

## 1-A

砷已被研究證實為人體致癌物之一，人體攝入砷主要來源有魚類、其他海產食物及飲用水。根據漁業署針對台灣地區養殖用水現況調查指出，嘉義縣與台南縣每年抽用之地下水為1.6億及0.9億 $m^3$ ，兩縣各佔全國地下水總抽用量17%及10%，但該地區地下水中含有高量的砷，以這樣的水質條件進行養殖，可能會讓魚介類暴露於砷污染之威脅下，因此運用生物指標 (biomarker) 研究砷在魚體內各組織之劑量是有其必要性的。本研究除了探討養殖池水中砷含量濃度與虱目魚之間的關聯性外，同時建立及發展以生理為基礎之藥理動力學模式 (Physiologically-Based Pharmacokinetic, PBPK)，透過魚體之生化參數、生理參數、及組織器官間傳輸及質量平衡的觀念，擬合及預測出砷在魚體內之傳輸及分佈流，同時藉由外插文獻資料，發展成為一個適合台灣水域環境之生態風險評估工具。

## I-1

許多研究證實，水域環境中的污染質不僅會對水生生物造成不良影響，甚至會因食物鏈的串聯而間接危害到人類 (1,2)。魚貝類終日棲息於水中，一旦水域環境遭受到污染，污染質常會藉著生物濃縮 (bioconcentration) 及生物放大 (biomagnification) 效應而累積在生物體內，一旦人類食用這些生物時，便會把這些污染質攝入體內，對人體造成負面影響 (2,3)。當污染質濃度較高時，會引起急性毒病症；反之污染質濃度較低時，會經由生物累積作用，可能對人體細胞、組織、器官的機能造成影響，甚至導致器官衰竭或癌症(4)，例如：1960年間日本沿海居民食用遭受甲基汞污染魚貝類所引發的水俣病 (minamata disease) 事件，以及 1986 年台灣銅污染的綠牡蠣事件等，都是知名的重金屬污染事件。

## I-2

魚介類是人們蛋白質的重要來源之一，一旦遭到污染會對人體造成很大的傷害 (5)。台灣一向是國際知名的魚介類養殖重鎮，特別是在內陸養殖部份其產量佔了 330 萬噸，年產值更高達了 27,300 元；尤其在台灣西南沿海一帶，養殖魚塢及淺海養殖甚至蔚為地方特色 (6)。根據漁業署委託農業工程研究中心所進行的養殖用水現況調查分析報告顯示，1997 年台灣養殖漁業的地下水使用量為 9.6 億  $m^3$  (7)，而嘉義縣與台南縣每年抽用的地下水為 1.6 億及 0.9 億

m<sup>3</sup>，兩縣各佔全國地下水總抽用量的 17% 及 10%。

### I-3

但該地區地下水中含有高量的砷，以這樣的水質條件進行養殖，會讓魚介類暴露於砷污染的威脅下。

### I-4

在當地眾多養殖魚類中，虱目魚是台灣非常重要之水產品。

### I-5

再加上虱目魚養殖所需的用水量非常的大 ( $3.8 \times 10^4 \sim 4.9 \times 10^4 \text{ m}^3$ )，污染質可能因此污染了養殖池 (8)，但潛在的砷污染危害性卻未有完善的探討。

### I-6

本計劃擬據 1983 年美國國家科學院所提出的風險評估報告，來建構適合台灣水域生態環境的風險評估工具；所謂的『風險評估』係由危害之鑑別、劑量-反應評估、曝露評估及風險特性等四個部份所組成；其中以 PBPK 模式最適合做為風險評估中之劑量-反應評估工具(11)。因此本計劃以烏腳病疫區之地下水養殖虱目魚作為主要的研究對象，除了進行野外背景資料的建立及分析，同時進行實驗室之曝露試驗；探討養殖池水中砷含量濃度與虱目魚之間的關聯性，並首嘗運用 PBPK 模式來推估砷在虱目魚體內的分佈流，其主要目的為發展出一套適合台灣水域生態環境的風險評估工具，而所模擬出來的資料；可供管理當局作為養殖水域環境的預警系統，或為環境監測之依據。

### L-2-1 水域環境及水生生物體內之砷的分佈。

一般自然水體中的砷含量非常少，但在油田及熱泉水中有較高的含量 (12)，故砷會透過熱泉水而進入地表水及地下水體中(13)。水域環境中砷的化學型態相當複雜，在不同氧化還原狀態下，砷有四種穩定的價位 (+5；+3；-3 及 0)，於水域環境中砷常以砷酸鹽 ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ )、亞砷酸鹽 ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ )、單甲基砷 (monoethylarsonic acid, MMA) 與雙甲基砷 (dimethylarsonic acid, DMA) 的型式存在 (14, 12)。

Smedley 等研究指出，大多數與空氣接觸的水體 (如河水、湖泊及海水等)，其砷的型態多是以五價為主；地下水為封閉水體，其砷的型態多以還原狀態之三價砷為主。Chen 等研究台灣烏腳病疫區地下水砷物種型態指出，溶解態的砷均為無機砷，其中三價與五價砷之化學型態分別為  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  及  $\text{HAsO}_3$ ，兩者

比值為 2.6。其中，非溶解性砷佔總砷的 3%，有機砷含量則在偵測極限以下。

生物體內亦有砷的分佈，主要是藉由水體為傳送的途徑 (16)，水生生物往往有較多的機會接觸到砷。水生生物體內可能含有無機砷與有機砷，其中無機砷的量通常較少（一般約為  $0.9-2.5 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt），有機砷含量較多，通常佔總砷的 65% 以上 (17)。水生生物體內已被偵測出的砷物種包括：單甲基砷酸 (Monomethylarsonic acid, MMA)、雙甲基砷酸 (dimethylarsinic acid, DMA) 等 (17, 18)。

一般而言，海洋生物體內的砷含量遠高於陸生生物及淡水生物，有些種類的海洋生物對砷具有較大的富集能力，其主要的因素可能是因為海藻能綜合砷酸醣類 (arsenosugars)、AC 和 AB，而這些砷化合物容易被食藻性魚類腸胃道吸收所致 (19)。

### L-2-2 砷的毒理效應及危害

砷對人體的毒理現象非常複雜，其毒性依暴露時間的長短可分為慢性毒及急性毒兩種型式。急性砷中毒的初期反應是嘴唇及咽喉感到異常乾燥，嚴重者甚至出現語言障礙、臉部水腫、呼吸困難、心悸、腸胃道不適、腹部絞痛、腹瀉、血尿、嘔吐及神經系統受阻等病變。也可能引起食慾不振、黃疸、紅斑與神經緊張；甚至會導致迅速脫水而死 (20)。長期暴露於較低濃度砷環境中時，會造成砷慢性中毒，其症狀有：掉髮、指甲鬆動、溼疹、皮下微血管叢擴展，皮膚紅斑、手足部出現色素過度沉澱、表皮角化、嚴重脫屑及脫落性皮膚炎等症狀，嚴重者會導致癌症 (20)。

根據 Johns Hopkins 大學針對砷致癌途徑所進行的研究報告指出，人體細胞暴露於低濃度三價砷的環境中時，細胞酵素活動力會明顯降低，進而導致修護染色體的細胞死亡，使得健康細胞分裂後的粒腺體急速縮小，形成癌細胞，顯示三價氧化砷具基因性毒，會破壞人體細胞內的 DNA (21)。

依據美國毒物標準局疾病登記處 (Agency of Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) 所彙整之砷和癌症相關研究資料顯示，砷會對心血管、神經、免疫、內分泌、生殖等系統造成傷害，並會導致肺癌、皮膚癌、膀胱癌、肝癌、腎癌、前列腺癌及鼻咽癌。另外，砷可經由飲水途徑進入人體，不但會損及健康，也會引發血管、皮膚和其他組織、系統的病變，甚至導致癌症 (21)。

1961-1985 年間臺灣西南沿海地區曾發生飲用井水遭砷污染事件，大約有 140,000 居民長期暴露於砷污染環境中，並引發烏腳病的流行 (22)。根據相關

研究調查發現，當地井水中所含的砷濃度為  $0.01\sim 1.82\text{ mg L}^{-1}$ ，其中大部份水井所含的砷濃度介於  $0.4\sim 0.6\text{ mg L}^{-1}$  之間，砷物種型態多為三價的無機砷，其與五價砷的比值為 2.6 (23)。根據環保署(1998) 委託工業技術研究院化工所調查結果顯示，義竹、布袋、北門及學甲這四個地區受檢測之 160 座的水井當中，有 66% 的含砷量超過自來水水質標準，有的甚至超出標準值 40 倍以上。其中北門鄉不合格水井的比率高達 90%。義竹鄉、布袋鎮和學甲鎮水井不合格比率分別為 62%、60%、52%。直到政府提高自來水普及率，並強力宣導禁用井水作為飲用水後，烏腳病疫情才逐漸獲得改善。

根據世界衛生組織 2001 年所公佈的資料顯示，開發中國家對飲用水砷含量並沒有嚴格限制，因此飲用水中的砷濃度往往比已開發國家高，例如：阿根廷、巴西、智利、匈牙利、墨西哥、泰國、越南和印度東部都有砷污染的問題 (12)。

### L-2-3 砷的攝入途徑及安全標準

根據 1993 年美國食品藥物管理局(US Food and Drug Administration, US FDA) 研究指出，在人類所攝入的砷當中，有 90% 的砷來自於水產食物，其他 10% 來自於其他食物，且 Tam (24) 等研究發現人體攝入砷的主要來源是魚類及其他海產食物。早在二十世紀初，就有學者發現水產生物體內含有高濃度的砷化合物，而 arsenobetaine 砷化合物便是 Edmonds 等人在 1977 年分析龍蝦體內化學成分時所發現的 (25)，其後有更多的研究在其他水產生物體內發現了大量砷化合物。因此，食用水產食物為人類攝入砷最主要的途徑 (26)。其中，以魚類、扇貝、牡蠣、貽貝、蝦子及蟹等甲殼類動物所含的砷含量較高 (24, 27)。

在飲水部份，一般民眾攝入的途徑大部分來自於飲用水，每日的攝入量為  $< 10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  (28)。根據世界衛生組織 2002 年的報告中指出，現今許多歐洲國家及台灣已將飲用水的砷含量標準濃度從  $0.05\text{ mg L}^{-1}$ ，降為 WHO 建議的  $0.01\text{ mg L}^{-1}$ ，而美國國會也於安全飲用水 (Safe Drinking Water Act, SDWA) 法案中，要求美國環保署修改飲用水中的砷含量標準，由原先的  $0.05\text{ mg L}^{-1}$  調降至  $0.01\text{ mg L}^{-1}$ ，並於 2002 年 2 月以前開始生效。目前飲用水中砷含量標準值，維持於  $0.05\text{ mg L}^{-1}$  的國家尚有孟加拉、中國及印度等國家 (29)。除了飲用水之外，我國環保署也訂定有水產養殖用水的砷含量標準為  $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ 。然而，政府當局對養殖池水的水質卻未有完善的監控，以這樣的水質進行養殖，

可能造成人們在飲食過程中，攝入過量的砷之虞。

#### L-2-4

水域中的污染物質常會對環境中的生物造成某程度上不良的影響，甚至間接地危害到人類 (1)。有些生物具有累積水域中化學物質之能力，使得生物體內的化學物質含量遠高於水域中的濃度，產生所謂的生物累積效應。生物累積是水域生物藉由食物或週遭水體吸收並保有某種化學物質的現象，依吸收途徑之不同可分為生物濃縮及生物放大兩部份。生物濃縮是水域中的化學物質藉由主動的擴散作用而進入生物體的過程，此過程為生物體吸收及排除化學競爭的結果；生物放大則是隨著營養階或生物階的升高，經由生物選擇性的濃縮物質傾向，故位於食物鏈頂層的生物會累積相當高的物質濃度(30)，因此它們常被用來作為污染程度之指標，或為環境監測之依據。

許多文獻提到水中污染物質的生物累積過程，可利用生物濃縮因子(BCF)來描述生物所產生之累積效應(31)。所謂的生物濃縮因子係指「在穩定狀態下生物體中的污染物質濃度與水域中污染質濃度的比值」，可用來推估生物體對污染物的累積能力(31)。然生物濃縮是生物體吸收及排除之間相互競的結果，因此可根據污染物質在生物體內的吸收及排除之速率常數，求出該生物濃縮的理論值 $K_1$ 的單位為 $\text{mg g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ；這兩個常數分別以 $K_1$ 及 $K_2$ 來表示，其中 $K_2$ 的單位為 $\text{day}^{-1}$ 。為求得此兩個參數值，Lin (31) 等在文獻中皆利用「一階單區塊模式」來進行研究，結果顯示生物濃縮是生物累積能力之主要來源。

#### L-2-5

近年來許多研究廣泛地運用生理為基礎的藥理動力學模式(PBPK model)，來描述化學物質在生物體內的吸收、分佈、代謝及排除等生理機制之過程(32)。且它最大的特色是藉由真實生物體的生理（組織體積、血液量、呼吸量）、生化（最大代謝能力常數等）數據與曝露環境資料（時間、濃度），作為模式所需的運算參數 (11)，並劃分具生理、生化特性之區塊，藉由血液之流動將環境中曝露的污染質帶至全身，於各組織區塊中進行分布、代謝或累積等之時間-濃度預測 (33, 34)。此外，PBPK 模式具有下列優點：(1) 可運用在動物體曝露於不同劑量之化學物質時，推估出其吸收、代謝的分布流；(2) 針對各種暴露途徑與時間，來描述化學物質的傳輸及分佈；(3) 能作為不同物種間，曝露在化學物質劑量之差異性評估，因此能將動物試驗之數據加以應用及模擬，並作

為不同環境中生物/人曝露於化學物質狀態之風險評估工具 (35)。

### M-3-0

本論文的研究方法與步驟擬分成兩大階段。第一階段可分為兩部份，一是「野外調查」部份，藉以瞭解養殖池中養殖水、魚體的實際砷含量及其互動關係；另外是「實驗室模擬」部份，藉以瞭解不同砷濃度下魚體吸收/排除砷的速率，進而推估出生物濃縮因子及吸收/排除速率常數；第二階段則利用「生理為基礎的藥理動力學模式」，求出砷在生物區塊中與時間變異條件下，對水域生態環境及生物所造成之危害性，冀能發展出一套適用於水域環境生態之風險評估工具，其研究方法分述如下：

#### 第一階段：

##### (一) 野外調查

- (1) 於台灣西南部嘉南平原四區分別選擇養殖池，長期監測養殖水和魚體的砷含量，以建立養殖環境的背景資料。
- (2) 每月前往養殖池採集樣本，其中水樣存放於 500 ml 的細口瓶中，並以  $\text{HNO}_3$  固定；魚體經池水漂洗後，分別置入封口袋，冷凍後攜回研究室處理。
- (3) 魚體經冷凍乾燥處理後，分別秤其乾重後備用。

##### (二) 實驗室模擬

- (1) 首先設置水族缸（含過濾系統、恆溫器），加入未被砷污染的養殖水及實驗魚類，用來模擬養殖池中的環境條件。馴養期間，水溫控制在 25℃，並以無污染的餌料餵食，馴養時間訂為一週。
- (2) 進行初步的毒性實驗，根據半致死濃度，瞭解魚體對砷濃度的耐受極限。
- (3) 選擇生物所能承受的砷濃度，進行生物體對砷的吸收/排除實驗：
  - A、實驗組（魚體所含的砷，包括自體的原本含量，以及累積自養殖水的新加入量）
    - a、吸收實驗（包括養殖水和魚類）

設置上述條件的水族缸，將魚類至入水族缸中，在養殖水中加入砷，並定時餵以無污染之餌料。於第 0、1、2、4、7 天進行採樣。

b、排除實驗（包括養殖水和魚類）

移入無污染之水族缸，並餵以無污染之餌料，以相同的時間區隔進行採樣。

B、空白組（實驗期間生物體無砷的新加入量，所測得含量作為上述兩步驟的校正值）

重覆上述步驟 a、b，但不加入砷。

(4) 將生物體冷凍乾燥、磨成細粉後，連同固定好的水樣進行砷含量分析。

(三) 砷含量分析

取上述粉末及水樣，以原子吸收光譜儀（Atomic Absorption Spectroscopy, AAS）分析其砷含量。

(四) 生物濃縮因子及吸收/排除速率常數計算

根據 A、B 組間的差值，可求得魚類從水中吸收的砷含量，以動力學的理论計算出生物體對砷的吸收/排除速率及生物濃縮因子。

**第二階段：**

(一) 吸收/排除動力學分析

(1) 利用一階單區塊模式(1<sup>st</sup>-order one-compartmental model)

描述吸收及排除動力之方程式，可以下式表示：

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad (1)$$

其中  $k_1$  表示吸收速率常數 ( $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )； $k_2$  表示排除速率常數 ( $\text{d}^{-1}$ )； $C_w$  表示化學物質在水中濃度 ( $\text{ng ml}^{-1}$ )； $C_f$  表示化學物質在生物體內濃度 ( $\text{ng g}^{-1}$ )。若  $C_w$  為常數，(1)式可寫為：

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (2)$$

當接近穩定狀態 ( $t \rightarrow \infty$ )，方程式 (2) 可寫成：

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} C_w \quad (3)$$

由 BCF 之定義：

$$\text{BCF} = \frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} \quad (4)$$

當生物移至清水中，排除常數  $k_2$  可由下式斜率得之：

$$\ln C_f(t) = \ln C_f(0) - k_2 t \quad (5)$$

由排除試驗所得之“時間 -log  $C_f$ ”圖形可求得暫時的  $k_2$ 。接

著由生物體中量測到最大濃度時之  $\frac{C_f}{C_w}$  求得暫時的 BCF

值。再將  $k_2$  及 BCF 值代入 (4) 式  $\text{BCF} = \frac{k_1}{k_2}$  中，得一暫時的  $k_1$ 。

(2) 假設水體中  $C_w$  值在每一段量測期間皆保持常數，則可將

上述求得之  $k_1$ 、 $k_2$  及  $C_w$  代入  $\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f$  (方程式 (1))，

並應用數學軟體程式 (6<sup>th</sup>-order Runge-Kutta method) 可求得自量測開始至結束之  $C_f$  值。

(3) 接著計算此估計  $C_f$  值與實際  $C_f$  值之誤差。最後改變  $k_1$  及  $k_2$  值，並重覆上述步驟，以使誤差儘可能最小。

## (二) PBPK 模式之建構

本研究所建構之砷-PBPK 模式，主要是應用動態線性系統來描述水域生物 (虱目魚) 暴露於遭砷污染環境中，污染質的濃度-時間對生物造成之危害進行探討；因此本模式必須先做假設簡化砷累積於虱目魚體內的傳輸、分佈、代謝與排除等之物理及生化特性。此外，本模式參考及修改 Wintermyer (34, 36, 37, 38) 等學者所發展出來之 PBPK 模式，並根據 PBPK 模式之兩項基本要點，建構出砷在虱目魚體的 PBPK 模式，其要點如下：(1) 選定能充份代表生物體構造之標的組織 (鰓、血液、心臟/腎臟、肺、腸、肌肉、皮等)；(2) 藉由微分方程式來描述污染質在水域環境與生物體之分佈、排除等情況。

### (1). 模式之基本假設

1. 生物體內之生理參數/生化參數於模式中皆為固定值，並不會隨這時間而有所變動。



2. 鰓傳輸系統: 假設鰓是一個連續攪拌的反應器, 對流入及流出的水體而言, 為一個均勻混和區, 使得化學物質及氧氣可藉由擴散方式傳輸到虱目魚體內, 而水流在水道中是均勻的分布。
3. 血液傳輸系統: 血液由 I 區塊流到 j 區塊之流率為  $Q_{ij}$ , 且區塊間之傳輸皆由血液流動而產生, 而個區塊的相互相響作用皆可被忽略, 血液在血管中之流動是均勻穩定的。
4. 化學質量平衡: 對每個區塊而言, 進與出之化學物質的量會達成平衡, 且化學物質在區塊內的量會達到一個穩定的狀態。

## (2) 模式之建構

模式之建構主要依據在虱目魚體之 PBPK 流程圖(圖一), 來描述及撰寫魚體各組織的統御方程式, 而各組織間的生理參數及生化參數推算均是以質量平衡 (mass balance equations) 的概念來表示, 其魚體各組織器官之方程式描述如下(符號參照表一):

### R-A--1

- (1). 建立完整的野外背景資料及瞭解當地魚類養殖之污染現況。
- (2). 依據實驗室之試驗結果, 來推測當環境發生重金屬污染時, 魚體對污染物的累積能力, 同時也可依據試驗所得之理論模式, 將生物體視為污染指標, 推估水域中的重金屬濃度。
- (3). 根據「水域/魚體組織」、「魚體/魚體組織」的重金屬含量比值, 亦可直接利用魚體內某一組織作為污染指標。
- (4). 透過 PBPK 模式之建構, 瞭解魚體內各組織的重金屬含量與分佈流, 並提醒消費者減少特殊部位之攝食。
- (5). PBPK 模式所得之數據, 可以提供管理當局作為養殖環境; 或為水域環境監測之依據。
- (6). PBPK 模式所得之數據, 亦能提供作為人體暴露與風險模式之用, 進而推估或計算出人體最大可允許的重金屬攝入量, 將潛在可能對人體健康之傷害降到最低。