

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

奈米微粒健康風險評估與管理研究：以奈米氧化鋅為例--
子計畫二：動物體內奈米氧化鋅微粒攝取動力學探討(I)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型

計畫編號：NSC 95-2621-Z-002-012-

執行期間：95年08月01日至96年10月31日

執行單位：國立臺灣大學公共衛生學院職業醫學與工業衛生研究所

計畫主持人：黃耀輝

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：陳麗安

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年01月08日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

奈米氧化鋅微粒實驗動物攝取吸收動力學模式探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2621-Z-002-012

執行期間：95年08月01日至96年10月31日

計畫主持人：黃耀輝

共同主持人：無

計畫參與人員：陳麗安、張淳農

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台大職衛所

中 華 民 國 96 年 12 月 26 日

一、前言

研究背景

奈米科技可說是近年來最熱門的研究領域之一，它帶動了奈米材料的廣泛使用，舉凡光電、化工、生技、藥粧等方面，目前均有不少產品已經上市。在台灣，氧化鋅是一種產量及應用均相當可觀的奈米材料，由於它具有光、電、磁、熱、敏感等特性，活性高且具有抗紅、紫外線和殺菌的功能，已被廣泛應用於防曬、抗菌防臭、污水處理和光催化劑材料等產品。其次，它也是橡膠工業中最有效的無機活性劑和硫化促進劑(Kirk-Othmer 1982, ZOPA 1998)。可應用於油漆、塗料中，陶瓷工業的乳蝕釉料和助熔劑，以及國防工業的隱形材料。

奈米微粒可能引起之健康效應

奈米微粒可能引起的健康效應已有許多文獻探討，主要部份包括呼吸道發炎反應 (Edilberto et al. 2004, Beckett et al. 2005)，循環系統心肌發炎 (Kodavanti et al. 2003)、心律不整及心肌梗塞(Pope et al., 2004)，中樞神經系統影響(Oberdörster et al. 2004, Elder et al. 2006)，以及其它毒性作用，如提高氧化壓力，造成纖維化、顆粒腫，擾亂有絲分裂，誘發細胞凋零，損害 DNA 等等。

氧化鋅相關研究

在作業場所中，以往與氧化鋅相關的職業危害，最為人熟知的就是金屬燻煙熱 (Metal fume fever)，雖然對於金屬燻煙熱的成因沒有明確定論，但推測是導因於在焊接過程中，作業員吸入高溫下產生的金屬氧化物，引發急性中毒，出現肌肉酸痛、疲倦、咳嗽等類似感冒的症狀 (Barceloux et al., 1999; Fine et al., 1997; Kuschner et al., 1997; Van Pee et al., 1998)。另外在作業過程中，也有可能直接吸入氧化鋅粉塵微粒，因此有些國家及機構針對氧化鋅的職業性暴露製訂了官方或非官方的容許暴露濃度值(EU 2004)。除了吸入性的暴露方式之外，在作業過程中也有可能因搬運或機台維修而造成皮膚接觸性的暴露。而在日常生活中，一般民眾的暴露途徑亦是以皮膚接觸為主。然而上述之容許暴露濃度均是以傳統可吸入性微粒 (粒徑範圍 0.1~ 4 μm)或總懸浮微粒 (粒徑範圍 > 0.1 μm)的暴露為前

提。隨著新興的奈米科技產業時代來臨，不論是職業性或是日常生活中，暴露到奈米氧化鋅微粒的可能性大為提高，但卻仍然沒有較為完善的健康風險評估方式。

研究目的

綜合上述，奈米材料已被廣泛使用在各種工業上，目前亦有不少針對量子點 (Quantum dot)、二氧化鈦 (Titanium dioxide)、奈米碳管 (Carbon nano-tube) 及聚苯乙烯 (Polystyrene) 的毒理研究，但對於奈米氧化鋅的相關研究可說是付之闕如，對於它可能造成的健康危害更是不甚瞭解。本研究之目的即在於了解實驗動物暴露氧化鋅奈米微粒之後的體內分佈特性，並以此資料建立氧化鋅奈米微粒在實驗動物體內之攝取動力學模式。

二、材料與方法

研究設計

實驗動物以全身暴露 (Whole body exposure) 之方式，暴露於氧化鋅奈米微粒後犧牲，取得其主要臟器及組織，經冷凍乾燥及微波消化等前處理後，藉由感應耦合電漿質譜儀 (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 進行鋅濃度分析。所得之實驗數據則以 Wilcoxon Rank Sum Test 進行統計檢定。而依照探討重點之不同，可分為微粒特性與暴露時間對動物體內鋅濃度分佈的影響兩部分。研究設計分述如圖 3.1、圖 3.2 所示。

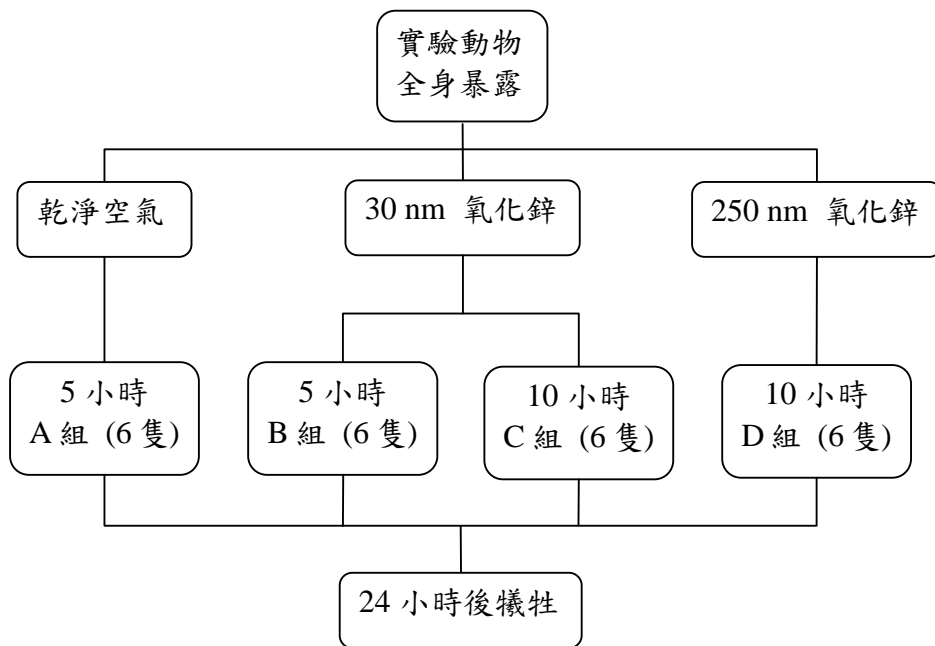


圖 1、奈米微粒特性與暴露時間影響研究設計流程圖

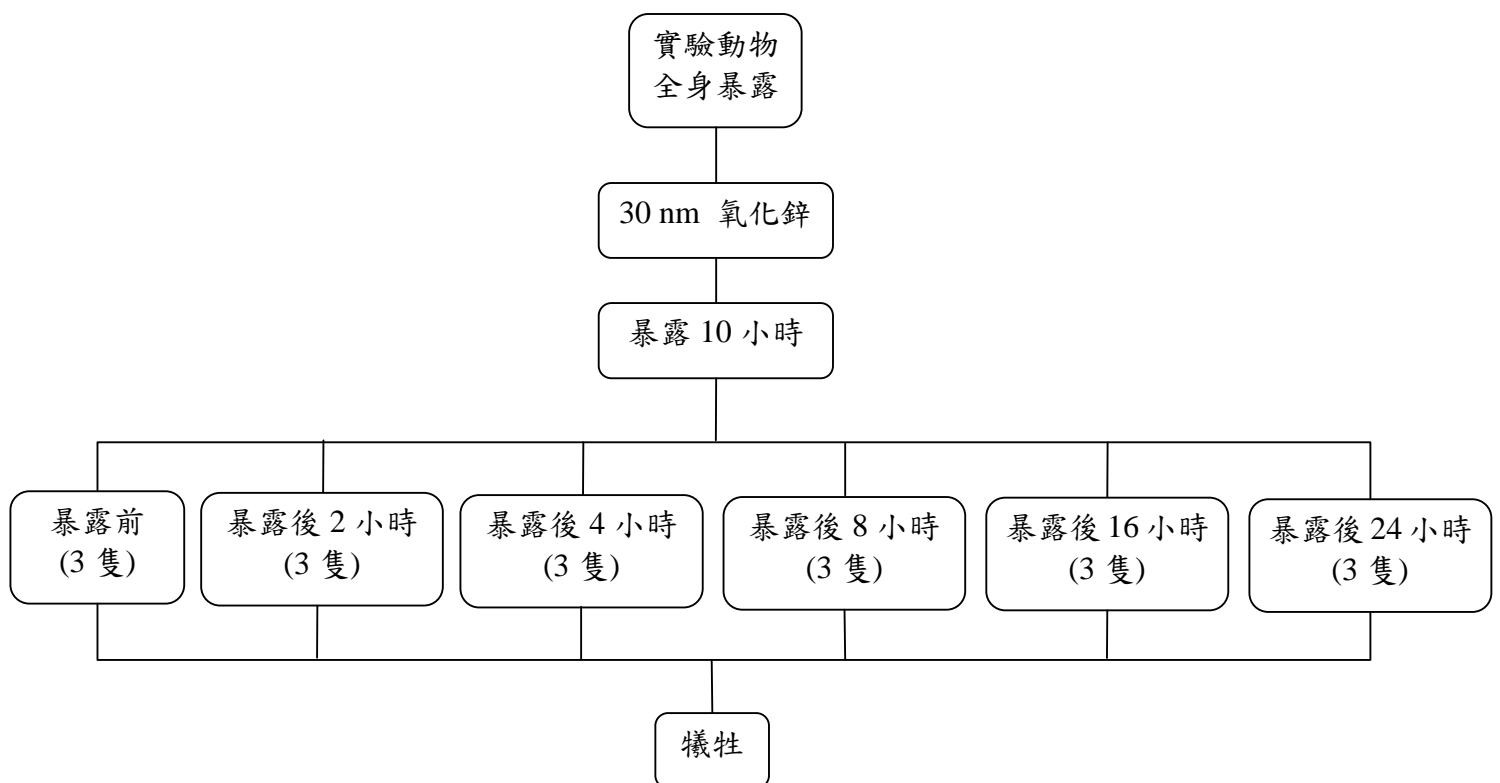


圖 2、奈米微粒暴露攝取之動力學特性研究設計流程

微粒特性與暴露時間

將實驗動物分為控制組與暴露組，每組各 6 隻，分別將之暴露於乾淨空氣與粒徑為 30 nm 級與 250 nm 級之氧化鋅微粒。另將暴露組之暴露時間分為 5 小時及 10 小時，於暴露後 24 小時進行犧牲，取得腦部、肺臟、肝臟、腎臟、血清、血漿等器官組織進行分析。另外將實驗動物暴露於粒徑為 30 nm 級之氧化鋅微粒下 10 小時，並於暴露前及暴露後 2、4、8、16、24 小時等時間點，各以三隻實驗動物進行犧牲，分別取得腦部、肺臟、心臟、肝臟、腎臟與全血等器官組織進行分析。

微粒產生

奈米微粒產生系統產生奈米微粒的原理如下所述：先以高溫加熱石英舟上鋅粉槽內的鋅粉，使鋅粉蒸發形成飽和蒸汽。再利用爐管前端通入之乾淨空氣作為輸送氣體 (Carrier gas)，將蒸汽分子帶離爐管，送至混合腔藉凝結機制形成氧化鋅奈米微粒。爐內之溫度、蒸發面積、輸送氣體以及稀釋氣體的流量，均會影響產生之奈米微粒的粒徑及濃度。

實驗動物

選用 8 週大雄性 SD 大鼠(Sprague-Dawley rats)，重約 250 ~ 300 g，飼養於台灣大學醫學校區實驗動物中心，使之經過一週的適應後再進行暴露實驗。實驗動物安置於飼養籠中，飼養籠環境保持固定溫度(22 ± 2 °C)及溼度(55 ± 10 %)，並且設定 12 小時白晝，12 小時夜晚，以模擬一天 24 小時日夜的週期變化。提供飼料及飲水，由實驗動物自由取食。

生物樣本

血清樣本—實驗動物暴露 24 小時後，以腹腔注射 50 mg/kg 之 Pentobarbitol 進行麻醉，之後取得腹腔動脈血裝入含 EDTA 之迷彩頭管中，以 3000 rpm，15 min 的條件進行離心後，取其上層澄清液，置入微量離心管(Eppendorf)中，儲存於-80 °C之冰箱。

血漿樣本—實驗動物如前述，取得腹腔動脈血裝入含 EDTA 之紫頭管中，其餘做法與血清樣本前處理方法相同。

全血樣本—另於暴露前後不同時間點觀察實驗動物體內鋅濃度的研究部分，分別於暴露前及暴露後 2、4、8、16、24 小時，如上述將各組三隻實驗動物麻醉犧牲後從腹腔動脈採血，每次取血約 0.5 ml，裝入含 EDTA 之紫頭管中，於 -20 °C 之冰箱中進行低溫保存，直到進行前處理及分析前才取出回溫。

器官樣本—所有實驗動物在暴露結束如上述麻醉犧牲後，取下其腦部、心臟、肺臟、肝臟、腎臟，放進事先以去離子水洗淨晾乾的培養皿中(直徑 3.5 及 5 cm)，儲存在 -80 °C 的冰箱中，直到進行樣本前處理及分析前才取出回溫。

樣本前處理

冷凍乾燥—將剪碎之樣本冷凍成固體狀後送往台大醫學院第二共同研究室進行約 10 天的冷凍乾燥，冷凍乾燥的條件為 -20 °C，60 milli-torr。

微波消化—秤取乾燥樣本粉末 0.1 g 或吸取血液類樣本(血清、血漿或全血) 0.1 mL 至各消化瓶後，加入 10 mL 之 65 % 濃硝酸，進行微波消化。消化液定量至 50 mL，準備上機分析。

三、結果

動物實驗暴露條件

本實驗根據微粒特性、暴露時間及取樣時間，進行了兩階段共五批次的動物暴露實驗，第一階段分為四批次，暴露條件分別為：A 組—暴露乾淨空氣 5 小時，B 組—暴露 30 nm 級 ZnO 奈米微粒 5 小時，C 組—暴露 30 nm 級 ZnO 奈米微粒 10 小時及 D 組—暴露 250 nm 級 ZnO 奈米微粒 10 小時，這四個批次均在暴露後 24 小時才進行實驗動物的犧牲，主要探討微粒特性與暴露時間對實驗動物體內鋅濃度分佈的影響。第二階段的暴露條件則為暴露 30 nm 級 ZnO 奈米微粒 10 小時(E 組)，分別在暴露前、暴露後 2、4、8、16 及 24 小時進行實驗動物的犧牲。主要探討暴露 ZnO 奈米微粒後不同時間點實驗動物體內之鋅濃度分佈特性。各

批次之實驗條件整理如表 1 所示。

表 1、各組 ZnO 奈米微粒暴露實驗濃度及劑量分佈情形

參數	單位	第一階段				第二階段
		乾淨空氣	30 nm ZnO	30 nm ZnO	250 nm ZnO	30 nm ZnO
		5小時(A)	5小時(B)	10小時(C)	10小時(D)	10小時(E)
CMD	nm		34.0	24.7	214.4	28.9
GSD			1.18	1.72	1.79	1.68
平均暴露濃度						
數目濃度	#/cm ³	—	5.3×10^5	4.1×10^6	7.7×10^6	2.8×10^7
表面積濃度	$\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$	—	8.4×10^4	2.9×10^5	9.4×10^6	2.9×10^5
重量濃度	mg/m ³	—	6.6	23.2	2100	44.8
吸入劑量						
數目	#	—	1.3×10^{10}	1.8×10^{11}	3.1×10^{11}	1.3×10^{12}
表面積	μm^2	—	2.0×10^9	1.3×10^{10}	3.8×10^{11}	1.3×10^{10}
重量	mg	—	0.16	1.02	84.58	2.08

鋅濃度分佈特性

以感應耦合電漿質譜儀分析實驗動物經過暴露後，進行實驗動物犧牲後取得之腦、肝、肺、腎、心臟、血漿、血清及全血等樣本，不同實驗組別所得之鋅濃度值如表 2、表 3 所示。由表 2 的數值可看出，隨著數目濃度的增加，肝和血漿中的鋅濃度也有逐漸增加的趨勢；相反的，在腦、肺、腎和血清中則看不出有這樣的趨勢，沒有明顯變化。而由表 3 的數值來看，除了肝在暴露後兩小時，心臟在暴露後四小時，鋅濃度有略微上升隨即逐漸下降趨於穩定之外，腦、肺、腎、血液中的鋅濃度在暴露前後幾乎都維持在穩定的濃度範圍。

暴露劑量與鋅濃度之關係

為了釐清影響實驗動物體內鋅濃度分佈之因素，本研究嘗試以數目、表面積及重量三種不同劑量表示方法對第一階段實驗的各器官、組織之鋅濃度作圖，如

圖 3、圖 4 及圖 5 所示。雖因實驗設計限制，只有三組不同劑量別的數據，仍可從圖中看出，肺、肝及血漿的鋅濃度值呈現隨著氧化鋅暴露劑量增加而上升的趨勢，而在腦、腎及血清部份則看不出這個結果。

實驗組別間鋅濃度比較統計分析結果

將所得之各器官組織鋅濃度值是否因不同暴露組別(第一階段)、不同觀察時間點(第二階段)而有所差異。在第一階段實驗中，腦與血清之鋅濃度不會因暴露組別不同而有所差異；腎之鋅濃度的變化趨勢不明顯，只有 C 組與 A 組、C 組與 B 組檢定後達到顯著差異；肺、肝及血漿之鋅濃度則隨暴露組別不同而有明顯增加之趨勢；肺之鋅濃度只有 D 組與 A 組、D 組與 B 組經檢定後達到顯著差異；肝之鋅濃度只有 C 組與 A 組、D 組與 A 組、D 組與 B 組在檢定後達到顯著差異；血漿之鋅濃度只有 D 組與 A 組、D 組與 B 組、D 組與 C 組檢定後達到顯著差異。詳細結果如表 2、圖 6、圖 7 所示。在第二階段實驗中，暴露前後不同觀察時間點之各器官、組織的鋅濃度變化趨勢並不明顯，只有肝和心臟的鋅濃度稍呈隨觀察時間點變化而升降的趨勢。但經檢定後只有心臟在暴露後 4 小時之鋅濃度顯著高於暴露前之鋅濃度，詳細結果如表 3、圖 8 所示。另將各器官組織之鋅濃度值進行 Spearman 相關分析，求得其相關係數，結果列於表 4，其中肝與腎、肝與血漿、肝與血清、腎與血漿、血漿與血清的相關性具統計學上之顯著意義。除此之外，血清與其他器官組織均呈現負相關，這是數據上比較特殊的一點。

表 2、實驗動物在不同粒徑等級奈米微粒暴露條件下，結束暴露後 24 小時之器官、組織中鋅濃度 (第一階段實驗)

奈米微粒	暴露時間	數目濃度	腦 ^a	肝 ^a	肺 ^a	腎 ^a	血漿 ^b	血清 ^b
乾淨空氣	5 小時	—	59.11 (0.89) ^c	95.49 (3.03)	78.10 (1.45)	74.77 (3.88)	9.67 (1.32)	1.10 (0.11)
30 nm 級	5 小時	$5.3 \times 10^5 \text{ \#/cm}^3$	59.63 (0.58)	101.75 (5.28)	73.77 (2.49)	74.77 (2.91)	10.32 (1.38)	1.10 (0.06)
30 nm 級	10 小時	$4.1 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$	59.04 (0.98)	111.31 (5.02)	77.03 (4.56)	84.89 (1.69)	13.86 (1.95)	1.04 (0.04)
250 nm 級	10 小時	$7.7 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$	57.99 (1.04)	132.36 (8.31)	92.29 (5.24)	79.88 (4.25)	21.03 (2.69)	0.92 (0.14)

^a：濃度單位： $\mu\text{g/g}$ -乾重

^b：濃度單位： $\mu\text{g/mL}$

^c：表示方式為：平均值 (標準誤)

表 3、實驗動物暴露於粒徑 30 nm，濃度 2.8×10^7 #/cm³ 之氧化鋅奈米微粒 10 小時後不同時間點腦、肺、心臟、腎、肝、全血之鋅濃度分佈比較 (第二階段實驗)

	腦 ^a	肺 ^a	心臟 ^a	腎 ^a	肝 ^a	全血 ^b
暴露前	61.40 (0.78) ^c	80.08 (2.75)	66.33 (1.26)	75.71 (1.45)	93.86 (2.37)	17.65 (1.34)
暴露後 2 小時	57.52 (1.49)	77.82 (2.88)	67.91 (0.46)	76.38 (3.35)	100.85 (5.89)	15.61 (1.27)
暴露後 4 小時	59.10 (1.19)	80.35 (0.43)	70.82 (1.32)	75.21 (2.91)	90.67 (2.22)	13.88 (1.21)
暴露後 8 小時	54.83 (1.31)	81.42 (1.06)	67.27 (0.57)	75.63 (3.13)	90.98 (4.81)	20.25 (5.58)
暴露後 16 小時	54.52 (0.64)	74.60 (5.14)	66.05 (1.65)	74.93 (2.67)	89.01 (3.71)	15.53 (1.62)
暴露後 24 小時	53.32 (1.27)	76.53 (0.74)	66.88 (0.21)	71.60 (2.94)	86.64 (4.44)	15.08 (2.14)

^a：濃度單位： μ g/g-乾重

^b：濃度單位： μ g/mL

^c：表示方式為：平均值 (標準誤)

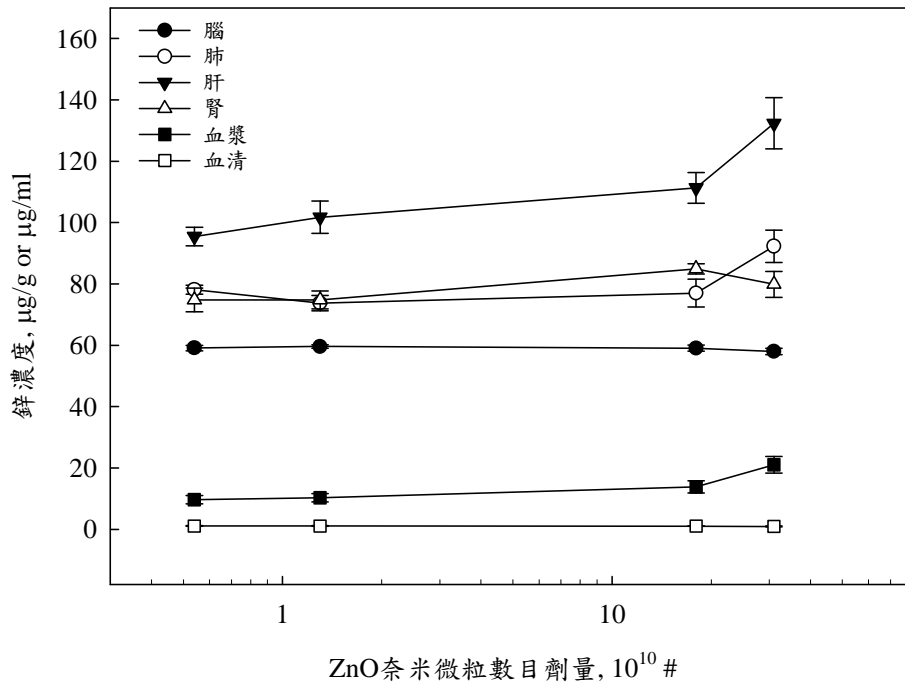


圖 3、氧化鋅奈米微粒暴露數目劑量與各器官組織鋅濃度關係圖

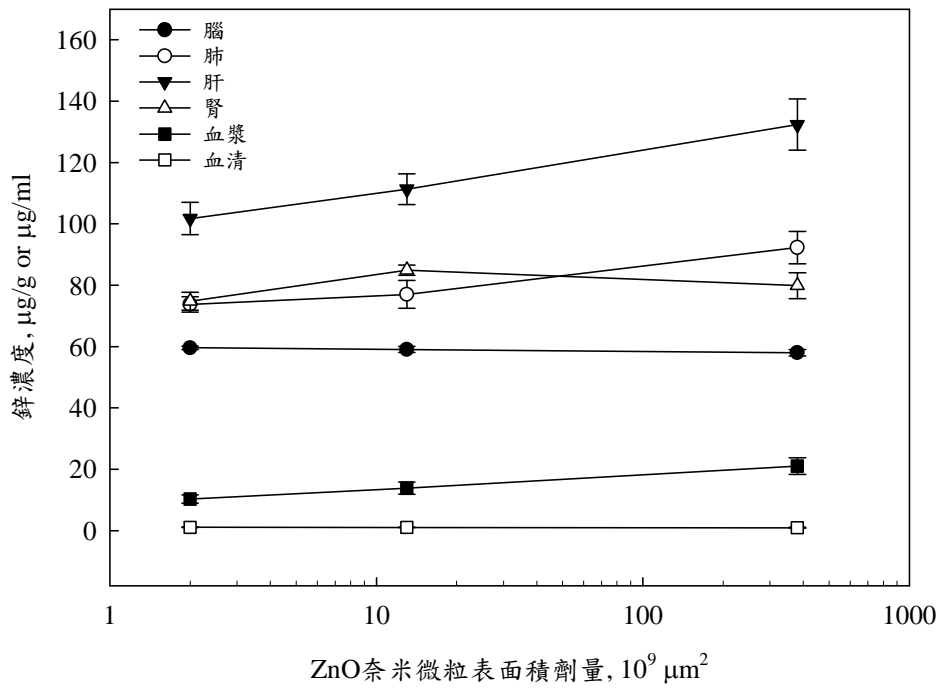


圖 4、氧化鋅奈米微粒暴露表面積劑量與各器官組織鋅濃度關係圖

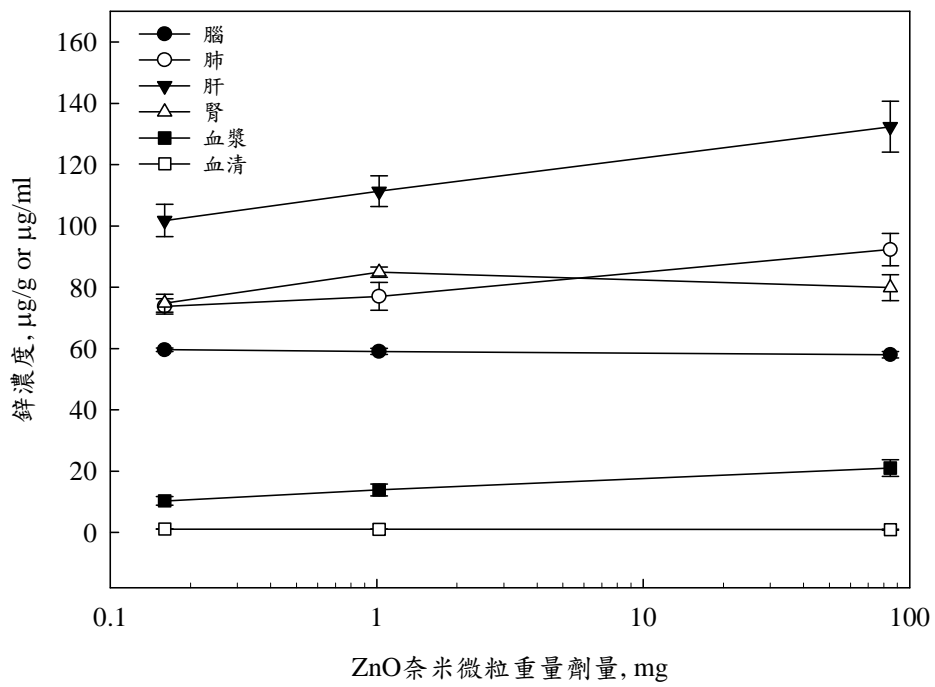
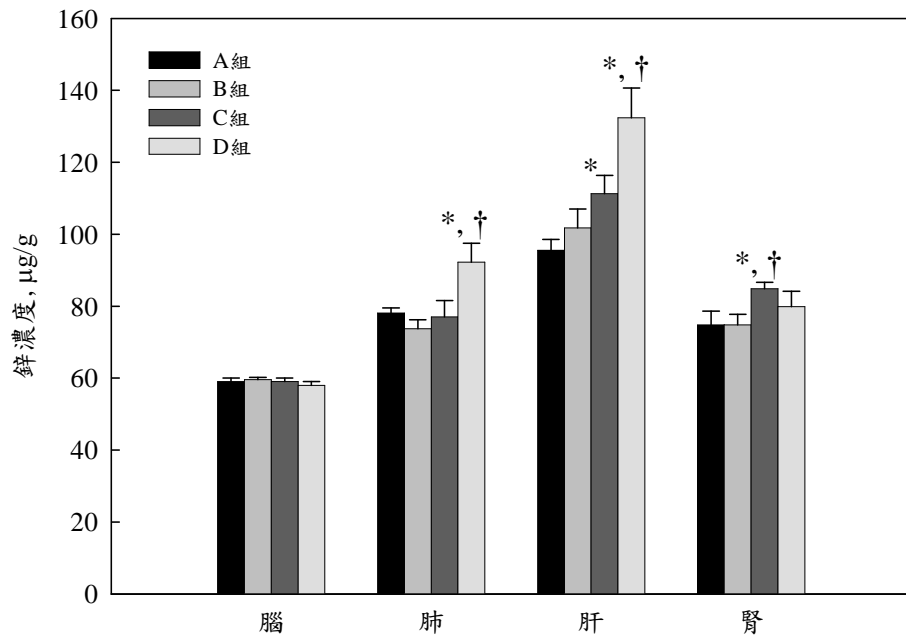


圖 5、氧化鋅奈米微粒暴露重量劑量與各器官組織鋅濃度關係圖



動物實驗暴露組別與樣本類別

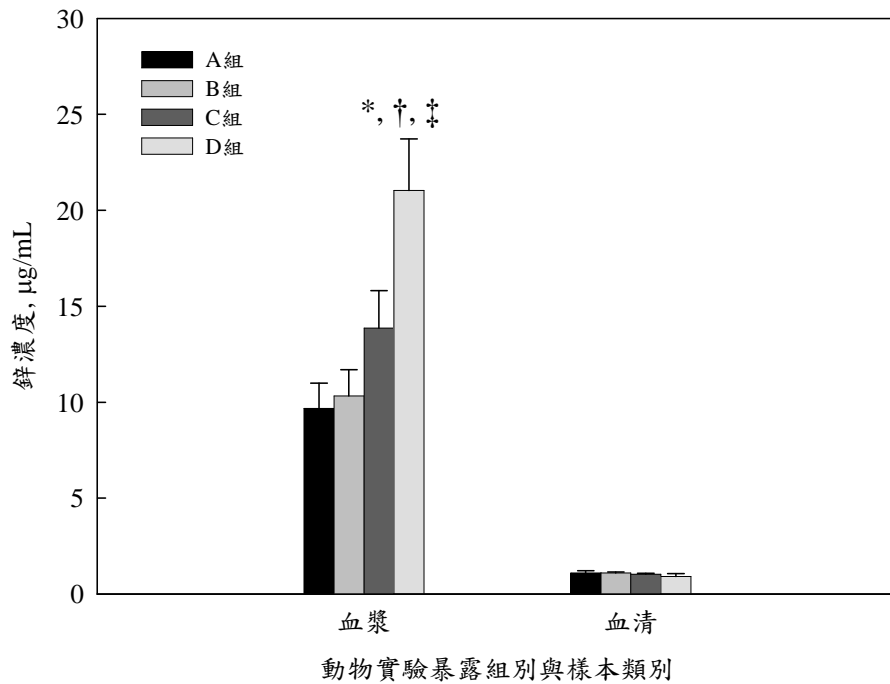
註 1：各長條圖上方線條範圍代表一個標準誤 (SE) 的大小。

註 2：暴露組別：A 組—乾淨空氣，5 小時；B 組—30 nm 級 ZnO，5 小時， $5.3 \times 10^5 \text{ \#}/\text{cm}^3$ ；C 組—30 nm 級 ZnO，10 小時， $4.1 \times 10^6 \text{ \#}/\text{cm}^3$ ；D 組—250 nm 級 ZnO，10 小時， $7.7 \times 10^6 \text{ \#}/\text{cm}^3$ 。

*：Wilcoxon Rank Sum Test，相較於 A 組， $p < 0.05$ 。

†：Wilcoxon Rank Sum Test，相較於 B 組， $p < 0.05$ 。

圖 6、腦、肺、肝、腎等器官在不同奈米微粒與不同時間暴露條件下的鋅濃度分佈比較圖



註 1：各長條圖上方線條範圍代表一個標準誤 (SE) 的大小。

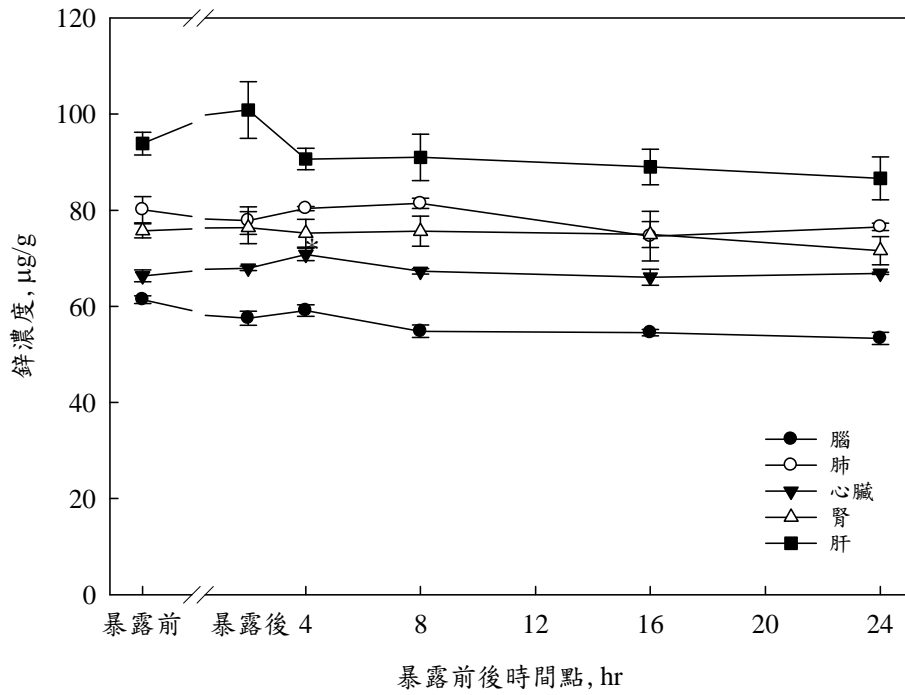
註 2：暴露組別：A 組—乾淨空氣，5 小時；B 組—30 nm 級 ZnO，5 小時， $5.3 \times 10^5 \text{ \#/cm}^3$ ；C 組—30 nm 級 ZnO，10 小時， $4.1 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$ ；D 組—250 nm 級 ZnO，10 小時， $7.7 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$ 。

*：Wilcoxon Rank Sum Test，相較於 A 組， $p < 0.05$ 。

†：Wilcoxon Rank Sum Test，相較於 B 組， $p < 0.05$ 。

‡：Wilcoxon Rank Sum Test，相較於 C 組， $p < 0.05$ 。

圖 7、血漿、血清等組織在不同奈米微粒與不同時間暴露條件下的鋅濃度分佈比較圖



* : Wilcoxon Rank Sum Test , 相較於暴露前 , $p < 0.05$ 。

圖 8、實驗動物暴露於氧化鋅奈米微粒後，各器官鋅濃度隨時間點分佈圖

表 4、各器官、組織間鋅濃度值之 Spearman 相關係數

	腦	肺	肝	腎	血漿
肺	-0.150				
肝	0.195	0.250			
腎	-0.074	0.052	0.440*		
血漿	-0.002	0.389	0.689**	0.427*	
血清	-0.127	-0.380	-0.448*	-0.350	-0.619**

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.005$

四、討論

動物體內鋅濃度分布特性

有關奈米氧化鋅微粒進入實驗動物體內後的流布情形在表 2 及圖 7 有清楚的描述。根據以往的研究指出，採取呼吸暴露方式進行研究，受暴露實驗動物肺部均會出現化學物質濃度升高的情況。然而在本研究第一階段實驗當中，原本預期會看出與暴露濃度、時間趨勢有關的肺部卻沒有看見對應的濃度上升趨勢，這趨勢卻是出現在肝和血漿部分。原因可能是因為實驗動物結束暴露 24 小時後，微粒已代謝至肝，所以在肺部這邊看不到的明顯的濃度變化。而本研究另一現象是實驗動物肝臟及血漿的鋅濃度變化會隨暴露增加而增加，而肺部的鋅濃度變化卻沒有如此明顯，這似乎是支持奈米微粒經吸入至肺部後，會穿透細胞間隙進到血液循環，而未必要完全經過肺泡吸收的看法。抑或是因為本研究採取全身暴露方式進行，氧化鋅奈米微粒被攝取進入實驗動物體內的途徑還包括食入或皮膚接觸。Oberdörster 等學者在 2002 年發表了一篇以 ^{13}C 為主要的研究，也有類似發現。該研究在吸入實驗後的第一天即發現有大量的奈米微粒進入到血液循環中，主要的可能機制推測有三：第一，在肺泡區，奈米微粒可以穿透細胞間隙；第二，在氣管支氣管區，奈米微粒則是被纖毛運動進行清除，第三，也有可能是微粒沉積在實驗動物的毛羽上，實驗動物清理毛髮時將之吞食 (Oberdörster et al., 2002)。另外，也有可能是因本研究同時進行肺部灌洗(lavage)取樣動作，因此造成呼吸道表面的部分鋅含量被移除，致使肺部鋅濃度不如預期高。

另外，由本研究第一階段的實驗數據看來(表 2，圖 7)，腦部的鋅濃度在不同粒徑不同暴露劑量的組別間並沒有太大的差異。這似乎暗示著本研究之 ZnO 奈米微粒在進入實驗動物體內之後，沒有沿著嗅神經這個路徑進入腦部。在 Oberdörster 等人的研究中，使大鼠暴露奈米微粒 6 小時後觀察 7 天，暴露後 1~7

天的這段期間可看出肺部、嗅球、大腦及小腦的奈米微粒含量變化(Oberdörster et al., 2004)。因此本研究中看不到腦部鋅濃度增加，也有可能是因為氧化鋅奈米微粒自被吸入實驗動物體內到進入腦部所需時間較長。本研究只觀察暴露結束後 24 小時內的實驗動物體內鋅濃度變化，觀察時間太短，可能因此沒有看出微粒轉移至腦部的情況。此外，血漿和血清的成份相近，差別只在於血漿中含有血纖維蛋白而血清中沒有，但兩者間在實驗動物經氧化鋅奈米微粒暴露後的鋅濃度變化趨勢卻不盡相同。由此可推論氧化鋅奈米微粒若被攝取進入實驗動物的血液循環系統中，會迅速與相關蛋白質結合，例如此處的血纖維蛋白。

各器官組織鋅濃度與各生化指標之相關

本計畫為整合計畫中之子計畫之一，整合計畫中的總計畫則針對同一批實驗動物也做了十一種生化指標的探討，包括 HCT (hematocrit，血容比)、RBC (red blood cell，紅血球)、PLT (platelet，血小板)、WBC(white blood cell，白血球)、HGB (hemoglobin，血紅素)、IL-6 (Interleukin-6，發炎前趨細胞激素)、Total cells (此指有顆粒球之白血球總和)、% of Neutrophils (噬中性球百分比，含量最多的白血球)、Macrophages (巨噬細胞)、LDH (Lactate dehydrogenase，乳酸脫氫酵素，與糖代謝有關) 及 Total proteins (總蛋白質) 等，其中前六者是採集周邊血液樣本分析得來，後五者則是採集肺泡灌洗液分析得來。本計畫利用此機會整合兩計畫的研究結果進行相關分析。結果如表 5 所示，多項生化指標，如：HCT、RBC、PLT、HGB、Totalcells、% of Neutrophils、LDH 及 Totalproteins，與肺、肝、腎及血漿之鋅濃度達到統計學上之顯著相關，而 WBC、IL6 及 Macrophages 則與各器官組織之鋅濃度相關不大。這些相關分析的結果顯示，實驗動物體內的發炎反應指標有明顯關連，但又與傳統機制未必相同。例如 Macrophages (巨噬細胞)的數目與鋅濃度看不出相關性，顯示這些被攝取至動物體內的奈米微粒並非它作用

的主要對象。先前也有研究顯示，當大粒徑微粒(微米等級)進入生物體，會被 Macrophages 辨識為外來物，因此啟動免疫機制進行吞噬作用，形成發炎反應。若是小粒徑微粒(奈米等級)進入生物體內，則較容易直接穿透細胞間隙，進入血液循環系統(Donaldson et al., 2001)。另外，肝與血漿之鋅濃度是與暴露劑量成正相關的趨勢，在表 5 中肝與血漿之鋅濃度也顯示與發炎指標呈現較強的之正相關性，例如 PLT、Neutrophils(%)、LDH 及 Total proteins 等。此外，有研究指出，以氣管灌注之方式讓實驗動物暴露於不同粒徑的微粒時，肺泡灌洗液中的 LDH 與 Total proteins 的數量均是超細微粒暴露組多於細微粒暴露組(Li et al., 1999)。這些研究結果進一步驗證實驗動物的發炎反應與已攝取進入其體內的鋅含量與大小特性等因素有關。至於其他各種影響相關作用機轉的因素，例如奈米微粒暴露時間、進入體內後的鋅物種形式等，也都值得在後續的研究繼續予以探討。

研究限制與未來修正方向

本年度研究為整合型計畫第一年，許多研究條件仍在嘗試與調整中，因此有些條件的穩定性掌控不如理想。例如奈米微粒的產生數目濃度、批次間的微粒粒徑大小等因素，都會造成研究結果的變異性增加，造成解釋上的不確定性。另外，因為每批次之實驗動物不相同，生物個體間的差異性也可能增加上述不確定性的問題。不過，也由於本階段研究的經驗，諸多問題已大致解決。

在往後的持續研究中，除了要克服這些研究限制，並且還要應針對先前研究的缺失進行調整改善，例如動物的奈米暴露方式改為 Nose Only 暴露模式，以確定實驗動物受氧化鋅奈米微粒暴露的主要途徑為呼吸，再進行進一步的特定暴露途徑的奈米微粒暴露攝取與再分佈研究。同時，針對 PBPK 模式的研究目的，可改用微透析(Microdialysis)的採樣方法，以精確掌握不同部位器官、組織系統的

連續採樣，建構暴露後鋅在動物體內分佈的特性。微透析是一項可用在活體連續採樣的技術，概念上類似毛細血管，利用被動擴散的原理，以半透膜包覆的同軸雙套管探針來進行取樣。使用時將灌流液(perfusate)引進外管，藉由濃度梯度的差異，使受測動物體內的待測物質擴散至內管後再將之導出收集，此收集液稱為透析液(dialysate)。這個技術目前已被廣泛應用於神經科學、藥理學、藥物動力學及臨床醫學等方面。微透析探針可分別置入同一實驗動物之不同部位同時取樣，且此技術採集的是取樣部位經物質交換的透析液而非實驗動物之體液，因此對實驗動物之生理狀況影響較小(Tsai, 2007)。由於微透析技術具有上述優點，採用這種取樣方法，不僅可解決不同實驗動物體內鋅濃度的個體間差異所造成的量測值比較上的干擾，亦可縮短取樣時間間距，提高時間軸上的解析度，對於建立實驗動物暴露於氧化鋅奈米微粒後的體內藥物動力學分佈模式助益很大。應用此技術大量取得之時間濃度變化值，結合實驗動物之生理值，可用於建立初步之以生理為基礎的藥物動力學模式，有助於更了解奈米氧化鋅微粒經實驗動物攝取後，在生物體內吸收、分佈、代謝及排除的情形。

另一可行的改進方式則為利用人工強化的非自然鋅同位素(enriched isotope)進行奈米微粒暴露試驗，以協助判斷奈米氧化鋅微粒暴露後的劑量分佈比例與時序關係等。本研究的量測項目是實驗動物器官、組織中的鋅濃度，但由於鋅是生物體內含量較多的必需元素之一，背景濃度值可達 ppm 等級，因此分析上潛在干擾較大。若實驗動物的氧化鋅奈米微粒暴露劑量不大，有可能造成鋅濃度的上升變化不易被察覺。為了克服此一問題，可利用鋅在自然界中的不同同位素量測來克服。鋅元素在自然界中有 64、66、67、68、70 等 5 個不同物種質量數可供測定，一般分析時是以含量最多的 ^{66}Zn 為準進行量測。但在本研究中，若能運用人工加工的強化同位素，如成分 99% 以上的 ^{67}Zn 、 ^{68}Zn 或 ^{70}Zn 等特殊質量數之鋅粉來產生氧化鋅奈米微粒，再暴露於實驗動物。若此，則在本研究實驗動物相關生物檢體上的鋅濃度量測上，可以利用這些特定質量數鋅元素的增加幅度，

判斷為係因實驗動物受奈米氧化鋅微粒暴露後所造成的鋅濃度增加量。

表 5、各器官組織之鋅濃度與 11 項生化指標之 Spearman 相關係數

	HCT	RBC	PLT	WBC	HGB	IL6	Totalcells	Neutrophils	Macrophages	LDH	Total proteins
腦	0.032	0.115	-0.036	0.157	0.041	0.201	-0.164	-0.119	0.076	-0.195	-0.260
肺	0.450*	0.447*	0.601**	-0.386	0.326	-0.219	0.266	0.395	-0.308	0.315	0.463*
肝	0.652**	0.635**	0.510*	-0.270	0.584**	0.421	0.722***	0.749***	-0.193	0.800***	0.673***
腎	0.375	0.467*	0.462*	0.125	0.524*	0.449	0.437*	0.490*	-0.108	0.519*	0.198
血漿	0.527*	0.529*	0.357	-0.465*	0.524*	0.363	0.616**	0.634**	-0.202	0.730**	0.570*
血清	-0.477*	-0.435*	-0.178	0.054	-0.510*	0.049	-0.186	-0.225	0.185	-0.371	-0.208

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.005$

*** : $p < 0.0005$

五、參考文獻

- Barceloux DG. Zinc. *Journal of Toxicology* 1999;37(2):279-92.
- Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, et al. Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(10):1129-35.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occupational and Environmental Medicine* 2001;58(3):211-6, 199.
- Edilberto B, James BM, Brian AW, et al. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological Sciences* 2004;77(2):347.
- Elder A, Gelein R, Silva V, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 2006;114(8):1172-8.
- EC. European Union risk assessment report: ZnO. Volume 43. European Commission Joint Research Centre, 2004.
- Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Beckett WS. Metal fume fever: characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 1997;39(8):722-6. <http://computox.colostate.edu/>
- Kirk-Othmer. *Encyclopaedia of chemical technology*. 3rd ed., Vol. 7, 8, 16, 20 and 24, New York: John Wiley and Sons, 1982.
- Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, et al. Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci* 2003;71(2):237-45.
- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environmental Research* 1997;75(1):7-11.

- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K. Short-term inflammatory response following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhalation Toxicology* 1999;11(8):709-31.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A* 2002;65(20):1531.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004;16(6-7):437-45.
- Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 2004;109(1):71-7.
- Tsai TH. Assaying protein-unbound drugs using microdialysis techniques. In: Westerink BHC, Cremers TIFH, eds. *Handbook of Microdialysis*, Vol 16. Elsevier 2007.
- Van Pee D, Vandenplas O, Gillet JB. Metal fume fever. *Eur J Emerg Med* 1998;5(4):465-6.
- ZOPA. Comments of ZOPA. Draft RAR zinc oxide. December 1998.