

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

短期臭氧暴露對呼出氣體成分之變化與影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 95-2314-B-002-273-

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環境衛生研究所

計畫主持人：馬一中

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：陳孟筠

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 96 年 10 月 28 日

短期臭氧暴露對呼出氣體成分之變化與影響

報告內容

前言

臭氧是一種由氮氧化物、反應性碳氫化合物及日光照射後產生之二次污染物。具強氧化力，對呼吸系統具刺激性，能引起咳嗽、氣喘、頭痛、疲倦及肺部之傷害，即使暴露於低濃度臭氧仍可能造成各項健康危害，例如加重氣喘病情、減少肺容量、增加肺炎和支氣管炎等疾病發生率。

人類的呼出氣體中含有數百種的揮發性有機物(Volatile organic compounds, VOCs)，包括碳氫化合物、醇類、酮類和醛類等，其組成成分與吸入的空氣有著顯著的不同。呼出氣體中的 VOCs 其可能的來源為：體內代謝作用的產物、吸入的空氣、特殊暴露等。由於部份代謝作用後的產物會藉由血液運送至肺部，透過氣體交換進入肺泡出現在呼出氣體之中，因此透過測量呼出氣體可以反映出身體狀況的相關資訊。特殊暴露的情況(如：抽菸、飲酒)會影響呼出氣體的成分組成，所以可由量測呼出氣體獲得相關的暴露情形。

研究目的

本研究主要目的為分別比較抽菸與非抽菸之健康受試者暴露臭氧前後呼出氣體中揮發性有機物的差異，觀察抽菸與非抽菸者對暴露臭氧反應之不同，並利用呼氣中戊烷(Pentane)作為氧化壓力指標探討暴露臭氧前後體內之氧化壓力變化情形。

文獻探討

臭氧為一強氧化劑，會和身體各部組織起反應，尤其是肺部，肺部上皮細胞表面覆有一層薄的肺部上皮內襯液(lung epithelial lining fluid; ELF)，ELF 中包含肺泡界面活性劑及生化分子。上呼吸道的 ELF 較厚，且比起肺部含有較高量的

抗氧化劑，因此下呼吸道部分較容易受到氧化傷害。ROS 和 ELF 表面的介面活性劑、抗氧化劑或生化分子反應導致細胞表面氧化，可能傷害肺的功能及影響呼吸、促進發炎反應和水腫，造成呼吸道疾病如氣喘、肺氣腫、成人呼吸窘迫症候群、囊包性纖維症的發生，若肺泡介面活性劑被破壞，則會造成肺泡空間的縮小或崩塌，引起呼吸系統疾病。

孩童較成人有更多的時間待在戶外、運動量較大，且發育中的肺較為易感，所以比成人更容易受到臭氧的影響。健康者暴露到臭氧後，其肺泡灌洗液中(BALF)的細胞、生化發炎指標有增加的現象；暴露臭氧後會使呼吸道中的嗜中性白血球(PMNS)有聚集和活化的現象，此現象會使呼吸道產生過多的反應性活氧物種(ROS)和過氧化氫(H₂O₂)。ROS 的產生和呼吸道細胞表面的脂質過氧化現象有關，隨後造成 arachidonic acid 的裂解，產生許多小分子，包括 malondialdehyde(MDA) (Pryor and Church, 1991)、8-isoprostane (Long et al., 2001)、PMN chemotactic mediator leukotriene B-4 (LTB₄) (McBride et al., 1994)。肺泡灌洗液和唾液的檢測有助於了解上述指標在肺部暴露於臭氧後產生的生化反應過程，但由於此檢測方法具有侵入性，且其檢測本身過程就可能造成呼吸道不適及發炎的狀況，不適宜用在一般例行的檢測中。

文獻指出以早上九點到晚上五點在戶外送信的郵差作為研究臭氧對人體肺功能影響的對象(11/14 ~12/31, 2001.)，結果發現臭氧八小時平均濃度升高的日子，當天、隔天、隔兩天郵差的尖峰吐氣流量都會變小，顯示肺功能受到影響，實驗期間的臭氧小時濃度僅 6~96ppb，並未超過環保署目前空氣品質標準 120ppb。德國曾有研究，運動員在戶外時，只要臭氧小時濃度達 80ppb，就會產生負面影響；荷蘭的研究則指出在 60ppb 就會有影響。另外有實驗針對參加夏令營的孩童，因為這些孩童會長時間在戶外從事各種運動，受到空氣污染的影響也較大，共收及六個夏令營孩童的樣本，發現臭氧暴露造成孩童的第一秒分時肺活量(FEV₁)及尖峰吐氣流量(PEF)有顯著的下降。

目前針對臭氧的研究依 G.lhorst e.t 2003 將暴露時間大致區分為：

(1)short-term exposure : 1h~several days (2)medium-term exposure : several months (3)longterm-term : years。短期暴露實驗方法多為調配所需臭氧濃度(一般高於環境濃度)，利用暴露腔或面罩進行暴露；中、長期暴露是利用一般環境當中的臭氧濃度(20~50ppb)，經過長時間暴露後觀察各項指標是否有顯著差異。

U.S EPA 為了制定臭氧八小時平均濃度的標準，發展了一套臭氧暴露的標準方法，研究者將臭氧濃度控制在 120ppb，利用 Chamber 暴露的方式使受試者暴露 6.6 個小時，搭配每小時 50 分鐘的運動，使其換氣速率達到每分鐘 40L，進而計算實際吸入的臭氧量，另外也紀錄了體表面積的換氣速率使之達到 20L/min/m² 以確保每位受試者的實際臭氧暴露量是相近的。相同的實驗方法後來被實施在較低濃度的臭氧暴露(80ppb)。

由於建立臭氧暴露 Chamber 花費較高且維持困難，後來又發展出利用 Silicon rubber 材質的面罩(用 Teflon 覆蓋內層表面)，此系統一開始被用來實驗暴露 4 小時，為測試受試者是否能忍受此種呼吸狀態，結果顯示為良好，受試者並指出在此系統下可呼吸達 6.6 小時。在這四小時的實驗中，每小時末受試者會移開面罩進行尖峰吐氣流量的測試，此時臭氧的閥為關閉的，避免臭氧外洩的周圍空氣中。待測試結束後受試者再重新戴上面罩繼續暴露，每次測試時間大約 3 分鐘，暴露的臭氧濃度為 120ppb，其餘條件皆和之前所述的暴露架構相同。結果發現，平均 FEV₁ 為 -13.6%，和之前研究的結果相符合(-13%~-15%)。在比較不同的實驗結果時，即使將暴露濃度、時間、實際臭氧暴露量、換氣速率...等因素都控制在相同的範圍內，在個人暴露臭氧後肺功能的反應還是有很大的變異，且這些變異具有重複性，作者將此變異歸咎於個人對臭氧的感受性不同，但其反應機制相關研究目前還是非常少。

Horstman et al.(1990)利用前述 6.6 小時暴露腔暴露的架構進行實驗發現，暴露於臭氧 120ppb 3 小時後，FEV₁ 會有顯著下降；100ppb 4.6 小時、80ppb 5.6 小時後也有相同結果，顯示出臭氧濃度和暴露時間之間的相關性。McDonnell et al. (1991)也發現在暴露臭氧濃度 80ppb 後肺功能和反應有顯著的差異。William

C. Adams (2002)利用面罩暴露於相同的 6.6 小時研究架構下，進行低濃度 (60ppb)的臭氧暴露實驗，其肺功能測試和反應症狀皆和暴露於 Filter air 無明顯差異，但其 FEV₁和症狀反應總分在暴露於 60ppb 4 小時後在數字上各自高於暴露於 Filter air，但值得注意的是此研究中的 6/30 位受試者其 FEV₁ 下降幅度 >10%。

其後有學者質疑利用面罩暴露是否會因為改變原本的呼吸方式造成結果的不同。為解決此問題，實驗者利用相同的受試者各自進行五種實驗：(1)重複之前文獻探討中的 6.6 小時 Chamber 暴露於 0.12ppm 臭氧 (2)相同的 6.6 小時 Chamber 暴露於 Filter air (3) 6.6 小時暴露架構但暴露方式改為面罩暴露 0.12ppm (4)6.6 小時面罩暴露於臭氧 0.08ppm (5)6.6 小時面罩暴露於臭氧 0.04ppm。此實驗結果指出，利用 Chamber 和面罩暴露的結果類似，且暴露濃度越高，FEV₁，隨時間下降的趨勢就越大。

研究方法

本實驗採用縱向研究設計，以降低個體差異造成之影響，並假設受試者之呼出氣體在正常狀況下成份及含量為穩定狀態，控制受試者在實驗期間無其他特殊暴露(不包含抽菸，唯暴露前及暴露後隔天兩次採樣前皆要求前晚午夜 12:00 開始禁菸)，其餘皆與受試者日常作息無異。

收集 29 位 20~30 歲健康無呼吸道疾病歷史、過敏、氣喘、二個星期內無呼吸道發炎狀況的受試者，利用口罩暴露使之口鼻暴露於臭氧 100ppb±10 環境中兩小時，暴露時間固定於上午九時至十二時之間，再分別利用採樣袋採集受試者暴露前、暴露後五分鐘、暴露後三十分鐘、及暴露後隔天呼出氣體、週邊空氣、空白樣本也一併收集。以內部填充 Tenax-TA、Carbopack B、Carbosive S III 的複合式採樣管採集採樣帶內氣體中的 VOCs。分析方面則是採用熱脫附法配合氣相層析質譜儀進行樣品分析及訊號偵測，最後以統計分析暴露後各時間點和暴露前呼出氣體成分組成份及濃度是否有顯著差異。

結果與討論

由本方法分析扣除再現性不佳後可得的化合物有 51 種，包括烷類、烯類、醇類、酮類、酯類、呋喃類、芳香族化合物、硫化物、含氯化合物、以及其他類之有機化合物。以 SPSS 11.0 軟體對抽菸者及非抽菸者分別進行 Wilcoxon signed rank test，比較暴露後各時間點和暴露前的肺泡含量梯度(AG)是否有顯著差異($p < 0.05$)。

暴露後短時間內含硫物質如 thiobismethane、3-(methylthio)-1-propene、1-(methylthio)-1-propene(Z)、dimethyl-disulfide 於非抽菸組與暴露前有顯著差異；抽菸組則無，暴露後隔天與暴露前相比兩組皆無顯著差異。此結果顯示暴露臭氧後短時間內造成非抽菸者呼氣中含硫物質含量上升。呼出氣體中的含硫化物主要來自 methionine 的代謝不完全(Miekisch, Schubert et al. 2004)。Methionine 為含硫的胺基酸，負責清除體內多餘的自由基，本實驗推測在非抽菸者呼氣中觀察到之硫化物濃度上升現象原因為自由基和 methionine 反應產生之物質。臭氧本身並非自由基，但在體內和生物分子交互作用後會產生 ROS，具活性的 ROS 容易破壞蛋白質的結構，尤其是會與蛋白質上的-SH 官能基結合，當此反應發生後可能造成蛋白質的分解，改變了蛋白質原有的功能。過去研究指出在接受肺部移植手術後的病人，其有急性排斥反應之患者呼氣中 Carbonyl sulfide (COS)含量顯著高於沒有排斥反應的病患，暴露臭氧是否對非抽菸者肺部造成類似的排斥效應有待更進一步的研究。

呼出氣體中的直鏈及支鏈碳氫化合物(扣除抽菸與非抽菸組有顯著差異的物質)有 2,4-dimethylheptane、4-methyloctane 等，此類物質暴露後短時間內兩組皆有下降的趨勢，暴露後隔天抽菸者呼氣中上述兩物質與暴露前含量相比皆達顯著差異，顯示抽菸者呼氣中此類物質於暴露後隔天仍受前一天臭氧暴露所影響。推測臭氧暴露降低或抑制肺部細胞的代謝速率，且抽菸者的回復能力較非抽菸者差。

本實驗所偵測到之不飽和脂肪酸包含 2-pinene、2-.beta.-pinene、limonene，其不論抽菸與否在暴露後短時間內含量皆下降達統計水準，原因可能為臭氧會和烯烴類反應產生自由基，使得呼氣中的上述物質減少，此類物質是否有潛力成為臭氧暴露之生物指標仍須再確認。

比較抽菸者(13 位)與非抽菸者(16 位)暴露前之呼出氣體，利用 SPSS11.0 軟體進行 Mann-Whitney U test 發現在 2-methyl-2-butene、cyclopentene、2-hexene、3-methyl-2-pentene、2-methylfuran、cyclohexene、2-methyl-2-hexene、2,5-dimethylhexane、2-ethylfuran、2-ethyl-5-methylfuran、camphene 之濃度抽菸者皆顯著高於非抽菸者，此類物質在非抽菸者呼氣中只有極少的含量。本實驗所測得之呋喃類皆屬於和抽菸相關之化合物，僅出現在抽菸者呼出氣體中；硫化物在兩組間的比較並無差異，顯示呼出氣體中所含的硫化物並非和抽菸相關的化合物。除了 2-methyl-2-butene 和 cyclohexene 無法從本實驗結果得知是否為內生性化合物，其餘根據 AG 正負值判斷皆屬於體內呼出之氣體，雖然抽菸者前一晚禁菸停止暴露，但此類物質可能因為代謝較慢仍存在於體內而於隔天仍顯現於呼出氣體中。呋喃類與烯類在臭氧暴露後的降低顯示臭氧之暴露可導致吸菸者肺部內之化學反應，其反應產物為何以及產物之毒性如何值得探討。

以上所提之物質除了 2-methyl-2-butene 和 2,5-dimethylhexane 外，其餘皆在抽菸者暴露後 5、30 分鐘內顯著下降，非抽菸者則無。在本實驗 13 位抽菸的受試者中，有一位年齡最長(27 歲)、菸齡最長(10 年)，其呼出氣體中的上述可能為抽菸指標物質在呼氣中的含量最多，且暴露後下降的幅度最大。推測可能暴露臭氧 100ppb 兩小時後對抽菸者肺部造成傷害，降低體內排除此類物質之速度，換句話說暴露臭氧提高了抽菸者肺部對此類化合物的吸收使呼氣中的含量減少導致 AG 顯著下降。

實驗結果顯示抽菸者暴露 100ppb 的臭氧兩小時後隔天呼氣中的 pentane 量會增加，實驗過程採靜態(坐姿)暴露，若在環境中此濃度下進行戶外運動會增加

臭氧的吸收量極可能造成肺部的傷害。目前我國環保署對臭氧濃度之標準為 120ppb、國外為 80ppb 仍有改進的空間。

在直鏈及支鏈的碳氫化合物中，不論抽菸與非抽菸其濃度皆在暴露後短時間內有下降的趨勢，暴露後隔天非抽菸者呼氣中的濃度已接近原來的水平，但抽菸者呼氣中的此類物質仍較暴露前來的低，達到邊緣性統計水準，推測抽菸者受到臭氧暴露後回復能力較非抽菸者來的差。在含硫物質方面，非抽菸者臭氧暴露導致呼氣內的硫化物含量增加可能因為細胞膜上的蛋白質被自由基壞，細胞膜流動性及通透性可能會改變，導致胞器腫脹、細胞膜破裂，並可能造成肺部永久性傷害。而抽菸者在暴露後短時間內上升趨勢較緩慢，可能為抽菸者肺部抗氧化酵素含量較非抽菸者多，能暫時抵禦臭氧產生的自由基的攻擊。呼氣中硫化物含量或有潛力成為短期臭氧暴露造成肺部氧化性傷害之生物指標。造成抽菸者與不抽菸者間觀察到的差異的因素，有必要做進一步探討。

過去評估臭氧對肺部造成損傷多使用肺泡灌洗液、唾液的檢測及肺功能測試。本研究嘗試偵測呼出氣體凝結液中反應性含氧物種，顯然遠不如分析呼出氣體揮發有機物靈敏，在所有受試者中皆觀察不到統計差異，此結果顯示分析呼出氣體對臭氧暴露的評估有較高的敏感性，具有相當的潛力成為日後臨床上評估氧化壓力或特殊暴露之非侵入性指標。

本實驗主要為利用呼氣體分析探討短期暴露臭氧對肺部造成之氧化壓力傷害，實驗結果符合之前假設：暴露臭氧會造成呼氣中的氧化壓力指標 pentane 含量的增加，因收集個案數較少(抽菸者 13 人非抽菸者 16 人)唯抽菸者在暴露後隔天與暴露前 pentane 含量達到邊緣性相關，在往後的實驗可增加樣本個數並加強實驗地點的通風設備降低樣本被污染的情況，或許更能確認暴露臭氧與肺部氧化壓力上升之相關性。且在研究中發現非抽菸者暴露臭氧後短時間內雖然較易受到影響，但停止暴露後呼氣中的氧化壓力指標物濃度會回復到原本的水平，而暴露臭氧對抽菸者的影響持續時間比較久，往後實驗可延長追蹤時間確認臭氧暴露對抽菸者的影響。

參考文獻

Pryor WA, Church DF: **Aldehydes, Hydrogen-Peroxide, and Organic Radicals as Mediators of Ozone Toxicity.** *free radical biology and medicine* 1991, **11**:41-46.

Long NC, Suh J, Morrow JD, Schiestl RH, Murthy GGK, Brain JD, Frei B: **Ozone causes lipid peroxidation but little antioxidant depletion in exercising and nonexercising hamsters.** *journal of applied physiology* 2001, **91**:1694-1700.

Mcbride DE, Koenig JQ, Luchtel DL, Williams PV, Henderson WR: **Inflammatory Effects of Ozone in the Upper Airways of Subjects with Asthma.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **149**:1192-1197.

Horstman DH, Folinsbee LJ, Ives PJ, Abdulsalaam S, Mcdonnell WF: **Ozone Concentration and Pulmonary Response Relationships for 6.6-Hour Exposures with 5 Hours of Moderate Exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 Ppm.** *American review of respiratory disease* 1990, **142**:1158-1163.

Mcdonnell WF, Kehrl HR, Abdulsalaam S, Ives PJ, Folinsbee LJ, Devlin RB, Oneil JJ, Horstman DH: **Respiratory Response of Humans Exposed to Low-Levels of Ozone for 6.6 Hours.** *archives of environmental health* 1991, **46**:145-150.

Adams WC: **Comparison of chamber and face-mask 6.6-hour exposures to ozone on pulmonary function and symptoms responses.** *inhalation toxicology* 2002, **14**:745-764.

Schubert JK, Miekisch W, Geiger K, Noldge-Schomburg GFE: **Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations.** *expert review of molecular diagnostics* 2004, **4**:619-629.

計畫結果自評

本研究內容與原計畫相符，並已達成預期目標。根據本研究之結果，我們發現臭氧暴露後會造成許多呼出氣體中揮發性有機物含量之改變，且吸菸者與不吸菸者有部分之差異存在。此外，本研究也觀察到臭氧暴露後隨時間之變化。對於本研究之發現，已開始撰寫論文以發表於期刊。由於直接以自願者進行暴露實驗較難取得足夠樣本數或使用較高之暴露濃度，為了進一步瞭解與澄清本研究觀察到的現象，我們已開始著手從事細胞培養與臭氧暴露之基礎研究。