

## 環境荷爾蒙的危害性:生物技術評估方法

黃壬瑰，環境保護署環境檢驗所科長  
王世冠\*，環境保護署環境檢驗所組長  
阮國棟，環境保護署環境檢驗所所長

### 摘要

內分泌干擾物質化學結構與天然荷爾蒙相近，易與體內受體結合而干擾生物成長、發育、生殖等生理機能。為了解環境中潛在內分泌干擾物質及其影響，除了化學檢驗分析外，以生物技術來評估環境荷爾蒙危害性是最直接的做法。美國自1996年起開始召集各界相關團體專家學者組成內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會(EDSTAC)，訂定以生物檢測方法篩檢疑似內分泌干擾物質之流程。以分層階段篩選方式來評估各目標化合物之環境荷爾蒙危害性。本文整理目前執行中的五階段篩選(Tier Screening)原則，以及各階段可用之生物檢測技術，同時介紹環保署環境檢驗所這些年來在生物技術評估環境荷爾蒙危害性所做的成效。

關鍵字：環境荷爾蒙危害性、內分泌干擾、生物檢測、分層階段篩選

### 一、前言

當經濟快速發展，人口密集都市化型態日漸普遍，農業工業活動頻繁，伴隨各類污染物質，以氣狀物、懸浮顆粒或廢污水等大量釋入自然環境中。有些化學物質結構與天然荷爾蒙相近或其他因素，一旦進入生物體內，可能與體內荷爾蒙受體結合或干擾荷爾蒙的合成、代謝，造成調節失序，阻礙成長、發育、生殖等生理機能，甚至於造成雄性化或雌雄同體等現象，影響族群數量，牽動生態平衡。此類化學物質泛稱為內分泌干擾化合物(Endocrine Disruptor Compounds, EDCs)，又稱為環境荷爾蒙。

有關於環境荷爾蒙之化學分析，以現有技術多能涵蓋，惟生物危害性之評估，仍在起步階段。對於人工合成化學物質，世界各國多會要求製造販賣廠商在物質安全資料表(Material Safety Data Sheet, MSDS)中提供相關毒性測試資料，諸如實驗動物半致死濃度(LD50)、皮膚接觸毒性、眼鼻黏膜組織刺激性等，但鮮少有觸及生物內分泌系統影響之評估。本文主要說明國際上有關以生物技術來評估環境荷爾蒙之做法，同時也介紹環保署環境檢驗所多年來在這方面所做的努力與進展。

### 二、對環境荷爾蒙危害性評估的階段性架構

美國國會1996年通過法案，要求其環保署(USEPA)增訂內分泌測試方法，以利評估其對人類或生態的影響。USEPA於是召集了由工業界代表、政府官員、環保與公衛團體、勞工安全團體及學界專家所組成的內分泌干擾物質篩選及測定方法諮詢委員會(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee,

EDSTAC), 開始研究環境中可能干擾內分泌干擾系統的化學物質。1998 年參考經濟合作發展組織(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)的作法, 訂出篩選及測試具內分泌干擾物質的分級或分層方式, 包括初始分類(Initial Sorting)、優先度設定(Priority Setting)、第一階段篩選(Tier One Screening)及第二階段篩選(Tier Two Screening)之原則。到了 2002 年細分為 5 個階段(圖 1):

### **第 1 階段:依據現有資訊排列篩選優先順序**

進行內分泌干擾篩選或測試之前, 化學物質應先了解其物理化學特性(例如分子量、活性、揮發性及生物降解性)、人體或環境暴露情形(例如產量、釋放、使用模式)及風險性(例如毒理數據), 以減少不必要的測試。

### **第 2 階段:活體外試驗作用機制數據**

在這個階段的檢測主要作為篩檢化學物質可能作用機制 (mechanisms of action, MOAs), 預測不利的結果路徑 (adverse outcome pathways, AOPs), 排定篩選優先次序。活體外試驗數據可能用來獲得初步判斷, 也可以基於親和力等試驗提供“具潛力”的數據, 換句話說, 將提供給一些化學物質, 在體內的反應陽性, 但旨在減少內分泌干擾物質沒被發現的風險。值得注意的是, 體外試驗中缺乏代謝系統生物轉化過程, 將測試的物質轉化為具內分泌干擾活性, 導致偽陰性, 但相對地也可能因迅速轉化為無活性代謝內分泌的化學物質, 導致誤判內分泌活性的化學物質。

### **第 3 階段:活體試驗, 單一內分泌干擾機制及影響**

這階段活體試驗通常所需時間短, 可提供以接受體為媒介的內分泌, 如雌激素、雄激素或甲狀腺素等是否受到干擾, 其他如甲狀腺素被抑制碘化也可以被偵測出。這類活體試驗包括子宮增生試驗、Hershberger 分析、魚體卵黃質檢測等。

### **第 4 階段:活體試驗, 多種內分泌干擾機制及影響**

對於未成年及成年生物體內分泌干擾實際情形更徹底評估, 並模擬真實環境低劑量進行測試, 實驗包括魚性腺發展試驗及青蛙變態試驗。

### **第 5 階段活體試驗, 內分泌干擾及其它機制影響資料**

這階段試驗可以提供對人類及野生脊椎動物發育及生殖影響、風險及劑量反應數據, 包括觀察老鼠生殖影響和魚、兩棲及鳥類生活史中的毒害。

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals		
<b>Level 1</b> Sorting & prioritisation based upon existing information	- Physical chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability - Human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns - Hazard, e.g., available toxicological data	
<b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data	- ER, AR, TR receptor binding affinity - Transcriptional activation - Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i> - Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding - QSARs	-High Through Put Prescreens -Thyroid function -Fish hepatocyteVTG assay -Others (as appropriate)
<b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine mechanisms	- Uterotrophic assay (estrogenic related) - Hershberger assay (androgenic related) - Non-receptor mediated hormone function - Others (e.g. thyroid)	-Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)
<b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine mechanisms	- Enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms) - Male and female pubertal assay - Intact male assay	-Fish gonadal histopathology assay -Frog metamorphosis assay
<b>Level 5</b> <i>In vivo</i> assays providing adverse effects data from endocrine & other mechanisms	- 1-generation assay (TG 415 enhanced) <sup>1</sup> - 2-generation assay (TG 416 enhanced) <sup>1</sup> - Reproductive screening test (TG 421 enhanced) <sup>1</sup> - Combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced) <sup>1</sup> <small><sup>1</sup> Potential enhancement will be considered by VMG mamm.</small>	- Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates (developmental and reproduction)

圖 1. OECD 之環境荷爾蒙測試與評估之階段性概念架構

### 三、環境荷爾蒙危害性評估使用到之生物技術

OECD 架構中除第一階段係就現有背景資料評估外，其餘各階段都用到生物檢測技術，以下就目前已發展成熟之評估技術，分別介紹。

(一) **活體外(*in vitro*)試驗**：依應用原理分三大類，受體結合分析、細胞增生分析及轉錄分析。

#### 1. 第一類:受體結合分析 (Receptor Binding Assay)

待測物質與放射性荷爾蒙競爭定量之受體(圖 2)，為一快速篩選待測物質與雄性或雌性受體結合力之檢測。然這類方法無法區別待測物的拮抗作用。歐洲替代方法驗證中心(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM)建議在環境荷爾蒙體外生物檢測上不優先採用以動物組織為受體來源，並且不使用放射性物質。

(1) 雌激素受體鍵結效應 (estrogen receptor binding assay)；將 85~100 日老

鼠(Sprague-Dawley rats)去除卵巢手術後 7~10 天內收集其子宮胞漿(uterine cytosol)做為雌激素受體，添加待測物與放射性同位素標識之雌激素，共同競爭下，檢測待測物與雌激素受體相對鍵結親合力(relative binding affinity, RBA)來推估其雌性素活性。

- (2) 雄性激素受體鍵結效應(androgen receptor binding assay) ，去勢 60~90 日齡鼠的生殖組織(如附睪、攝護腺等)中，分離出雄性素受體(androgen receptor)，添加待測物與放射性同位素標識之雄激素，共同競爭下，檢測待測物與雄激素受體相對鍵結親合力來推估其雄性素活性。

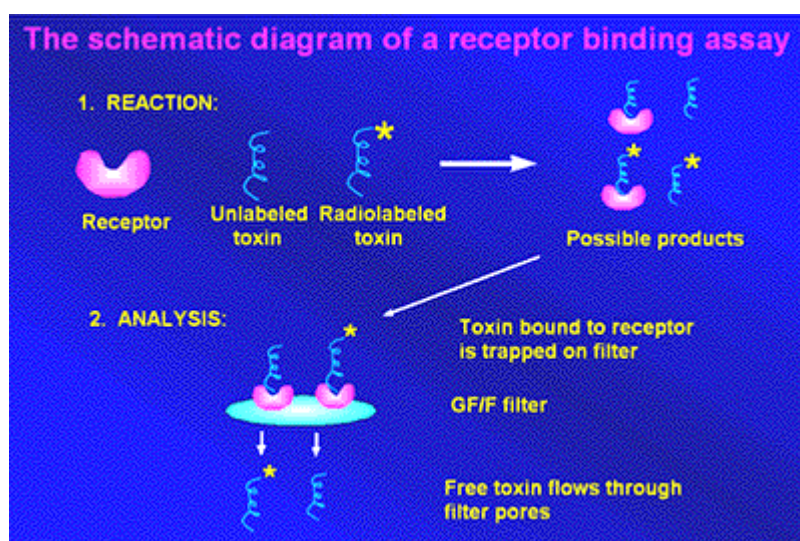


圖2 受體結合分析概略圖 (摘自 www.nwfsc.noaa.gov)

## 2. 第二類:細胞增生分析 (Cell Proliferation Assay)

### E-screen Assay

係由 Soto et al., 1995 年研發，以人類乳癌(human mammary adenocarcinoma)細胞株 MCF-7 增殖分析法 (MCF-7 proliferation assay) 又稱 E-Screen<sup>(1)</sup>，原理是雌激素或類雌激素(Estrogen-like)物質存在時，MCF-7 細胞株會與雌激素接受體結合產生細胞增殖，利用 SRB 螢光法測定細胞增殖量，進而測定其雌激素活性效應，此類分析方法還有測試雌激素細胞株 T47D(ER-CALUX)<sup>(2)</sup>；雄激素細胞株如 LNCaP<sup>(3)</sup>或 DU-145<sup>(4)</sup>。2012 年 OECD<sup>(5)</sup>發現在此類增生試驗中，細胞增生有些係透過媒介傳輸，並非經雌激素基因轉錄活化，基於專一性的考量，OECD 未推薦此類方法。但文獻上可找到許多使用此類方法所發表之研究報告<sup>(6-8)</sup>。

## 3. 第三類:轉錄分析(Transactivation assays)或報導基因分析 (Reporter gene assay)

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

(1) 酵母菌雌性激素篩檢法(Yeast Estrogen Screen, YES)及酵母菌雄性激素篩檢法(Yeast Androgen Screen, YAS)

將營養缺陷的酵母菌中，殖入人類雌(雄)性激素受體(human estrogen/androgen receptor)之質體，在缺乏Uracil特定營養物質，卻含類雌(雄)激素環境下，缺陷的酵母菌會增生，藉此確認此類化學物質具雌性激素之干擾效應(圖3)。一般而言，酵母菌雌性激素篩檢法，而轉殖之酵母菌可永久保存，為一簡便且靈敏之測試法，目前已有市售測試組。但因酵母菌屬真菌類其代謝情況與人類不同，且具細胞壁較無法反映化學物質穿透人類細胞膜之情形，因此EDSTAC並不建議使用，但因程序簡單易操作，仍普遍有許多應用此方法之文獻陸續發表<sup>(9)</sup>。

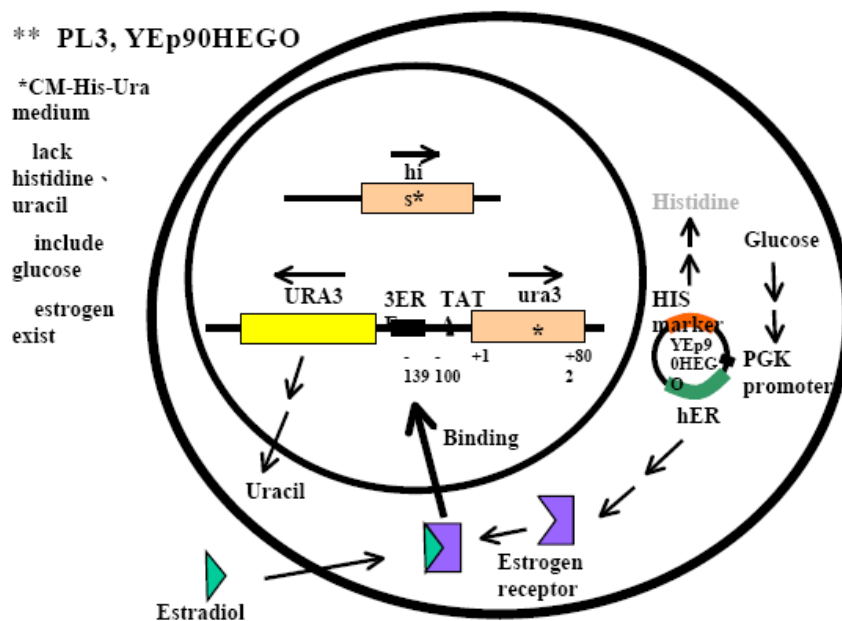


圖3：酵母菌雌性激素檢測法示意圖

(2) 人類乳癌細胞株 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法 (MVLN estrogen specific transcription assay)

MVLN細胞株係在人類乳癌細胞株MCF-7上穩定轉染(stable transfection)適當之發光酵素(如Vit-Luc Luciferase)的報導基因(reporter gene)，當樣品中存在有雌激素或類雌激素化學物質時，會與雌激素接受體結合，蛋白質轉錄機制因受雌性激素所調控而被活化，而產生具專

一性Luciferase基因表現的蛋白質。轉錄之蛋白質luciferase可採用冷光法加以定量，與E2之效應互相比較可得到樣品中待測化學物的雌激素活性（Estrogenic activities）<sup>(10)</sup>。全部測試耗時約為2天，偵測靈敏度與E-Screen 相近，且誤差機率較低。方法原理如圖4所示：

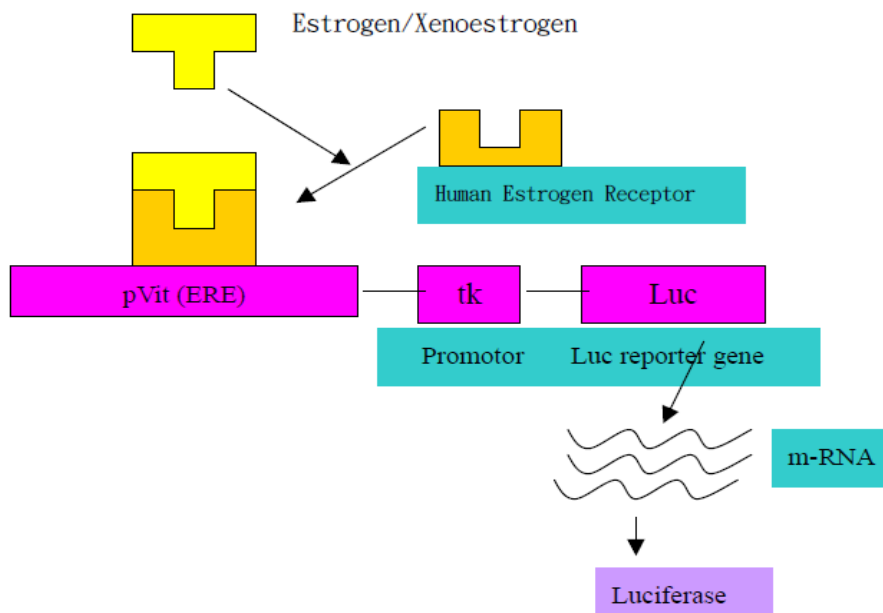


圖 4. MVLN 細胞株發光機制

## (二) 階段 3 之活體試驗：

1. 子宮試驗(uterotrophic assay)：子宮增重試驗是一個短期的篩選試驗，起源於1930年的。可篩選出具雌性素活性的化學物質，它是由OECD與USEPA共同建立，活體雌鼠子宮增生測試，迄今最準確之雌性激素篩檢測試法之一，它可檢測出化學物質對鼠子宮反應雌性素抑制或刺激的能力。實驗方式是以未成熟的雌幼鼠(斷奶後青春期前)或經卵巢摘除之雌成鼠作為測試之實驗動物，待測物以口服或注射方式進入動物體內。雌性激素效應可由測定控制組與實驗組之子宮的脂肪、乾重或濕重確認。試驗中具雌性激素效應之物質，可促子宮增加細胞分裂，子宮細胞形態也轉變，包括增加上皮細胞的高度，腺上皮細胞高度，基質厚度和腔上皮的分化和延伸，為圓柱狀。

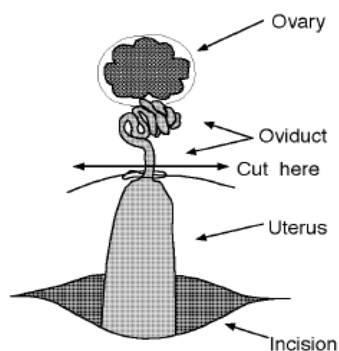


圖 5 切除卵巢位置

2. Hershberger assay<sup>(11)</sup>: 去勢的雄鼠其第二次性徵—攝護腺及儲精囊，成長或維持其大小，須靠用雄性素，睪固酮及 dihydrotestosterone DHT。本方法以去勢的雄老鼠餵飼或注射睪固酮或待測物混合物，最後檢測其攝護腺及儲精囊的重量，若增加或維持不變，則具雄激素活性。

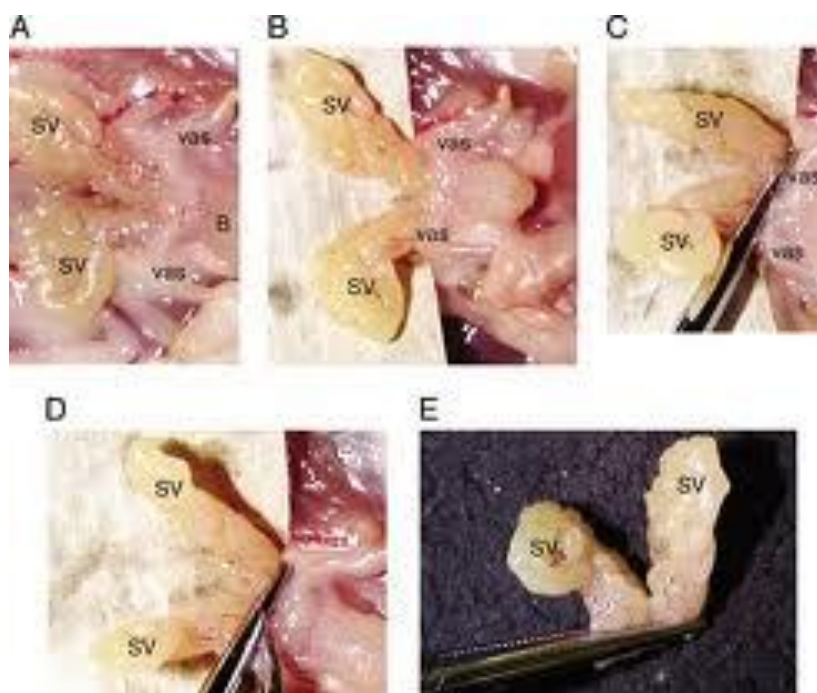


圖 6 Hershberger assay<sup>(11)</sup>

(三)階段 4 的活體試驗：

1. 齧齒動物為期28天重複劑量口服毒性研究 (Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents)；以不超過9星期大小的健康齧齒動物為研究對象，在其食物中混入待測物，平時記錄攝食量、水量及活動情形等，最後解剖量測體重及各器官重量。

2. 青蛙變形分析試驗 (Frog metamorphosis assay): 經暴露於待測物超過14天的幼生(蝌蚪)期非洲青蛙(African clawed frog, *Xenopus laevis*)，以電腦輔助的攝影器材，定量蝌蚪轉化為青蛙時，尾巴吸收的速度，若待測物具甲狀腺活性，加速尾巴吸收，反之，待測物抑制甲狀腺素。
3. 魚性腺再現分析(a fish gonadal reproductive screening assay); 魚類的荷爾蒙結構、雌性素接受器形狀及功能有別於哺乳類(如哺乳類的睪固酮testosterone，魚類則為1-ketotestosterone)，類固醇接受器與肝臟分泌的卵黃前質也僅產卵動物所特有。故須針對魚類作內分泌干擾試驗。此試驗設計用來篩選待測物雄性素與雌性素活性。觀察成熟雌魚及雄魚不正常的存活率、生殖行為、第二性徵、生殖指數(gonadosomatic index, GSI)、產卵數目、受精率、孵化率、子代存活率等。

#### (四)階段5的活體試驗：

1. 哺乳類二代間生育繁殖系統毒性測試(two-generation mammalian reproductive toxicity study); 此方法透過觀察老鼠親代與子代之間，評估待測物對親代老鼠生殖功能、動情期的週期、求偶行為、受精率、懷孕至分娩，而子代哺乳、斷奶及最後能存活至成鼠且具生殖功能的影響。
2. 鳥類生育繁衍影響測試(鸕鶿與野鴨) (avian reproduction with bobwhite quail and mallard); 以鳥類作為觀察對象，而鸕鶿與北方野鴨為此方法常用的研究對象。由成鳥開始暴露於具待測物的環境中，經產卵、孵化、子代的出生，爾後子代繼續暴露，成長，最後又成熟產卵。在這二代之間除詳實記錄內分泌干擾活性相關資料如產卵量、破壞卵量、卵殼厚度、胚胎存活率及小鳥14天存活率外，攸關其它荷爾蒙觀察指標如重要器官(包括腦)重量、腺體重、骨骼發育、腳及翅膀長度、各器官與骨的比值、骨骼的X-光片、病理、功能測試及子代生育能力等資料均須一併記錄。
3. 魚類生命週期測試(鱒魚) (fish life cycle, fathead minnow) ; 在演化過程中，魚類在脊椎動物中與哺乳類關係最遠，生殖策略上從卵生、卵胎生至胎生都有，內分泌干擾物質對不同科別的魚可能就有很大差異，還有地理因素須考慮。淡水魚-鱒魚(fathead minnow, *Pimephales promelas*)從受精、發育、成熟、生殖至子代發育須約花300天的暴露評估。至於海水魚的評估試驗有些科學家朝向以鮭魚(salmon)作試驗對象發展。鱒魚試驗一開始，須使用200個受精卵，分置於8個培養缸中進行暴露，至孵化、幼魚、成熟後，將一隻雄魚與二隻雌魚各別圈養，當受精產卵後移走成魚，完成待測物的單一濃度試驗。但此試驗除須有控制組的考量下，每一種待測物須進行五種濃度測試。



4. 糠蝦生活史(Americamysis) (Mysid life cycle, Americamysis)；無脊椎動物(特別是節肢動物如昆蟲、蝦、蟹等)佔全球生物種類比例極大部份，但較少以無脊椎動物作為試驗生物。常用於毒性測試的無脊椎動物，巧合都為甲殼類；海水方面以糠蝦(Mysidacea目)，淡水則用水蚤(Daphnia magna or Daphnia pulex)，前者雌雄異體，後者生活史中以孤雌生殖為主。雖然水蚤也有有性生殖，但一般標準測試僅限孤雌生殖的水蚤進行。這兩種甲殼類雖採不同的生殖策略，但具備若干共同生理特徵，例如兩者均係以蛻殼素為主要調控生長及蛻殼機制，體內也都有類似雌性素的物質刺激產生卵黃前質。針對這些無脊椎動物的生殖與生長情形(蛻殼狀況、體長)進行觀察。
5. 兩棲類成長及生育繁衍能力的測試(amphibian development and reproduction, Xenopus)；這是透過暴露幼生期的青蛙(蝌蚪)經變態、生長、生殖的評估，目前試驗的品種及標準化程序還在評估測試。

#### 四、環境檢驗所歷年建立環境荷爾蒙危害性評估生物技術

環保署多年來十分重視環境荷爾蒙的監控，歷年來透過與學界合作及自行研究發展，在EDC之生物檢測方法的開發及驗證上，有許多進展。

1. 建立人類乳癌細胞株增生測試 (MCF-7 cell proliferation assay; E-screen) (與中興大學林伯雄教授合作)：以計量粒線體代謝活性MTT法與蛋白質質量總合SRB法評估雌酯二醇、壬基酚、辛基酚、磷苯二甲酸二酯及雙酚A等對乳癌細胞株量測細胞增生情形，方法偵測靈敏度 $1\sim 100 \times 10^{-12}M$ 。
2. 建立酵母菌指標性基因雌性激素測試 (Yeast Estrogen Screen, YES)<sup>10</sup>：由成大郭育良教授提供攜帶URA3基因之PL3品系酵母菌，針對河川及工業廢水進行環境樣品測試，河川水樣之雌性激素當量(Estrogenequivalent concentration, EEQ)測試結果介於 $1.4\sim 3.8 \text{ ng EEQ/L}$ ，工業區廢污水處理廠之進流水與放流水中雌性激素當量，則介於 $4\sim 7 \text{ ng EEQ/L}$ 。
3. 建立人類乳癌細胞株 MVLN 雌激素專一性轉錄分析法(與大仁技術學院陳福安教授合作)：進行42種塑化劑中，其中Butyl benzyl phthalate (BBP, 10 M)、Bis(4-methyl-2-pentyl)phthalate (BMPP, 10 M)、Diethoxyethyl phthalate (DEEP, 1 & 10 M)、Hexyl-2-ethylhexyl phthalate (HEHP, 10 M) 及 Monobenzyl phthalate (MBP, 10 M) 呈現顯著雌激素效應，屬弱雌激性化學物質。檢測高屏溪84個樣品中，相對雌激素活性 $>70\%$ 者有4.8%，相對雌激素活性介於25%與70%之間者有7.1%。
4. 建立雄鯉魚體中卵黃前質雌性激素酵素免疫分析法(與海洋大學張清風教授合作)：正常環境下成熟雄魚體內卵黃前質量低，以酵素免疫分析法(ELISA)檢測雄魚血漿中的卵黃前質(vitellogenin)異常增加可以驗證化學物

質對魚體產生雌性激素的作用。

5. 建立人類乳癌細胞株MCF7-AR1之雄激素專一性轉錄分析法 (A-Screen) (與大仁技術學院許美芳教授合作): 檢測高屏溪84個樣品中, 無樣品超過相對雄激素活性>70%, 相對雄激素活性介於25%與70%之間者有4.8%。
6. 化學物質干擾活體生物荷爾蒙平衡之研究<sup>(12)</sup>-中興大學環工系林伯雄/、成功大學環醫研究所郭育良(委託研究案)

建立活體外篩選方式如酵母菌雌性刺激素測試法 (YES assay) 及人類乳癌細胞增生測試法 (E-screen) 二種方式。針對台灣地區常見工業有機性污染物, 4-NP、4-OP、DEHP、DBP、BPA、styrene, 以體外細胞株雌性激素測試, 驗證個別化合物之潛在雌性激素效應, 發現4-NP、4-OP、及BPA具強雌性激素干擾效應, DEHP、DBP、styrene則未發現具雌性激素干擾特性。

7. 環境荷爾蒙調查研究(三年)計畫<sup>(13)</sup>-大仁技術學院, 陳福安、林美芳、陳庭堅(委託研究案)

利用人類乳癌細胞株 VLN 雌激素專一性轉錄分析法, 探討雌激素效應物質之篩選, 用 MCF7-AR1 細胞, 探討雄激素效應物質之篩選, 並以高屏溪流域採集 84 個真實環境樣品驗證兩種生物分析法應用可行性。

8. 烷基酚類化合物對雄鯉魚卵黃前質生成之影響<sup>(14-16)</sup>-黃壬瑰(自行研究案)

以酵素免疫分析法(ELISA)來檢驗血漿中卵黃前質(vitellogenin)的含量, 以驗證烷基酚類化學物質暴露對魚體所產生雌性激素的作用。結果顯示, 透過注射、餵飼或直接暴露含壬基酚或辛基酚食物或水體後, 均提高雄鯉魚卵黃前質含量。不過短暫暴露於含辛基酚水體後, 卵黃前質雖然上升, 但將雄魚移至乾淨水中, 卵黃前質含量降至未暴露前的濃度值, 顯示此一影響或許為一種可回復之暫時症狀。

## 五、結語

內分泌干擾化合物對生物及人體的作用雖緩慢卻影響深遠。如何在眾多化學物質中決定環境荷爾蒙物質清單項目, 歐美國家考量對產業衝擊與健康風險, 一直是抱持著相當審慎的態度。美國 EDSTAC 與 OECD 所使用之篩選流程與對應的生物檢測技術, 也可應用在環境樣品之環境荷爾蒙特性評估上。環境檢驗所這些年來在檢驗能量的建立及相關調查的進行, 已略有基礎。未來仍將繼續為降低環境荷爾蒙的風險而努力。

## 參考文獻

1. Soto, A.M., et al., The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental health perspectives*, 1995. 103(Suppl 7): p. 113.
2. Legler, J., et al., Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences*, 1999. 48(1): p. 55-66.
3. Montgomery, B.T., et al., Hormonal regulation of prostate specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *The Prostate*, 1992. 21(1): p. 63-73.
4. Dondi, D., et al., Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer research*, 1994. 54(15): p. 4091-4095.
5. OECD, Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption 2012. Wagner, M. and J. Oehlmann, Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011. 127(1): p. 128-135.
6. Schiliro, T., et al., Oestrogenic activity of a textile industrial wastewater treatment plant effluent evaluated by the E-screen test and MELN gene-reporter luciferase assay. *Science of the Total Environment*, 2012. 432: p. 389-395.
7. Schiliro, T., et al., Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011.
8. Krein, A., et al., Determination of Estrogen Activity in River Waters and Wastewater in Luxembourg by Chemical Analysis and the Yeast Estrogen Screen Assay. *Environment and Pollution*, 2012. 1(2): p. 86.
9. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report
10. Legler, J., et al., Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line.

Toxicological Sciences, 1999. 48(1): p.55-66.

11. Gray L. E., et al., Hershberger Assay to Investigate the Effects of Endocrine-Disrupting Compounds with Androgenic or Antiandrogenic Activity in Castrate-Immature Male Rats Current Protocols in Toxicology, 2005,16(9) .
12. 林伯雄、郭育良，化學物質干擾活體生物荷爾蒙平衡之研究，EPA-90-E3S5-02-01, 2002。
13. 陳福安、林美芳、陳庭堅，環境荷爾蒙調查研究(1-3)，EPA-92-E3S5-02-01, 2003~2005。
14. 黃壬瑰，環境荷爾蒙生物檢測方法-酵母菌檢測，環境檢驗所環境調查年報第9期，2002，187-206。
15. R.Huang, C. Wang, The Effect of Two Alkylphenols on Vitellogenin Levels in Male Carp, Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B),2001,Vol.25,No.4, 248-252.
16. 王正雄、張小萍、黃壬瑰、李宜樺、王世冠、洪文宗、陳珮珊，環境荷爾蒙-壬基苯酚殘留調查及其對雄鯉魚生理效應之研究，環境檢驗所環境調查研究年報第9期，2002，291-312。