

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

總計畫：奈米微粒健康風險評估與管理研究：以奈米氧化 鋅為例(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-002-011-
執行期間：95年08月01日至96年07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：鄭尊仁
共同主持人：林宜平
計畫參與人員：碩士級-專任助理：劉蓉燕
碩士班研究生-兼任助理：李梅菁
協同主持人：簡弘民

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 08 月 16 日

目錄

目錄	I
第一章 前言	1
第二章 目的	2
第三章 文獻探討	3
3-1 奈米材料的應用及特性	3
3-2 奈米氧化鋅的特性及應用	3
3-3 奈米微粒毒理研究	4
3-4 奈米微粒與肺部毒性	5
3-5 奈米微粒其他相關毒理研究	7
3-6 奈米氧化鋅相關毒理研究	7
3-7 肺部發炎及發炎反應指標	8
3-8 系統性發炎及發炎反應指標	9
3-9 氣管灌注與呼吸暴露方式比較	9
3-10 奈米微粒產生方法	10
3-10-1 噴霧法 (Atomization)	10
3-10-2 爐管氣流反應器 (Furnace flow reactors)	10
第四章 材料與方法	11
4-1 奈米及次微米微粒產生與監測	11
4-1-1 奈米及次微米氧化鋅微粒的產生	11
4-1-2 監測系統	11
4-2 實驗動物	11
4-3 實驗設計	12
4-4 全身性呼吸暴露模式 (whole-body inhalation exposure)	12
4-5 系統性發炎反應指標分析	12
4-6 肺泡灌洗液發炎損傷指標分析	13
4-7 統計方法分析	13
4-8 實驗架構	14
第五章 結果	15
5-1 奈米氧化鋅微粒的暴露	15
5-2 動物實驗	16
第六章 討論	19
6-1 奈米產生器以及微粒的產生及暴露	19
6-2 呼吸暴露奈米氧化鋅微粒所引起之毒性效應	21
第七章 結論	24
第八章 建議	25
參考文獻	42
研究成果自評	46

表目錄

表 1 各種操作條件及量測項目	26
表 2 實驗動物的基本特性	27
表 3 肺泡灌洗液指標分析	27
表 4 系統性發炎反應指標分析	28

圖目錄

圖 1-1 奈米氧化鋅產生系統全貌.....	29
圖 1-2 奈米氧化鋅產生系統全貌.....	29
圖 1-3 奈米氧化鋅產生系統全貌.....	30
圖 2 奈米氧化鋅產生系統流程圖.....	30
圖 3 Exposure I 組粒徑及數目濃度分佈圖.....	31
圖 4 Exposure II 組及 Exposure III 組粒徑及數目濃度分佈圖.....	32
圖 5 Exposure I 組數目濃度時間分佈圖.....	32
圖 6 Exposure II 組數目濃度時間分佈圖.....	32
圖 7 Exposure III 組數目濃度時間分佈圖.....	33
圖 8 Control 組數目濃度時間分佈圖.....	33
圖 9 Exposure I 組粒徑時間分佈圖.....	34
圖 10 Exposure II 組粒徑時間分佈圖.....	34
圖 11 Exposure III 組粒徑時間分佈圖.....	35
圖 12 Control 組粒徑時間分佈圖.....	35
圖 13 以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 所拍攝之奈米氧化鋅微粒.....	36
圖 14 肺泡灌洗液 (Total cells) 指標分析.....	37
圖 15 肺泡灌洗液 (Neutrophils) 指標分析.....	38
圖 16 肺泡灌洗液 (LDH) 指標分析.....	38
圖 17 肺泡灌洗液 (Total protein) 指標分析.....	39
圖 18 周邊血液血球及分類計數 (WBC) 的測定.....	39
圖 19 周邊血液血球及分類計數 (PLT) 的測定.....	40
圖 20 周邊血液血球及分類計數 (RBC) 的測定.....	40
圖 21 周邊血液血球及分類計數 (HGB) 的測定.....	41
圖 22 細胞激素 (IL-6) 的測定.....	41

第一章 前言

隨著奈米科技的發展，不同特性的奈米材料陸續被開發運用以因應不同功能及需求，這些新興奈米材料的毒性也都需要進一步被檢驗。我們選擇奈米氧化鋅微粒 (Zinc oxide nanoparticles) 進行研究，因為氧化鋅的用途很廣，近來已大量被應用在塗料、油漆、橡膠輪胎工業、化妝品等產品上，但隨著材料被奈米化，且過去相關的毒理研究並不足以回答奈米級微粒所會引發的毒性效應，為了瞭解及預防奈米微粒對健康造成危害，因此需要進行毒理研究來進行後續的風險評估。

第二章 目的

在前一年的計畫中我們完成奈米產生器的部分，今年進一步將整套奈米及次微米微粒產生、暴露及監測系統架設完成。本研究使用此系統，產生不同粒徑之氧化鋅微粒（包括30 nm及250 nm），並監測所產生的微粒粒徑和數目濃度，以全身性呼吸暴露的方式（whole-body inhalation exposure）將氧化鋅微粒暴露於健康大鼠，觀察暴露微粒後對健康大鼠所造成的肺部及系統性毒性效應。

本研究提出的假說為：

實驗動物分別暴露於不同粒徑之氧化鋅微粒（包括30 nm及250 nm），可引起肺部及系統性的發炎反應。

第三章 文獻探討

3-1 奈米材料的應用及特性

人造奈米材料廣泛的被應用在資訊、光電、生醫及材料等領域上(Seaton et al., 2005; 馬遠榮, 2002)。奈米級的材料製造了許多奈米級的產品，進而帶給了人們很大的便利，也帶來許多可觀的利益。例如：在癌症治療上，可藉由奈米微粒的傳遞，將一些較難傳遞的藥物傳遞到標的器官；也可製造體內奈米感測機，用於診斷及影像攝影等(Maynard, 2007)。未來奈米科技會繼續朝向產品生產技術發展，例如：奈米碳管及奈米碳球的合成技術、更耐用的奈米陶瓷、醫學義肢、汽車零件、更有效率的奈米淨水過濾膜等；相對的，奈米材料跟人類社會及環境也將會有更密切的關係。

奈米(nanometer)是一種測量大小的相對單位，相當於十億分之一公尺。人體毛髮約為8萬奈米，紅血球約為7千奈米，水分子約為0.3奈米，一般所指的奈米等級是指粒徑在100nm以下，在這個等級範圍的物質與較大的比較具有不同的特性。

物質在奈米等級具有不同特性的主要原因有：

- 1、在相同重量濃度下，奈米等級的物質具有較大的表面積，使物質較具化學活性。例如，某些物質粒徑較大時為惰性，但在奈米等級時，具有活性且會改變作用力及電子特性；
- 2、在奈米等級時，量子特性會影響光電特性及磁性，尤其粒徑越小影響越大。(The Royal society and the Royal Academy of Engineering, 2004)

3-2 奈米氧化鋅的特性及應用

奈米氧化鋅是一種無機材料。由於顆粒的細微化，其表面電子結構和晶體結構發生變化，產生了宏觀物體所不具有的表面效應、體積效應、量子尺寸效應和宏觀隧道效應，以及高透明度和高分散性等特點。近年來發現它在催化、光學、磁學、力學等方面展現出許多特殊功能，使其在陶瓷、化工、

電子、光學、生物、醫藥等許多領域有重要的應用價值 (Gao et al., 2006; Malandrino et al., 2005)。

奈米氧化鋅活性高，具有屏蔽紅外線、紫外線和殺菌的功能，已被廣泛應用於防曬化妝品、自潔抗菌玻璃、污水處理和光催化等產品。

奈米氧化鋅是橡膠工業最有效的無機活性劑和硫化促進劑，它具有硫化速度快，反應溫域寬，轉化為硫化鋅的轉化率高等特點，可大幅度提高橡膠製品的機械強度、耐溫、耐老化以及耐磨性。

奈米氧化鋅還可應用於油漆、油墨、塗料中，能明顯提高產品遮蓋力和著色力。此外，奈米氧化鋅還可廣泛應用於電纜、造紙、醫藥等行業 (Barceloux, 1999)。

3-3 奈米微粒毒理研究

有關奈米氧化鋅微粒的毒理資料並不多，相關的研究，大多來自空氣污染微粒的研究，這些微粒主要是燃燒的產物。流行病學 (Peters et al., 1997; Wichmann et al., 2000) 與毒理學 (Brown et al., 2000; Brown et al., 2001) 研究顯示，小粒徑顆粒可能造成較大的毒性，這些毒性主要發生在呼吸道與心血管系統。近年也有研究顯示，奈米微粒可能經呼吸道進入中樞神經系統，造成發炎反應 (Oberdorster et al., 2004)。不過，人造奈米微粒與空氣污染微粒的物理化學特性並不完全一致，其健康危害可能也不一樣，有關人造奈米微粒的危害需要進一步的研究，提供健康風險評估參考。

有關人造奈米微粒的毒性研究，尚在起步階段，目前並無足夠之病例報告及流行病學資料，所以奈米毒性研究必須仰賴實驗室的研究。有關奈米研究之綜論文章為數不多，請參閱參考文獻 (Oberdorster et al., 2005; Donaldson et al., 2002; Kreyling et al., 2004; Nel et al., 2006; 鄭尊仁等, 2006)。目前奈米微粒相關毒理研究僅限於幾種材質，包括碳黑、二氧化鈦、聚苯乙烯、氧化鋅及奈米碳管等。美國的動物實驗研究顯示，在相同重量濃度下，奈米微粒會比較大粒徑之微粒產生較嚴重的肺部反應，而表面積扮演了很重要的角色

(Oberdorster, 2001)。雖然許多研究指出奈米微粒健康效應與傳統使用的質量濃度相關較小，而與顆粒濃度或表面積濃度相關較大，但是目前研究發現奈米微粒有聚集或凝聚的現象，奈米 (nm) 微粒可能變成微米 (μm) 粒徑，所以如何正確評估顆粒數目及粒徑，是目前奈米毒理學亟待解決的問題。

除了表面積與奈米微粒毒性有關，細胞及動物實驗研究發現，經過表面處理的奈米微粒毒性會改變 (Oberdorster, 2001; Rehn et al., 2003; Warheit et al., 2005; Nemmar et al., 2005; Wittmaack, 2007)。最近，有研究顯示表面積可能不是決定奈米微粒毒性最重要的因子 (Warheit et al., 2006)，進一步研究顯示奈米微粒表面結晶結構也與毒性有關 (Sayes et al., 2006)。這些研究都說明了目前奈米微粒之毒性測試結果不是很一致，種種跡象均指出這些不一致的特性都和奈米微粒之物理化學特性複雜有關，所以大家認為要進行奈米微粒毒性測試，需先瞭解微粒特性。

奈米微粒經由呼吸道吸入後，除了引起肺部發炎反應之外，最新的研究指出，暴露奈米碳黑微粒於過敏小鼠，可能引起明顯的免疫相關反應 (de Haar et al., 2005)。此外，因為奈米微粒粒徑小的特性，被吸入肺部後，在肺內的分佈與沈降位置與較大粒徑不同，可能有較多數量會沈積在肺泡的部位；奈米微粒不僅能由肺泡巨噬細胞的吞噬作用進入血液循環系統，也有可能直接穿透細胞、組織進入血液循環系統 (Nemmar et al., 2002)。

奈米微粒毒性相關研究，在肺部發炎反應部分，不論是動物體內 (*in-vivo*) 或體外 (*in-vitro*) 都有許多相關研究，但奈米微粒在毒理學上許多詳細的作用機制仍不清楚，需要有更多的相關研究進一步加以釐清。

3-4 奈米微粒與肺部毒性

在2007年最新一篇二氧化鈦奈米微粒的毒理研究指出，以呼吸暴露 (inhalation exposure) 的方式將粒徑為2-5 nm的二氧化鈦奈米微粒進行急性 (4 hr) 及亞急性 (4 hr/day for 10 days) 的暴露，急性暴露組分別在高濃度 (7.22 mg/m³) 與低濃度 (0.77 mg/m³) 下進行，而亞急性組暴露濃度為8.88

mg/m³。研究發現急性暴露的部分僅在高濃度下有顯著的肺部發炎反應，亞急性的部分則在暴露奈米二氧化鈦微粒後1天及2天，均能引起顯著的肺部發炎反應 (Grassian et al., 2007)。

其他過去的研究發現，在動物實驗中以氣管灌注方式 (intratracheal instillation) 暴露不同粒徑的聚苯乙烯 (polystyrene) 微粒後，超細微粒 (ultrafine particles) 能產生顯著肺部發炎現象 (Brown et al., 2001)；實驗動物暴露細粒徑及超細粒徑的碳黑微粒 (carbon black, CB) 或二氧化鈦微粒 (titanium dioxide, TiO₂)，超細微粒 (ultrafine particles) 能比細微粒 (fine particles) 引起較顯著的發炎現象 (Brown et al., 2000; Dick et al., 2003)。在腫瘤相關研究發現，不易溶且毒性低的微粒如CB、TiO₂及煤灰，不論是細粒徑或超細粒徑都能在齧齒動物身上引起肺癌，在大鼠實驗也有被注意到，但在人類流行病學上仍缺乏足夠證據(Borm et al., 2004)；也有報告指出各種微粒長期暴露可引起動物肺部腫瘤，而且與其表面積有相關 (Driscoll, 1996)。有關奈米微粒之急性毒理研究較多，慢性毒理資料則較少，有一個研究使用奈米粒徑二氧化鈦長期暴露小動物，發現經過13星期的暴露，高劑量組在第52星期時可觀察到大鼠肺部有纖維化反應，不過在小鼠及倉鼠的反應較不明顯 (Bermudez et al., 2004)，顯然不同的動物對奈米微粒的反應也不一樣。

此外，隨著奈米科技的蓬勃發展，不同特性的奈米材質陸續開發使用，以因應不同功能及需要，這些新興奈米材質的毒性也都需要進一步檢驗。有關新興奈米材質毒性的研究，特別是奈米碳管的毒性值得注意，由於奈米碳管的直徑是奈米尺寸，但是其長度可達微米，形狀和石綿纖維極為相似，其健康危害值得進一步探討 (Seaton et al., 2005)。

另外，以杜邦 (DuPont) 公司為主要的研究群，使用含鎳及鈷的單壁奈米碳管 (single-walled carbon nanotube, SWCNT, 30nm) 注入實驗大鼠的氣管 (1-5mg/kg)，觀察其暴露三個月後的變化，結果發現部分動物肺部出現肉芽腫 (granuloma)，然而並沒有清楚的劑量反應關係 (Warheit et al., 2004)。

同時，另一組以美國太空總署（National Aeronautics and Space Administration, NASA）為首的研究團隊，利用萊斯大學（Rice University）及CarboLex公司生產的不同成分組成的單壁奈米碳管進行研究，以氣管灌注的方式暴露實驗小鼠（0.1-0.5 mg/隻），90天之後發現奈米碳管會造成肉芽腫的發生，並有劑量反應關係（Lam et al., 2004）。最近的研究報告進一步指出以咽部吸入方式將小鼠暴露單壁奈米碳管，發現在較低的劑量（20-40 μg /隻）就可引起肉芽腫及間質組織纖維化，同一研究也發現奈米碳管暴露會引起肺功能異常與排除細菌能力降低（Shvedova et al., 2005）。奈米碳管事實上多含有不同濃度的各種金屬，這些金屬也可能與毒性有關，這同時說明了為何眾多類似的研究結果不很一致。

3-5 奈米微粒其他相關毒理研究

比利時的科學家將惰性聚苯乙烯奈米微粒直接注入實驗動物的氣管中，發現除了呼吸道發炎反應之外，也發現疾病動物的血管有血栓形成（Nemmar et al., 2002），顯示奈米微粒可以穿過呼吸道進入血液，並且在身體其他系統引發健康危害。奈米微粒除了進入呼吸道造成呼吸道疾病，也可能使用於化妝品，影響皮膚，或是經由皮膚吸收進入人體，不過這方面的健康效應並不清楚，有待進一步研究（Oberdorster et al., 2005）。

3-6 奈米氧化鋅相關毒理研究

過去的研究指出，有關氧化鋅微粒最常見的職業暴露是焊接工與電鍍工，因為加熱含鋅的合金後，會產生氧化鋅微粒，經由呼吸吸入而引起金屬煙燻熱（metal fume fever），會有類似感冒的症狀，像是肌肉酸痛、咳嗽、疲勞等等（Barceloux, 1999; Fine et al., 1997; Kuschner et al., 1997）。有研究發現，在人體實驗中以呼吸暴露的方式暴露300 nm，濃度為2.5 mg/m^3 的氧化鋅微粒兩小時後，能產生金屬煙燻熱的症狀，且血漿中的IL-6濃度也有增加的趨勢（Fine et al., 1997）；另外，同樣以人體實驗，將0.17 μm ，濃度為33 mg/m^3

的氧化鋅微粒以呼吸暴露的方式暴露，暴露3小時後，進行肺泡灌洗，研究發現肺泡灌洗液中的細胞素濃度(TNF、IL-6、IL-8)皆有顯著增加(Kuschner et al.,1997)；此外，有研究指出，將40 nm，濃度為500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的奈米氧化鋅微粒以呼吸暴露的方式暴露，暴露2小時後，並沒有發現有急性的系統性效應(Beckett et al., 2005)。有趣的是，有研究顯示連續暴露氧化鋅微粒會有耐受性的情況發生，一樣是以人體實驗，將300 nm，濃度為5 mg/m^3 的氧化鋅微粒以呼吸暴露的方式暴露，連續暴露3天後，所引起的臨床反應症狀以及肺泡灌洗液中的嗜中性球百分比(Neutrophils)與IL-6濃度皆有逐漸下降的趨勢(Fine et al., 2000)。Gordon等人以呼吸暴露的方式對天竺鼠、大鼠、兔子暴露粒徑為60 nm，濃度為2.5及5 mg/m^3 的氧化鋅微粒，研究發現天竺鼠及大鼠以鼻部暴露腔(nose-only exposure chamber)暴露5 mg/m^3 的氧化鋅微粒3小時，24小時後犧牲，肺泡灌洗液中的總細胞數、乳酸脫氫酵素(LDH)及蛋白質含量，皆有顯著增加(Gordon et al., 1992)。

3-7 肺部發炎及發炎反應指標

發炎反應是生物體保衛本身不為外來物侵襲之重要機制，當生物體受到刺激、發生感染或組織受損時的一種生理反應。在發炎急性期，發炎反應會快速反擊並持續一段時間，並且通常會伴隨系統性的反應，例如各種血漿蛋白的快速變化；當慢性發炎發生時，有些疾病會有持續的免疫作用發生，並且隨之產生病理上的變化。

白血球種類分為顆粒球(granulocyte)、淋巴球(lymphocyte)以及單核球(monocyte)三種，可存在於血液循環系統中或進到組織中；單核球進入組織中成為巨噬細胞，是人體免疫系統的第一道防線，具有吞噬的功能，可將細菌、細胞殘骸、外來物質清除乾淨，此外它們會分泌一些細胞激素及化學趨化物質，活化一連串與發炎反應相關的細胞，並釋放組織胺使血管通透力增加，讓更多白血球穿透組織到達病灶區；活化的多核球、單核球以及組織巨噬細胞都有釋放氧化自由基的能力，使病灶區的氧化反應大幅增加形成

oxidative burst。發炎反應之主要特徵，包括血管通透力之增加以及白血球浸潤，在發炎反應初期最早進入組織的血球就是嗜中性球，嗜中性球會大量滲透進入組織，並在發炎反應的24個小時達到高峰，因此肺泡灌洗液中總細胞數及白血球分類比例計數，可用來當作暴露微粒後肺部發炎指標；另外血管通透性增加也會使原本血液中的蛋白質滲透至發炎部位，而乳酸脫氫酵素（lactate dehydrogenase, LDH）存在身體各臟器及血液中，一旦肺部組織或細胞受到破壞便會溢出至肺泡，所以肺泡灌洗液中的總蛋白質及LDH也可以用來當作肺部發炎的指標（Roitt et al., 1996）。

3-8 系統性發炎及發炎反應指標

周邊血液血球及分類計數（CBC/DC）上升，代表已造成系統性的發炎；TNF- α 主要是由單核球以及巨噬細胞所分泌，它是一個多功能的細胞激素，尤其在發炎反應中扮演著關鍵性功能，它可以增加附近周邊血管上的細胞黏著分子，以及促進細胞激素IL-8和IL-6的分泌，另外它也會促進細胞分泌針對巨噬細胞的趨性素，可吸引巨噬細胞來到受感染的區域，產生較強的免疫反應反清除感染源。IL-6是一種多功能的細胞介白質，在各種發炎反應中，會被細胞製造出來。它可刺激B淋巴球及T淋巴球的活化及分泌，引發發燒及調控急性期蛋白的合成。因此周邊血液中的血球數目以及細胞激素可以用來當作系統性發炎的指標（Roitt et al., 1996）。

3-9 氣管灌注與呼吸暴露方式比較

研究微粒在生物體上的效應時，經由呼吸道吸入（inhalation exposure）及由氣管內灌注（intratracheal instillation）的方式都是很常用的暴露模式。雖然氣管內灌注暴露模式在暴露劑量上，可以精確估計且操作方便，但卻無法像呼吸暴露能較真實的模擬一般人體暴露情況，同時奈米微粒必須以緩衝溶液配製，但存於液體時奈米微粒容易聚合，所以奈米粒徑及濃度的掌握較不清楚，另外考量將來要進一步進行慢性暴露研究，因此以呼吸暴露方式似

乎比較可行。不過呼吸暴露也有其限制性，除了造價成本高昂以及操作的高技術性外，也較費時。雖然呼吸性暴露有這些限制性，但基於以上考量，及嘗試應用結果於風險評估，決定後續研究採用呼吸暴露方式 (Li et al., 2007; Driscoll et al., 2000; Hurt et al., 2006; Muller et al., 2006)。

3-10 奈米微粒產生方法

奈米微粒的產生有許多方法，以下簡單介紹幾種奈米微粒產生方法 (簡弘民等, 2004)，本實驗採用爐管氣流方式產生奈米微粒。

3-10-1 噴霧法 (Atomization)

噴霧或霧化是指使液體破碎而變成在空氣中懸浮液滴狀態的過程。以液體分散機制來產生微粒，為普遍使用的奈米產生方法，雖然使用霧化器產生奈米微粒是既簡單且便利的方法，但是這個方法卻容易因水中的雜質乾燥後累積於固體微粒上，因而導致不純且比預期大的固體微粒。

3-10-2 爐管氣流反應器 (Furnace flow reactors)

爐管氣流反應器，是一種利用蒸發-凝結機制來形成微粒的裝置。蒸發-凝結其實就是懸浮在氣體中之微粒與周圍之氣體分子發生質量交換的現象，也就是說，蒸氣分子可凝結在微粒表面，微粒表面之分子也可能蒸發進入氣體。此反應器就是利用爐管加溫，將液體蒸發形成飽和蒸汽，飽和蒸汽再凝結成氣膠微粒。

除了前面介紹的二種奈米微粒產生技術外，還有許多微粒產生技術，包括雷射反應器 (Laser reactors)、固體的雷射蒸發作用 (Laser vaporization)、火焰反應器 (Flame reactors)、電漿反應器 (Plasma reactors)、放電及金屬線激發 (Spark source and exploding wire)、陰極真空噴射 (Sputtering)、惰性氣體的冷凝作用 (Inert gas condensation)、膨脹-冷卻法 (Expansion-cooling)、靜電噴霧系統 (Electrospraying) 及固體的雷射燒蝕 (Laser ablation) 等等。

第四章 材料與方法

4-1 奈米及次微米微粒產生與監測

4-1-1 奈米及次微米氧化鋅微粒的產生

本微粒產生系統可產生氧化鋅奈米及次微米微粒，此系統由工研院所研發（圖1-1、1-2及圖2），以「爐管氣流反應器」原理製造，利用蒸發-凝結機制來形成微粒。爐管氣流反應器就是利用爐管加溫，使固體蒸發形成飽和蒸汽，再降溫凝結成氣膠微粒。整套裝置可分為蒸發區與凝結區，所謂的蒸發區是指爐管的部分，凝結區則是發生在稀釋器出口端到暴露腔（exposure chamber）入口之間。將金屬鋅置入耐高溫之容器中，放置於爐管內，爐管之前端則通入乾淨之空氣作為輸送氣體（carrier gas），其功能在於將蒸汽分子攜帶出爐管，凝結機制開始作用以形成奈米級之氣膠，帶至暴露腔，而凝結區之作用除了降溫凝結之外，同時可利用乾淨空氣來稀釋微粒濃度以減少因微粒碰撞，而產生膠結。所通入之輸送氣體、反應氣體及稀釋氣體以質量流量控制系統（Mass Flow Control system）監控。爐內之溫度、蒸發面積、輸送氣體以及稀釋氣體的流量，均對微粒的粒徑及濃度有影響。

4-1-2 監測系統

微粒產生系統除了微粒的產生外，還包括了即時監測系統，微粒產生後於暴露腔（exposure chamber）進行混和，並以次微米（10-1100 nm）微粒粒徑濃度分佈自動監測儀（SMPS+CPC，圖1-3）監測粒徑分佈及數目濃度。另外，於暴露腔腔體側面的採樣孔接上四用氣體偵測儀（MicroRAE plus）監測氧氣濃度。

4-2 實驗動物

本實驗所使用的是8週雄性的Sprague Dawley rats（SD rats），購自樂斯

科生物科技股份有限公司，飼養於台灣大學實驗動物中心。本研究計畫通過台大醫學院暨公衛學院動物實驗管理小組審查，符合動物實驗倫理規範。

4-3 實驗設計

我們利用呼吸暴露 (inhalation exposure) 的方式對實驗動物進行奈米氧化鋅微粒的暴露。在相同操作條件下 (表1)，分別進行Exposure I組 (30nm, 5hrs) 以及Exposure II組 (30nm, 10hrs) 的暴露，而對照組則以未填入鋅粉於爐管內，採用空燒的方式進行暴露 (5hrs)。另外在不同操作條件下進行Exposure III組 (250nm, 10hrs) 的暴露。每組皆於暴露後24小時進行犧牲，並採集周邊血液樣本，測試血液中血球數目 (CBC/DC) 及細胞激素的濃度 (IL-6、TNF- α)，同時採集其肺泡灌洗液 (BALF) 進行肺部發炎及傷害指標的分析，包括總細胞數 (所有白血球之總數, Total cells)、血球分類計數 (Cell differential counts)、乳酸脫氫酵素 (LDH) 及總蛋白質 (Total protein) 含量。

4-4 全身性呼吸暴露模式 (whole-body inhalation exposure)

將實驗動物放置於暴露腔中，供給飼料、水及墊料進行暴露，並監測暴露腔中的氧氣濃度以及溫度。以奈米產生器產生氧化鋅微粒，通入暴露腔進氣管，通過整流板，使微粒均勻分散於暴露腔內，暴露腔腔體大小為 $103 \times 102 \times 176 \text{ cm}^3$ 。

4-5 系統性發炎反應指標分析

老鼠以腹腔注射50 mg/kg之Pentobarbital進行麻醉，以腹腔動脈採全血2 ml置於EDTA tube，將檢體送至台大動物中心以全自動血球分析儀 (MEDONIC CA530) 檢測周邊血液血球及分類計數 (CBC/DC)。剩餘的全血收集至Citrate tube，離心3000 rpm/15分鐘後取出上清液約500 μl 置於1.5 ml eppendorff 中，使用Rat IL-6及TNF- α ELISA kit (R&D systems, Inc.) 進行IL-6

以及TNF- α 指標分析。

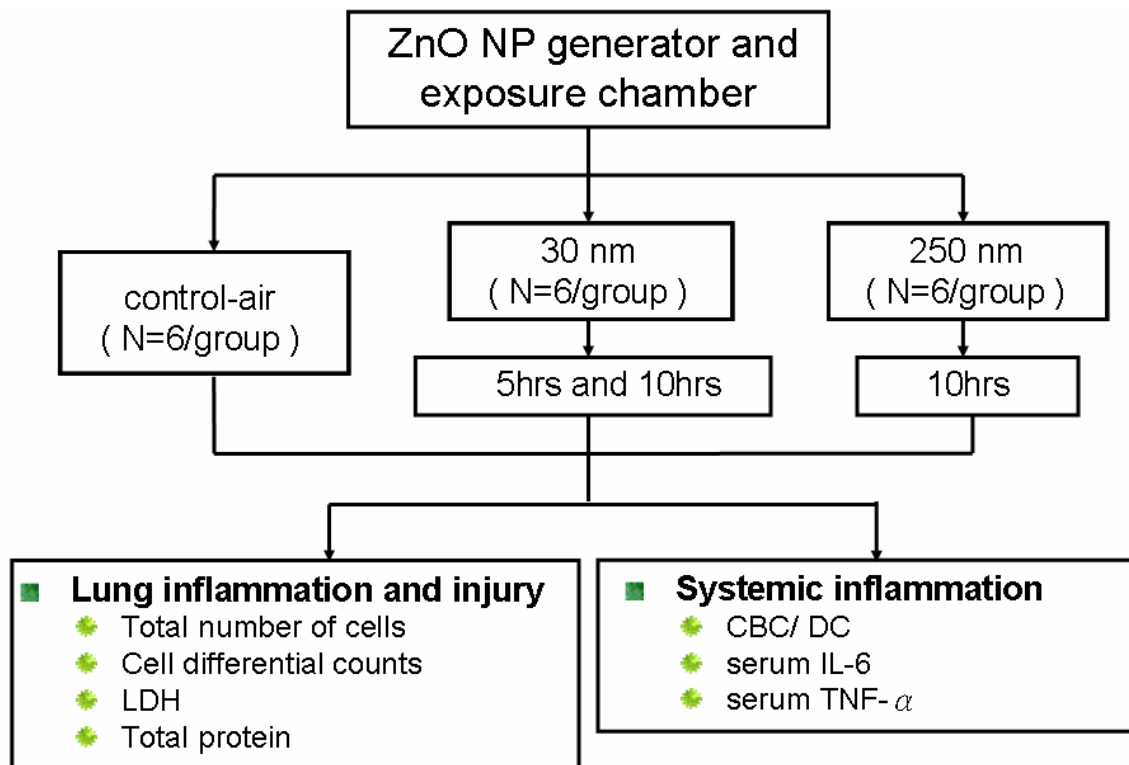
4-6 肺泡灌洗液發炎損傷指標分析

切開老鼠氣管，將氣管套上PE管，以pH 7.4緩衝液（PBS）打入肺臟內，體積計算為28 ml/kg（接近75% 肺容積），來回沖洗約4次，將肺泡灌洗液置於冰上以利後續實驗進行。將離心機先預冷4°C，肺泡灌洗液離心1000轉/10分鐘，離心後，取上清液0.5 ml置於送檢專用管，送至台大動物中心以自動血清乾式生化分析儀（SPOTCHEM SP4410）檢測乳酸脫氫酵素（LDH）含量及以自動血清濕式生化分析儀（Bio Systems BTS-370 Plus）檢測總蛋白質（Total protein）含量。準備染色劑（trypan blue），取100 μ l肺泡灌洗液和100 μ l染劑混合均勻，取適量到細胞計數器上，使用顯微鏡或倒立式顯微鏡計算九宮格之4大格的平均值計數總細胞數。沈澱物部份以低速離心機（cytospin），600轉/5分鐘，用吹風機盡快烘乾固定，再用劉氏染色劑染色，A劑染30秒，B劑染1分30秒，會出現金屬光澤，用水沖洗背面，以光學顯微鏡顯微鏡計算200個細胞內含多少巨噬細胞、嗜中性白血球、嗜酸性白血球、淋巴球。再利用細胞計數算出每毫升含有多少巨噬細胞、嗜中性白血球、嗜酸性白血球、淋巴球。

4-7 統計方法分析

本研究以SAS system for windows 9.0 版統計軟體進行分析，實驗數據以平均值加減標準差（mean \pm SD）表示，暴露組與控制組及暴露組之間之比較以Wilcoxon Rank Sum test，P<0.05視為有統計上顯著差異。

4-8 實驗架構



第五章 結果

5-1 奈米氧化鋅微粒的暴露

本研究分別進行Exposure I組（30nm，5hrs）、Exposure II組（30nm，10hrs）、Exposure III組（250nm，10hrs）以及對照組的實驗，四次暴露的各種操作條件及量測項目如表1。產生微粒的同時以次微米微粒粒徑濃度分佈自動監測儀（SMPS+CPC）進行微粒粒徑及濃度的監測，但是四次暴露以不同廠牌的監測儀監測（Exposure I組：TSI FMPS；Exposure II組及Exposure III組：GRIMM SMPS+CPC；對照組：TSI SMPS+CPC），可能在比較上會有所誤差。所產生的氧化鋅微粒之粒徑及濃度分佈範圍如圖3及圖4，可以看到Exposure I組的中數粒徑（count median diameter, CMD）為34.0 nm（圖3）；Exposure II組的中數粒徑為24.7 nm；Exposure III組的中數粒徑為214.4 nm（圖4）；而對照組，因為監測儀器借用須歸還的緣故，因此只監測1.5小時（從開始暴露算起1.5小時）。

另外，Exposure I組所產生的奈米氧化鋅微粒的平均數目濃度約為 $5.3 \times 10^5 \text{ \#/cm}^3$ ；Exposure II組所產生的奈米氧化鋅微粒的平均數目濃度約為 $4.1 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$ ；Exposure III組所產生的氧化鋅微粒的平均數目濃度約為 $7.7 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$ ；而對照組的平均數目濃度約為 $2.1 \times 10^5 \text{ \#/cm}^3$ （圖5、圖6、圖7及圖8）。從圖發現，Exposure I組所產生的奈米氧化鋅微粒，微粒粒徑約3小時後開始趨於穩定（圖9），微粒數目濃度則在約2小時後趨於穩定（圖5）；Exposure II組所產生的奈米氧化鋅微粒，粒徑及數目濃度約3小時後開始趨於穩定（圖6、圖10）；Exposure III組所產生的氧化鋅微粒，微粒粒徑約3.5小時後開始趨於穩定（圖11），微粒數目濃度則在約4小時後趨於穩定（圖7）；而對照組的微粒粒徑及數目濃度約1小時後開始趨於穩定（圖8、圖12）。

為了更進一步的觀察氧化鋅微粒，我們以鐵氟龍濾紙採樣收集產生的奈米氧化鋅微粒，送至台大奈米科技中心以高解析熱電子型場發射掃描式電子顯微鏡(JEOL JSM-6500F Field Emission Scanning Electron Microscope, SEM)觀察微粒的外觀與型態(如圖13)，可以觀察到奈米氧化鋅微粒收集在鐵氟龍濾紙上呈現不規則且似珊瑚的形狀，微粒因為收集在鐵氟龍濾紙上，因此有聚集的現象產生。

此外，進一步以微粒粒徑濃度監測儀所測得的數目濃度推估實驗動物所暴露的重量濃度及表面積濃度(表1)，可以看到Exposure I組的重量濃度約為 6.6 mg/m^3 ，表面積濃度約為 $8.4 \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ ；Exposure II組的重量濃度約為 23.2 mg/m^3 ，表面積濃度約為 $2.9 \times 10^5 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ ；Exposure III組的重量濃度約為 2100 mg/m^3 ，表面積濃度約為 $9.4 \times 10^6 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ 。在吸入劑量方面，Strohl等人研究指出每100克的SD健康大鼠，每分鐘呼吸的量為 $28.17 \pm 1.37 \text{ ml}$ (Strohl et al., 1997)，因此我們以此公式換算得到吸入劑量(數目)，Exposure I組的吸入劑量為 $1.3 \times 10^{10} \text{ #}$ ，Exposure II組的吸入劑量為 $1.8 \times 10^{11} \text{ #}$ ，Exposure III組的吸入劑量為 $3.1 \times 10^{11} \text{ #}$ 。另外再將吸入劑量以重量及表面積表示，Exposure I組的部分分別為 0.16 mg 及 $2.0 \times 10^9 \text{ } \mu\text{m}^2$ ，Exposure II組的部分分別為 1.02 mg 及 $1.3 \times 10^{10} \text{ } \mu\text{m}^2$ ，Exposure III組的部分分別為 84.58 mg 及 $3.8 \times 10^{11} \text{ } \mu\text{m}^2$ (表1)。

5-2 動物實驗

實驗動物的基本特性請見表2。Exposure I組、Exposure II組、Exposure III組及對照組的實驗動物，在週數及體重上，沒有差異。

本實驗以肺泡灌洗液測定肺部發炎及傷害反應。實驗結果顯示，動物暴露Exposure I組的奈米氧化鋅微粒後，肺泡灌洗液中的總細胞數(Total cells)與對照組比較，有增加的趨勢，但無顯著；暴露Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，與對照組比較一樣有增加的趨勢，但也無顯著；而暴露Exposure III組的氧化鋅微粒後，總細胞數則是顯著高於對照組($p < 0.05$ ，表3，圖14)。

另外還將Exposure I組與Exposure II組及Exposure II組與Exposure III組兩兩之間互相比較，並無顯著差異（表3，圖14）。在細胞分類計數中，可觀察到暴露Exposure I組、Exposure II組以及Exposure III組的氧化鋅微粒後，嗜中性球百分比（Neutrophils）顯著高於對照組（ $p < 0.05$ ，表3，圖15）；另外，將Exposure I組與Exposure II組及Exposure II組與Exposure III組兩兩之間互相比較，發現Exposure II組的嗜中性球百分比顯著高於Exposure I組，也發現Exposure III組的嗜中性球百分比顯著高於Exposure II組（ $p < 0.05$ ，表3，圖15）。此外，也觀察到暴露Exposure I組、Exposure II組以及Exposure III組的氧化鋅微粒後，肺泡灌洗液中的乳酸脫氫酶（LDH）顯著高於對照組（ $p < 0.05$ ，表3，圖16）。至於肺泡灌洗液中的總蛋白質含量（Total protein），僅暴露Exposure III組的氧化鋅微粒與對照組比較有統計上顯著意義（ $p < 0.05$ ，表3，圖17）。

另外，本實驗以周邊血液血球及分類計數（CBC/DC）與細胞激素（IL-6及TNF- α ）測定系統性的發炎反應。實驗結果顯示，動物暴露於Exposure I組的奈米氧化鋅微粒後，全血中的白血球數目（WBC）與對照組比較，有增加的趨勢，但無顯著；而暴露於Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，則是顯著高於對照組（ $p < 0.05$ ，表4，圖18）；至於暴露於Exposure III組的氧化鋅微粒後與對照組比較則是呈現下降的趨勢。動物暴露於Exposure I組的奈米氧化鋅微粒後，全血中的血小板數目（PLT）與對照組比較，則是有下降的趨勢；但暴露於Exposure II組及Exposure III組的氧化鋅微粒後，則是顯著高於對照組（ $p < 0.05$ ，表4，圖19）；另外，將Exposure I組與Exposure II組互相比較，發現Exposure II組的血小板數目顯著高於Exposure I組（ $p < 0.05$ ，表4，圖19）。至於動物暴露於Exposure I組的奈米氧化鋅微粒後，全血中的紅血球數目（RBC）及血紅素含量（HGB）與對照組比較，則是有下降的趨勢；但暴露於Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，則是有增加的趨勢，但無顯著；而暴露於Exposure III組的氧化鋅微粒後，則是顯著高於對照組（ $p < 0.05$ ，表4，圖20及圖21）。另外，將Exposure I組與Exposure II組互相比較，發現Exposure II組的紅血球數目及血紅素含量顯著高於Exposure I組（ $p < 0.05$ ，表4，圖20及

圖21)。

此外，細胞激素的部分，實驗結果顯示動物暴露於Exposure I組的奈米氧化鋅微粒後，全清中的IL-6濃度顯著高於對照組 ($p < 0.05$ ，表4，圖22)；而暴露Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，IL-6濃度也是顯著高於對照組 ($p < 0.05$ ，表4，圖22)；而暴露Exposure III組的奈米氧化鋅微粒後之IL-6指標則尚未分析。至於血清中的TNF- α 濃度，與對照組比較則無差異。

第六章 討論

6-1 奈米產生器以及微粒的產生及暴露

在Exposure I組以及Exposure II組兩次實驗，使用不同廠牌的次微米微粒粒徑濃度分佈自動監測儀（Exposure I組：TSI FMPS；Exposure II組：GRIMM SMPS+CPC），進行微粒粒徑及濃度的監測，這個部分在比較上會有所誤差（圖5、圖6、圖9及圖10）。從圖可以看到，Exposure I組所產生的奈米氧化鋅微粒，在穩定後粒徑大約為25.5 nm（圖9），穩定後的數目濃度約為 $4.8 \times 10^5 \text{ \#/cm}^3$ （圖5）；另外也可以看到，Exposure II組所產生的奈米氧化鋅微粒，在穩定後粒徑大約為23.0 nm（圖10），穩定後的數目濃度約為 $4.1 \times 10^6 \text{ \#/cm}^3$ （圖6）。因為在儀器的借用上無法調配，使得兩次實驗用了不同的監測儀。在不同的實驗，儀器的使用上相同，才能方便於日後的比較，雖然也可能是每一次產生微粒會些微受到外在因素的干擾而造成誤差，但應該不至於造成10倍的差異。目前TSI FMPS送回美國原廠維修，因此無法將兩台監測儀進行比對，另外查詢了過去的文獻，有關這兩台儀器之間的差異很少被詳細研究，建議在後續的實驗使用相同的監測儀進行監測，以將誤差降到最低。

另外，由於儀器的限制，啟動後便無法再開啓暴露腔，因此需要在產生器啟動加熱之前，將老鼠放置於暴露腔內。但是從圖5、圖6、圖7、圖9、圖10及圖11看到，大約在3-4小時後，才能穩定的產生氧化鋅微粒，因此在前面的3-4小時，粒徑及濃度還不穩定，這個部分可能會對所引起的發炎反應造成貢獻，使我們無法確切的瞭解暴露於粒徑約為30 nm以及250 nm的氧化鋅微粒所引起的毒性效應。因此，需要在產生器與暴露腔之間接上一個混合腔（mixing chamber），待穩定的產生氧化鋅微粒後，再通入暴露腔中。

暴露腔中氧氣濃度、溫度及濕度的監測對於老鼠是重要的，我們監測了氧氣濃度及溫度（表1），氧氣濃度皆穩定的維持在20.9 %，而最高溫度卻升高到25-27 °C左右，一般老鼠最舒適的溫度為21 °C，因此溫度有過高的情況，而且濕度也必須同時監測，這個部分需要設法改善，否則會影響到老鼠的生理狀況。此外，在過去較常被使用的暴露方法為以氣管灌注（intratracheal instillation）的方式來進行暴露，雖然氣管灌注暴露模式在暴露劑量上，可以精確估計且操作方便，但卻無法像呼吸暴露能較真實的模擬一般人體暴露情況，同時奈米微粒會聚合，所以奈米微粒粒徑及濃度的掌握較不清楚。因此我們建立全身性的呼吸暴露模式（whole-body inhalation exposure），雖然此暴露模式所需耗費的經費、人力、技術都比傳統的氣管灌注方式還要來的多且複雜，但是實驗動物能正常活動不被侷限，因此比較符合一般正常的呼吸情況。

本研究已經能穩定產生粒徑約為30 nm 以及250 nm的氧化鋅微粒，但目前數目濃度較難控制。因此建議嘗試調整操作條件之參數，以獲取實驗需求所要的數目濃度，進而在未來研究當中比較不同粒徑，但相同數目濃度的毒性效應。

最後為了精確得到暴露期間微粒重量濃度（Mass concentration）以及表面積濃度（Surface area concentration），未來可以在實驗動物暴露微粒的同時，進一步加以監測，以下為可供參考的監測方法：

重量濃度：

- （1）以濾紙匣承接濾紙接上採樣幫浦收集氧化鋅微粒，分別量測濾紙前、後重，以得微粒重量濃度。
- （2）採用漸縮元件振盪微量天平（Tapered Element Oscillating Microbalance, TEOM）技術的微粒質量濃度連續監測儀，進行重量濃度的監測。

表面積濃度：

使用奈米表面積監測儀 (Nanoparticle Surface Area Monitor) 進行表面積濃度監測。

6-2 呼吸暴露奈米氧化鋅微粒所引起之毒性效應

本研究結果顯示動物暴露於Exposure I組、Exposure II組以及Exposure III組的氧化鋅微粒後，肺部發炎反應增加，肺泡灌洗液中的嗜中性球百分比 (Neutrophils) 以及乳酸脫氫酵素 (LDH) 呈現劑量反應關係 ($p < 0.05$ ，表3，圖15及圖16)。在系統性發炎反應測定的部分發現，動物暴露於Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，全血中的白血球數目 (WBC) 及血小板數目 (PLT) 與血清中的IL-6濃度相較於對照組有顯著的增加 ($p < 0.05$ ，表4，圖18、圖19及圖22)，且動物暴露於Exposure III組的氧化鋅微粒後，全血中的血小板數目 (PLT) 相較於對照組也有顯著的增加 ($p < 0.05$ ，表4，圖19)。

研究顯示暴露於Exposure III組的氧化鋅微粒比暴露Exposure II組的奈米氧化鋅微粒更容易造成肺部及系統性的毒性效應。過去的研究指出在相同的重量濃度下，奈米粒徑微粒因為粒徑小、表面積大，相較於粒徑較大之微粒引起較嚴重的肺部發炎反應，但本研究結果顯示暴露於粒徑約為250 nm的氧化鋅微粒所引起的毒性效應較粒徑約為30 nm的奈米氧化鋅微粒來的大，原因在於本研究中粒徑為250 nm的微粒數目濃度較大，也具有較大的表面積，因此引起較大的毒性反應。有關氧化鋅微粒的毒理研究不多，且大部分都是人體實驗。有研究指出，以呼吸暴露的方式暴露300 nm，濃度為 2.5 mg/m^3 的氧化鋅微粒兩小時後，能產生金屬煙燻熱的現象，且血漿中的IL-6濃度也有增加的趨勢 (Fine et al., 1997)。也有動物實驗發現，以鼻部暴露腔 (nose-only exposure chamber) 的方式對天竺鼠及大鼠暴露粒徑為60 nm，濃度 5 mg/m^3 的氧化鋅微粒3小時，24小時後犧牲，肺泡灌洗液中的總細胞數、乳酸脫氫酵素 (LDH) 及蛋白質含量，皆有顯著增加 (Gordon et al., 1992)。這些研究均指出暴露氧化鋅微粒能引起肺部及系統性的發炎反應。

我們的實驗發現，暴露Exposure I組、Exposure II組以及Exposure III組的

氧化鋅微粒後，肺泡灌洗液中的乳酸脫氫酵素（LDH）均顯著高於對照組，而總蛋白質含量（Total protein）與對照組比較有增加趨勢，唯暴露Exposure III組的氧化鋅微粒後顯著高於對照組。一般這兩個指標被用來當作肺部傷害的指標，當呼吸道表皮細胞受損時，細胞內的乳酸脫氫酵素（LDH）會進入肺泡，另外，當血管受損時，通透性會增加，使得周邊血液中的蛋白質滲透肺泡。本研究顯示，氧化鋅除了可以引起肺部發炎反應，還可以造成肺部傷害。

另外，暴露Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，周邊血液血球及分類計數（CBC/DC）中的白血球數目（WBC）及血小板數目（PLT）與對照組比較有顯著的增加。但是也觀察到暴露Exposure III組的氧化鋅微粒後，周邊血液血球及分類計數中白血球數目卻有下降趨勢，推測可能是檢體未馬上處理、檢測，因而導致細胞死亡。過去研究指出，將40 nm，濃度為500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的奈米氧化鋅微粒以呼吸暴露的方式進行人體臨床試驗，暴露2小時後並沒有發現急性的系統性效應(Beckett et al., 2005)。有關氧化鋅微粒引起系統性發炎反應-周邊血液血球及分類計數指標的相關文獻很少，無法予以佐證，因此以其他不同成分的微粒來加以探討。在過去我們實驗室的研究指出，實驗動物暴露於濃縮懸浮微粒（concentrated ambient particles, CAPs）會引起周邊血液中的白血球增加，可能會進而影響系統性的壓力（Lei et al., 2004）。不過，濃縮懸浮微粒的微粒成分複雜，而氧化鋅微粒成分則較單純。另外，有一篇研究是以暴露氧化錳微粒（Magnesium Oxide, MnO）所做的人類毒理研究，研究發現周邊血液中的白血球濃度沒有顯著差異（Kuschner et al., 1997）。

此外，暴露Exposure I組及Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，血清中IL-6濃度與對照組比較有顯著的增加。過去的研究指出，以人體臨床試驗暴露粒徑300 nm，濃度為2.5 mg/m^3 的氧化鋅微粒2小時後，發現會引起血漿中IL-6濃度的增加（Fine et al., 1997）。至於暴露Exposure I組及Exposure II組的奈米氧化鋅微粒後，血清中TNF- α 濃度與對照組比較則無差異。過去的研究

指出，以人體臨床試驗暴露粒徑 $0.17\ \mu\text{m}$ ，濃度為 $33\ \text{mg}/\text{m}^3$ 的氧化鋅微粒，暴露後3小時以及20小時進行肺泡灌洗，研究發現暴露後3小時肺泡灌洗液中的TNF- α 顯著高於暴露後20個小時（Kuschner et al., 1997），顯示TNF- α 指標出現的時間約為暴露後3小時，但在暴露後20個小時看不出類似的趨勢，因此本研究在暴露後24小時未能觀察到有增加的趨勢。綜合本研究結果，不同粒徑之氧化鋅微粒（30 nm及250 nm）皆會誘使健康大鼠發生急性肺部發炎與傷害反應，同時有系統性發炎產生，顯示本研究的奈米氧化鋅微粒可能具有急性毒性效應，值得進一步關注，不過真正機制需要未來研究加以探討。

此外有趣的是，有研究顯示連續暴露氧化鋅微粒會有耐受性的情況發生，以人體臨床試驗，將300 nm、濃度為 $5\ \text{mg}/\text{m}^3$ 的氧化鋅微粒以呼吸暴露的方式暴露，連續暴露3天後，所引起的臨床反應症狀以及肺泡灌洗液中的嗜中性球百分比與IL-6濃度則有逐漸下降的趨勢(Fine et al., 2000)。因此，除了單一天數暴露外，未來還可以朝慢性暴露所造成的耐受性這個方向來加以探討。

過去的相關研究以及本研究結果皆顯示，暴露於微米級以及奈米級的氧化鋅微粒後，皆發現會引起肺部的發炎反應。過去的人體臨床試驗研究也曾探討奈米氧化鋅微粒是否會造成系統性的毒性效應(Beckett et al., 2005)，但其結果並無法證實此種效應。因此本研究進一步建立了一套可以產生奈米尺寸氧化鋅微粒的全身性呼吸暴露系統，能清楚完整的監測暴露情況，這是過去研究無法達到的。另外此產生器不僅能夠產生氧化鋅微粒，還能產生其他微粒，例如：氧化銀微粒（ Ag_2O ）。此暴露系統複雜，包含奈米產生器、動物暴露腔、質量流量控制系統（Mass Flow Control system）及微粒粒徑濃度監測儀，目前可以穩定的產生奈米氧化鋅微粒，但是還是有一些地方需要加以改進（如5-1所談及），使之更加完善。我們已經完成初步的研究，實驗結果顯示實驗動物暴露於不同粒徑之氧化鋅微粒（30 nm及250 nm），皆會造成肺部及系統性的毒性效應。

第七章 結論

利用微粒產生及監測系統產生不同粒徑之氧化鋅微粒（30 nm及250 nm），以全身性的暴露模式進行動物毒理實驗，發現健康大鼠暴露於不同粒徑及濃度的氧化鋅微粒後，會引起肺部發炎反應，其中肺泡灌洗液中的嗜中性球百分比（Neutrophils）以及乳酸脫氫酵素（LDH）呈現劑量反應關係。

另外，動物暴露於奈米氧化鋅微粒後，除了引起肺部發炎反應外，還會引起系統性的毒性效應。本研究顯示暴露不同粒徑之氧化鋅微粒所引起的毒性效應值得重視。不過，真正機轉需要進一步加以研究。

第八章 建議

微粒產生及暴露系統已達成初步目標，未來需要改進的地方如下：

- (1) 產生微粒的同時，以相同廠牌的微粒粒徑濃度分佈自動監測儀進行微粒粒徑及濃度的監測；
- (2) 在產生器與暴露腔之間接上一個混合腔 (mixing chamber)，穩定的產生氧化鋅微粒後，再通入暴露腔中；
- (3) 控制暴露腔中的溫、濕度，以免影響老鼠的生理狀況；
- (4) 調整操作條件之參數，以獲取實驗需求所要的數目濃度；
- (5) 在實驗動物暴露微粒的同時，監測重量濃度以及表面積濃度。

表1 各種操作條件及量測項目

	Exposure I	Exposure II	Exposure III	Control
操作條件				
粒徑 (nm)	30	30	250	-
暴露時間 (hr)	5	10	10	5
Temp. (°C)	600	600	650	600
N2 (LPM)	1.0	1.0	1.0	1.0
Air (LPM)	10	10	10	10
Duluted gas (LPM)	120	120	120	120
量測項目				
監測儀器	TSI FMPS	GRIMM SMPS+CPC	GRIMM SMPS+CPC	TSI SMPS+CPC
O2 (%)	20.9	20.9	20.9	20.9
Temp. (°C)	27	-	25	-
平均暴露濃度				
數目濃度 (#/cm3)	5.3E+5	4.1E+6	7.7E+6	-
重量濃度 (mg/m3)	6.6	23.2	2100	-
表面積濃度 (µm2/cm3)	8.4E+4	2.9E+5	9.4E+6	-
吸入劑量				
數目 (#)	1.3E+10	1.8E+11	3.1E+11	-
重量 (mg)	0.16	1.02	84.58	-
表面積 (µm2)	2.0E+9	1.3E+10	3.8E+11	-

註1：Exposure I組為暴露30nm 5 hrs；Exposure II組為暴露30nm 10 hrs；Exposure III組為暴露250nm 10 hrs；Control組為暴露5 hrs，但只監測從開始暴露算起1.5小時

註2：GRIMM SMPS+CPC及TSI SMPS+CPC未能同時監測溫度，因此Exposure II組及Control組無溫度量測數據

註3：重量濃度及表面積濃度公式（SMPS User's Manual）

Statistic/Weight	Number	Surface Area	Volume	Mass
Concentration	$n = \frac{c \phi}{tQ \eta}$	$s = \pi D_p^2 n$	$v = \frac{\pi D_p^3 n}{6}$	$m = \rho v$
Total Concentration	$N = \sum_l^u n$	$S = \sum_l^u s$	$V = \sum_l^u v$	$M = \sum_l^u m$

（氧化鋅密度為5.8 g/cm3）

表2 實驗動物的基本特性

	Control	Exposure I	Exposure II	Exposure III
N	6	6	6	6
Age (week)	8	8	8	8
Body weight (g)	303.3 (10.3)	288.3 (9.8)	260.8 (15.0)	238.3 (16.0)

Mean (standard deviation)

N：實驗動物數目

表3 肺泡灌洗液指標分析

	Control	Exposure I	Exposure II	Exposure III
N	6	6	6	6
Total cells ($\times 10^4$ cell)	41.5 (11.2) ^a 38.3 (31.0-58.6) ^b	79.5 (51.9) 67.3 (30.0-163.6)	147.5 (101.3) 133.0 (21.5-325.5)	182.8 (81.5)* 200.5 (80.0-279.5)
Neutrophils (%)	1.7 (2.3) ^a 1.0 (0-6) ^b	23.5 (19.6)* 21.0 (2-46)	61.7 (13.2)*,† 58.5 (49-87)	83 (10.8)*,‡ 85.5 (65-94)
Macrophages ($\times 10^4$ cell)	40.6 (10.1) 37.8 (31.0-55.1)	53.0 (23.0) 49.9 (29.4-91.6)	48.4 (26.6) 44.2 (9.2-86.7)	24.1 (5.5)* 24.4 (16.8-31.3)
LDH (IU/L)	<100	412.7 (91.9)* 441.0 (291-512)	688.3 (372.9)* 658.0 (193-1293)	1490 (407.8)*,‡ 1696.5 (851-1834)
Total protein (mg/dl)	0.08 (0.02) ^a 0.09 (0.05-0.11) ^b	0.13 (0.14) 0.10 (0-0.4)	0.16 (0.13) 0.13 (0.06-0.42)	0.54 (0.21)*,‡ 0.48 (0.3-0.79)

^a Mean (standard deviation)

^b Median (mix-max)

*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

‡表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure II 組，p value < 0.05

表4 系統性發炎反應指標分析

	Control	Exposure I	Exposure II	Exposure III
N	6	6	6	6
CBC/DC				
WBC (10 ³ /mm ³)	1.5 (0.6) ^a 1.8 (0.4-1.9) ^b	2.1 (0.7) 2.0 (1.3-3.3)	3.6 (1.9)* 2.9 (1.7-6.5)	0.6 (0.2) 0.6 (0.4-0.8)
RBC (10 ⁶ /mm ³)	6.43 (0.83) ^a 6.46 (5.48-7.62) ^b	6.25 (0.35) 6.35 (5.79-6.69)	6.95 (0.54)† 6.73 (6.52-7.86)	7.53 (0.39)* 7.64 (7.05-7.99)
HGB (g/dl)	12.7 (1.1) ^a 12.8 (11.5-14.2) ^b	12.6 (0.9) 12.6 (11.4-13.9)	13.9 (1.0)† 13.8 (12.7-15.6)	14.3 (1.0)* 14.3 (13.2-16)
HCT (%)	35.5 (3.5) ^a 35.5 (30.6-39.6) ^b	35.5 (2.7) 35.3 (32.0-39.3)	37.7 (2.6) 37.0 (35.0-41.8)	45.9 (3.7)*,‡ 45.3 (14.4-52.4)
PLT (10 ³ /mm ³)	715 (105) ^a 731 (542-847) ^b	667 (141) 731 (402-780)	1205 (495)*,† 1006 (676-1917)	910 (112)* 896 (777-1086)
Cytokine				
IL-6 (pg/ml)	148.7 (4.5) ^a 148.4 (142.4-155.4) ^b	189.6 (45.5)* 170.0 (151.1-260.7)	197.5 (30.5)* 194.3 (159.6-240.7)	-

^a Mean (standard deviation)

^b Median (mix-max)

*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

‡表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure II 組，p value < 0.05

圖1-1 奈米氧化鋅產生系統全貌



圖1-2 奈米氧化鋅產生系統全貌

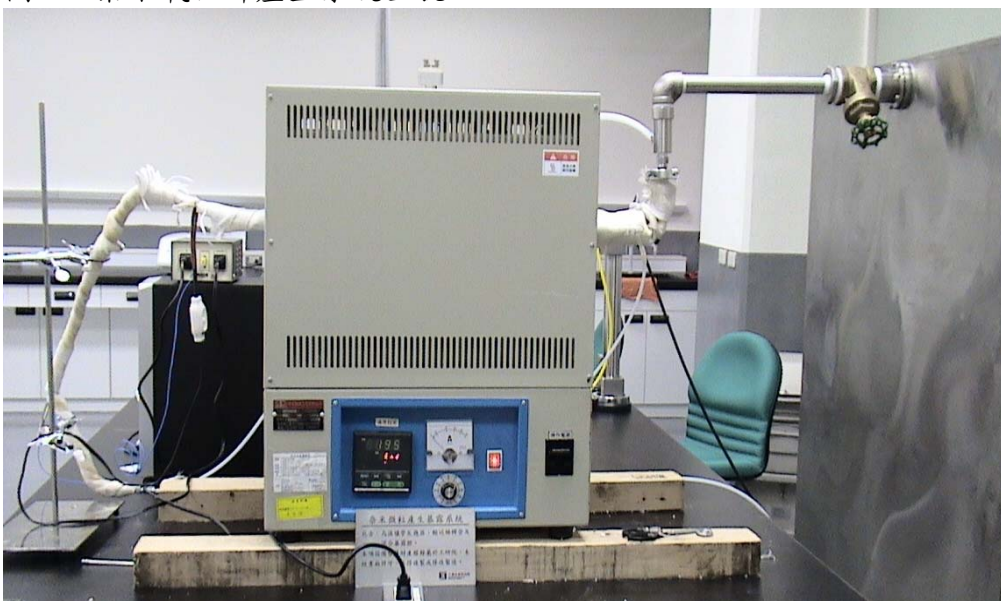


圖1-3 奈米氧化鋅產生系統全貌

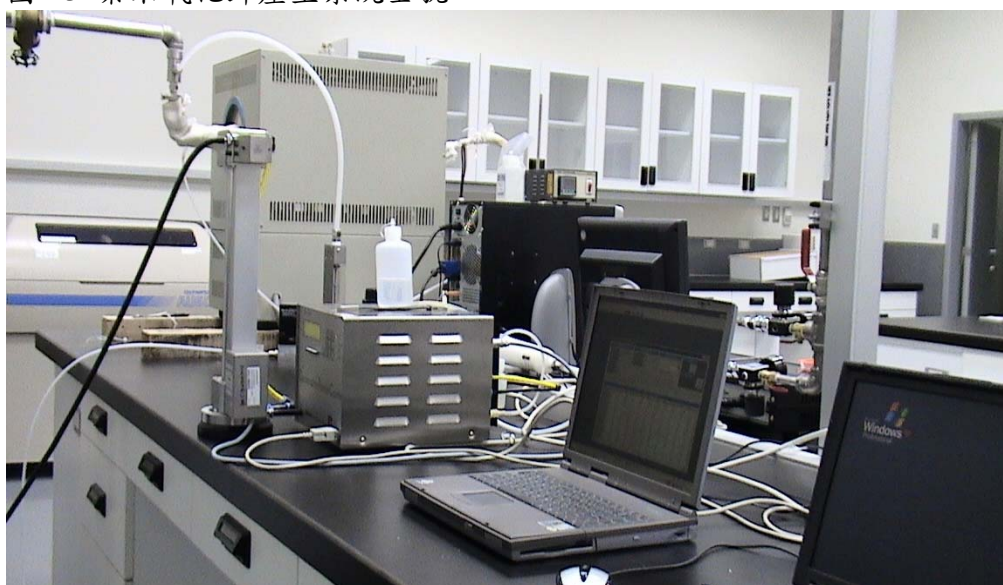


圖2 奈米氧化鋅產生系統流程圖

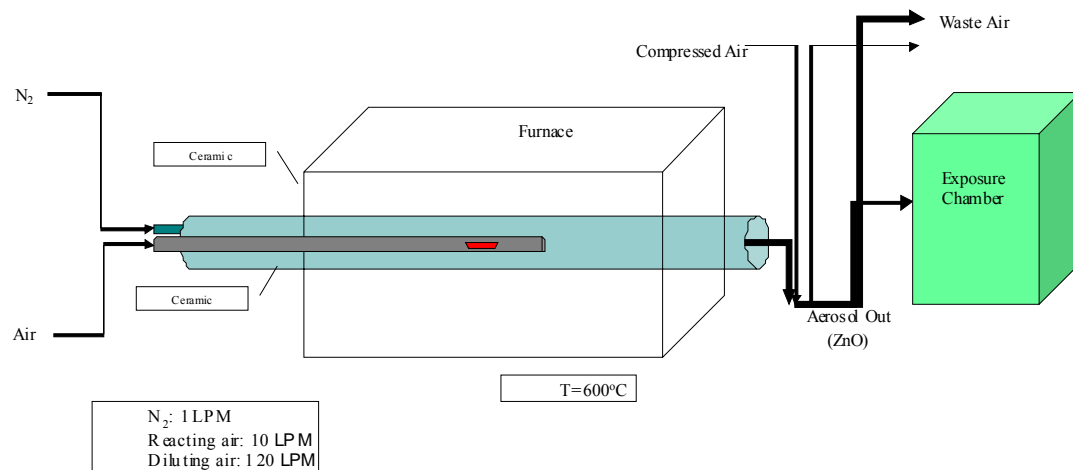


圖3 Exposure I組粒徑及數目濃度分佈圖

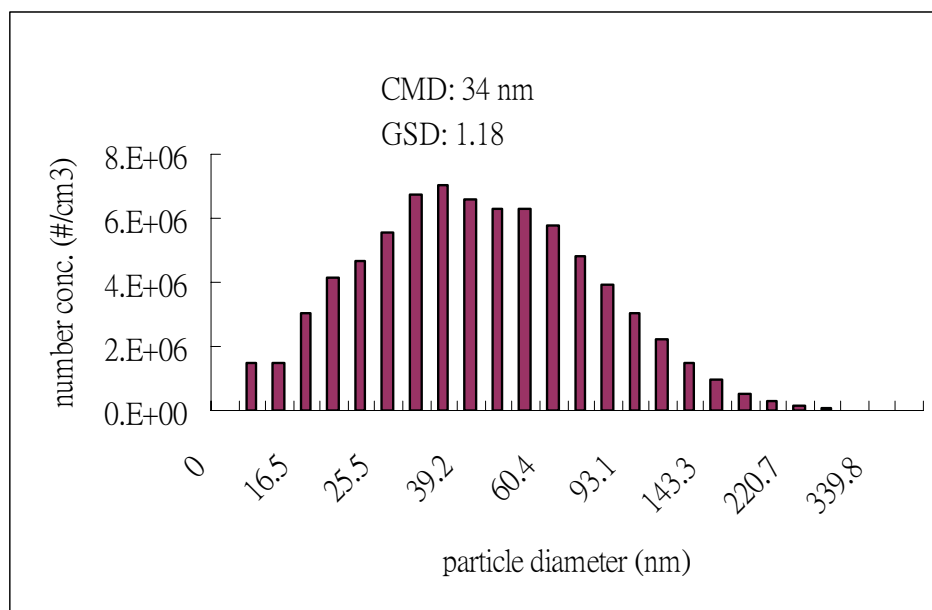


圖4 Exposure II組及Exposure III組粒徑及數目濃度分佈圖

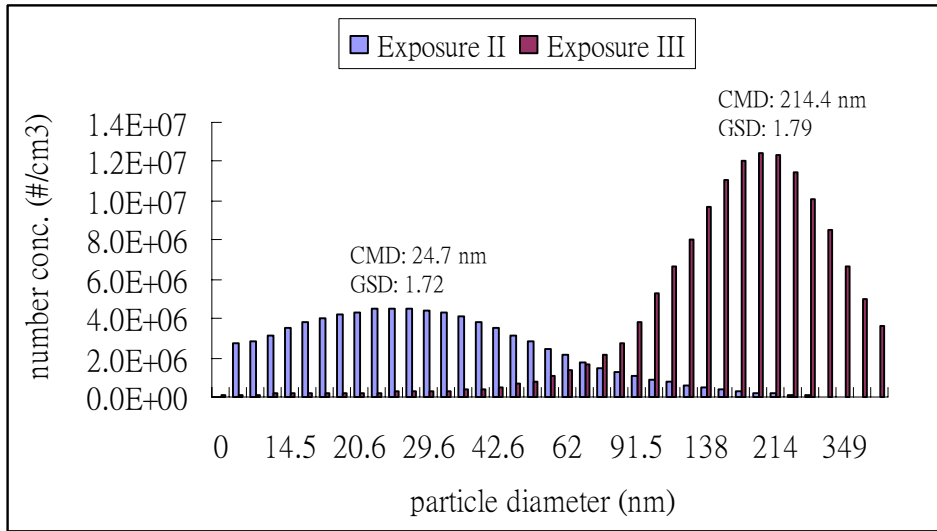


圖5 Exposure I組數目濃度時間分佈圖

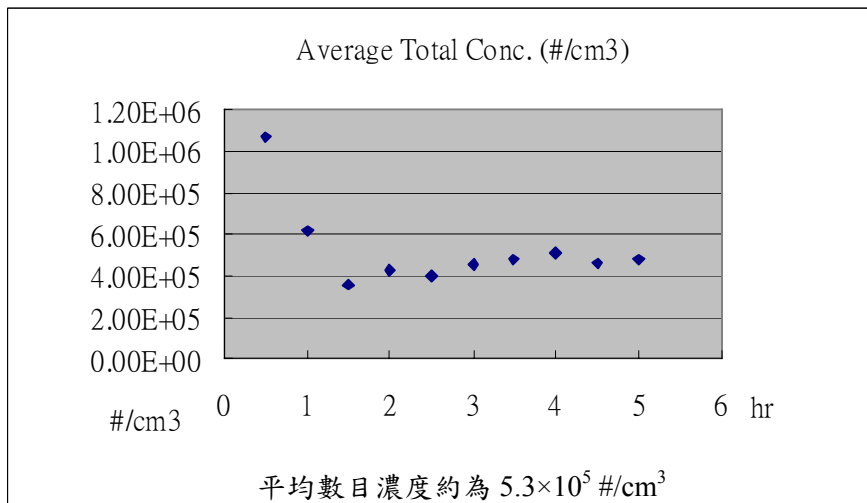


圖6 Exposure II組數目濃度時間分佈圖

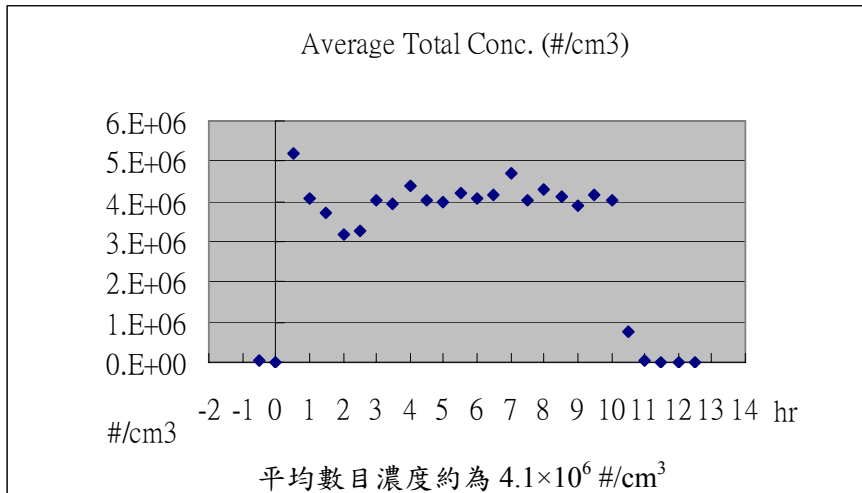


圖7 Exposure III組數目濃度時間分佈圖

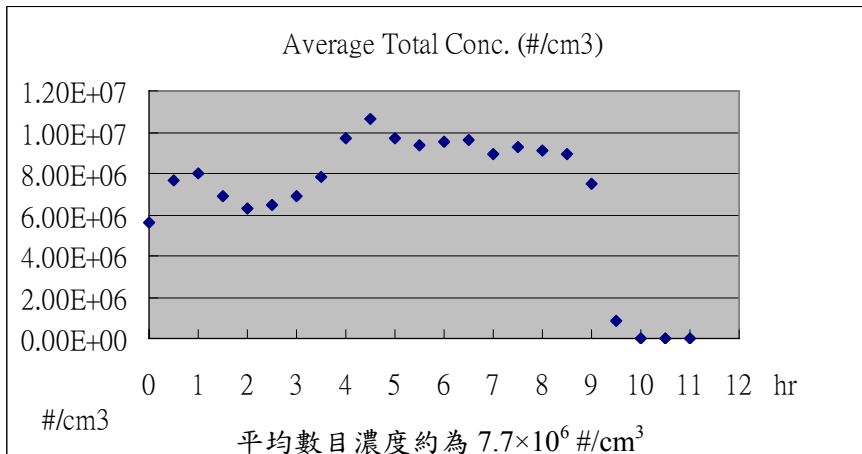
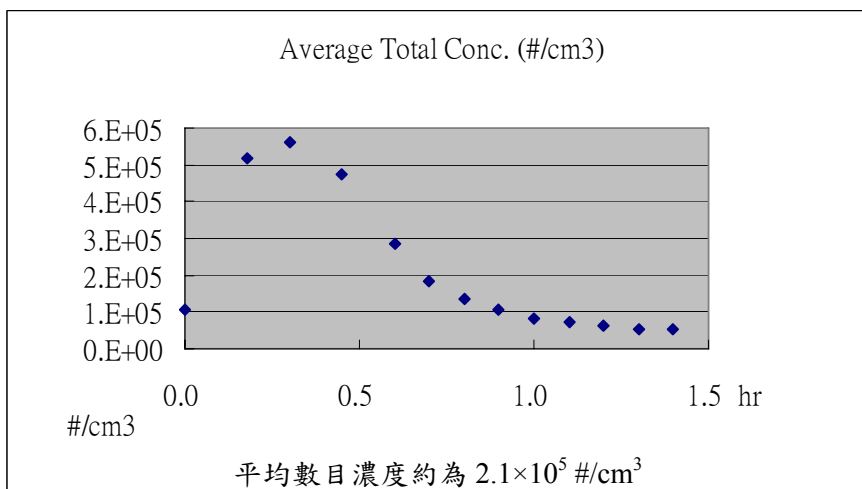


圖8 Control組數目濃度時間分佈圖



(只監測從開始暴露算起1.5小時)

圖9 Exposure I組粒徑時間分佈圖

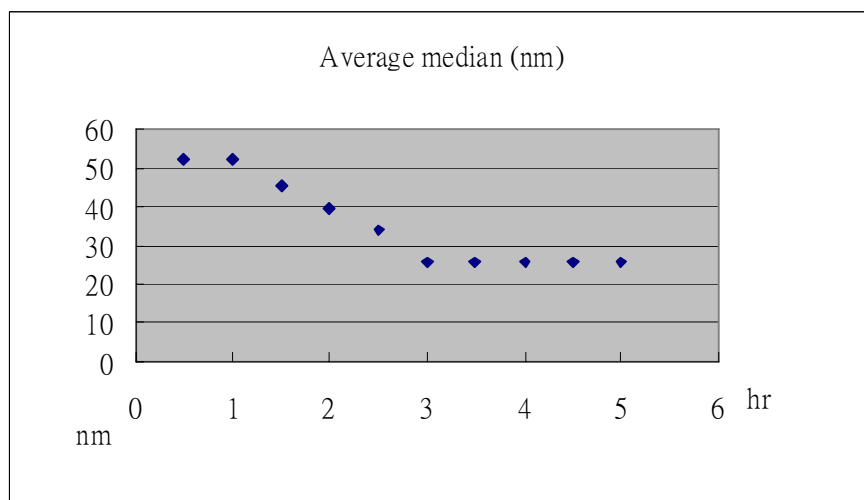


圖10 Exposure II組粒徑時間分佈圖

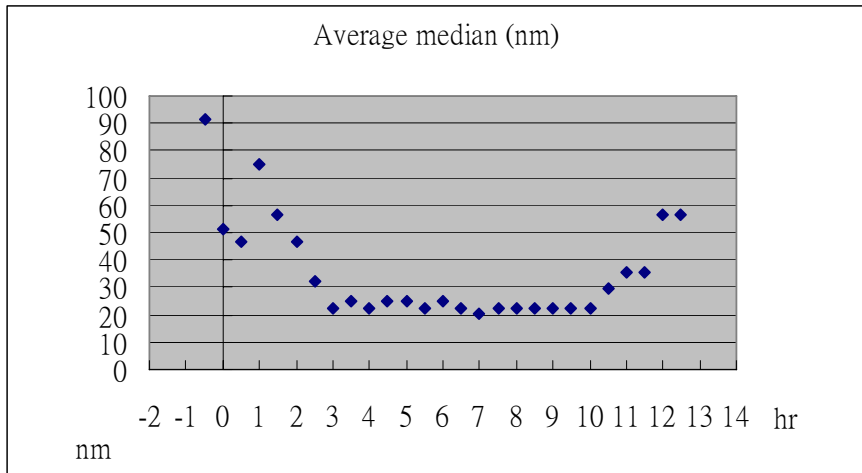


圖 11 Exposure III組粒徑時間分佈圖

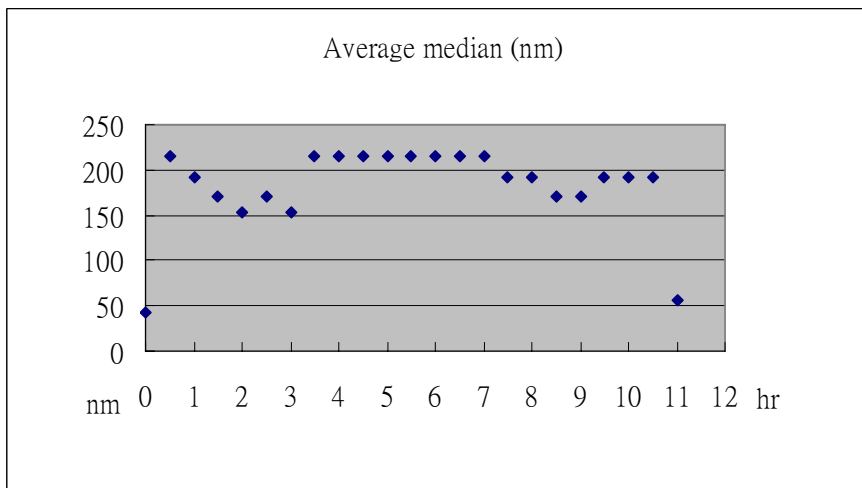
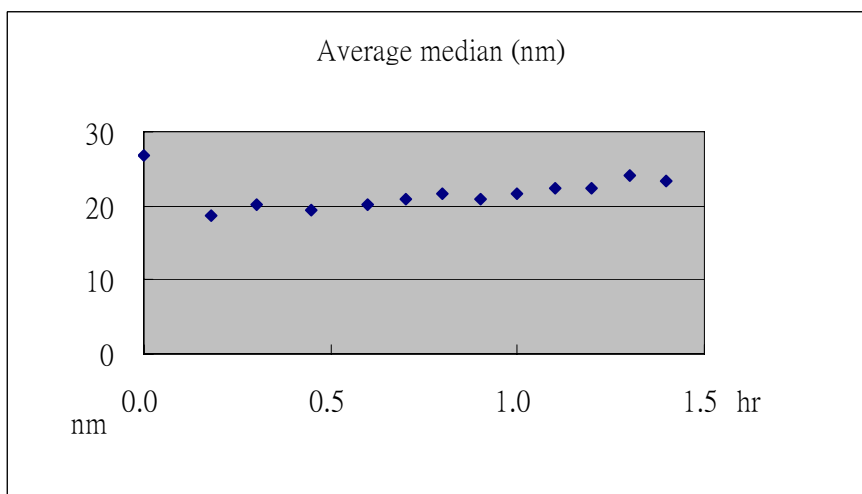
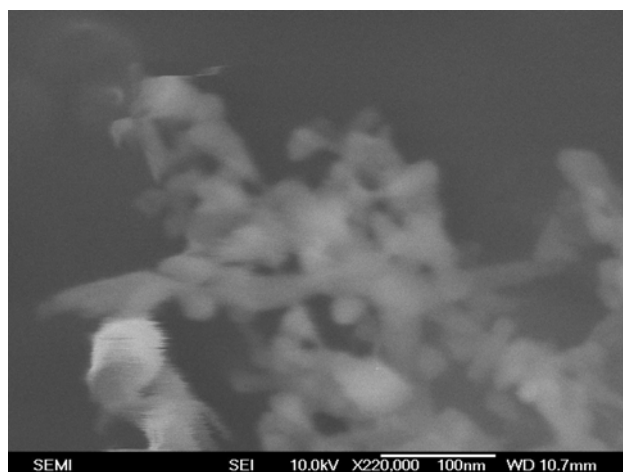


圖 12 Control組粒徑時間分佈圖



(只監測從開始暴露算起1.5小時)

圖13 以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 所拍攝之奈米氧化鋅微粒
(上圖：放大220,000倍；中圖：放大45,000倍；下圖：放大5,500倍)



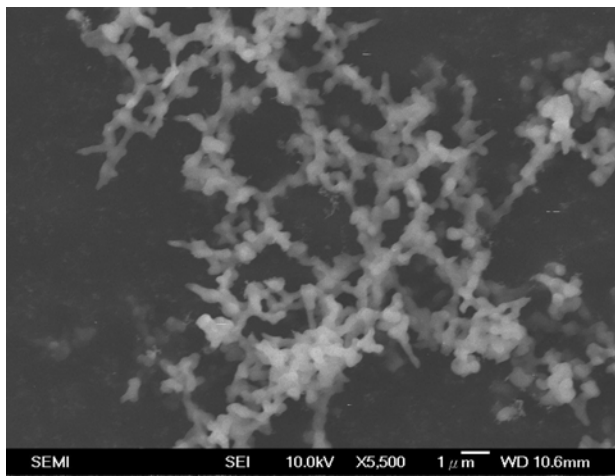
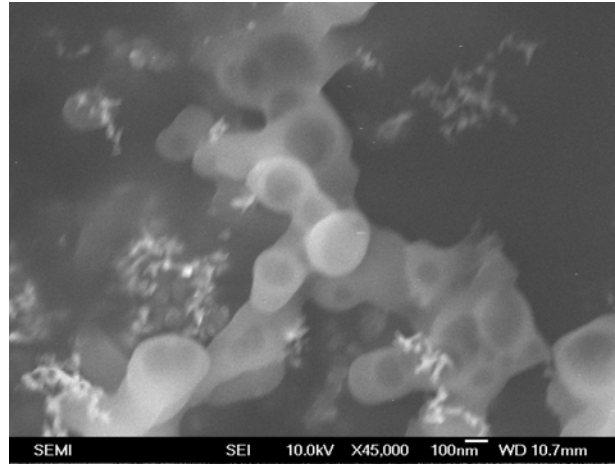
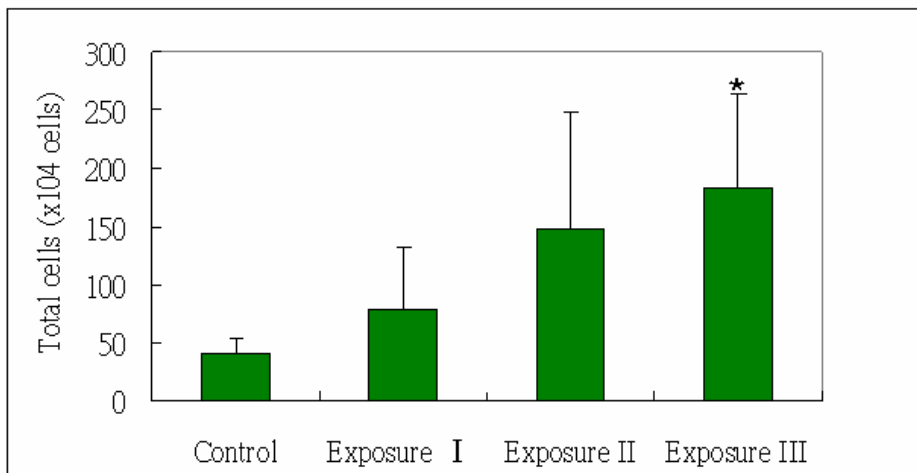
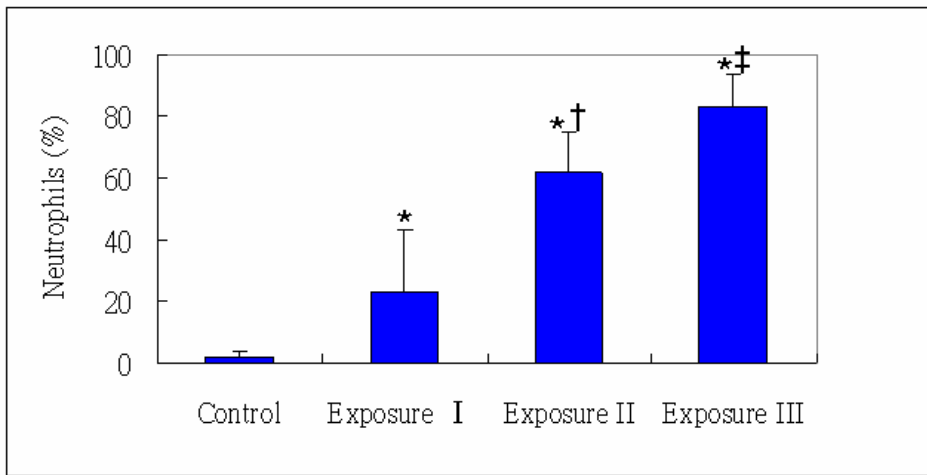


圖14 肺泡灌洗液 (Total cells) 指標分析



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

圖15 肺泡灌洗液 (Neutrophils) 指標分析

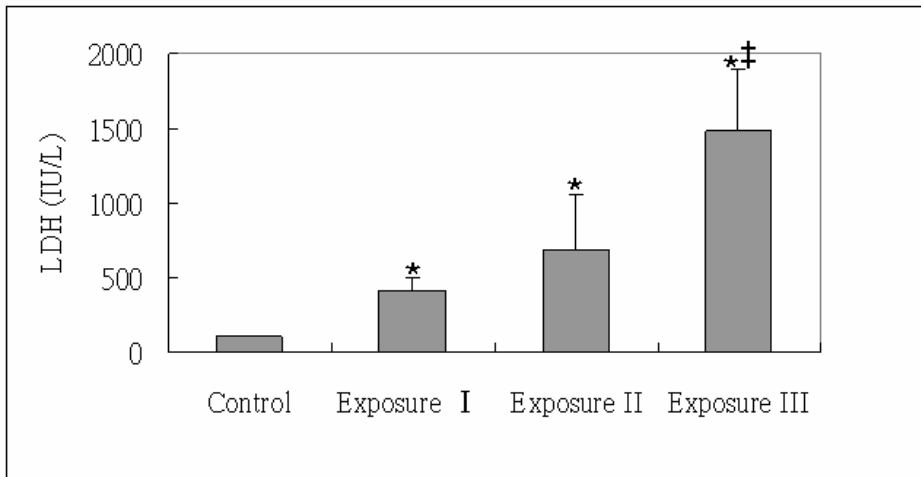


*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

‡表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure II 組，p value < 0.05

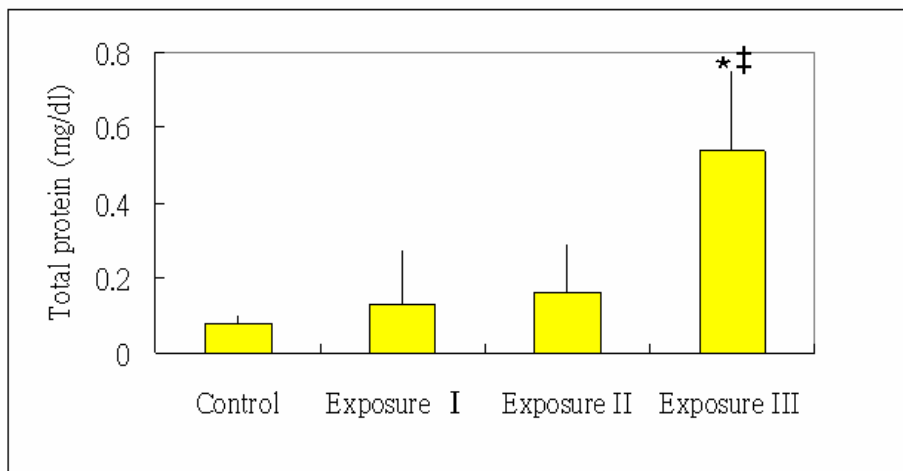
圖16 肺泡灌洗液 (LDH) 指標分析



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

‡表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure II 組，p value < 0.05

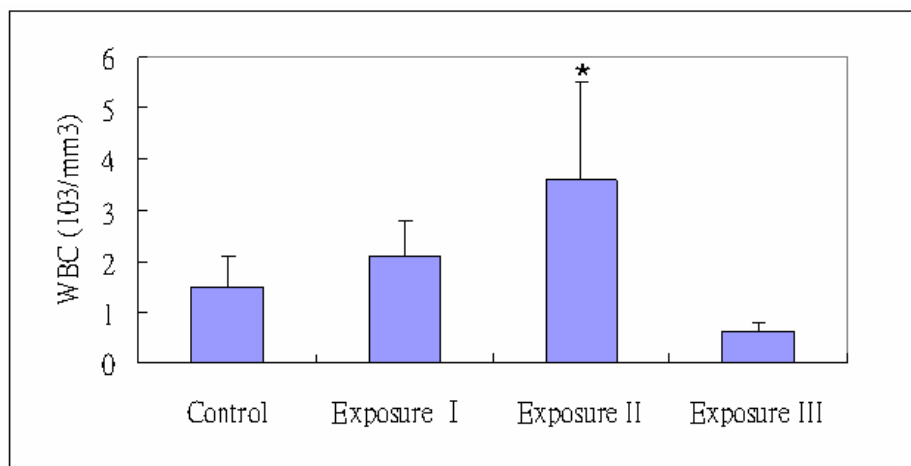
圖17 肺泡灌洗液 (Total protein) 指標分析



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

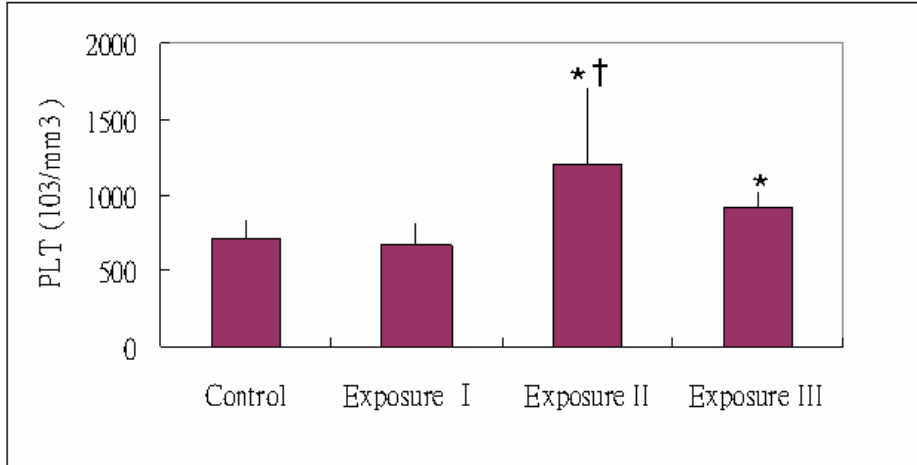
‡表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure II 組，p value < 0.05

圖18 周邊血液血球及分類計數 (WBC) 的測定



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

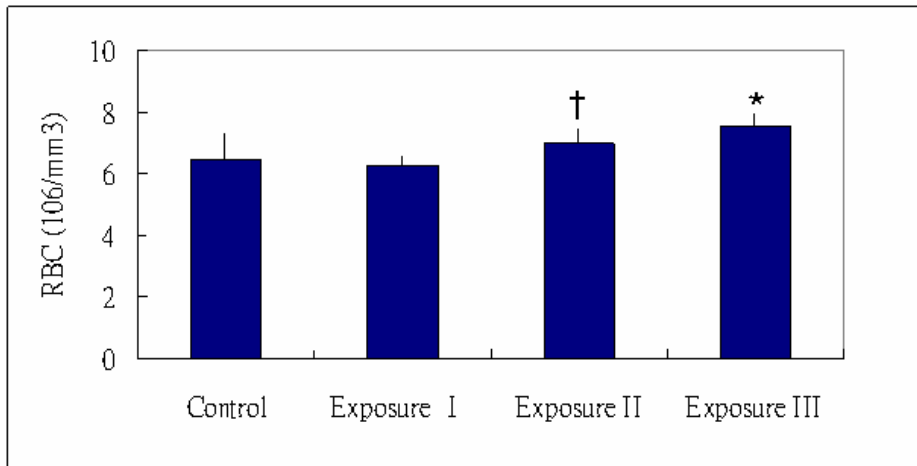
圖19 周邊血液血球及分類計數 (PLT) 的測定



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05

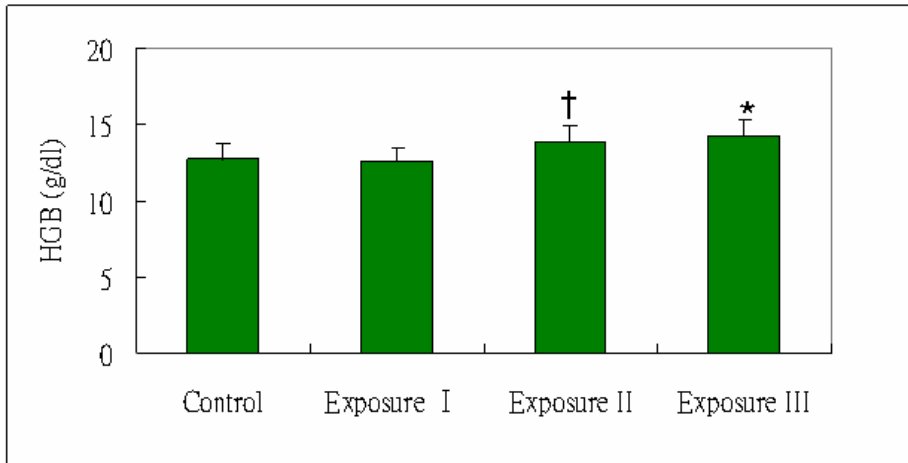
†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

圖20 周邊血液血球及分類計數 (RBC) 的測定



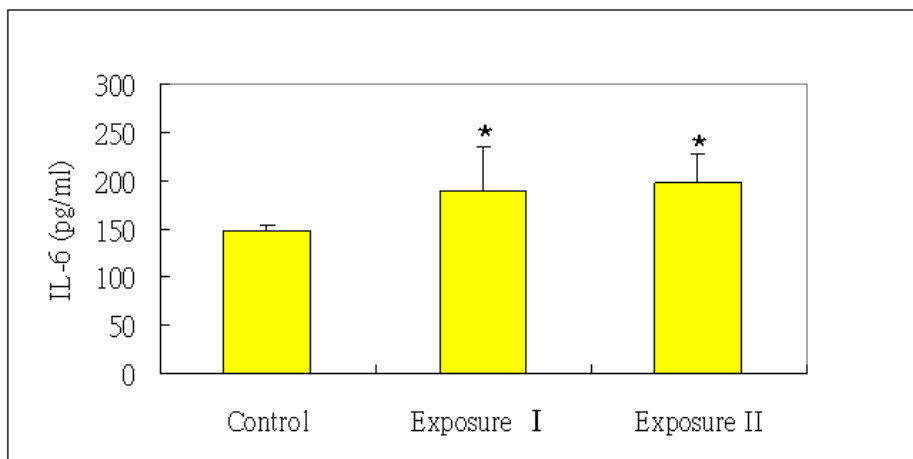
*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05
†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

圖21 周邊血液血球及分類計數 (HGB) 的測定



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Control 組，p value < 0.05
†表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於 Exposure I 組，p value < 0.05

圖22 細胞激素 (IL-6) 的測定



*表示以 Wilcoxon Rank Sum test 分析，相較於對照組，p value < 0.05

參考文獻：

Barceloux DG. Zinc. *Clinical Toxicology*. 1999;37(2):279-92.

Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, Speers DM, Stewart JC, Frampton MW., Utell MJ, Huang LS, Cox C, Zareba W, and Oberdorster G. 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.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*. 2004;77:347-57.

Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased inflammation and

- intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med.* 2000;57: 685-91.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;175:191-9.
- Borm PJ, Schins RP, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *International Journal of Cancer.* 2004;110:3-14.
- de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci* 2005;87:409-18.
- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhalation Toxicology.* 2003;15:39-52.
- Driscoll KE. Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure. *Inhal Toxicol.* 1996;8S:139-53.
- Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: Uses and limitations. *Toxicol Sci.* 2000;55:24-35.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2002;15:213-20.
- 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. *J Occup Environ Med.* 1997;39:722-6.
- Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Sparer J, Beckett WS. Characterization of clinical tolerance to inhaled zinc oxide in naive subjects and sheet metal workers. *J Occup Environ Med.* 2000;42:1085-91.
- Gao PX, Mai W, Wang ZL. Superelasticity and nanofracture mechanics of ZnO nanohelices. *Nano Letters.* 2006;6(11):2536-43.
- Gordon T, Chen LC, Fine JM, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA, Amdur MO. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1992;53(8):503-9.

- Grassian VH, O'shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect.* 2007;115(3):397-402.
- Hurt RH, Monthieux M, Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon.* 2006;44:1028-33.
- Kreyling WG, Semmler M, Moller W. Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2004;17:140-52.
- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environ Res.* 1997;75:7-11.
- Kuschner WG, Wong H, D'Alessandro A, Quinlan P, Blanc PD. Human pulmonary responses to experimental inhalation of high concentration fine and ultrafine magnesium oxide particles. *Environ Health Perspect.* 1997;105(11):1234-7.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* 2004;77:126-34.
- Lei YC, Chen MC, Chan CC, Wang PY, Lee CT, Cheng TJ. Effects of concentrated ambient particles on airway responsiveness and pulmonary inflammation in pulmonary hypertensive rats. *Inhal Toxicol.* 2004;16(11-12):785-92.
- Li JG, Li WX, Xu JY, Cai XQ, Liu RL, Li YJ, Zhao QF, Li QN. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ Toxicol.* 2007;22(4):415-21.
- Malandrino G, Blandino M, Perdicaro LMS, Fragalà IL, Rossi P, Dapporto P. A novel diamine adduct of zinc bis(2-thenoyl-trifluoroacetate) as a promising precursor for MOCVD of zinc oxide films. *Inorg. Chem.* 2005;44(26):9684-9.
- Maynard AD. Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing?. *Ann. Occup. Hyg.* 2007;51(1):1-12.
- Muller J, Huaux F, Lison D. Respiratory toxicity of carbon nanotubes: How worried should we be?. *Carbon.* 2006;44:1048-56.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006;311: 622-7.
- Nemmar A, Hamoir J, Nemery B, Gustin P. Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model. *Toxicology.* 2005;208:105-13.

- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002;105:411-4.
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113:823-39.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004;16:437-45.
- Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001;74:1-8.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1376-83.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;189:84-95.
- Roitt, Brodyoff, Male. *Immunology*. Wolters Kluwer Company. 1996.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci*. 2006;92(1):174-85.
- Seaton A, Donaldson K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *Lancet* 2005;365:923-4.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289:L698-708.
- Strohl KP, Thomas AJ, St Jean P, Schlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol*. 1997;82(1):317-23.
- Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: Toxicity is not dependent upon particle

- size and surface area. *Toxicol Sci.* 2006;91:227-36.
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci.* 2005;88:514-24.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci.* 2004;77:117-25.
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany. Part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst.* 2000;98:5-86.
- Wittmaack K. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what?. *Environ Health Perspect.* 2007;115(2):187-94.
- 鄭尊仁、林宜平、雷侑蓁：奈米科技的健康風險評估，台灣衛誌，2006；25(3):169-76。
- 馬遠榮：奈米科技，商周出版，2002。
- 簡弘民、陳姿名、徐玉杜：奈米微粒產生、監測及控制技術，工業技術研究院/環境與安全衛生技術發展中心，2004。

研究成果自評

本研究已初步完成微粒產生及暴露系統，這個技術平台可用於後續奈米整合計畫，及提供國內相關領域學者研究之用。我們也完成不同粒徑之氧化鋅微粒毒性研究，發現奈米氧化鋅微粒毒性效應值得進一步關注，綜合研究成果，已達成預定目標。

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	NSC 95-2621-Z-002-011
計畫名稱	總計畫：奈米微粒健康風險評估與管理研究：以奈米氧化鋅為例(I)
出國人員姓名 服務機關及職稱	鄭尊仁，台大職衛所教授
會議時間地點	巴黎，2006年9月
會議名稱	國際流行病學年會
發表論文題目	CYP2E1 and XRCC1 Genetic Polymorphisms and the Risk of Liver Fibrosis in Workers Exposed to Vinyl Chloride Monomer

一、參加會議經過

本次 ISEE 研討會於九月二日到六日在法國巴黎舉行，ISEE (International Society of Environmental Epidemiology)與 ISEA (International Society of Exposure Assessment)共同舉行年會，共有超過 60 國家，超過一千人與會，台灣也有許多學校組團參加。本次會議之各場討論會組成，申請者非常踴躍，只有少數人能得到主持討論會的機會。可惜這一次研討會，台灣的參加者沒有得到組成討論會及會議主持之機會。所以將來還需努力爭取參與的機會

二、與會心得

本次主題包括空氣污染，重金屬，戴奧辛，電磁波各種危害物之暴露測量與健康效應，環境相關生殖危害及小孩之健康效應，天氣與溫度變化健康效應，職業衛生，還有社會與政策討論。我的研究主題是空氣污染相關議題，所以本報告將以空氣污染相關研究為主。

空氣污染的健康議題，包括急性及慢性效應，過去研究顯示不同的研究與不同的城市，空氣污染效應的健康效應不一致，為了進一步釐清這個問題，許多大型整合計畫同時進行時間系列研究，探討多個城市及國家，有關空氣污染短期健康效應，這些國際合作大型計畫，包括歐盟(APHE)及美國加拿大(APHNA)，及結合歐洲與北美的 APHENA(Air Pollution and Health: A combined European and North American Approach)等，會議中也有亞洲的 PAPA (Public Health and Air Pollution in Asia)及南美洲的多城市的整合計畫。PAPA 包括中國，曼谷及印度等國的城市。這些整合計畫多先作單一城市健康效應研究，再作多城市的比較。研究結果顯示，一般來說，各城市之健康效應有相當一致性，不過在有些城市，某些成分比較有相關，同時是有些城市的健康效應較明顯，顯然這些城市差異與與各城市之空氣污染成分不一樣，或是與不同種族體質及生活習慣有關。空氣污染健康研究，大部分的研究使用監測站所收集的資料，這些暴露濃度與個人實際暴露狀況，可能有差距。因為個人暴露的測定費時也不經濟，目前有許多的模式考量污染物在時間與空間之差別來推估個別暴露，不過這部份還有許多空間來努力。除了污染物濃度的界定，有關干擾因子的控制，特別是生活習慣，飲食及所謂社經地位等，這些干擾因子之影響多有待進一步研究。

空氣污染除了多重城市短期研究，還有長期健康效應研究，例如大家熟悉的哈佛六城市研究，及美國癌症學會空氣污染研究等，除了這些研究，最近也有許多大型研究，例如法國

PAARC, 加州 LA 及 AHSMOG 研究, 霍普金司大學的美國 MEDICARE 研究, 哈佛的 NURSES HEALTH STUDY, 荷蘭的 NLCS-AIR STUDY, 美國 MULTI ETHNIC STUDY OF ATHEROSCLEROSIS 相關研究, 探討的相關的疾病包括死亡, 呼吸道及心血管疾病以及動脈粥狀硬化, 這部份的研究大都在進行中, 還需要一段時間才能回答問題。有些研究計畫, 例如荷蘭的計畫, 就結合流行病學與毒理學研究, 嘗試對一些干擾因子加以控制, 釐清污染源與成分之因果關係與機制。這些研究成果與短期研究對法規標準得制訂一樣重要。

有關污染源, 特別是交通污染源的研究是近來熱門研究議題, 但是交通污染的健康研究, 如何對不同成分及污染源的健康效應探討, 同時對所謂空間與時間之變動, 甚至交互作用, 都是尚待回答的議題。J SCHWARTZ 作了一個很好的結論, 他認為交通污染源會產生健康效應, 但是到底是什麼因素? 他也不確定, 但是他同意有必要對交通污染源進行瞭解及對成分的暴露評估及社經因子之影響, 作進一步的研究。

有關基因與環境暴露對健康之交互影響, 也是未來探討的議題, 之前的分子流行病學, 已經開始探討有限的, 少數的基因多型性, 特別是與代謝及 DNA 修補有關的基因對環境暴露的影響。但是在基因體時代, 如何測試許多基因與暴露的關係, 有待統計學者與環境相關領域專家努力。

有關空氣污染的研究很多, 但是流行病學研究對於解決問題, 好像有其限制, 研究規模越作越大, 經費花費也相對增加, 但是除了早期的相關研究, 回答了初步相關問題, 也影響法規, 修正暴露標準。近年來, 有關成分與來源對健康之影響, 相對能回答的問題有限。流行病學如何在方法上有突破, 是流行病學與統計學專家必須嚴肅思考的問題。除了流行病學, 應該嘗試結合其它領域, 特別是暴露評估及分子生物方法, 才能以有效的資源, 得到最大的解答, 並對政策的制訂有幫忙。

另外, 比較有趣的是, 經由研討會與許多國際學者有交流機會。日本國立職業與健康組織的 NORI 教授, 近年開始進行氯乙烯研究, 大概有 5 千人的世代, 本研究室也有氯乙烯暴露世代約 4 千人, 過去本研究室完成許多氯乙烯臨床, 流行病學與分子流行病學研究, 台日雙方同意一年內互訪, 並交換資料共同進行研究。另外, 本人與本所詹長權教授與郭育良教授也與瑞士 BASAL 大學劉麗貞教授合作進行國際合作, 探討空氣污染對學童的健康影響。