用CALUX生物檢測食品的相關研究越來越多，目前歐盟也已在2002/69/EC及2002/70/EC兩份指令(Directives)中，採用CALUX bioassay作為食品及飼料的戴奧辛篩選及定量檢測標準方法(EC, 2002a; EC, 2002b; EC, 2002c)。

生物快速檢測法已被廣泛使用於檢測各種檢體中戴奧辛含量，如中國的學者利用CALUX生物檢測法調查焚化爐周界土壤樣品中戴奧辛含量，其CALUX(11.0 pg TEQ/g)與化學分析法(6.09 pg TEQ/g)，兩者平均值呈現顯著相關性($R = 0.87$)(Du et al., 2011); Grung et al., (2011)則是使用CALUX法調查挪威奧斯陸港口與奧斯陸峽灣內底泥中戴奧辛含量，其濃度為31.0~473 pg TCDD TEQ/g。國內也有學者利用CALUX[®]來分析牛奶中PCDD/Fs的濃度，並和HRGC/HRMS所分析出來的結果做比對，兩種方法彼此有很好的相關性($R=0.953$, $p<0.01$)，適合用來篩選大量的樣品數(Chou et al., 2008); 另一個台灣市售乳製品調查研究也證實了，CALUX可提供良好的線性關係的標準曲線，且與傳統化學分析方法數據比較後發現並無顯著的差異(朱正明，2005); 本團隊也於2014年期刊論文發表利用DR-CALUX[®]分析台灣10個地區800個土壤與底泥樣本，台灣北部土壤檢出之戴奧辛濃度為最高 61.8 ± 62.3 pgBEQ/g d.w.，其次為台灣南部(24.9 ± 26.3 pgBEQ/g d.w.)與中部(22.2 ± 12.8 pgBEQ/g d.w.)(Lin et al., 2014)。國外文獻方面，Greet等人在2000年3月及2001年3月於比利時市場隨機抽取牛乳，並以CALUX bioassay分析來自個人農場牛乳35件次，其戴奧辛含量為3.5(2.6~4.2) pg TEQ/g lipid以及乳製品工廠的牛乳17件次，其戴奧辛含量為2.0(1.5~2.3) pg TEQ/g lipid (Greet et al., 2004)。近年來CALUX除了應用在乳製品之外，許多研究也將其應用餘分析飼料中Dioxins含量，其平均值為0.14 ng CALUX-TEQ/kg (Vanderperren, 2004); 日本也曾使用生物分析與傳統HRGC/HRMS來檢測41個食用魚油PCDD/Fs與PCBs的毒性當量，發現彼此間有很好的相關性($R=0.90$, $p<0.01$)(Hasegawa et al., 2007); Van Overmeire等人在2009年發表的文獻中也有提到利用CALUX bioassay分析比利時春天及秋天居家生產雞蛋中戴奧辛含量，分別為4.08 pg CALUX-TEQ/g lipid以及5.86 pg CALUX-TEQ/g lipid (Van Overmeire et al., 2009)。

除了分析上述環境與生物體數據外，也有學者開始應用CALUX bioassay分析人體樣本，如：丹麥母親($n=98$)及新生兒($n=71$)血液中Dioxins濃度中位

數(全距)分別為37 (6~118)、33 (15~141) pg CALUX-TEQ/g lipid (Pedersen et al., 2010)。在亞洲地區，中國也有研究使用CALUX bioassay偵測生物檢體，如冷學者在天津及煙台沿海地區，利用CALUX bioassay檢測母乳中Dioxins含量，在天津Dioxins濃度的幾何平均及中位數分別為13.1、13.2 pg CALUX-TEQ/g lipid，而煙台Dioxins濃度的幾何平均及中位數分別為9.9、9.4 pg CALUX-TEQ/g lipid (Leng et al., 2009)，香港也有類似研究，其濃度為14.5 pg CALUX-TEQ/g lipid (Nelson et al., 2006)。由上述文獻指出，生物法可應用於不同檢體之分析，且其與化學分析法之間有很好的相關性，雖然在敏感度與穩定度方面尚不如化學分析法，但此方法作為快速篩檢樣本是一個很方便的工具，因此在這污染事件頻傳的現代，發展生物分析是重要且必要的。

2.6 篩檢方法原理及發展

在過去十年來，檢測戴奧辛的方法以化學分析為主，一般而言，以HRGC/HRMS來進行分析，由於戴奧辛對於自然環境之毒害日受重視，自1970至1993年以來，投入多氯戴奧辛與多氯呋喃毒性研究的經費，預估超過十億美金(Vanden Heuvel and Lucier, 1993)。化學分析所需之成本高、時間長，在分析樣品日益增加的現代，已不合乎成本效益且不敷實際需求。因此，近年來藉由生物科技的幫助，發展出一系列的 *in vitro* bioassays 與 ligand binding assays，以檢測戴奧辛及其類似物，更有歐美等國已公布戴奧辛生物偵測標準方法，例如美國環保署的Method 4025(Immunoassay)與Method 4425(A reporter gene on human cell line)、Method 4435 (CALUX®)。

根據文獻的記載，檢測戴奧辛活性的生物性偵測方法 (bioanalytical detection methods, BDMs) (Behnisch et al., 2001)，有以下幾種方式：(1) Enzyme induction (e.g., EROD)、(2) *In vitro* luciferase assay (e.g., CALUX®)、(3) Cell proliferation-based assay、(4) DNA binding assay、(5) AhR ligand binding (相關資料參照表2-3)，這些方法主要是利用受體 (receptor)、抗體 (antibody)、酵素 (enzyme)，使之與戴奧辛化合物結合，再利用不同的呈現方法，來量測樣品中戴奧辛類化合物之濃度。

表2-3、戴奧辛類化合物偵測方法

方法	原理	參考文獻
1. 生物指標 (Biomarker)	利用在植物、動物或人體上，所有對類戴奧辛化合物之生化反應產物測定，如活體內測試:AHH, CYP1A1-IA 或 EROD。	Schechter, 1999
2. 生物偵測 (Bioassay)	利用 AhR 相關之反應機制和利用含有 AhR 的萃取物或哺乳動物細胞來偵測特殊的生化反應，大部分是基於基因表現之誘導和類戴奧辛物質的誘導換算成相對於 2,3,7,8-TCDD 之比值。	Behnisch et al. 2001
(2-1)酵素誘導 (Enzyme Induction, 如 EROD)	利用細胞株可以表現出對 AhR 調控之 CYP1A1 之誘導反應來測定。如 EROD 是量測 ethoxyresorufin 氧化成 resorufin 所被激發出之螢光亮而得。	Sanderson et al.1996
(2-2) CALUX [®]	利用螢火蟲發光基因轉殖形成重組細胞，當戴奧辛或其類似化合物與 AhR 結合後，誘發轉殖的基因表現，藉由偵測冷光的強度測得其量。	Garrison et al. 1996
(2-3) 細胞增值分析(cell proliferation-based assay)	利用戴奧辛是氣瘻瘡之高誘導劑對角質細胞產生終止分化速率之量測而得到其暴露濃度。	Behnisch et al. 2001
(2-4)DNA 鍵結分析	利用被結合之 AhR 和 DNA 產生鍵結而進行量測，如 GRAB assay,藉由量測被誘發之 AhR 和被 P32 標誌的 DNA 鍵結之量而得。	Behnisch et al. 2001
(2-5)AhR ligand 鍵結(AhR ligand binding)	利用戴奧辛類似化合物行競爭性的 ligand 鍵結(如放射線標誌的戴奧辛 ligand)來量測對 AhR 相對之鍵結親和力而得。	Aarts et al. 1993
3. 酵素免疫分析法	利用酵素以化學鍵連結製抗原或抗體後，在加入受質與酵素反應，會產生有顏色的產物，經由光學密度的測量，即可定量之。	Hamer et al. 2000
4. 氣相層析法 (GC)	利用待測樣本之分子量大小、荷電數、極性或氧化還原電位之差異而達到定性定量之目的，準確度和精確度是這些方法中最高的。	Behnisch et al. 2001

2.7 本土戴奧辛生物快速篩選法之原理

本團隊於99年研究成果中，建構出利用腺病毒搭載冷光基因載體之本土生物篩檢技術(Ad-DR bioassay)，可應用於戴奧辛標準品、標準樣品、環境樣品與生物體和植物體樣品之檢測，但其穩定度與靈敏度並不足於商業化細胞株(BDS-與XDS-CALUXsystem)。本團隊將穩定轉殖含dioxin response element (DRE) 與luciferase的reporter vector (6X DRE-TATA-Luc) (圖2-2) 之系統建構於腺病毒載體中，再用基因改殖後的腺病毒(Ad-6XDRE-TATA-Luc) 感染大鼠肝腫瘤細胞，建立敏感度較佳且穩定之細胞(DRE-(6X)H4IIE cells)，如圖2-3。當戴奧辛或類戴奧辛化合物與AhR結合後，經由一連串的訊息傳遞，會誘發dioxin response element後面的luciferase基因表現，即可藉由偵測冷光的強度，間接得知戴奧辛濃度，此方法簡稱 DRE-CALUX 或是 AhR reporter gene assay，其作用原理如圖2-4 所示。

利用DRE-(6X)H4IIE細胞株為基礎，以各種不同濃度的2,3,7,8-TCDD標準品處理後，可誘發不同程度的 luciferase 酵素表現，藉由冷光反應畫出一組標準曲線圖(圖2-5)，可做為偵測環境樣品與生物檢體中戴奧辛含量的定性與定量依據。

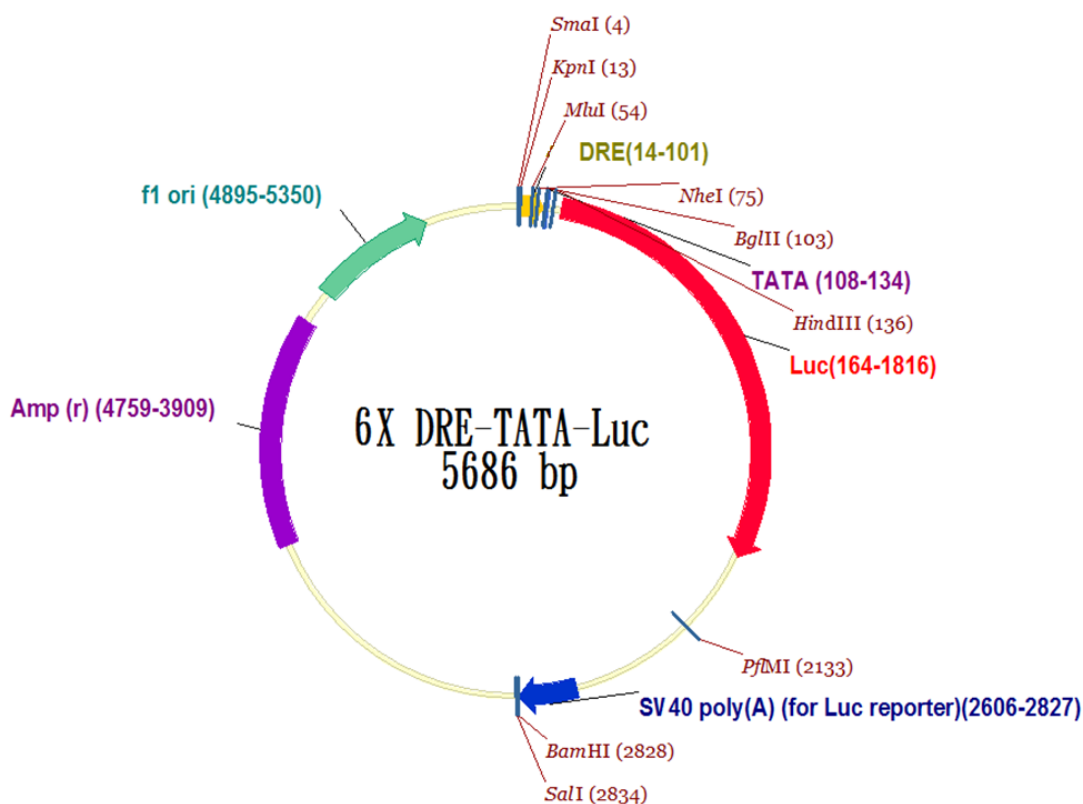


圖 2-2、6X DRE-TATA-Luc 質體圖譜

應用雙色冷光提升戴奧辛生物快速篩選技術
於土壤污染模場試驗先行評估計畫

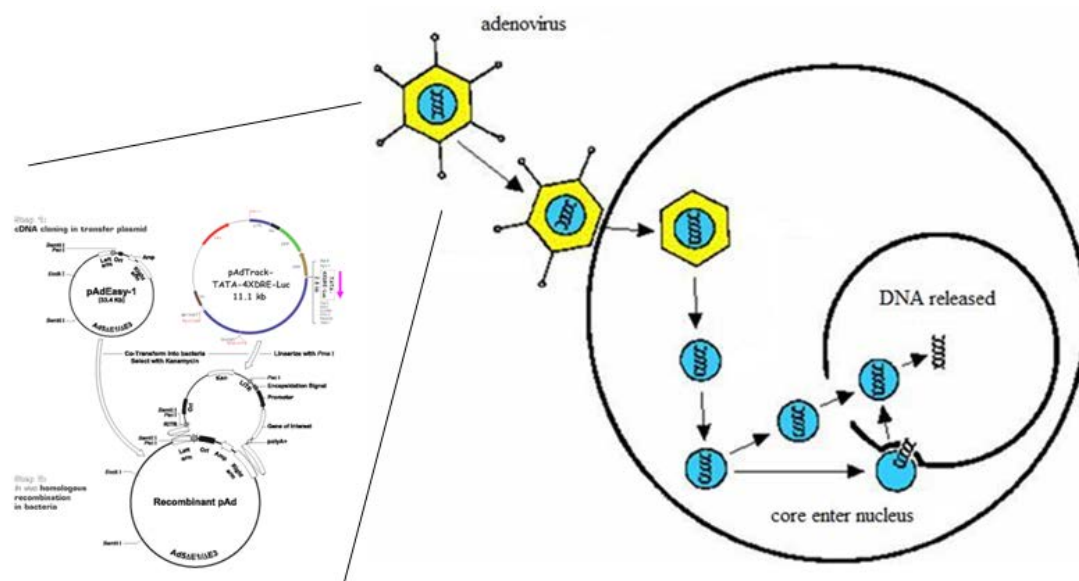


圖 2-3、腺病毒感染 H4IIE 細胞示意圖

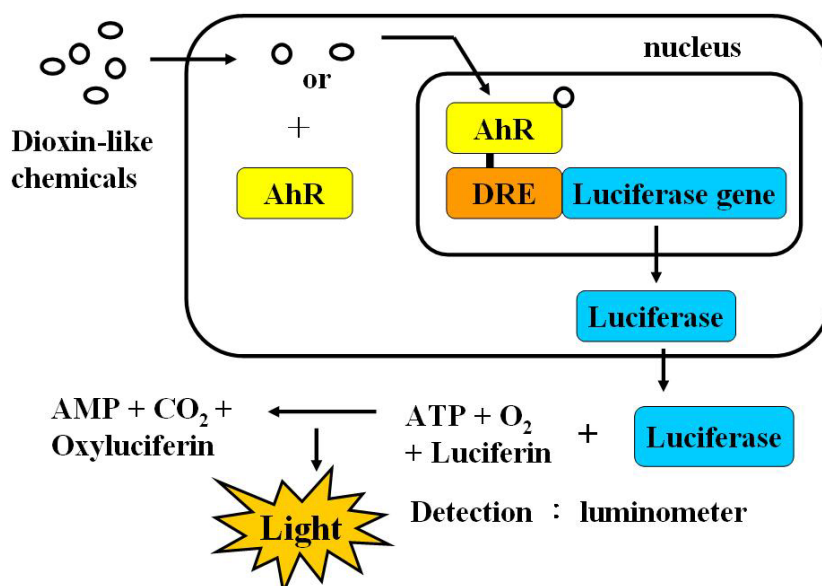


圖 2-4、DRE-CALUX 或 AhR reporter gene assay 作用原理示意圖

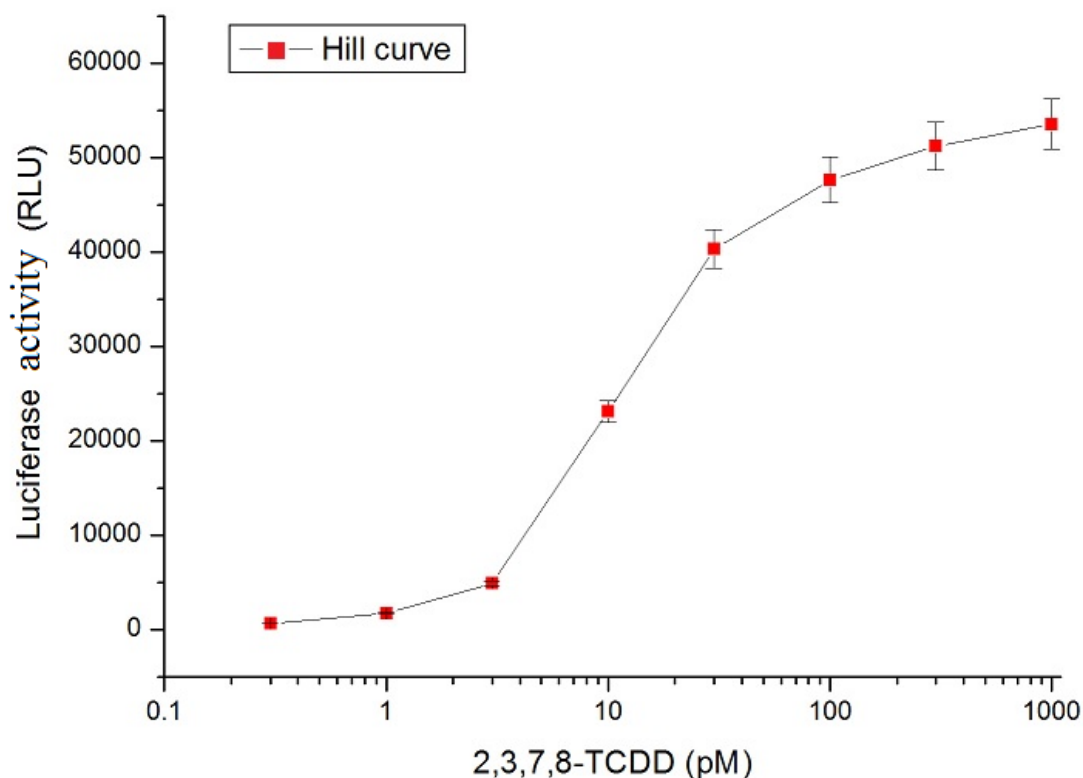


圖 2-5、Dose-response induction of luciferase activity by TCDD

2.8 台灣本土化戴奧辛生物快速篩檢法的發展歷程

國內焚化爐所產生之戴奧辛污染是國人關心項目之一，因此，工廠本身每年需定期進行焚化爐之煙道氣戴奧辛監測；而環保單位則需進行稽查工作，故其分析時間及成本相當龐大。國內環保署環檢所於2010年發表利用DR-CALUX[®] 快篩土壤中戴奧辛化合物，其中民國95年DR-CALUX[®]與HRGC/HRMS比值(DR-CALUX[®]/HRGC/HRMS)平均為3.8倍(1.0 - 8.9倍， $R^2 = 0.875$ ， $n=24$)，民國96年測值比平均為2.8倍(1.9 - 3.8倍， $R^2 = 0.979$ ， $n=16$)，民國97年測值比平均為2.8倍(1.6 - 5.1倍， $R^2 = 0.986$ ， $n=21$)，96年及97年測值比之相關性及穩定性均優於95年。總計95-97年間共比測61件土壤及底泥樣品，其DR-CALUX[®]/HRGC/HRMS測值比介於1.0~8.9倍，平均為3.8倍，且二者間之相關係數極佳， R^2 為0.940(李以彬，2008)。但因DR-CALUX[®]或XDS-CALUX[®]技術為荷蘭BDS公司或美國XDS公司之專利技術，專利費用極高，僅「國家級實驗室」可以負擔。未來，我國要像日本將低成本且高效

率的生物篩檢法納入環境樣品、食品樣本、生物樣品許可方法之一，以減輕業者負擔的話，開發本土生物篩檢技術，有其必要性。

本團隊目前擁有三套系統(1) Huh7-DRE-Luc bioassay (2) Ad-DR bioassay (3) Ad-(6X) DR bioassay。三套系統逐年發展過程中面臨許多不同的問題。研究初期本團隊建構出第一代系統 Huh7-DRE-Luc bioassay，主要將其用於了解人類肝腫瘤細胞中以 2,3,7,8-TCDD 經 AhR 傳遞所產生的基因表現，探討砷、鎘、鉻、汞與鉛等重金屬分別搭配 2,3,7,8-TCDD 產生干擾的細胞反應模式。上述重金屬皆為 non-AhR-Ligand，但同時處理 2,3,7,8-TCDD 與砷、鎘、鉻、汞、鉛發生了抑制反應，因此推測砷、鎘、鉻、汞、鉛的干擾路徑有相類似的機制，皆是透過抑制轉錄時的基因表現或轉錄後基因的活性而影響 Huh7-DRE-Luc bioassay 的讀值，導致對所計算的 luciferase activity 值有低估的情況，然而重金屬低濃度的情況下對 Huh7-DRE-Luc 細胞株而言是不受細胞毒性影響的，因此可排除細胞毒性所造成之影響(Chao et al., 2006；曾銀秋，2008；Chao et al., 2009；Chao et al., 2009)。2007 年本團隊發表的文獻提及檳榔鹼 Arecoline 與 2,3,7,8-TCDD 共處理時將增加 AhR Luciferase 的反應，高估 2,3,7,8-TCDD 的濃度(Chao et al., 2007)。本團隊參考國內外文獻認為要推行戴奧辛生物篩檢法勢必先解決基質干擾問題，除了砷、鎘、鉻、汞、鉛干擾了細胞反應之外，其他脂溶性的物質如多溴聯苯醚、DDT 等也會造成干擾，因此慎選前處理步驟是非常重要的，國外文獻也比較了不同萃取方法以及淨化方法對報導基因法的影響，由 Baston and Denison, (2011)學者發現當土壤與底泥中存在著其它污染物質時，即可能會對生物檢測法產生超高偽陽性現象(super-induction)，此現象可能造成樣本數據高於化學分析法 7~266 倍的毒性當量值，因此有效而且潔淨的前處理是有必要的。

2009 年本團隊承接環保署計畫『煙道氣樣本本土戴奧辛生物快速篩檢檢測技術開發計畫』，透過快速前處理(索氏萃取搭配硫酸矽膠淨化管柱與活性碳複合管柱(CAPE))進行 Huh7-DRE-Luc bioassay 測試。該年研究成果顯示，Huh7-DRE-Luc bioassay 回推煙道氣戴奧辛毒性當量濃度值表現並不理想，其與 HRGC/HRMS 平均比值為 29.7 倍(鄒等人，2010a)。但加強了樣本快速前處理之訓練與人員操作訓練後，本團隊使用 Huh7-DRE-Luc bioassay 調查國內高污染場址土壤與底泥的戴奧辛分佈研究中，與 HRGC/HRMS 兩者之間已可獲良好線性關係($R^2=0.8116$)，本團隊也將該研究成果發表至 Bull Environ Contam Toxicol 期刊論文(Chao et al., 2011)。但 Huh7-DRE-Luc

bioassay 仍無法完全規避國外專利，故隔年本團隊以 Huh7-DRE-Luc bioassay 為基礎，利用腺病毒載體感染 H4IIE 細胞株(大鼠肝腫瘤細胞株)，成功創建 AD-DR bioassay 戴奧辛生物快篩系統，即為第二代細胞株。該細胞株暴露於較低戴奧辛毒性當量濃度時，擁有比 Huh7-DRE-Luc bioassay 更加敏感的戴奧辛偵測能力，其檢測土壤及底泥樣本與 HRGC/HRMS 平均比值為 4.24 倍與 3.09 倍(鄒等人，2010b)。本團隊也將 AD-DR bioassay 應用於分析魚體樣本，分析魚體樣本與內臟組織其與 HRGC/HRMS 具有良好之關聯性 ($R^2=0.920$, $p<0.0001$)(Lin et al., 2013)。對以快篩需求所建置的 AhR-based bioassay 相關技術來說，Ad-DR bioassay 已成為戴奧辛快篩選項之一，但其穩定性與回推能力的評估結果仍未達完善，故本團隊參照國際文獻，將原腺病毒載體中 DRE copy numbers 自 4X 提升至 6X，建構出第三代 Ad-(6X)DR bioassay，並應用於生物體樣本檢測。Ad-(6X)DR bioassay 在生物體檢體的表現上與 Ad-DR bioassay 相似(趙等人，2011)，但改變 MOI 條件後(提升至 MOI=10)，經本研究室與環境檢驗所的測試後，得知 Ad-(6X)DR bioassay 對於戴奧辛的偵測效果並不遜於 DR-CALUX[®]或 XDS-CALUX[®]。

2.9 本土戴奧辛生物快速篩檢法未來趨勢

CALUX生物快速檢測法早在1996年被提出後，即受到許多學者重視與改進，現今CALUX快篩技術早已廣泛的使用在各種檢體上，但它仍會遇到像是類戴奧辛物質濃度過低或待測樣本體積或質量過少時，檢測不出來的窘境。鑒於此近年來許多學者開始嘗試新穎方法對CALUX檢測法進行改進(如：添加藥物配合檢測、改變實驗條件與製備新細胞株等方法)。

Zhao et al., (2010)添加皮質類固醇(dexamethasone)與PMA等藥物後進行測試，發現了添加藥物後可有效增強冷光物質的產生量，進而達到較大的發光量，同時該學者也嘗試降低了細胞株暴露樣本與2,3,7,8-TCDD時的溫度，從原本的37°C減至26、30、33°C，由實驗數據得知二氧化碳培養箱溫度調至33°C時，其將比在37°C有高5-15倍的冷光反應值。此結果將使以AhR為主的戴奧辛報導基法有更好的數據回推能力，其原因為較低的溫度可使較多的冷光蛋白質更能正確的摺疊成可以發光的形態；Saito et al., (2009)則是在細胞培養程序中將濃度為500 µg/mL放線菌酮(Cycloheximide)溶於DMSO，以1%比率加入培養液中，培養細胞24小時後可使報導基因法敏感度增加5倍，其

檢測數據與HRGC/HRMS方法兩者具有良好的線性關係($R = 0.922$, $n = 5$)。本團隊也參照上述文獻成果，改變Huh7-DRE-Luc bioassay樣本暴露溫度至35°C與添加PMA後，Huh7-DRE-Luc bioassay與HRGC/HRMS兩者具有高度線性相關($R^2 = 0.95$, $p < 0.001$)(Chao et al., 2012)。另一方面，美國Dr. Michael Denison與日本Dr. Hiroyuki Kojima兩位學者分別於2011年與2009時，發表了新細胞株測試CALUX生物檢測法相關文獻，其中Dr. Michael Denison團隊將小鼠肝腫瘤細胞株(Hepa1c1c7)內戴奧辛反應單元從原本的4倍增加至8倍與20倍，開發出第三代細胞株H1L7.2c1(8倍戴奧辛反應單元)與H1L7.5c3(20倍戴奧辛反應單元)；Dr. Hiroyuki Kojima學者則是將Hepa1c1c7細胞株內DNA結構進行重組，同時植入7倍戴奧辛反應單元開發出新細胞株並將此項技術稱之DR-EcoScreen cells(He et al., 2011 ; Anezaki et al., 2009)。Dr. Michael Denison使用第三代細胞株檢測青少年血液樣本，其結果顯示第三代細胞株與HRGC/HRMS測值相當接近，兩者比值為2.0倍；Dr. Hiroyuki Kojima將DR-EcoScreen cells用以測定80個具有低戴奧辛濃度特性的周界大氣樣本與新鮮的魚體與海鮮食品，這些樣品經過萃取與淨化等前處理程序後，同時使用DR-cell assay和HRGC/HRMS進行類戴奧辛濃度的比較分析，大氣樣本部分兩者測值具有高度線性相關($R^2 = 0.957$)，新鮮魚體與海鮮樣品亦呈現高度線性關係($R^2 = 0.912$)。(Croes et al., 2011; Anezaki et al., 2009; Kojima et al., 2011)。因此本團隊依照此概念提高DRE copy numbers，將原先4 copies增加到6、8、12、16以及20 copies，測試結果顯示本團隊DRE DNA序列最佳的反應倍數為6倍，而Ad-(6X)DR bioassay因應而生。

3. 研究方法與過程

3.1 研究架構

本團隊採用分項合作執行本研究計畫，透過屏東科技大學趙浩然教授與林雅芳助理教授測試由國家衛生研究院鄒粹軍研究員開發的DRE-(dual)H4IIE cells，並與HRGC/HRMS化學分析比較，提出有效的改善策略與建議，並持續觀察Ad-(dual)DR bioassay對真實樣本的適用性，藉此形成改善迴圈，穩定分析策略如圖3-1所示。

本次計畫預計完成項目如表3-1所示，本團隊於本次研究報告時完成Ad-(dual)DR bioassay 標準品與真實土壤樣本測試。標準品測試方面：包括2,3,7,8- TCDD標準品、液態標準品與CRM環境基質標準品，每一個項目預計完成10件次；真實樣本則為50件次土壤與底泥樣本，原訂包含三種不同濃度範圍之土壤樣本進行測試(如：0~100 ng-TEQ/kg、100~250 ng-TEQ/kg、250 ng-TEQ/kg以上)，因實際採樣化學分析最高值為131 ng-TEQ/kg，故將三種濃度範圍之土壤樣本重新定義為(0~10 ng-TEQ/kg、10~50 ng-TEQ/kg、50 ng-TEQ/kg以上)。

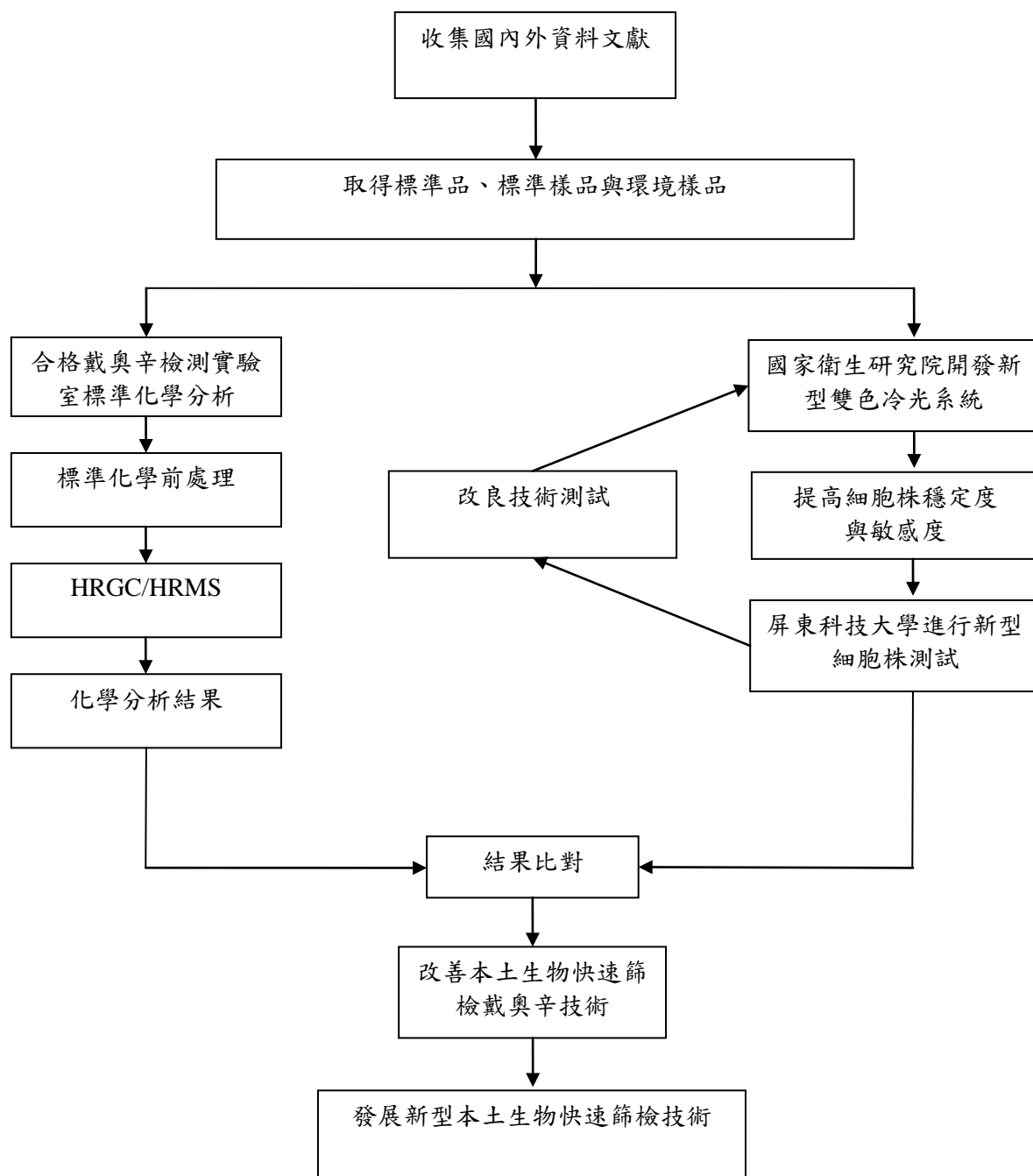


圖 3-1、研究架構

表3-1、預期進度與預期完成之工作項目甘特圖

年月 工作項目	4	5	6	7※	8	9	10	11※	備 註
1.文獻收集									
2.樣品收集									
3.開發新型技術									
4.測試標準品									
5.測試液態標準品									
6.測試 CRM 環境基質標準品									
7.測試土壤與底泥環境樣品									
8.數據整理分析									
9.期中報告									
10.期末報告									
工作進度估計百分比（累積數）	15 %	30%	40%	50%	60%	80%	90%	100%	
預定查核點	期中	1.完成改良技術程序標準品測試 2.完成樣品收集 3.完成 10 件次液態標準品測試 4.完成 10 件次 CRM 環境基值樣品測試 5.完成期中報告							
	期末	1.完成新型技術開發 2.完成 50 件次土壤與底泥樣品測試 3.完成所有數據之整理 4.完成期末報告							

3.2 雙色冷光本土戴奧辛生物快篩的原理

雙色冷光系統(dual-luciferase reporter system)其發展的主要目的為計算轉譯合成效率，將兩種不同的冷光基因序列(如：螢火蟲冷光酶(firefly luciferase)與珊瑚冷光酶(renilla luciferase))共同轉殖入細胞內，藉由計算兩種冷光基因活性標準比值(normalized ratio)，達到內部控制的目的。將核糖體(ribosomes)反應產物(Rf)與firefly luciferase反應活性(RF)利用方程式計算出核糖體反應比率(p)，其方程式如下： $p = RF/(RF+Rf)$ 。計算出核糖體反應比率後，藉由核糖體信號與renilla luciferase反應基因核糖體(R)信號進行計算，即可得到該次實驗轉譯效率(recoding efficiency)，其方程式如下： $Rec-eff = (RF_{test} + Rf_{test}) / (RF_{test} + Rf_{test} + R_{test}) = [(RF_{test}) / (RF_{test} + Rf_{test} + R_{test})] / p$ (Grentzmann et al., 1998)。由於此系統簡單且可對轉譯效率進行有效的評估，許多研究也將其應用於gene promoter分析與檢測特定酵素mRNA反應(Williams et al., 2000; Barriscale et al., 2014; Xu et al., 2014)。

本研究也將應用此系統於先前開發的Adeasy-Track-6XDRE-CALUX系統中，由於該實驗方法讀值之組內及組間的相對標準偏差(RSD)較大；為了降低組內及組間的相對標準偏差(RSD)，此計畫擬採用國家衛生研究院所建構完成之雙色冷光系統(如圖2-3與圖3-2)，在此病毒載體中，除了6XDRE-driven firefly luciferase gene 外，同時建構另一 promoter-less renilla luciferase gene 作為冷光偵測系統的內對照組(internal controls)。珊瑚冷光酶系統具有較低的自發性冷光干擾，可以避免高背景訊號的產生，因此適合用來當作冷光偵測系統的內對照組。利用此雙色冷光系統(Ad-(dual)DR bioassay)同時具有可對dioxins反應的firefly luciferase gene，也具有穩定表現的renilla luciferase gene，因此，實驗數據經校正後可有效降低實驗讀值之組內及組間的相對標準偏差(RSD)，可得到更穩定的實驗數據。

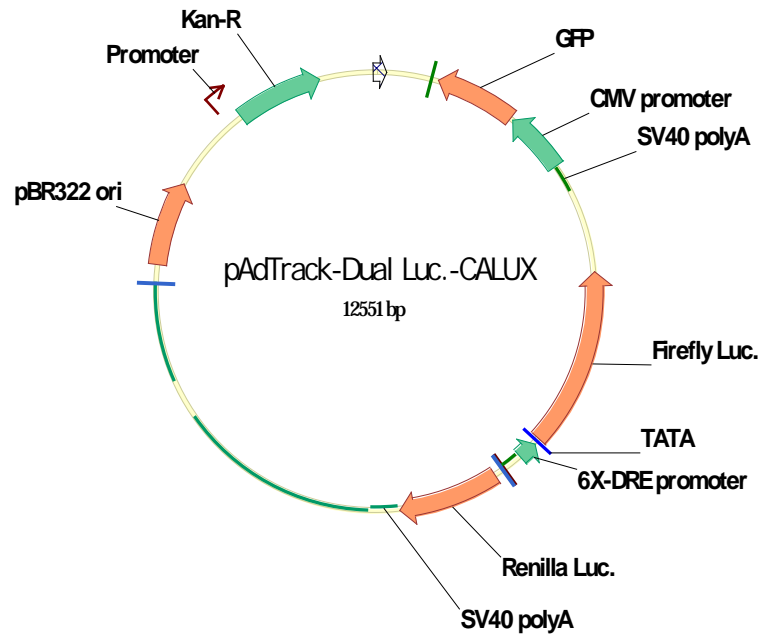


圖 3-2、病毒載體轉殖雙色冷光系統

3.3 欲分析之樣本

本團隊將採用新型改良技術Ad-(dual-DR) bioassay系統檢測10件次CRM環境基質標準品、10件次液態標準品與50件次土壤樣本。本研究將使用HRGC/HRMS以進行國內污染場址法定17種氯取代之戴奧辛/呋喃(表3-2) 之分析。此外，土壤進行採樣程序時建議依照環境保護署標準方法執行並將作業前、作業中及作業後之結果分別拍照存證(數位相片格式，且拍照位置、方向應一致)，本計劃之採樣和分析皆遵循環境保護署公告之相關規範。

表3-2、法定17種戴奧辛/呋喃

2,3,7,8-TeCDD	2,3,7,8-四氯戴奧辛
1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-五氯戴奧辛
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-六氯戴奧辛
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,6,7,8-六氯戴奧辛
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,7,8,9-六氯戴奧辛
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,2,3,4,6,7,8-七氯戴奧辛
OCDD	八氯戴奧辛
2,3,7,8-TeCD	2,3,7,8-四氯呋喃
1,2,3,7,8-PeCDF	1,2,3,7,8-五氯呋喃
2,3,4,7,8-PeCDF	2,3,4,7,8-五氯呋喃
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-六氯呋喃
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-六氯呋喃
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1,2,3,7,8,9-六氯呋喃
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2,3,4,6,7,8-六氯呋喃
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,2,3,4,6,7,8-七氯呋喃
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1,2,3,4,7,8,9-七氯呋喃
OCDF	八氯呋喃

3.4 分析方法

3.4.1 快速前處理

將採集得之土壤樣品，參考環保署公佈之戴奧辛/呋喃檢測方法NIEA S103.61C，搭配傳統索式萃取搭配酸性矽膠/活性碳管柱(CAPE) (CAPE Technologies)(South Portland, ME, USA).進行樣本前處理淨化，不添加內標準品利用索氏萃取裝置以甲苯萃取24小時，之後經過減壓濃縮、溶劑置換、酸洗、取出有機層後，以CAPE管柱進行淨化程序，去除非分析物質，最終萃取液以氮氣吹至近乾後，經過Dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶劑置換，再以Ad-(dual)DR bioassay進行戴奧辛類似物總濃度與總毒性反應之量測。

3.4.2 索氏萃取

先將300 mL 甲苯(Macron Fine Chemicals,Center Valley, PA, USA)倒至500 mL的平底燒瓶中並加熱預洗索氏萃尿管及圓筒濾紙(Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA)，預洗8小時後，將平底燒瓶中預洗的甲苯丟棄，再倒入300 mL 甲苯於索氏萃尿管的圓底燒瓶內，接著將樣品放入圓筒濾紙中，並於索氏萃尿管中加熱迴流24小時，流洗完將留於迴流管內之甲苯以虹吸方法回流至平底燒瓶，以25 mL/次甲苯，兩次清洗冷凝器使之流入回流管，以虹吸方法回流至平底燒瓶。

3.4.3 減壓濃縮

利用減壓濃縮機將索萃完後之甲苯萃取液濃縮至近乾，再添加10 mL的正己烷(Mallinckrodt Baker Inc, Phillipsburg, NJ, USA)再次濃縮到2 mL。

3.4.4 淨化

先配製40%的硫酸矽膠，如圖3-3將40 g 硫酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)與60 g 矽膠(Silicycle Inc., Québec, QC, Canada)充分混合後，靜置16小時。先取一空淨化管柱(18 × 300 mm)，底部填充些許玻璃棉，稱取15 g的40%硫酸矽膠填入管柱中，利用震盪方式使之密實，最上層填入適量無水硫酸鈉(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。以15 mL正己烷預洗管柱，再以巴斯特滴管轉移樣品並以2 mL正己烷/次，回洗容器，共3次轉移樣品至硫酸矽膠管柱，以40 mL正己烷沖提管柱，使用50 mL吹氮管加以收集，將收集流洗液以45°C吹氮濃縮至0.5 mL，流程如圖3-4。最後利用購買之酸性矽膠-活性碳複合管柱(CAPE)做為去除干擾物(如：多氯聯苯、多溴聯苯醚)之最後淨

化步驟。先組合酸性矽膠-活性炭複合管柱，用10 mL正己烷預洗酸性矽膠-活性炭複合管柱，管柱上頭接橡膠鎖，用針頭打入空氣，加壓流洗。流洗完以2 mL正己烷/次，共3次轉移樣品至酸性矽膠管柱加壓流洗後，再用11 mL正己烷/每次，共3次流洗管柱，流洗完後再將活性炭管柱由酸性矽膠管柱旋下，不翻轉活性炭管柱，直接接上空管柱，再利用1:1=甲苯:正己烷共3 mL流洗空管柱，再翻轉活性炭管柱，接上空管柱，最後以30 mL甲苯流洗管柱，並收及甲苯流洗液至吹氮管中步驟如圖3-5。

將上述甲苯流洗液，以45 °C吹氮濃縮至0.5 mL，加入正己烷5 mL~10 mL再吹至小於1 mL確保甲苯溶液在此完全移除，以免受干擾。最後將溶液轉換到Eppendorf裡，以少量正己烷兩次轉移樣品至吹氮管中，再吹氮至近乾，馬上加入200 µL DMSO(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)溶液，此時需將Eppendorf振盪，再吹氮1~2分鐘，確保正己烷移除且只剩DMSO，用parafilm封住開口，放入-20°C冰箱以待生物分析。

取 40 g 濃硫酸，緩緩加入 60 g 已活化之矽膠

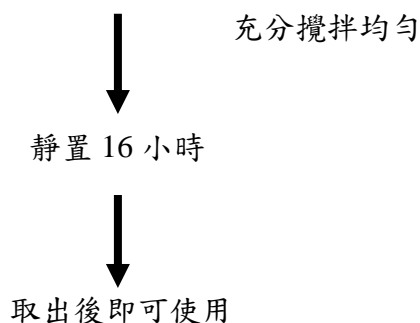


圖 3-3、40%硫酸矽膠配製流程

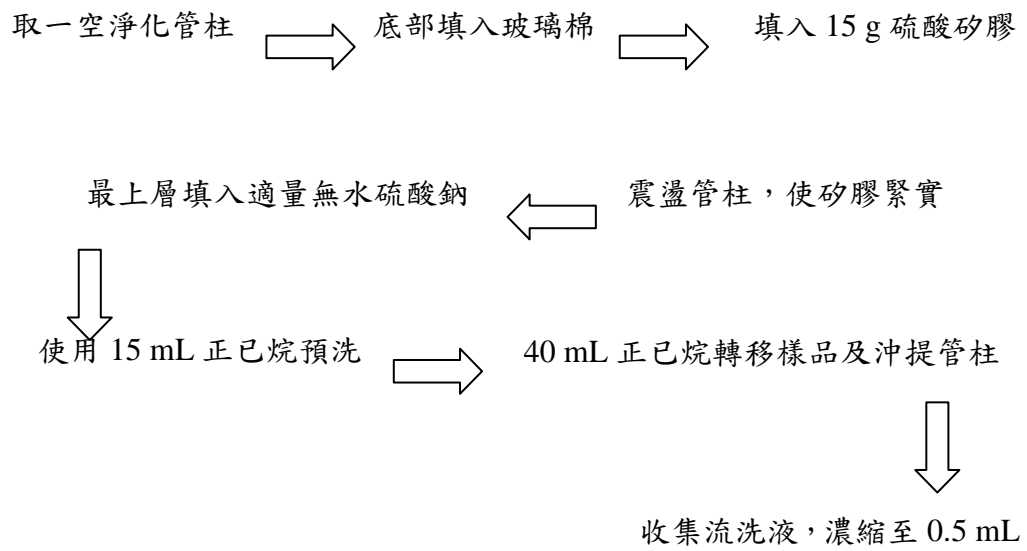


圖 3-4、40%硫酸矽膠淨化流程

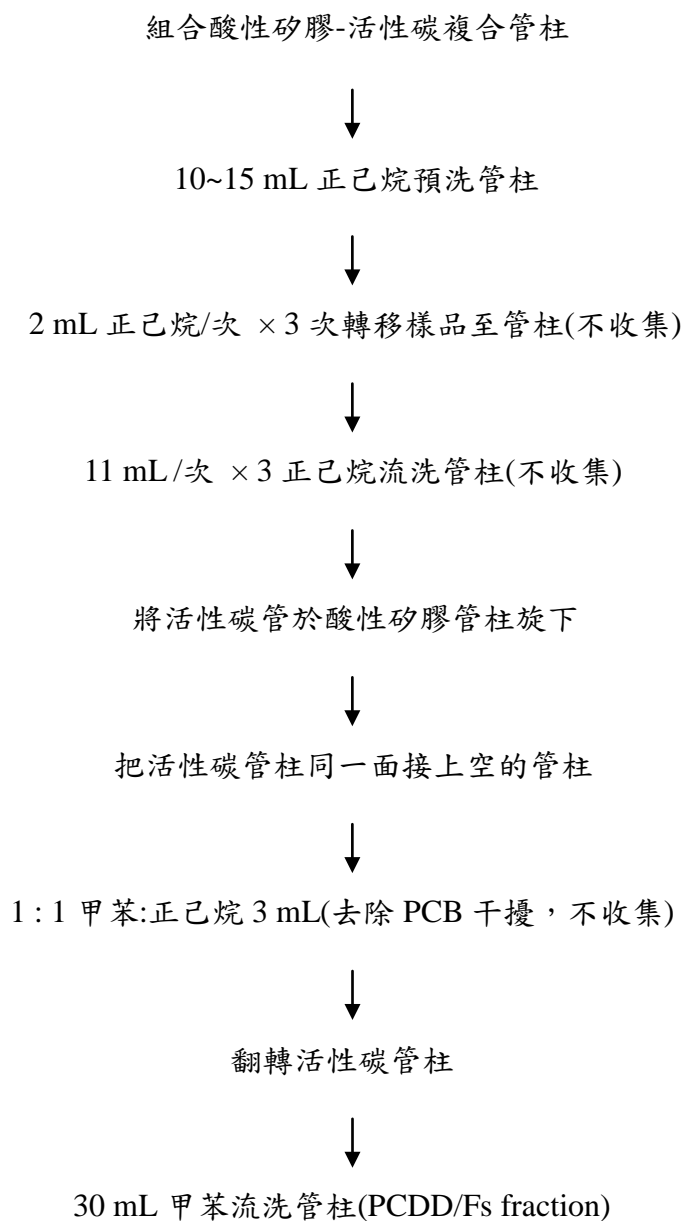


圖 3-5、CAPE 管柱淨化程序

3.4.5 生物分析Ad-(dual)DR bioassay

本次實驗使用第四代細胞(DRE-(dual)H4IIE cells)嘗試提高本土化第三代細胞(DRE-(6X)H4IIE cells)敏感度與穩定度。首先將實驗細胞種至96孔盤中加入腺病毒感染細胞株24小時，接著暴露2,3,7,8-TCDD (SUPELCO, St. Louis, MO, USA)標準品與待測樣品，24小時後使用冷光儀進行檢測，將檢測得到的冷光讀值計算戴奧辛物質之總毒性當量濃度值，以下詳述實驗步驟。

3.4.6 培養基配置

DRE-(dual)H4IIE cells為利用腺病毒感染大白鼠肝腫瘤細胞，宿主細胞株H4IIE所使用的培養基為MEM(Minimum Essential Medium)(Sigma-Algrich, St. Louis, MO, USA)內含約10% FBS與約1% P/S。首先將MEM粉末倒入1000 mL量筒中並加入去離子水600-700 mL，接著加入2.2 g的 NaHCO_3 放置電磁爐上利用磁石旋轉均勻混合一小時後，再倒入100-200 mL去離子水使其為800 mL。測其pH值，欲使pH值介於7.2-7.3之間，測量過程中如呈現酸性則加入NaOH中和，反之呈鹼性則加入HCl中和。在使用0.22 μm 過濾器過濾後加入90 mL FBS與10 mL 盤尼西林，總體積為990 mL。完成配置後冷藏於4°C冰箱。

3.4.7 細胞接種與繼代培養(Subculture)

細胞培養需在無菌操作台進行，首先本研究使用的細胞株(H4IIE)從液態氮筒拿出回溫後進行培養，將細胞株培養至10 cm培養皿中，觀察其生長狀況，當細胞覆蓋盤面約八成後接種96孔盤中。首先將培養基抽起，加入DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)(Sigma-Algrich, St. Louis, MO, USA)溶液清洗兩次以上，接著加入1 mL 1倍Trypsin EDTA(1X TE)(Sigma-Algrich, St. Louis, MO, USA)均勻覆蓋盤面後，放置CO₂培養箱培養3分鐘，取出培養皿並拍打盤面使細胞脫離盤面，細胞浮起後加入4 mL培養基充分混合均勻，再將培養皿中溶液全部抽入15 mL尖底離心管離心5分鐘。離心完畢後抽取上層液，再加入5 mL培養基後抽取100 μL 置入細胞計數器中計數，再依實驗設計將 2×10^4 H4IIE細胞分別接種至96 wells白盤內，每一孔盤內體積為80 μL ，放置CO₂培養箱培養十二小時，並將剩餘細胞移置培養皿中完成繼代培養。(如圖3-6)

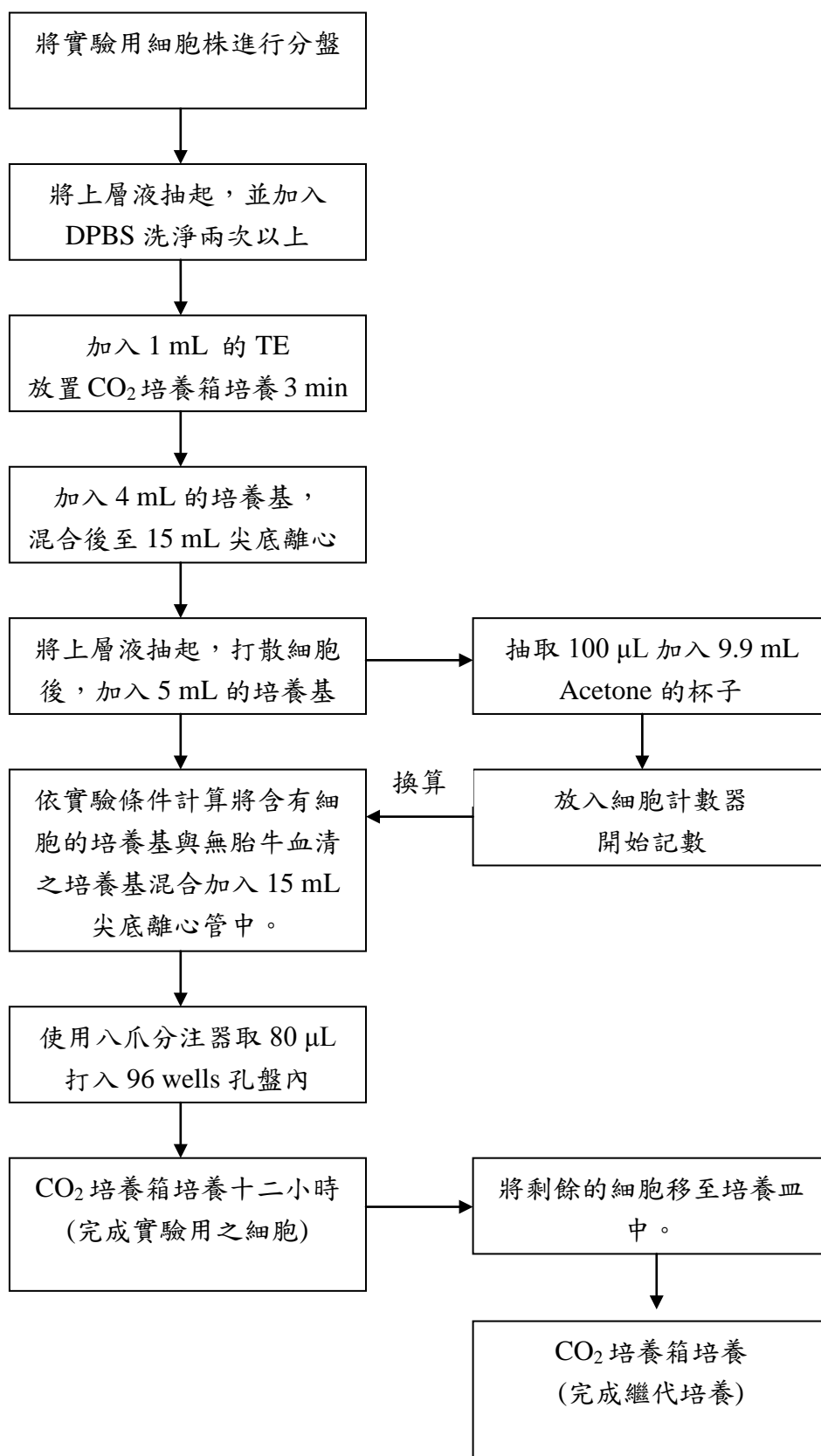


圖 3-6、細胞接種與繼代培養

3.4.8 腺病毒感染

腺病毒感染過程為將穩定轉殖入含dioxin response element (DRE) firefly luciferase gene的reporter vector (Ad-6XDRE-Luc firefly luciferase gene)與promoter-less renilla luciferase gene (renilla Luc)雙冷光系統之腺病毒(Adeasy-dual-6XDRE)，將其溶於無FBS的培養液經隔夜培養，接著取出96 wells白盤，將上層培養液抽離，加入(MOI=1 or 2 PFU/cell)病毒進行感染程序，腺病毒感染過程所添加之病毒濃度可視實驗需求調整，添加體積為90 μL ，感染 16 小時。

3.4.9 標準品、樣品暴露

生物分析方法由於需依靠檢量線進行公式配適後換算樣本濃度，因此本實驗在進行前需先依照實驗需求配製對應濃度2,3,7,8-TCDD之檢量線，將不同濃度之2,3,7,8-TCDD標準品利用連續稀釋方式配置，需要注意的是DMSO會對細胞產生毒性影響，故經連續稀釋後細胞株暴露樣品的DMSO濃度需為1%。本次實驗選用的2,3,7,8-TCDD標準品濃度分別為(0, 1, 2, 4, 12, 40, 120, 400) pM，將感染16小時後的H4IIE細胞取出，將各濃度的2,3,7,8-TCDD標準品以及樣品加入對應的孔盤內，每一孔盤添加體積為10 μL 添加完成後在 CO_2 培養箱35 $^{\circ}\text{C}$ 暴露24小時，如圖3-7顯示。

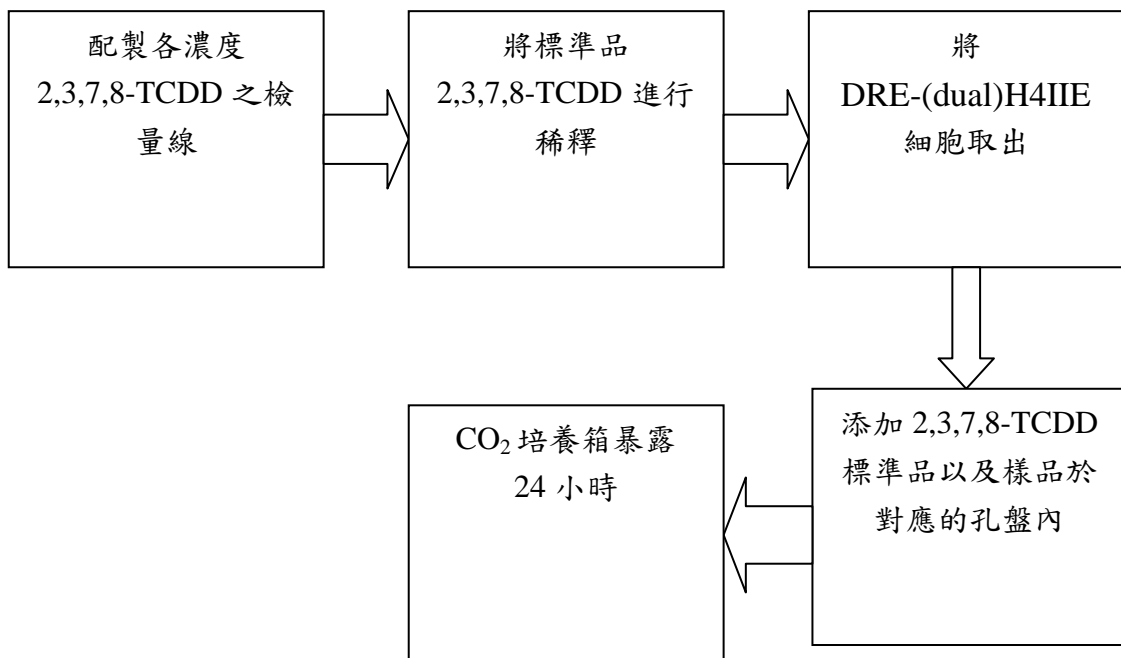


圖 3-7、標準品與樣品暴露

3.4.10 冷光讀值檢測

本實驗為冷光反應實驗，需觀察細胞冷光反應量，對應2,3,7,8-TCDD標準品檢量線濃度，藉此比對樣品數據的濃度，冷光分析是使用微盤冷光分析儀進行，在分析前需破碎細胞，以求樣品的準確性。首先我們將暴露24小時後96 well白盤取出，先將盤內液體抽離，加入100 μL 之1倍 Lysis buffer(Promage, E1960)以90 rpm 37°C 震盪10 min破碎細胞，冷光分析需利用化學藥劑驅使產生反應，本實驗所使用的冷光藥劑為Promega公司的Dual-luciferase reporter assay system的luciferase assay buffer與luciferase substrate粉末(Promage, Madison, WI, USA)。將上述兩藥劑回溫後混合均勻即可使用冷光儀檢測，每一孔盤加入100 μL 測定冷光讀值，如圖3-8顯示。

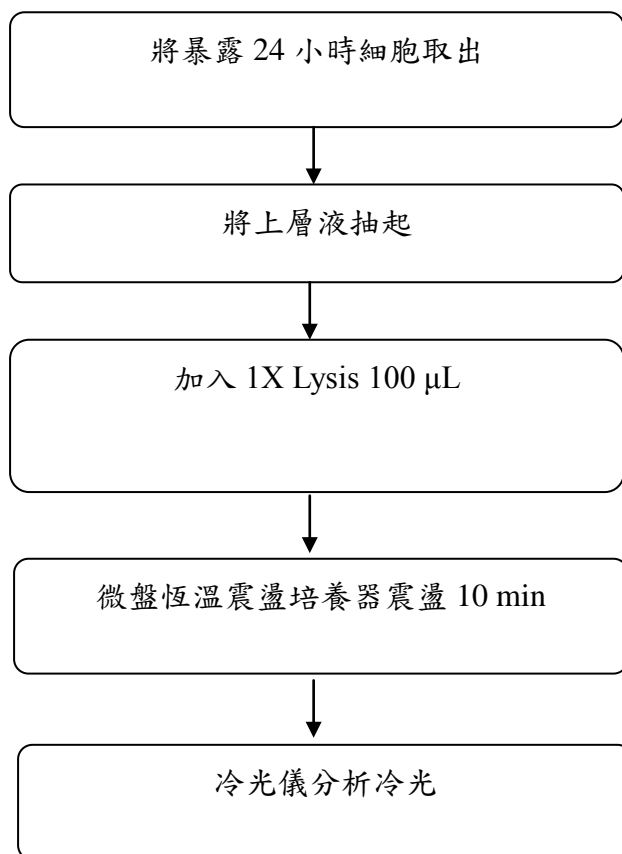


圖 3-8、冷光讀值分析

3.4.11 冷光值數據處理

每一96孔盤之冷光讀值均需扣除該盤之冷光背景值(空白樣本冷光平均值)後，再進行數據分析。2,3,7,8-TCDD檢量線配適使用最小平方最適迴歸法

(Least-squares best-fit)法則找出最符合2,3,7,8-TCDD標準品讀值之曲線，該曲線為希爾方程式(Hill equation)，最後將檢測樣本冷光讀值(y值)帶入方程式中，回推x值即為暴露培養液中類戴奧辛物質之總毒性濃度：

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

y = 經背景校正之冷光強度值 (RLU)
 x = 2,3,7,8-TCDD 之濃度值(pM)
 a_0 = 反應極限值
 a_1 = 50%有效濃度
 a_2 = 曲線的形狀參數

樣本經由Hill equation回推後得到之樣本濃度可利用下列公式將樣本濃度轉換為樣本的總毒性當量，其單位表示為ng ADL-TEQ/kg。此數據可用以評估當地戴奧辛類似物之濃度分布與環境曝露風險，對於高反應量之地區，可快速了解實際戴奧辛/呋喃濃度分佈情況，評估後進一步以GC-HRMS 進行確認。

$$\text{樣品總毒性當量濃度} = \frac{x}{c} \times d \times \frac{v}{10^6} \times 322 \div w$$

x: 暴露培養液中類戴奧辛物質之濃度(pM)

c: 暴露培養液中DMSO之最終百分濃度

d: 樣品萃取液之稀釋倍數

v: 樣品萃取液之體積(μL)

w: 樣品萃取克數(g)

3.5 品質管制(QA/QC)

3.5.1 冷光背景值

檢量線之冷光背景值以細胞培養液與DMSO試劑空白進行三重複分析，並以三重複分析之冷光強度平均值作為該盤之冷光背景值。

3.5.2 戴奧辛標準品2,3,7,8-TCDD檢量線

1. 除標準品2,3,7,8-TCDD濃度為0 pM之外(三重複分析)，其它檢量線TCDD濃度需至少進行二重複分析，並以二重複之冷光強度平均值進行檢量線計算。
2. 實驗者進行檢量線試驗時，該曲線與希爾方程式之間的配適程度以 R^2 進行評估，且 R^2 必須大於或等於0.98。
3. 檢量線查核樣品需選定於曲線的工作範圍內之濃度，且需進行至少三重複分析，再未扣除冷光背景值前，三重複分析之冷光強度相對標準偏差值需小於15%。
4. 檢量線查核樣品的回推數值需介於實際值的正負15%範圍內。

3.5.3.待測樣品

1. 待測樣品需至少進行三重複分析，且在未扣除冷光背景值前，重複分析之冷光強度相對標準偏差值是否小於15%。
2. 待測樣品之冷光讀值應落於檢量線 EC_{50} 附近之線性部分。

3.5.4 空白樣品

每分析10個待測樣品就需執行一次方法空白樣品分析。除檢測方法另有規定外，空白樣品分析值需低於待測樣品方法偵測極限的2倍。若空白樣品之分析結果無法達到上述的規定標準，則本土戴奧辛快速篩檢法需執行矯正措施，試圖找出污染的來源後，依實際狀況重新採樣檢測或重新進行該批次樣品之分析。

3.5.5 重複樣品間分析

重複樣品分析係將一待測樣品取二等份，依相同前處理及分析步驟執行檢測，每分析10個待測樣品就需執行一次重複樣品分析。

3.5.6 品管查核樣品分析

品管查核樣品應以添加標準溶液（如表3-3）配製，其濃度須小於1000 ng/kg。本計畫中以環境基質參考物質DX-1稀釋20倍做為品管查核樣品，濃度值為788.25 ng/kg。查核樣品分析係指將查核樣品經與待測樣品相同前處

理及分析步驟執行檢測。每10個待測樣品需執行一件次的品管查核樣品分析，並記錄品管查核樣品測定濃度值。

表3-3、待測物標準品溶液

化合物名稱	濃度 (pg/ μ L)
2,3,7,8-TeCDD	5
2,3,7,8-TeCDF	5
1,2,3,7,8-PeCDD	25
1,2,3,7,8-PeCDF	25
2,3,4,7,8-PeCDF	25
1,2,3,4,7,8-HxCDD	25
1,2,3,6,7,8-HxCDD	25
1,2,3,7,8,9-HxCDD	25
1,2,3,4,7,8-HxCDF	25
1,2,3,6,7,8-HxCDF	25
1,2,3,7,8,9-HxCDF	25
2,3,4,6,7,8-HxCDF	25
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	25
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	25
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	25
OCDD	50
OCDF	50

3.5.7 其它

以上未完善之事項，以環檢所公告之土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法—冷光酵素報導基因法(NIEA S901.60B)為遵循規則。若得到的冷光反應值超過檢量線最高定量上限時，本團隊將執行該樣品的第二次檢測，並變更檢測條件為：「稀釋待測樣品為10倍與100倍後進行戴奧辛毒性當量回推。」此條件符合NIEA S901.60B規範，並且可得出該樣品在回乘稀釋倍數後的毒性當量濃度值。

4. 結果與討論

4.1 Ad-(dual)DR bioassay 液態標準品測試

近年來本土化戴奧辛快速篩選法已逐漸被應用於篩檢大量戴奧辛污染樣本，Ad-(6X)DR bioassay檢測敏感度並不遜於國際上商業化之生物快速篩選戴奧辛系統，但該系統於低病毒MOI條件時在穩定度上表現不佳，於是提高病毒感染率(MOI=10)得到敏感又準確的結果。提高MOI的比例，除了成本增加外，病毒的耗損率也提高，H4IIE也常呈現虛弱的狀況，同時也增加了操作上的難度；故為了解決上述問題，本年度計畫開發出新型雙色冷光系統(Ad-(dual)DR bioassay)，利用renilla luciferase活性強度當作校正因子，期望解決穩定度問題。表4-1為本次研究使用Ad-(dual)DR bioassay測試不同病毒MOI對液態標準品回推數據。本次實驗共分析兩種不同病毒MOI比例(MOI=1與MOI=2)，結果顯示MOI為2時，2,3,7,8-TCDD標準品濃度在12、40、120、400 pM時，經Ad-(dual)DR bioassay回推濃度符合真實濃度 $\pm 15\%$ 區間，其三重覆RSD值為4 - 22%，EC₅₀濃度分別為54.3 pM與55.8 pM；MOI為1時，其2,3,7,8-TCDD標準品回推能力較差，僅case 4 檢量線回推濃度為12、40、120、400 pM時符合真實濃度 $\pm 15\%$ 區間。美國USEPA 4425與我國NIEA S901.60B規範之穩定度標準為RSD < 20%與RSD < 15%，本研究部分RSD值有過高的現象(13 - 34%)，EC₅₀濃度分別為95.9 pM與68.8 pM。比較兩種不同實驗條件數據，病毒MOI=2為Ad-(dual)DR bioassay最佳之實驗條件。當病毒MOI為2時其Ad-(dual)DR bioassay最佳的工作範圍為12 ~ 120 pM之間，且RSD值方面也較病毒MOI=1穩定。

新開發之Ad-(dual)DR bioassay其敏感度略遜於本團隊開發之第三代系統Ad-(6X)DR bioassay。導致Ad-(dual)DR bioassay在2,3,7,8-TCDD標準品濃度為1、2、4 pM時，其回推能力並未符合真實濃度 $\pm 15\%$ 區間，檢量線EC₅₀也相對偏高。但Ad/dual-DR(6X) bioassay經過renilla luciferase gene校正後，在MOI=2條件下，最佳工作範圍區間內RSD值優於Ad-DR(6X) bioassay。

表4-1、Ad/dual-DR(6X) bioassay測試2,3,7,8-TCDD液態標準品數據

2,3,7,8-TCDD標準品濃度(pM)(MOI=2)								
	1	2	4	12	40	120	400	EC ₅₀ (pM)
Case1	0*	0.99*	2.96*	13.08	38.2	125	383	54.3
(RSD)	(37%)	(15%)	(20%)	(4%)	(21%)	(22%)	(12%)	
Case2	0.093*	0.54*	2.17*	11.4	45.8	103	470	55.8
(RSD)	(38%)	(35%)	(1%)	(18%)	(8%)	(13%)	(9%)	
2,3,7,8-TCDD標準品濃度(pM)(MOI=1)								
	1	2	4	12	40	120	400	EC ₅₀ (pM)
Case3	0.248*	0.16*	1.16*	14.0*	51.9*	95*	446	95.9
(RSD)	(84%)	(22%)	(16%)	(13%)	(24%)	(22%)	(22%)	
Case4	0.216*	0.30*	2.11*	13.6	42.7	110	426	68.8
(RSD)	(46%	(26%)	(38%)	(34%)	(28%)	(27%)	(24%)	

*2,3,7,8,-TCDD 回推濃度未符合真實濃度±15%區間內

4.2 Ad-(dual)DR bioassay 環境基質標準品測試

本次研究共分析25組CRM環境基質標準品，CRM由環境檢驗所提供，其濃度為466 ng WHO₁₉₉₈-TEQ/kg d.w.，各同構物詳細濃度如表4-2所示。CRM樣品以四位數天秤精稱約1 g後(樣品稱取克數為1.1037~1.2741 g d.w.)，使用索式萃取以及CAPE酸性矽膠-活性碳複合管柱淨化法，並將所得之萃液進行溶劑轉換濃縮至50 µL DMSO中。由於Ad-(dual)DR bioassay檢量線最佳工作範圍為12 ~ 400 pM(EC_{50} = 54.3 ~ 55.8 pM)，為了使CRM檢測數據接近檢量線 EC_{50} ，故樣本將以連續稀釋法稀釋60倍與100倍兩種不同的濃度進行測試，每件次樣本均進行3重覆測試。

表4-3與表4-4為本次研究使用兩種不同比例之病毒MOI(MOI=1與MOI=2)測試CRM環境基質標準品數據。當病毒MOI為2時，15件次CRM樣本RSD值介於6 - 29%，Ad-(dual)DR bioassay分析濃度為481 ~ 727 ng BEQ/kg d.w.，與CRM毒性當量濃度(466 ng WHO₁₉₉₈-TEQ/kg d.w.)相比較，其平均比值為1.25倍；病毒MOI為1時，10件次CRM樣本RSD值為5 - 27%，Ad-(dual)DR bioassay分析濃度為588 ~ 902 ng BEQ/kg d.w.，與HRGC/HRMS平均比值為1.61倍。由上述25件次研究數據顯示，Ad-(dual)DR bioassay不論在MOI=1或MOI=2實驗條件下，其分析數據均與HRGC/HRMS比值相近。綜合上述兩實驗參數結果，本次Ad-(dual)DR bioassay檢測數據範圍為481 - 902 ng BEQ/kg d.w.，比對目前土壤中戴奧辛污染管制標準1000 ng TEQ/kg d.w.均未超過污染管制標準，並無任何偽陽性與偽陰性現象發生。

表4-5為比較本團隊歷年所開發之本土化快速篩檢戴奧辛系統分析CRM樣本數據。報告中載明之第三代Ad-(6X)DR bioassay研究數據所使用之MOI為0.3，非為目前台灣所使用之本土化快速篩檢戴奧辛系統之實驗參數(MOI=10)。Huh7-DRE-Luc bioassay 5件次CRM樣本與HRGC/HRMS平均比值為5.42倍；Ad-(6X)DR bioassay 13件次CRM樣本平均比值為5.02倍，Ad-(dual)DR bioassay 25件次CRM平均比值為1.41倍。由結果可知，Ad-(dual)DR bioassay檢測環境基質標準品(CRM)濃度的表現優於Huh7-DRE-Luc bioassay及Ad-(6X)DR bioassay(MOI=0.3)。

表4-2、CRM環境基質標準品17種戴奧辛檢測資料表

A. 樣品總毒性當量:		樣本基質：土壤、底泥		
1. 樣品濃度 A (pg/g d.w.)		來源：環檢所提供		
2. 樣品秤重 B (g d.w.):		(參考 CRM 標準品 Certificate)		
3. 樣品分樣 C		1.0000(參考實驗記錄簿)		
4. 樣品總量 D (pg):A*B/C		1.00(參考實驗記錄簿)		
5. 毒性當量換算因子 E (WHO-TEF)				
6.樣品毒性當量 F (pg TEQ):D*E				
B. 2, 3, 7, 8-PCDDs/PCDFs 個別濃度及毒性當量:				
樣品濃度 A		樣品濃度 D	毒性當量因子 E	樣品毒性當量 F
化合物名稱	(µg/g d.w.)	(µg)	(WHO-TEF)	(pg TEQ)
2,3,7,8-TeCDF	89	89	0.1	8.90E+00
1,2,3,7,8-PeCDF	39	39	0.05	1.95 E+00
2,3,4,7,8-PeCDF	62	62	0.5	3.10 E+01
1,2,3,4,7,8-HxCDF	714	714	0.1	7.14 E+01
1,2,3,6,7,8-HxCDF	116	116	0.1	1.16 E+01
2,3,4,6,7,8-HxCDF	57	57	0.1	5.70 E+00
1,2,3,7,8,9-HxCDF	28	28	0.1	2.80 E+00
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2397	2397	0.01	2.40 E+01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	137	137	0.01	1.37 E+00
OCDF	7122	7122	0.0001	7.12 E-01
2,3,7,8,-TeCDD	263	263	1	2.63 E+02
1,2,3,7,8,-PeCDD	22	22	1	2.20 E+01
1,2,3,4,7,8-HxCDD	23	23	0.1	2.30 E+00
1,2,3,6,7,8-HxCDD	77	77	0.1	7.70 E+00
1,2,3,7,8,9-HxCDD	53	53	0.1	5.30 E+00
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	634	634	0.01	6.34 E+00
OCDD	3932	3932	0.0001	3.93 E-01
總毒性當量				466

表4-3、Ad-(dual)DR bioassay測試CRM環境基質標準品數據(MOI=2)

樣本編號	RSD (%)	Ad-(dual)DR bioassay (ng BEQ/kg d.w.)	HRGC/HRMS測值 (ng WHO ₁₉₉₈ -TEQ/kg d.w.)	Ratio ^a
CRM-1	24	727	466	1.6
CRM-2	22	589	466	1.3
CRM-3	29	719	466	1.5
CRM-4	14	630	466	1.4
CRM-5	21	556	466	1.2
CRM-6	6	485	466	1.0
CRM-7	27	514	466	1.1
CRM-8	23	481	466	1.0
CRM-9	15	495	466	1.1
CRM-10	10	460	466	1.0 ^b
CRM-11	7	650	466	1.4
CRM-12	20	644	466	1.4
CRM-13	19	620	466	1.3
CRM-14	25	596	466	1.3
CRM-15	15	577	466	1.2

^a Ad-(dual)DR bioassay/HRGC/HRMS 比值^b 460/466=0.987四捨五入為1.00

表4-4、Ad-(dual)DR bioassay測試CRM環境基質標準品數據(MOI=1)

樣本編號	RSD (%)	Ad-(dual)DR bioassay (ng BEQ/kg d.w.)	HRGC/HRMS測值 (ng BEQ/kg d.w.)	Ratio ^a
CRM-16	12	856	466	1.8
CRM-17	22	794	466	1.7
CRM-18	27	836	466	1.8
CRM-19	22	891	466	1.9
CRM-20	19	902	466	1.9
CRM-21	13	725	466	1.6
CRM-22	5	657	466	1.4
CRM-23	8	588	466	1.3
CRM-24	9	646	466	1.4
CRM-25	20	627	466	1.3

^a Ad-(dual)DR bioassay/HRGC/HRMS 比值

表4-5、本團隊歷代本土化細胞株系統測試CRM環境基質標準品數據

樣本編號	RSD(%) ^a	Ratio ^b	參考文獻
Huh7-DRE-Luc bioassay(n=5)	8.00	5.42	鄒等人，2009
Ad-(6X)DR bioassay(n=13) ^c	5.46	5.02	趙等人，2011
Ad-(dual)DR bioassay(n=25)	17.4	1.41	本研究

^a 平均相對標準偏差測值

^b 本土化細胞株測試數據與 HRGC/HRMS 數據平均比值

^c Ad-(6X)DR bioassay 使用之病毒 MOI=0.3

4.3 Ad-(dual)DR bioassay 真實土壤與底泥基質樣本測試

本次研究共分析 59 件次真實土壤與底泥樣本(Soil and sediment, SS)，參照由 2,3,7,8-TCDD 標準品與 CRM 環境基質標準品所找出之最佳實驗參數 (MOI=2)進行數據分析。樣本數據比對方面，19 件次 SS 樣本與化學分析法 (HRGC/HRMS)測值進行比較；40 件次 SS 樣本與國際商業化生物快篩系統美國的 XDS-CALUX[®] (Xenobiotic Detection Systems)進行數據對照。

表 4-6 為 19 件次 SS 樣本 Ad-(dual)DR bioassay 數據與 HRGC/HRMS 測值比較表，19 件次 SS 樣本 Ad-(dual)DR bioassay 數據為 3.56 ~ 259 ng BEQ/kg d.w.，其 RSD 值均小於 30%，僅有 3 件次樣本 RSD 值高於 20%。樣本 HRGC/HRMS 測值濃度越小與 Ad-(dual)DR bioassay 比值呈負相關之趨勢：當樣本濃度高於 50 ng TEQ/kg d.w.，其與 Ad-(dual)DR bioassay 平均比值為 1.52 倍；樣本濃度為 10 ~ 50 ng TEQ/kg d.w.，與 Ad-(dual)DR bioassay 平均比值為 2.01 倍；樣本濃度為 0 ~ 10 ng TEQ/kg d.w.，Ad-(dual)DR bioassay 平均比值為 3.26。造成上述現象之原因為，Ad-(dual)DR bioassay 其敏感度略遜於本團隊開發之第三代系統 Ad-(6X)DR bioassay，最佳的工作範圍為 12 ~ 120 pM 之間，當樣本戴奧辛濃度過低時，其數據無法落於最佳之工作範圍導致回推能力受到干擾。但整體來說 19 件次土壤樣本 Ad-(dual)DR bioassay 與 HRGC/HRMS 平均比值為 2.59 倍(1.00 ~ 6.58)，其比值優於 Ad-DR bioassay6 且將兩數據進行逐步線性迴歸分析，兩者具有良好之關聯性 ($R^2=0.957$, $p<0.001$)。目前我國現行法規土壤中戴奧辛規範值為 1000 ng TEQ/kg d.w.，本次研究分析 19 件次樣本均屬低污染程度之樣本並無超標之情形，三個不同濃度區間之樣本(0 ~ 10 ng TEQ/kg d.w.、10 ~ 50 ng TEQ/kg d.w.、50 ng TEQ/kg d.w.)，均未發現任何「偽陽性」和「偽陰性」之機率問題。

表 4-7 與續表 4-7 為 40 件次 SS 樣本 Ad-(dual)DR bioassay 數據與 XDS-CALUX 數據對照表，兩者方法均屬於生物分析方法。40 件次 SS 樣本僅有 2 件次樣本 RSD 值高於 20%，兩件次樣本均屬於低濃度樣本(28.9 ng BEQ/kg d.w.與 30.7 ng BEQ/kg d.w.)，其原因推測同上述敏感度不足所致。Du et al., (2011)使用 XDS-CALUX 檢測中國垃圾焚燒發電場周界土壤戴奧辛濃度，其與 HRGC/HRMS 平均比值為 1.4 倍；Croes et al., (2013)分析 84 件次母乳樣本與 HRGC/HRMS 平均比值為 1.60 倍。本次檢測之 40 件次 SS 樣本其回推濃度與 XDS-CALUX 兩者平均比值為 0.974 倍(0.396 ~ 1.96)，顯示

Ad-(dual)DR bioassay 其戴奧辛毒性當量回推能力相似於 XDS-CALUX。台灣近年來追隨著國際趨勢，開始利用生物快速篩檢戴奧辛方法來建立各種基質樣本之戴奧辛濃度背景值。Lin et al., (2013)應用本土化 Ad-DR bioassay 檢測台灣竹筏港溪與鹿耳門溪魚體與其內臟組織中戴奧辛濃度，其濃度為 1.80 ~ 855 pg-BEQ/g w.w.；隔年 Lin et al., (2014)使用荷蘭 BDS-CALUX 系統篩檢全台灣地區 800 件次土壤樣本中戴奧辛濃度，台灣北、中、南、西部地區戴奧辛濃度分別為 61.8、22.2、24.9、7.80 ng-BEQ/kg d.w.，本次研究 SS 樣本檢出之濃度與 Lin et al., (2014)調查結果相似。

本研究所開發之 Ad-(dual)DR bioassay 在整體穩定度與回推能力的表現上，會隨著樣本自身濃度高低而有所影響，當樣本戴奧辛濃度為 30 ng TEQ/kg d.w.以下時，大多數樣本 RSD 值高於 15%，並未符合我國 NIEA S901.60B「土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法—冷光酵素報導基因法」規範。RSD 值計算方式為：相對標準偏差(RSD) = 標準偏差 ÷ 樣本平均數值，Ad-(dual)DR bioassay 使用低比例之病毒 MOI，其反應之冷光讀值低於 Ad-(6X)DR bioassay 系統 50-100 倍以上，導致在數學模式上低濃度樣本 RSD 容易高於 15%，但該現象並不影響數據回推能力。Ad-(dual)DR bioassay 戴奧辛毒性當量回推能力與 Ad-(6X)DR bioassay 相似，且 Ad-(dual)DR bioassay 在病毒的消耗量上遠比 Ad-(6X)DR bioassay 系統少，可大量節省病毒使用量即可達成先篩檢後檢測的效果。Ad-(dual)DR bioassay 在回推能力上符合預期的表現，雖然無法完全改善低濃度分析穩定度的表現，但若比照現行法規規範濃度 1000 ng TEQ/kg d.w.，Ad-(dual)DR bioassay 仍適合推廣與應用。

表4-6、Ad-(dual)DR bioassay與HRGC/HRMS土壤樣本數據比較(n=19)

樣本編號	RSD (%)	Ad-(dual)DR bioassay (ng BEQ/kg d.w.)	HRGC/HRMS測值 (ng TEQ/kg d.w.)	Ratio ^a
SS-1	11	140	132	1.06
SS-2	9	259	132	1.97
SS-3	6	53.3	46.3	1.15
SS-4	11	56.1	29.1	1.93
SS-5	18	48.5	29.1	1.67
SS-6	15	31.1	26.4	1.18
SS-7	22	40.4	26.4	1.53
SS-8	16	36.7	13.1	2.80
SS-9	21	49.9	13.1	3.81
SS-10	1	21.8	9.92	2.19
SS-11	4	24.3	9.92	2.45
SS-12	10	8.86	8.90	1.00
SS-13	14	28.1	8.90	3.16
SS-14	4	49.5	8.68	5.71
SS-15	9	48.9	7.44	6.58
SS-16	10	11.3	6.82	1.65
SS-17	21	11.0	5.01	2.19
SS-18	23	20.4	3.92	5.20
SS-19	8	3.56	1.74	2.05
Range	-	3.56 - 259	1.74 – 132	1.00 - 6.58
95% CI	-	28.9 - 83.0	13.1 - 41.4	1.94 - 3.31
Average	-	49.6	27.3	2.59

^a Ad-(dual)DR bioassay/HRGC/HRMS 比值

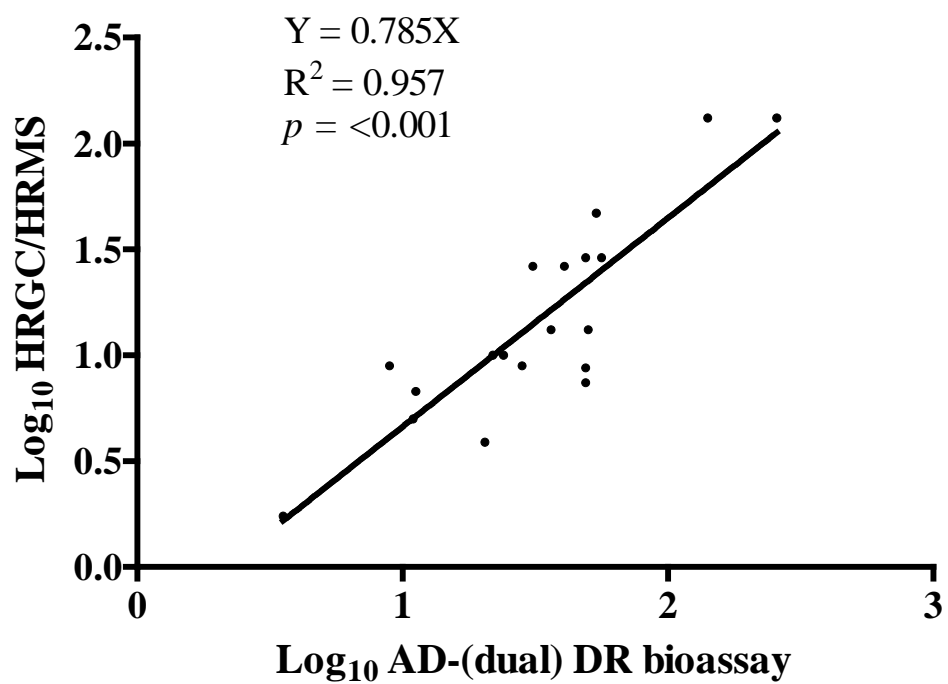


圖 4-1、AD-(dual) DR bioassay 與 HRGC/HRMS 線性迴歸

表4-7、Ad-(dual)DR bioassay與XDS-CALUX比較(n=40)

樣本編號	RSD (%)	Ad-(dual)DR bioassay (ng BEQ/kg d.w.)	XDS-CALUX測值 (ng BEQ/kg d.w.)	Ratio ^a
SS-20	5	56.8	67.4	0.842
SS-21	6	97.5	67.4	1.45
SS-22	4	83.1	120	0.692
SS-23	7	151	120	1.26
SS-24	5	104	135	0.773
SS-25	3	154	135	1.14
SS-26	7	78.3	76.8	1.02
SS-27	4	94.4	76.8	1.23
SS-28	6	52.9	79.9	0.663
SS-29	7	56.5	79.9	0.708
SS-30	7	93.7	81.8	1.15
SS-31	8	88.8	81.8	1.09
SS-32	7	73.7	77.6	0.950
SS-33	15	75.0	77.6	0.967
SS-34	5	69.9	69.4	1.01
SS-35	7	72.8	69.4	1.05
SS-36	5	51.4	94.3	0.545
SS-37	11	83.1	94.3	0.881
SS-38	4	52.7	86.5	0.609
SS-39	10	69.4	86.5	0.803

^a Ad-(dual)DR bioassay/XDS-CALUX 比值

續表4-7、Ad-(dual)DR bioassay與XDS-CALUX比較(n=40)

樣本編號	RSD (%)	Ad-(dual)DR bioassay (ng BEQ/kg d.w.)	XDS-CALUX測值 (ng BEQ/kg d.w.)	Ratio ^a
SS-40	17	32.6	28.9	1.13
SS-41	26	11.4	28.9	0.396
SS-42	12	33.5	38.1	0.880
SS-43	16	58.5	38.1	1.53
SS-44	7	46.2	66.6	0.693
SS-45	7	52.8	66.6	0.792
SS-46	6	34.2	37.4	0.914
SS-47	2	42.3	37.4	1.13
SS-48	13	43.1	56.3	0.765
SS-49	3	53.7	56.3	0.954
SS-50	13	29.7	40.5	0.734
SS-51	11	45.0	40.5	1.11
SS-52	7	20.5	51.5	0.398
SS-53	6	24.8	51.5	0.481
SS-54	23	23.7	30.7	0.770
SS-55	14	26.0	30.7	0.845
SS-56	17	53.3	34.9	1.53
SS-57	17	54.4	34.9	1.56
SS-58	5	71.2	44.6	1.60
SS-59	9	87.6	44.6	1.96
Range	-	11.4 - 154	28.9 - 135	0.396 - 1.96
95% CI	-	52.7 - 72.7	57.3 - 74.6	0.876 - 1.09
Average	-	62.6	65.9	0.975

^a Ad-(dual)DR bioassay/XDS-CALUX 比值

4.4 Ad-(dual)DR bioassay 應用與未來發展

本研究開發之第四代 Ad-(dual)DR bioassay 經液態標準品、CRM 環境基質標準品與真實土壤與底泥樣品測試，其成果符合本團隊預期之效益。Ad-(dual)DR bioassay 僅需低病毒消耗量(MOI=2)，在整體穩定度與回推能力即可相似於 Ad-(6X)DR bioassay。利用簡單的內校正法，降低操作人員種殖細胞與感染病毒之不穩定性，意謂著操作人員技術門檻降低，對於推廣至民間實驗室更為便利與快速。Ad-(dual)DR bioassay 分析所需耗費的資本門有冷光分析儀、倒立式螢光顯微鏡、二氧化碳培養箱、無菌操作台等，每一件次樣本成本資本門約為 2375 元；經常門包含前處理所需的耗材、有機溶劑、CAPE 淨化管、病毒消耗與人事成本等約為 2625 元，合計 Ad-(dual)DR bioassay 操作成本約為 5000 元，較環檢所使用 XDS 系統成本(約 9000 元)便宜。然而，時間成本的考量上 Ad-(dual)DR bioassay 需要使用病毒感染，樣本自分析至完成需要 4 天的時間，若分析的樣本數少時，可能為需考量的因素；但若分析樣本數龐大時，使用 Ad-(dual)DR bioassay 並不會造成時間成本的增加。

Ad-(dual)DR bioassay 利用 renilla luciferase gene 當作校正因子改善穩定度之想法，由本研究數據獲得證實，雖然在低濃度樣本 RSD 值仍未達到我國制訂之 NIEA S901.60B 規範，但已符合美國 USEPA 4425(RSD < 20%)與日本環保署國家標準法之標準(RSD < 30%)。由於本研究所開發之第四代細胞株轉殖 renilla luciferase gene 其基因序列接近戴奧辛反應單元(dioxin response element, DRE)，造成 renilla luciferase gene 也會受到戴奧辛誘導，干擾其校正 firefly luciferase gene 之能力。未來，本團隊也會以本次研究做為基礎，重新建構第五代更穩定之雙色冷光細胞株，將 renilla luciferase gene 更接近下游基因(down-stream)，使戴奧辛誘導產生之干擾降至最低，預期將比第四代 Ad-(dual)DR bioassay 更靈敏與穩定，提升本土化生物快速篩檢戴奧辛技術。

4.5 結論

本團隊預期完成之工作項目為(1)新型Ad-(dual)DR bioassay改良技術開發(2)土壤及底泥樣本收集(3)完成10件次液態標準品測試(4)10件次CRM環境基質標準品測試(5)50件次真實土壤與底泥樣本，本次研究成果分述如下：

1. 本團隊已於本次研究完成新型Ad-(dual)DR bioassay改良技術。
2. 本次研究使共用兩種不同病毒MOI條件之Ad-(dual)DR bioassay進行2,3,7,8-TCDD液態標準品測試，共測試28件次。其結果顯示病毒MOI=2條件下2,3,7,8-TCDD液態標準品回推能力與穩定度優於MOI=1。
3. 本次研究共測試25件次CRM環境基質標準品，其Ad-(dual)DR bioassay數據與HRGC/HRMS平均比值分別為1.25與1.61倍，顯示在低病毒MOI條件下Ad-(dual)DR bioassay回推能力準確。
4. 本次研究共測試59件次真實土壤與底泥樣本，19件次樣本與HRGC/HRMS平均比值為2.59倍，40件次樣本與XDS-CALUX比值為0.974倍。
5. Ad-(dual)DR bioassay與HRGC/HRMS逐步線性迴歸分析顯示，兩者具有良好之關聯性($R^2=0.957$, $p<0.001$)，以本研究自行訂定規範標準500 ng TEQ/kg d.w.，均未發現任何「偽陽性」和「偽陰性」之機率問題。
6. Ad-(dual)DR bioassay在病毒的消耗量上遠比Ad-(6X)DR bioassay系統少，雖然無法完全改善低濃度分析穩定度的表現，但若比照現行法規規範濃度1000 ng TEQ/kg d.w.，Ad-(dual)DR bioassay非常適合推廣與應用。

5. 參考文獻

- Anezaki K, Yamaguchi K, Takeuchi S, Iida M, Jin K, Kojima H, 2009. *Application of a Bioassay Using DR-EcoScreen Cells to the Determination of Dioxins in Ambient Air: A Comparative Study with HRGC-HRMS Analysis*. Environmental Science & Technology 43(19): 7478-7483.
- Behnisch PA, Hosoe K, Sakai SI, 2001. *Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds a review of bioassay/biomarker technology*. Environment International 27(5): 413-439.
- Bhavsar SP, Reiner EJ, Hayton A, Fletcher R, MacPherson K, 2008. *Converting Toxic Equivalents (TEQ) of dioxins and dioxin-like compounds in fish from one Toxic Equivalency Factor (TEF) scheme to another*. Environment International 34(7): 915-921.
- Chao HR, Wang YF, Lin DY, Cheng YT, Tsou TC, 2011. *Fast cleanup system combined with a dioxin-responsive element-driven luciferase bioassay for analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans in sediments and soils*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 86(3):278-82.
- Chao HR, Wang YF, Wang YN, Lin DY, Gou YY, Chen CY, Chen KC, Wu WK, Chiang BA, Huang YT, Hsieh LT, Yeh KJC, Tsou TC, 2012. *An improved ahr reporter gene assay for analyzing dioxins in soil, sediment and fish*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 89(4):739-43.
- Chen HL, Huang HY, Huang PC, Lee CC, 2010. *Relationship of PCDD/F concentrations in duck-egg farmers and consumption of ranched duck eggs in central Taiwan*. Environmental Toxicology and Chemistry (11):2402-8.
- Chou IC, Lee WJ, Wang LC, Chang-Chien GP, Lee WS, Lee H, 2008. *Validation of the CALUX bioassay as a screening and semi-quantitative method for PCDD/F levels in cow's milk*. Journal of Hazardous Materials 154(1-3): 1166-1172.

- Croes K, Van Langenhove K, Hond ED, Bruckers L, Colles A, Koppen G, Loots I, Nelen V, Schoeters G, Nawrot T, Van Larebeke N, Denison MS, Vandermarken T, Elskens M, Baeyens W, 2011. *Quantification of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in small amounts of human serum using the sensitive H1L7.5c1 mouse hepatoma cell line: Optimization and analysis of human serum samples from adolescents of the Flemish Environment and Health Study (FLEHS II)*. Talanta 85(5):2484-91.
- De Mul A, Bakker MI, Zeilmaker MJ, Traag WA, Leeuwen SP, Hoogenboom RL, Boon PE, Klaveren JD, 2008. *Dietary exposure to dioxins and dioxin-like PCBs in The Netherlands anno 2004*. Regul Toxicol Pharmacol 51(3):278-87.
- Du Y, Chen T, Lu S, Yan J, Li X, Cen K, Nakamura M, Handa H, 2011. *Comparative analysis of PCDD/Fs in soil around waste incineration plants in China using CALUX bioassay and HRGC/HRMS*. Journal of Hazardous Materials 192(3):1729-38.
- EC (European community), 2002a. *Commission directive 2002/69/EC*. Off.J. Eur. Comm. 6.8.2002, L209/5.Brussels.
- EC (European community), 2002b. *Commission directive 2002/70/EC*. Off.J.Eur. Comm. 6.8.2002, L209/15. Brussels.
- EC (European community), 2002c. *Commission decision of 12 august 2002 implementing Council directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, Off.J. Eur. Comm. 7.8.2002, L221/8. Brussels.
- Gibbs LM, 1995. *Dying from Dioxin: A Citizen's Guide to Reclaiming our Health and Rebuilding Democracy*. South End Press; Slight Moisture Damage edition.
- Greet S, Marie PG, Daniella O, Rudy VC, 2004. *The evaluation of dioxin and dioxin-like contaminants in selected food samples obtained from the Belgian market: comparison of TEQ measurements obtained through the CALUX bioassay with congener specific chemical analyses*. Chemosphere 54(9):

1289-1297.

- Gregoraszczuk EL, 2002. *Dioxin exposure and porcine reproductive hormonal activity*. Cad Saude Publica 18(2):453-462.
- Grung M, Næs K, Fogelberg O, Nilsen AJ, Brack W, Lübcke-von Varel U, Thomas KV, 2011. *Effects-Directed Analysis of Sediments From Polluted Marine Sites in Norway*. Journal of Toxicology and Environmental Health. 74(7-9): 439-54.
- Hasegawa J, Guruge KS, Seike N, Shirai Y, Yamata T, Nakamura M, 2007. *Determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in fish oils for feed ingredients by congener-specific chemical analysis and CALUX bioassay*. Chemosphere 69(8): 1188-1194.
- He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S, Denison MS, 2011. *Third Generation Ah Receptor-Responsive Luciferase Reporter Plasmids: Amplification of Dioxin Responsive Elements Dramatically Increases Calux Bioassay Sensitivity and Responsiveness*. Toxicological Sciences 123(2):511-22.
- Jones KC, Duarte-Davidson R, 1997. *Transfers of airborne PCDD/Fs to bulk deposition collectors and herbage*. Environmental Science & Technology 31(10): 2937-2943.
- Kjeller LO, Jones KC, Johnston AE, Rappe C, 1996. *Evidence for a decline in atmospheric emissions of PCDD/Fs in the U.K.* Environmental Science & Technology 30(4): 1398-1403.
- Kojima H, Takeuchi S, Tsutsumi T, Yamaguchi K, Anezaki K, Kubo K, Iida M, Takahashi T, Kobayashi S, Jin K, Nagai T, 2011. *Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells*. Chemosphere 83(6):753-9.
- Leng JH, Kayama F, Wang PY, Nakamura M, Nakata T, Wang Y, 2009. *Levels of persistent organic pollutants in human milk in two Chinese coastal cities, Tianjin and Yantai: Influence of fish consumption*. Chemosphere 75(5):

634-9.

- Lin C, Hsu JF, Liao PC, 2012. *Coexposure of Dioxin-like Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Free-Range Hens and Implications Derived from Congener Profile Analysis*. J Agric Food Chem 60(8): 1963-72.
- Lin DY, Shy CG, Chen FA, Wang YF, Chen KC., Hsieh LT, Tsai FY, Tsou TC, Chao HR, 2013. *Use of a highly sensitive recombinant hepatoma cell method to determine dioxin concentrations in samples of fish and crab from a hotspot area*. Environ Sci Process Impacts. 15(6): 1264-70.
- Lin DY, Lee YP, Li CP, Chi KH, Liang BWP, Liu WY, Wang CC, Lin S, Chen TC, Yeh KJC, Hsu PC, Hsu YC, Chao HR, Tsou TC, 2014. *Combination of a Fast Cleanup Procedure and a DR-CALUX[®] Bioassay for Dioxin Surveillance in Taiwanese Soils*. Int J Environ Res Public Health 11(5): 4886-904.
- Lorber M, Pinsky P, Gehring P, Braverman C, Winters D, Sovocool W, 1998. *Relationships between dioxins in soil, air, ash, and emissions from a municipal solid waste incinerator emitting large amounts of dioxins*. Chemosphere 37(9-12): 2173-2197.
- Maronpot RR, Foley JF, Takahashi K, Goldsworthy T, Clark G, Tritscher A, Portier C, Lucier G, 1993. *Dose response for TCDD promotion of hepatocarcinogenesis in rats initiated with DEN: histologic, biochemical, and cell proliferation endpoints*. Environmental health perspectives 101(7): 634-642.
- McKay G, 2002. *Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review*. Chemical Engineering Journal 86(3): 343-368.
- Nakao T, Aozawa O, Ohta S, Miyata H, 1998. *Real situation of environmental pollution in Saitama Prefecture by dioxin analogues by using black pine needle*. Organohalogen compounds 39: 347-350.

- Nelson EA, Hui LL, Wong TW, Hedley AJ, 2006. *Demographic and lifestyle factors associated with dioxin-like activity (CALUX-TEQ) in human breast milk in Hong Kong*. Environ Sci Technol 40(5), 1432-1438.
- Ok G, Ji SH, Kim SJ, Kim YK, Park JH, Kim YS, Han YH, 2002. *Monitoring of air pollution by polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans of pine needles in Korea*. Chemosphere 46(9-10): 1351-1357.
- Paustenbach DJ, Wenning RJ, Lau V, Harrington NW, Rennix DK, Parsons AH, 1992. *Recent developments on the hazards posed by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in soil: Implications for setting risk-based cleanup levels at residential and industrial sites*. J Toxicol Environ Health 36(2): 103-49.
- Parzefall W, 2002. *Risk assessment of dioxin contamination in human food*. Food and chemical toxicology 40(8): 1185-1189.
- Pedersen M, Halldorsson TI, Mathiesen L, Mose T, Brouwer A, Hedegaard M, Loft S, Kleinjans JC, Besselink H, Knudsen LE, 2010. *Dioxin-like exposures and effects on estrogenic and androgenic exposures and micronuclei frequency in mother-newborn pairs*. Environ Int 36(4): 344-51.
- Poiger H, Schlatter C, 1986. *Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man*. Chemosphere 15(9-12): 1489-1494.
- Puga A, Maier A, Medvedovic M, 2000. *The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells*. Biochemical Pharmacology 60(8): 1129-1142.
- Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A, 1998. *Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms*. Toxicology Letters 102-103: 343-347.
- Saito K, Matsunaga H, Ohmura A, Takekuma M, Matsuki Y, Nakazawa H, 2009. *Highly sensitive reporter gene assay for dioxins in human plasma by using cycloheximide as an enhancer substance*. Anal Sci 25(8): 1029-32.
- Schuhmacher M, Bocio A, Agramunt MC, Domingo JL, de Kok HAM, 2002.

- PCDD/F and metal concentrations in soil and herbage samples collected in the vicinity of a cement plant. Chemosphere 48(2): 209-217.*
- US EPA, 1994b. *Combustion Emissions Technical Resource Document (CETRED)*. Report No. EPA 530-R-94-014.
- US EPA, 1994a. *Health Assessment Document for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds. EPA/600/Bp-92/001c Estimating Exposure to Dioxin-Like Compounds, EPA/600/6-88/005Cb, Office of Research and Development.*
- US EPA, 2000. *Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds. Part I: Estimating Exposure to Dioxin-like Compounds. Volum 3: Properties, Environmental Levels, and Background Exposures, EPA/600/P-00/001 Ac.*
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, 2006. *The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol. Sci. 93(2):223-41.*
- Van Leeuwen FXR, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M, 2000. *Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. Chemosphere 40(9-11): 1095-1101.*
- Van Overmeire I, Waegeneers N, Sioen I, Bilau M, De Henauw S, Goeyens L, Pussemier L, Eppe G, 2009. *PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in home-produced eggs from Belgium: Levels, contamination sources and health risks. The Science of the total environment 407(15): 4419-4429.*
- Vanden Heuvel JP, Lucier G, 1993. *Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Environmental health perspectives 100: 189-200.*
- Vanderperren H, Van Wouwe N, Behets S, Windal I, Van Overmeire I, Fontaine A, 2004. *TEQ-value determinations of animal feed; emphasis on the CALUX bioassay validation. Talanta 63(5): 1277-80.*

- Wagrowski DM, Hites RA, 1997. *Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation*. Environmental Science and Technology 31(1): 279-282.
- Wang IC, Wu YL, Lin LF, Chang-Chien GP, 2009. *Human dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in Taiwan*. Journal of Hazardous Materials 164(2-3): 621-6.
- Welsch-Pausch K, McLachlan MS, Umlauf G, 1995. *Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to Lolium multiflorum (Welsh ray grass)*. Environmental Science and Technology 29: 1090-1098.
- WHO Regional Office for Europe, 1987. *PCBs, PCDDs and PCDFs: Prevention and Control of Accidental and Environmental Exposures*. Environmental Health Series 32.
- Wittsiepe J, Furst P, Schrey P, Lemm F, Kraft M, Eberwein G, Winneke G, Wilhelm M, 2007. *PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers*. Chemosphere 67(9): S286-S294.
- Wittsiepe J, Fürst P, Wilhelm M, 2007. *The 2005 World Health Organization re-evaluation of TEFs for dioxins and dioxin-like compounds--what are the consequences for German human background levels?* Int J Hyg Environ Health 210(3-4): 335-9.
- Zhao B, Baston DS, Khan E, Sorrentino C, Denison MS, 2010. *Enhancing the response of CALUX and CAFLUX cell bioassays for quantitative detection of dioxin-like compounds*. Science China Chemistry 53(5): 1010-1016.
- NIEA S901.60B, 2010。土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法-冷光酵素報導基因法，環境檢驗所。
- 杜敬民，2008。台灣地區廢水中戴奧辛排放評估與非法棄置飛灰來源查證技術建立之研究，國立清華大學，化學系，博士論文。
- 朱正明，2005。應用生物快速篩檢方法測定乳品中戴奧辛含量之探討，國立海洋大學，食品科學系，碩士論文。

李以彬、陳元武、李秋萍、洪文宗、翁英明，2010。環境污染物快速篩選技術-以土壤中戴奧辛為例，桃園。

李俊賢、詹長權、王榮德，1999。從戴奧辛毒性談台灣醫療事業廢棄物焚化處理，中華衛誌。

陳建民、李孫榮，1996。戴奧辛、環境與人類，工業污染防治。

許菁芳，2000。油症患者血液中多氯聯苯、多氯戴奧辛、多氯夫喃同源物濃度與肝功能異常之相關性研究，國立成功大學，環境醫學研究所，碩士論文。

鍾仁棋，2002。台灣地區農業土壤戴奧辛之調查研究，環境檢驗所環境調查研究年報。

鍾仁棋、潘復華，2002。台中地區農業土壤中戴奧辛背景值之探討。

潘復華，2002。台灣地區農業土壤戴奧辛之調查研究，環境檢驗所環境調查研究年報。

行政院環境保護署檢驗所，2001。台灣地區河川底泥戴奧辛背景初步調查報告，行政院環保署環保新聞。

張簡國平，2004。九十三年空保處第二科執行計畫，大型垃圾焚化廠周界空氣、植物及土壤中戴奧辛含量調查，正修科技大學超微量研究科技中心

王琳麒，2008。九十七年度屏東縣固定污染源排放戴奧辛與重金屬檢測與環境界質調查期末報告，屏東縣政府環境保護局。

紀凱獻，2008。九十七年度專案研究計畫，台灣地區持久性有機污染物大氣沉降特性及湖泊底泥歷史變動趨勢研究(1/3)，行政院環境保護署檢驗所。

紀凱獻，2009。九十八年度專案研究計畫，台灣地區持久性有機污染物大氣沉降特性及湖泊底泥歷史變動趨勢研究(2/3)，行政院環境保護署檢驗所。

張簡國平，2009。九十八年度嘉義市環境介質戴奧辛含量調查計畫，嘉義市環境保護局。

張簡國平，2009。九十八年度台中縣戴奧辛監測計畫，正修科技大學。

鄒粹軍、趙浩然、王雅玟，2010^a。煙道氣樣品本土戴奧辛生物快速篩選檢

測技術開發計畫，行政院環境保護署。

鄒粹軍、趙浩然、王雅玢，2010^b。污染場址國內戴奧辛生物快速篩選檢測技術開發計畫，行政院環境保護署。

趙浩然、鄒粹軍、王雅玢，2011。污染場址國內新戴奧辛生物快速篩選檢測技術開發計畫(II)，行政院環境保護署。

環境保護署，2011。土壤污染管制標準，行政院環境保護署環境檢

應用雙色冷光提升戴奧辛生物快速篩選技術
於土壤污染模場試驗先行評估計畫