

國立台灣大學公共衛生學院環境衛生研究所

碩士論文

Graduate Institute of Environmental Health

College of Public Health

National Taiwan University

Master Thesis

奈米銀微粒對氣喘模式小鼠之呼吸毒理研究

Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles in a Murine
Model of Allergic Asthma



胡靜君

Cheng-Kuan Wu

指導教授：鄭尊仁 博士

王根樹 博士

Advisor : Tsun-Jen Cheng, MD. ScD.

Gen-Shuh Wang, PhD.

中華民國 102 年 1 月

January, 2013

致謝

兩年半的研究所時光轉眼就過去，不知不覺在台灣求學也有六年了，這裡的一切都讓我感覺窩心，無論是民眾的熱情有禮貌、種類繁多的美食、有特色的觀光景點，都是我喜歡這裡的原因，而且幾乎大部分的土地我都踏過了（其實我另一個身份是小小觀光客），真的要謝謝台灣。

當然我最主要的目的是求學，除了要感謝在公衛系四年來教過我的所有老師外，最感謝的還是在研究所這段時間以來，給予我最多建議與鼓勵的指導教授鄭尊仁老師，雖然我思慮得不夠周全，老師卻總是包容我的缺點，並且教會我如何用嚴謹及認真的態度進行研究，在過程中慢慢引導我往正確的方向思考，讓我學習到無論是研究及生活上都要認真細心的處事態度。另外我還要感謝另一位指導教授王根樹老師，除了在論文撰寫時給予指導與建議外，也感謝老師在大學時期作為導師對我的關心與鼓勵。謝謝蕭大智老師幫助實驗室建立了新的奈米產生系統，而且不辭勞苦一次次從中壢來幫忙解決問題，並快速又親切地解答了很多疑問，對我的研究幫助很大。還有謝謝林靖瑜老師、李珍珍老師在口試時給予寶貴的意見，讓我的論文得以更完整。

由於喜歡做動物實驗的關係，我進入了 TJC lab，我覺得是最正確的決定，因為實驗室的大家都會互相幫助。謝謝元鴻學長在 meeting 時給的建議，又帶我們去吃吃喝喝；黃醫師除了與我一起學習小鼠技術外，在數細胞及氣喘模式方面也為我解決了不少疑問；校奇學長雖然你很愛嗆我，可是還是要謝謝你在討論實驗設計及進行期間一起付出的努力；謝謝慧嫻學姐在微粒分析時也幫了很大的忙；還有萬能助理哲雯，除了教我動物技術外，還在我時間緊迫設計實驗時，憑自身經驗給予協助與支持；賀萌學姐花了一下午的時間與我一起思考討論的部分，真的對我幫助很大；亭亭學姐做事非常認真，是我的好榜樣；謝謝小阮學姐親自帶著我教我如何做呼吸暴露實驗，還有許多經驗傳承及大大的鼓勵；安琪學姐雖然

研究方向不同，仍然有耐心聆聽我遇到的困難並努力給我建議；最感謝的是我的好搭擋映君，一直以來不管遇到多少挫折，多緊張的狀況，我們都互相支持走過來了，謝謝你在我快崩潰時的安慰與幫忙，雖然你也很愛嗆我，可是我知道這是愛的表現，我也愛你喔；謝謝小朋友們 Karen、阿寬和佩靜，有你們的實驗室總是溫暖又有朝氣，你們的鼓勵也是我畢業的動力喔，祝你們也實驗順利。

另外在環職衛所也認識了很多很多朋友，在身邊互相打氣的日子非常快樂，特別是北醫的一群好朋友—雅婷、仰真、姮君、popo、大毛等等，感激有你們在學術的道路上一起努力，偶爾還相約煮東西和出遊放鬆心情。還要謝謝廁所、寶慧、小朵、小瑜、Emily 和鋼鋼，大家一起出國玩，互相關心對方的研究進度和傾訴煩惱，都讓我能一直保持樂觀又愉快的心情面對困難。

感謝 Alan 六年來的陪伴與支持，雖然我們的科系完全不同，可是在追求知識的路上有人陪是一件很棒的事，謝謝你與我一起分享喜怒哀樂，並經常拉我一起吃美食，創造了許多會變胖的美好回憶。最後要謝謝我的父母、姐姐和弟弟一直對我的包容與支持，即使我因為遇到挫折而心情不佳，你們在電話另一端也可以察覺到並鼓勵我，使我得以專心一意在台灣完成學業，我期許自己能成為讓你們驕傲的女兒，把最好的都給你們以回報從小對我的無私愛護。

我終於畢業了！謝謝大家一直以來的幫助，與你們的相處讓我成長為一個更棒的人，祝願大家都能平安快樂。在進入社會後，我會謹記保持一顆樂觀進取的心，迎接人生的每一個挑戰！

靜君謹致 2013.01.30

目錄

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	5
第二章 背景與重要性.....	6
2.1 奈米微粒特性與毒性.....	6
2.2 奈米銀微粒.....	7
2.2.1 微粒特性.....	7
2.2.2 流行病學研究.....	7
2.2.3 毒理研究.....	8
2.3 氣喘.....	10
2.3.1 氣喘疾病.....	10
2.3.2 氣喘疾病產生機制.....	11
2.4 奈米產生系統.....	13
2.5 肺部發炎與傷害指標.....	15
2.6 研究目的.....	16
第三章 材料與方法.....	17
3.1 研究架構及時程.....	17
3.2 氣喘模式建立.....	18
3.3 呼吸暴露.....	18
3.3.1 奈米微粒特性檢驗.....	19
3.4 呼吸道阻力測試.....	20
3.5 肺泡灌洗液.....	21
3.5.1 肺泡灌洗液中總死亡細胞數.....	22
3.5.2 肺泡灌洗液中血球分類計數.....	22
3.5.3 肺泡灌洗液中細胞因子 IL-13	23
3.5.4 肺泡灌洗液中總蛋白數.....	24
3.6 血液中的 IgE 抗體濃度.....	24
3.7 組織病理切片.....	25
3.8 統計分析.....	26
第四章 結果.....	27
4.1 微粒產生暴露系統.....	27
4.2 奈米微粒成分分析.....	27
4.3 氣喘疾病生理指標.....	28
4.4 呼吸道阻力.....	29
4.5 肺部發炎指標.....	29
4.6 組織病理切片.....	30

第五章 討論與建議.....	31
5.1 奈米微粒產生及暴露系統.....	31
5.2 氣喘疾病及肺部發炎指標.....	33
5.2.1 奈米銀微粒對健康小鼠之呼吸毒理作用.....	34
5.2.2 奈米銀微粒對氣喘小鼠之呼吸毒理作用.....	35
5.3 組織病理切片.....	36
5.4 肺泡灌洗液中總死亡細胞數及血球分類之計數.....	37
5.5 結論及建議.....	38
第六章 參考文獻.....	39



表目錄

表 1. 奈米銀微粒呼吸及食入暴露之文獻回顧.....	47
表 2. 呼吸暴露操作條件測試.....	49
表 3. 奈米銀呼吸暴露操作條件及平均暴露濃度.....	50
表 4. 暴露期間平均粒徑及濃度.....	51
表 5. 以 SMPS 及濾紙採樣奈米銀微粒質量濃度之比較	51
表 6. 奈米銀微粒使用 X 光能譜散佈分析儀 (EDS)分析之元素成分	52
表 7. 致敏期結束後，健康和氣喘模式小鼠之 IgE 濃度.....	52
表 8. 奈米銀微粒呼吸暴露後之 IgE 及 IL-13 濃度.....	52
表 9. 肺泡灌洗液中總死亡細胞數、血球分類計數中單核白血球、嗜中性白血球 比率及總蛋白濃度.....	53
表 10. 實驗小鼠呼吸暴露後之呼吸道阻力測試結果.....	54
表 11. 不同奈米微粒對過敏性氣喘小鼠之呼吸毒理研究.....	55



圖目錄

圖 1. 奈米微粒產生及全身暴露系統.....	56
圖 2. 實驗期間奈米銀微粒產生系統穩定性.....	57
圖 3. 連續一週呼吸暴露期間之微粒平均暴露濃度.....	58
圖 4. 奈米銀微粒在掃描式電子顯微鏡(SEM)下觀察結果.....	59
圖 5. 奈米銀微粒使用 X 光能譜散佈分析儀 (EDS)分析之元素成分結果	60
圖 6. 血液中免疫球蛋白 IgE 抗體濃度.....	61
圖 7. 肺泡灌洗液中細胞激素 IL-13 濃度	62
圖 8. 嗜酸性白血球在肺泡灌洗液中比率.....	62
圖 9. 呼吸道阻力 AHR 之 Penh 值相對增加比例	63
圖 10. 肺泡灌洗液中總死亡細胞數.....	64
圖 11. 嗜中性白血球在肺泡灌洗液中比率.....	64
圖 12. 單核白血球在肺泡灌洗液中比率.....	65
圖 13. 肺泡灌洗液中總蛋白濃度.....	65
圖 14. PBS 健康組小鼠肺部組織切片(倍率為 20X).....	66
圖 15. PBS 健康組小鼠肺部組織切片(倍率為 200X).....	67
圖 16. OVA 氣喘組小鼠肺部組織切片(倍率為 20X).....	68
圖 17. OVA 氣喘組小鼠肺部組織切片(倍率為 200X).....	69



摘要

由於全球各地的氣喘盛行率逐年持續上升，加上近年奈米科技產品日新月異，尤其以具有抗菌功效的奈米銀應用至為廣泛，因此大量勞工可能在生產過程中吸入空氣中的奈米銀微粒；除了關注奈米銀對一般健康勞工的呼吸毒性外，針對氣喘此易感族群的相關呼吸毒理研究也有其重要性。

本研究利用蒸氣冷凝法產生奈米銀微粒，以進行氣喘動物之呼吸暴露實驗。一開始要先建立氣喘動物模式，將 BALB/c 小鼠分為健康(PBS)和氣喘模式(OVA)兩組，再細分為奈米銀暴露組(NP)和過濾空氣控制組(FA)。因此四組分別表示為 PBS/FA (N=5)、PBS/NP (N=6)、OVA/FA (N=5)、OVA/NP (N=5)，暴露時間為 6 小時/天，連續 7 天，結束後測量各組呼吸道阻力。最後分析氣喘疾病及肺部發炎指標，以及肺部病理組織切片。

奈米銀暴露組所暴露之奈米微粒平均粒徑為 32.78nm，質量濃度為 3.34 mg/m³，經過連續 7 天的暴露後，可觀察到在健康組間，分別在肺泡灌洗液 (BALF) 的嗜酸性白血球比率、嗜中性白血球比率及總死亡細胞數三個生理指標中，PBS/NP 相比 PBS/FA 皆有上升趨勢；而在氣喘組間，則在血清的免疫球蛋白 E(IgE)(呼吸暴露後)、BALF 的介白素 13 (IL-13)和總死亡細胞數(total cell)，以及呼吸道阻力(AHR)這些生理指標中，OVA/NP 相比 OVA/FA 皆有上升趨勢。而且肺部病理組織切片的結果也顯示，無論是健康組還是氣喘組，經過奈米銀暴露後的發炎反應會較強烈。

目前針對氣喘疾病的奈米銀呼吸毒理研究非常缺乏，本研究使用由奈米微粒產生器所產生之奈米銀氣膠進行呼吸暴露，可觀察到奈米銀對健康或氣喘小鼠皆有不良健康效應之趨勢，惟此趨勢在統計上並不顯著，推估是由於此氣喘模式中致敏劑劑量過高所致，建議應下調劑量以適用於奈米呼吸暴露研究；此外，過去亦有研究顯示奈米銀微粒對氣喘小鼠反而有抑制發炎的作用，因此目前奈米銀微

粒對於氣喘模式小鼠的健康效應未有一致結論，其毒理影響及作用機轉仍有待更多相關研究。

關鍵字：奈米銀微粒、氣喘、蒸發冷凝法、呼吸暴露



Abstract

Nowadays, asthma is one of the most common airway inflammatory disease and its prevalence is high in developed and developing countries. A wide range of silver nanoparticle applications has emerged in consumer products ranging from disinfecting medical devices to water treatment. We are interested in the inhalation toxicity of silver nanoparticles in susceptible allergic asthmatic mice.

In this study, silver nanoparticles were produced in a generation system. The BALB/c mice were divided into normal group (PBS) and asthmatic group (induced by OVA injection). These two groups were further exposed for filtered air (FA) (PBS/FA (N=5) 、 OVA/FA (N=5)) and silver nanoparticles (NP) (PBS/NP (N=6) 、 OVA/NP (N=5)) 6 hours a day for one week.

The average size and concentration of NP during exposure was 32.78 nm at 3.34 mg/m³. The inflammation and asthma markers including IgE in serum, IL-13, total protein, total cells, proportion of neutrophils, macrophages and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and AHR (airway hyperresponsiveness) were determined.

The results showed that animals had adverse health effects after exposure to AgNPs (silver nanoparticles). In normal group, percentage of neutrophils, eosinophils and

total cells in BALF increased after AgNPs exposure as compared to FA control. In asthma group, IgE, IL-13, AHR and total cells also increased after AgNPs exposure as compared to FA control but it was not statistically significant. These results suggested that asthmatic model needs further modification. Additionally, some previous experiments showed that AgNPs might act as anti-inflammatory agents. Thus, further studies are needed to assess the toxicity of AgNPs in allergic asthma model.

Key words : silver nanoparticles, asthma, evaporation-condensation, inhalation exposure



第一章 前言

隨著科技發展，奈米微粒因為其特殊的光學、磁性、導電性和抗微生物等物化特性，而被廣泛應用在不同領域中，包括能源、醫療藥物、光電產業、生技工程、半導體產業和化妝品等等。由於奈米微粒的應用顯示出其優越特性，因此先進國家或產業都投入大量資源進行研究，產生出來的商品不但可以高度發揮原本效能，更能節省能源及促進環保。目前國際上的奈米產品數量眾多，如奈米衣物、奈米化妝品、奈米陶瓷等，其中以奈米氧化鋅、二氧化鈦和銀等奈米微粒的使用最多，其中奈米銀由於其高穩定性和特殊的抗菌能力，常被應用在紡織衣物、化妝品、洗衣機、醫藥噴劑、塗料等產品中，因此生產此類消費品過程中的勞工，容易從呼吸道暴露到奈米銀微粒。

另一方面，過去已有不少研究證實奈米微粒具有呼吸毒性[1-4]，這些奈米產品投入到消費者市場中，除了一般健康勞工可接觸到外，其中患有心血管或呼吸道等疾病的易感族群也無可避免地接觸到；過敏性氣喘即是其中一種呼吸道疾病，尤其在先進國家的盛行率頗高，因此有必要探討奈米銀微粒毒性對患有過敏性氣喘疾病此類易感族群的健康影響。

目前對於奈米銀的研究仍主要著重於其抗菌特性，關於奈米銀的毒性研究則以體外細胞及口服實驗較多，呼吸毒性的探討仍然不足。此外也有不少關於各種奈米微粒對過敏性氣喘易感族群的研究，惟獨針對過敏性氣喘的奈米銀微粒呼吸毒理研究仍然相當缺乏，因此有必要對於奈米銀在連續暴露情況下進入氣喘模式動物體內的毒性作進一步的研究。故本研究目標是希望利用全身性呼吸暴露方式探討奈米銀的毒性作用，以探討奈米銀微粒對過敏性氣喘易感族群之呼吸毒理作用。

第二章 背景與重要性

2.1 奈米微粒特性與毒性

目前國際上把粒徑在 1 至 100 奈米範圍的微粒定義為奈米微粒；奈米微粒由於體積小，因此其相應的表面積一體積比非常大，從而增加其表面可吸附的金屬、化學物質，並可能穿透肺泡到血液中，與血清、唾液、黏液和肺內層液體等的反應增強，導致奈米微粒比一般大粒徑微粒有更強的表面活性和反應性[5]；同時各種奈米微粒各自擁有優異的物化特性，包括對光的反射率很低，同時對光的吸收率隨粒徑減少而大大增加，可作為高效率的光熱、光電等轉換材料；比表面積增大，有高表面活性及化學反應性增加，可用作高效催化劑；隨著粒徑逐漸減小，表面原子的比例上升，熔點會下降；此外，奈米微粒在低溫時，導熱性極佳，可做為低溫導熱材料；奈米微粒也具有有良好的磁學及力學特性，可用於製作強磁性電子器材或耐磨、耐壓與高強度的奈米複合材料。由於奈米微粒具有如此優異的特性，因此被廣泛應用在磁性材料、電子材料、光學材料、高密度複合材料、催化、陶瓷及塗料等廣闊工程領域中[6-8]。

奈米微粒可通過肺部上皮細胞進入組織間質，之後再轉移到血液和淋巴並到達體內各個器官並沉積，危害健康[5, 9]。過去因為量測技術的限制，對於這種肉眼看不見的細小粒子並未給予重視。近來由於奈米科技及奈米材料的迅速發展，加上奈米銀微粒因其特有的殺菌能力被廣泛使用，消費者接觸機會大增，才逐漸引起各界廣泛的關注。

有研究發現奈米微粒(銨 Ir, 15 及 80nm)能通過血液循環分布至各個器官，包括肝臟、脾臟，甚至心臟、腎臟和免疫器官[10]。Oberdörster 等人以呼吸暴露方式進行奈米碳粉暴露大鼠 6 小時，發現奈米微粒不但會影響呼吸系統功能，還能通過嗅神經進入腦部[5]。另外，奈米微粒粒徑大小也會影響在動物體內的流佈，Ferin 等人分別使大鼠吸入 20 及 250 nm TiO₂ 奈米微粒，暴露 12 週後，

發現小微粒從肺組織中清除的速率較慢，而且小微粒更易穿越上皮細胞進入間質組織和淋巴結，說明不同粒徑的奈米微粒會造成不同程度的毒性反應[11]。將 BALB/c 小鼠暴露於濃縮超細微粒(*ultrafine particles*)大氣中，發現腦中誘導發炎細胞因子(IL-1 α)、腫瘤壞死因子(*tumor necrosis factor*, TNF- α)和細胞核轉錄因子(*nuclear factor-kappa B*, NF- κ B)都有增加的現象[12]。

2.2 奈米銀微粒

2.2.1 微粒特性

奈米微粒由於其粒徑大小，而擁有不同於一般大粒徑微粒的物化特性，其中奈米銀微粒因其特殊的抗菌能力，是最被廣泛應用的奈米材料之一，根據 Nowack 於 2011 年對奈米銀應用及管理的回顧，奈米尺寸的銀最早於 120 年前已被合成出來，以此方法製造的銀膠粒徑為 7-9nm [13]，並逐漸開始使用，而且由於奈米銀特殊的物化特性，直到今天，世界各地每年會生產 320 噸的奈米銀應用在各領域上[14]；由於近幾年來被高度應用在消費產品上，大大增加了對人以及環境的暴露，且相關暴露評估仍然不足，因此需更多相關的研究以釐清其暴露風險[15]。

目前市面上相關產品眾多，例如衣物、化妝品、洗衣機、醫藥產品及設備、表層塗料等。消費市場中，含有銀的護理產品都標榜有殺菌功能，它的機制是通過緩慢釋放出銀離子，在低濃度下可以破壞細菌的細胞膜，並與裡面酶蛋白的巯基結合在一起，通過降低活性酶的活性達到抗菌目的，目前有關奈米銀抗菌的研究已相當多[16-18]。

2.2.2 流行病學研究

奈米銀材料早於 120 年前已被合成出來並開始應用，但針對人體的相關毒理研究仍然非常缺乏，另一方面，奈米銀材料的大量應用，使得作為第一線接觸者的勞工，在生產其相關消費品的過程中，暴露到奈米銀微粒的風險非常高。雖然我們一般認為勞工都是較健康的族群，但實際上在呼吸道疾病盛行率非常高的情

況下，無法完全避免患有氣喘等疾病的易感族群，在工作時暴露到具有毒性的奈米微粒。

韓國研究團隊於 2011 年針對生產奈米銀材料的工廠勞工進行暴露水平評估，兩名工人暴露的濃度分別為 0.35 及 1.35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，經過 7 年的工作暴露，血液及尿液中的濃度皆極低，並無明顯健康效應[19]。另外以即時監測方式使用個人採樣、SMPS 及粉塵偵測器等儀器，測得奈米銀重量濃度為 0.02 至 1.18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [20]，遠低於 ACGIH(American Conference of Governmental Industrial Hygienists)訂定職業暴露的恕限值(Threshold limit values, TLV) - 0.1 mg/m^3 (total silver)，因此不易觀察其不良健康效應。另外於 2012 年的研究中發現，在澆注金屬熔爐旁的微粒濃度與基值(熔爐升溫前)相比高 1000 倍以上，即使有局部通風系統仍無法避免逸散[21]。因此對於患有呼吸道疾病並在高暴露區域工作的勞工，仍有潛在健康風險，需進行更多相關的流行病學研究。

2.2.3 毒理研究

過去已有不少奈米銀毒性相關研究，其中以體外細胞實驗具多；有研究發現粒徑少於 100nm 的奈米銀溶液，在不同濃度下，對四種老鼠和人類細胞株皆有明顯抑制存活率的作用[22]。此外，也有使用 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的奈米銀溶液暴露小鼠的精原細胞 (Spermatogonial stem cell) 24 小時，可導致線粒體功能下降及細胞凋亡[23]。Hussain 等人於 2005 年分別用 25 及 100nm 的 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 奈米銀溶液暴露於 BAL 3A 大鼠肝細胞 24 小時，發現線粒體功能顯著下降、細胞膜滲漏乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)及氧化壓力指標- 活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)上升[24]。其後於 2008 年又分別用 15、30 及 55nm 奈米銀溶液暴露大鼠肺泡巨噬細胞 24 小時，發現隨著暴露濃度上升(10-75 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，形成氧化壓力，細胞膜活力明顯下降，而且在暴露 15nm 奈米銀溶液後，觀察到發炎反應介質的釋出，包括腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α)及巨噬細胞抑制蛋白(macrophage inhibitory protein, MIP-2)等，說明發炎反應與氧化壓力的

形成有高度相關[25]。Arora 等人於 2009 年亦有進行類似的研究，他們選擇用 10-200 $\mu\text{g/ml}$ 且粒徑在 7-20nm 的奈米銀溶液，暴露小鼠的纖維母細胞及肝細胞 24 小時，同樣導致氧化壓力形成、細胞活性下降及凋亡[26]；而且證實奈米銀是通過調控線粒體產生氧化壓力的途徑，誘導細胞凋亡[27]。除了動物細胞外，也有直接使用人類細胞測試奈米銀毒性的研究，例如 Park 等人於 2010 年使用了 5-10nm (濃度 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$)的奈米銀溶液對人類肝癌細胞株-HepG2 細胞進行 28 小時暴露，也會造成氧化壓力的產生及細胞凋亡[28]，因此奈米微粒可望應用於癌症治療技術。從上述研究可知奈米銀微粒無論是對動物還是人類細胞，皆有明顯細胞毒性(cytotoxicity)。

細胞實驗優點為方便快捷且成本低，但是其暴露情況與實際奈米微粒進入人體內接觸細胞不同，其毒性影響難以推論，因此仍需要進一步的口服及呼吸暴露毒性測試。Kim 等人於 2008 年分別用不同濃度(30、300 及 1000 mg/kg) 60nm 粒徑奈米銀，以口服方式暴露 SD 大鼠 28 天，發現暴露於奈米銀濃度 300 mg/kg 以上會造成輕微肝臟損傷，而且鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase)與膽固醇值 (cholesterol values)有劑量效應，同時觀察到銀微粒在體內的分佈濃度，以胃、肝及腎臟的濃度最高，其他如睪丸、腦、肺及血液中也可偵測到[29]；除此之外，銀微粒亦有分佈在腸道之上層絨毛及皺褶中，並刺激杯狀細胞分泌黏液顆粒[30]。該研究團隊期後於 2010 年又進行一次為期 90 天之亞慢性口服暴露實驗，使用較低劑量(125mg/kg)的奈米銀暴露已可造成肝臟損傷，且在暴露後膽管增生的發病率增加，可能伴隨壞死、纖維化及色素沉著等病變[3]。重複低劑量(1mg/kg)暴露也可以造成器官毒性及引起發炎反應[31]。

根據估計，大約 14%的奈米銀技術應用產品在使用過程中，會釋放出奈米銀微粒在空氣中[32]，從而暴露到人類呼吸道，因此口服實驗雖然較易控制攝入劑量及執行方便，但呼吸暴露仍然是最接近實際暴露的途徑，因此呼吸毒理實驗仍有其必要性。呼吸暴露大致分四種途徑，分別是氣管霧化吸入(intratracheal

nebulization , IN)、氣管灌注(intratracheal instillation , IT)、鼻部吸入(nose-only inhalation)及全身性呼吸暴露(whole-body inhalation)。氣管霧化吸入與氣管灌注比較，霧化吸入的技術需求較低，但兩者都可明確了解動物的真實暴露劑量，惟此方法與人類實際呼吸情況不同[33, 34]；鼻部吸入較接近實際情況，但動物若長時間固定會產生壓力或窒息，影響實驗結果，因此全身性呼吸暴露為最合適之實驗暴露途徑，動物全身處於充滿奈米微粒的空間，可自由呼吸活動，因此可作長期的慢性毒理研究，缺點則是無法精確微粒暴露量及成本頗高[35]。

有研究使用氣管灌注方法暴露小鼠，28 天後觀察到促進發炎的細胞激素(例如 TNF- α)增多，導致發炎及組織損傷相關之基因表現上調[36]。也有研究發現大鼠吸入低濃度奈米銀顆粒(>100nm)6 小時後，肺泡中的奈米銀顆粒通過肺泡-毛細血管屏障進入血液，導致血中銀濃度上升[37]。除了進入血液外，也有許多研究進一步發現奈米微粒能通過血液循環分布至各個器官，包括肝臟、脾臟，甚至心臟、腎臟和免疫器官等[10, 38, 39]。

有韓國研究團隊針對奈米銀呼吸毒性進行了相關實驗，利用全身性呼吸暴露方式，使健康大鼠暴露 15 nm 奈米銀微粒 13 週，濃度為 49-515 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，發現會增加混合發炎細胞浸潤、慢性肺泡發炎及小肉芽腫病變[1]。次年該研究團隊再用類似條件進行 18nm 奈米銀微粒 4 小時急性暴露，濃度為 76-750 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，但是並沒有觀察到顯著毒性反應；參考 ACGIH 訂定的恕限值(TLV) 0.1 mg/m^3 ，推論奈米銀微粒濃度在超過的 TLV 情況下，對長時間暴露的毒性較明顯[40, 41]。目前關於奈米銀呼吸毒理的研究仍然非常缺乏，故相關之毒理機制仍需進一步探討(表 1)。

2.3 氣喘

2.3.1 氣喘疾病

根據歐洲過敏反應和臨床免疫學會(EAACI)的統計結果，歐洲1/3兒童有過敏

疾病，而且其中30-50%會發展為氣喘，估計到了2015年有半數歐洲人為過敏性氣喘所苦[42]。在臺灣，根據行政院衛生署國民健康局的資料顯示，95年年底台灣約有50萬3,000人罹患氣喘；98年的國民健康訪問調查，針對3,531位12歲以下兒童曾被醫師診斷有氣喘之比率為6.7%，從上述調查同時得知，影響12歲以下兒童發生氣喘的因素中，空氣污染就佔了27.5%，空污同時是氣喘常見環境誘發因子。根據台大研究團隊調查台北市7到15歲兒童的氣喘盛行率，從民國74年的5.08%，上升至83年的10.79% [43]；到了民國96年，北市國小一年級學童氣喘盛行率更達到20.34% (臺北市國小一年級學童食物過敏原檢測計畫)。

過敏性氣喘作為兒童常見及重要的慢性疾病之一，其形成同時受先天遺傳傾向和後天環境因素影響。而且有研究發現富裕國家的兒童氣喘盛行率與貧窮國家相比為高[44]，此現象可由衛生假說(hygiene hypothesis)所解釋，假說是由學者針對氣喘盛行率持續上升所提出的理論，是指由於衛生條件的改善，兒童生長環境缺乏強烈的感染源，加上疫苗及抗生素的使用導致人體免疫系統對自然物質(例如花粉)作出不正常的免疫反應[45]。

2.3.2 氣喘疾病產生機制

氣喘的生理機制相當複雜，臨床上症狀為長期的咳嗽、流鼻涕，還有因呼吸道收縮而發出氣喘聲，病理組織現象則有呼吸道上皮細胞脫落、水腫及發炎細胞滲透。一般來說，患有器官特异性自體免疫疾病的人吸入過敏原時，免疫系統受到刺激而反應，其輔助性T細胞(T helper cell)傾向於Th1免疫反應；有過敏體質的人，則傾向Th2免疫反應，氣喘的過敏發炎反應與Th1、Th2免疫反應之間的不平衡有關[46]。

過敏性氣喘由Th2免疫反應主導，當暴露到外來過敏源時，抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APC)，例如樹突細胞(dendritic cell)，接觸到從呼吸道吸入的抗原，會移動到附近的淋巴結，再將處理過的抗原呈現給T細胞及B細

胞，刺激 T helper cell 增殖，分泌細胞激素(cytokine)，例如介白素 4 (Interleukin 4，IL-4)、介白素 5(IL-5)和介白素 13(IL-13)並促進 B 細胞分泌 IgG₁ 和 IgE；IL-5 可刺激漿細胞(plasma cell)分泌 IgA 抗體；IL-5 同時會刺激嗜酸性白血球(eosinophil)分化成熟，並釋放到血液中，內含豐富的發炎蛋白，例如主要基本蛋白(major basic protein)，可以直接傷害氣管上皮，增強氣管反應，並誘發肥大細胞(mast cell)釋放其合成物質；嗜酸性白血球同時會釋放氧化自由基(oxygen radicals)，導致過氧化物(reactive oxygen species)的產生，形成氧化壓力及上皮細胞受損。

肥大細胞與抗原交叉結合反應(cross-linking)後活化，會分泌 IL-4、IL-5、腫瘤壞死因子(TNF- α)及組織胺(histamine)等，當釋放到血液時，會導致急/慢性的發炎反應。前面提及的嗜酸性白血球和肥大細胞皆會產生白三烯素(leukotrienes)，此物質會導致平滑肌收縮，增加血管通透性，呼吸道阻力(AHR)上升；另一方面，單核白血球(monocyte)和嗜中性白血球(neutrophil)因血管通透性增加而順利進入肺泡，攻擊過敏源，因此在發生發炎反應時，可在肺泡中可觀察到其數量上升 [47]。

過去已有不少微粒與氣喘疾病的相關研究，Klot S 等人於1996-97年間，進行了一個關於暴露大氣微粒(ambient fine and ultrafine particles)與氣喘患者用藥相關性的流病研究，收集其藥物紀錄、症狀程度及同期大氣中的PM₁₀、PM_{2.5}微粒濃度，結果顯示藥物使用頻率及氣喘症狀加劇，與空污微粒有相關性；且超細微粒(ultrafine particles)濃度與氣喘盛行率同樣有相關性[48]。在另一項流病研究中，也有發現暴露PM₁₀、PM_{2.5}超細微粒的濃度，與呼吸困難等氣喘症狀有相關性[49]，證明暴露小粒徑的微粒對氣喘疾病有不良效應。

另外亦有針對職業性氣喘的研究，過去有研究發現9-15%的成人氣喘個案是由職業性暴露造成的[50]，其中異氰酸酯被廣泛應用在工業上，同時又是引致職業性氣喘的化學物質[51]；因此S. Hussain 等人使用化學致敏劑-甲苯二異氰酸酯(toluene diisocyanate, TDI)，以皮膚吸收方式誘發BALB/c小鼠的氣喘模式，之後

口咽吸入40 μ l奈米微粒懸浮液(0.4 mg/ml TiO₂、Au)，發現呼吸道阻力上升，肺泡灌洗液中嗜中性白血球和巨噬細胞增加，組織切片則觀察到水腫、上皮受損及發炎現象，顯示肺內較低的奈米微粒劑量，已可導致氣喘小鼠產生肺部發炎及肺功能下降[52]。

可是根據2010年一篇奈米銀微粒暴露氣喘小鼠的研究，使用了卵蛋白(OVA)誘發氣喘，將小鼠分為4組(saline、OVA、Ag 40和OVA+Ag 40)以霧化(nebulizer)吸入的方式對雌性C57BL/6小鼠暴露奈米銀5天(40mg/kg)，發現正常組(saline、Ag 40)暴露後氧化壓力程度較高，氣喘組(OVA、OVA+Ag 40)卻反而是暴露後氧化壓力程度降低；相同的趨勢也發生在細胞激素(IL-4、IL-5和IL-13)、總細胞數、細胞分類計數和呼吸道阻力的結果中[53, 54]。此實驗結果顯示，氣喘確實會造成發炎反應發生，但奈米銀微粒的暴露反而降低了發炎反應的程度，與其它奈米微粒的暴露結果並不一致，且作用機制亦未明確，因此需要更多及進一步的研究。

2.4 奈米產生系統

奈米微粒的產生方法很多，可分為物理及化學方法兩大類。物理方法包括蒸發冷凝法、物理粉碎法、機械球磨法、熱分解法等；化學方法則包括化學氣相沈積法、沈澱法、水熱合成法、溶膠凝膠法及微乳液法等，其技術需求及產生微粒性質各不相同。在實驗室及工程領域中，最常使用的奈米微粒產生方法大概有以下幾種[55]。

蒸發冷凝法(Evaporation-condensation)原理是利用高溫將物質(例如銀、金、矽等)加熱揮發成蒸汽後，在前端通入攜帶氣體(通常是惰性氣體)將蒸汽帶往下游，在控制凝結核和蒸汽濃度的條件下，使蒸汽慢慢通過凝結區(溫度下降)，於是蒸汽遇冷凝結成具奈米粒徑的微粒。可通過調整攜帶氣體流量、高溫爐的溫度、盛載金屬的瓷舟位置等條件，來控制生成微粒的粒徑大小及濃度；此方法產生的微

粒粒徑單一、純度及濃度高、能長時間穩定產生，缺點是技術設備需求高、系統體積大、高溫爐升溫至穩定耗時及耗能[56, 57]。

火焰噴霧熱解法(Flame spray pyrolysis, FSP)多作商業生產用途，其原理是將已溶解有機金屬成分的液態前驅物，用注射器勻速噴出，同時周邊環狀狹縫提供氧氣，中央有火焰噴嘴點燃前驅物，瞬間與氧氣反應生成金屬氧化物，並在火焰中燒結、冷卻形成奈米微粒；此方法適用於大規模生產工程用金屬氧化物奈米微粒，其優點有不形成液態副產物、步驟簡明、純度高、可形成單一特定形態微粒應用於工業產品，但是對粒徑及微粒表面積較難控制、只能產生金屬氧化物奈米微粒也是此系統限制[58-61]。

噴霧乾燥法(Spray-drying technique)可快速產生乾燥微粒，原理較簡單，將配製好溶有微粒粉末的液態前驅物，使用旋轉磁盤或單流體高壓超聲波噴嘴產生粒徑為 10 至 500 μm 液滴，之後經過熱蒸汽氣化去除水分，形成流動之乾燥粉末；此方法操作簡單、成本低，但產生粉末粒徑未達奈米粒徑且純度低、分佈不均勻、也難以控制粒徑穩定度[62]。另有電噴霧法(Electrospray)，原理與噴霧乾燥法相似，但霧化時則是把液態前驅物從高電場噴嘴中噴出，經電場力和液體表面張力的作用，液體會變成帶電的奈米液滴；但由於過程中要控制液體導電性，因此所產生的微粒必須為非電解質之可溶物質。

綜合上述奈米微粒產生方法，考量動物模式之呼吸毒理研究，需長時間穩定產生高濃度單一粒徑微粒，因此蒸發冷凝法為最適合本研究之微粒產生方法。

本實驗室的奈米銀產生系統主要是由高溫爐(furnace)、冷卻管(cooling chamber)和稀釋管(mixing chamber)所組成，高溫爐利用蒸發/冷凝法(evaporation-coagulation)產生奈米銀微粒[56, 57]。先以氧化鋁舟盛載銀粉，將氧化鋁舟放入石英管內由高溫爐加熱，隨著溫度升高，固態銀粉開始蒸發成為銀蒸氣，之後銀蒸氣由載流氣體—純氮氣攜帶往下游，進入冷卻管內管，外管則由冷卻器輸送冷水以逆向流動方式進行熱交換，其中內、外管內容物完全隔絕；在銀

蒸氣溫度快速下降的過程中，會因為蒸發、凝結機制形成奈米等級的氣膠。之後奈米銀微粒進入稀釋管，以氮氣和氧氣按空氣中比例進行混合及稀釋，最後導入全身性呼吸暴露腔供實驗小鼠暴露，並以微粒粒徑分徑器及微粒計數器(SMPS, TSI-3080 DMA 及 TSI-3022 CPC)進行連續監測微粒粒徑和數目濃度。

2.5 肺部發炎與傷害指標

當過敏體質的人暴露到外來刺激源時，Th1 與 Th2 兩種免疫反應的平衡被破壞，其中 Th2 與氣喘、過敏有關，屬於體液免疫反應，接下來會引發一連串以 Th2 為主導的免疫反應。當微粒進入呼吸道到肺泡，巨噬細胞對外來物質產生作用，開始啟動上皮細胞、嗜中性白血球，產生過氧化物(ROS)，例如自由基，攻擊外來過敏源，於數小時內合成細胞激素，例如 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等等，分泌到受影響區域，同時 IL-5 會促進嗜酸性白血球活化，IL-13 促進 B 細胞分泌 IgG 和 IgE[63]。

系統性發炎會觀察血球分類計數(cell differential count)，包括嗜中性白血球(neutrophil)、單核白血球(monocytes)-未成熟之巨噬細胞、淋巴細胞(lymphocyte)及嗜酸性白血球(eosinophil)。在肺部發炎初期，最早進入組織的是嗜中性白血球，屬於非專一性作用細胞，此細胞只要發現外來物就會立即前往消滅，因此可作為早期肺部發炎指標。在發炎的肺部中，嗜中性白血球是主要的氧化劑來源，會產生 ROS 並導致氧化壓力上升，因此它在發炎反應中是一個敏感的指標。不少研究觀察到微粒暴露後其數量有上升趨勢，因此肺泡灌洗液中總細胞數及不同白血球的比率計算，可代表微粒暴露後的早期肺部發炎指標。

氣喘的免疫反應過程中，包括被活化的肥大細胞及其他呼吸道細胞釋放出多種不同的促炎介質，吸引許多其他發炎細胞的聚集，包括嗜中性白血球、嗜酸性白血球以及 Th2 為主的淋巴球，使發炎反應更強烈，它們會釋放出組織胺、半胱胺醯基白三烯素 C4 等，導致呼吸道過度反應、平滑肌收縮、造成急性支氣管

收縮以及呼吸困難等症狀；因此呼吸道阻力(AHR)也是其中一個氣喘症狀的評估指標。

總蛋白質(total protein)屬於由血液釋放出來的大分子，可能由於內皮細胞、間質細胞、上皮細胞壞死，造成總蛋白質濃度上升，其值亦代表微血管之擴張與通透性增加[64]。肺組織切片也在很多研究中直接用作觀察肺部之病理變化。

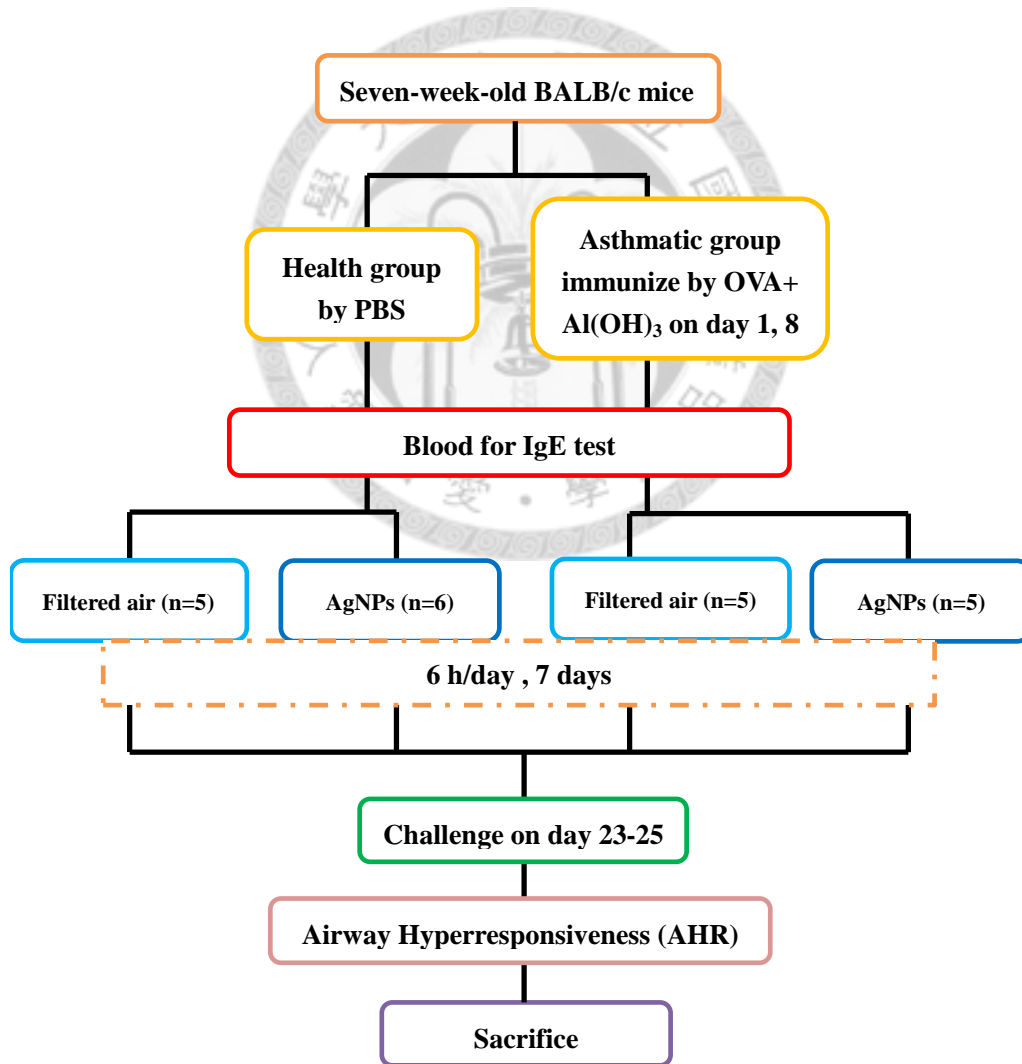
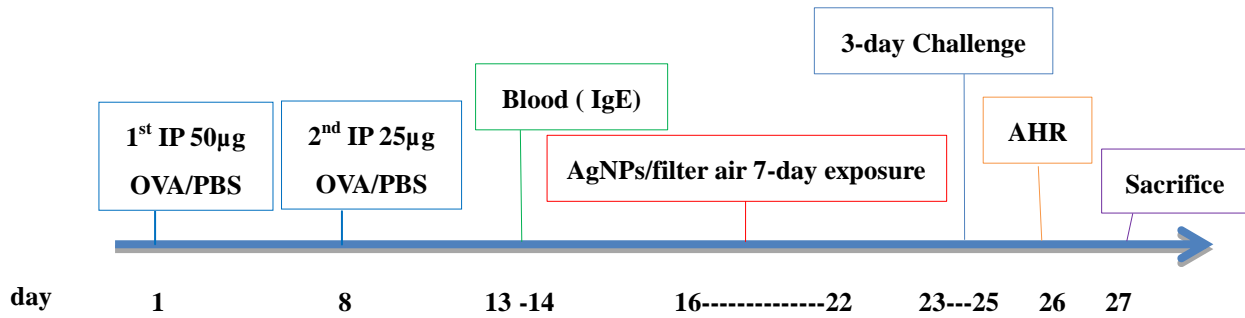
2.6 研究目的

目前奈米銀的研究仍主要著重於其抗菌特性，關於奈米銀呼吸毒性的研究不少，但針對勞工氣喘族群的呼吸毒性探討仍然非常不足。雖然國外有部分關於奈米微粒對氣喘族群的呼吸毒性研究，但不同微粒對氣喘動物的生理影響並不一致，因此本研究希望利用全身性呼吸暴露方式，針對奈米銀微粒對氣喘疾病生理指標及症狀的影響作進一步的研究。



第三章 材料與方法

3.1 研究架構及時程



3.2 氣喘模式建立

本研究使用 7 週大之雌性 BALB/c 小鼠，BALB/c 小鼠適用於免疫相關研究 [65-68]。實驗前兩週購自國家實驗研究院實驗動物中心(National Laboratory Animal Center)，飼養於台灣大學公共衛生學院動物飼養室，該飼養環境維持 12 小時晝夜循環，恆溫恆濕控制，實驗動物於飼養室內調理一週後進行實驗。

將實驗動物分為兩組，分別是健康和需要誘導成氣喘模式的 BALB/c 小鼠。其中氣喘模式小鼠在第 1 和第 8 天以腹腔注射 (Intraperitoneal Injection, IP) 方式分別注入 50 μ g/200 μ l 和 25 μ g/200 μ l 的致敏劑—卵蛋白(ovalbumin)及佐劑—氫氧化鋁(aluminium hydroxide, 4mg) 以誘發過敏性氣喘反應；氫氧化鋁在暴露到抗原時，有助於推動免疫反應中 Th2 細胞表現型的發展。而健康小鼠則是注射 PBS(Phosphate buffered saline)及佐劑-氫氧化鋁(4mg)。

在施打致敏劑這段期間稱為致敏期(Sensitisation period)，致敏期結束後，為證實氣喘模式建立成功，使用 4mm 採血針於小鼠臉頰採血 100-150 μ l，靜置 30 分鐘待血球凝集，隨後以 4200 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液—血清 40 μ l，之後使用 Mouse IgE ELISA Set(BD Biosciences)檢測 total serum immunoglobulin E(IgE) 抗體的濃度是否有增加。

3.3 呼吸暴露

本研究利用奈米銀全身性呼吸暴露系統進行暴露(圖 1)，以高溫爐利用蒸發/冷凝法產生奈米銀微粒。先以氮氣除去系統內微粒，再以瓷舟盛載銀粉放入石英管內，由高溫爐加熱產生奈米銀微粒。過程中高溫爐中心維持在 1090-1100 $^{\circ}$ C 之間，使用 6 lpm 的載流氣體—氮氣將銀蒸氣帶往下游，其中氮氣與銀蒸氣不反應；進入冷卻管內管後，由於溫度快速下降，銀蒸氣會凝結形成奈米粒徑的氣膠。之後奈米銀微粒進入稀釋管，分別以 2.5 lpm 氮氣和 2.5 lpm 氧氣(按空氣中氮、氧比例)進行混合及稀釋，粒徑大小及濃度穩定後導入兩個全身性呼吸暴露腔進行

暴露。其中控制組為吸入奈米產生器經 HEPA 過濾之去微粒乾淨空氣，並同時使用四用氣體偵測儀(MicroRAE plus)監測暴露腔內氧氣濃度，另測溫度、濕度、微粒粒徑及數目濃度。

呼吸暴露時 BALB/c 小鼠會從健康和氣喘模式兩組中，再分為奈米銀暴露組和控制組，以 PBS 表示為健康組，OVA 表示為氣喘模式組；NP 表示為奈米銀暴露組，而 FA 則表示為暴露已過濾空氣的控制組。因此，本實驗進行奈米銀呼吸暴露時，動物共分四組，分別表示為 PBS/FA(N=5)、PBS/NP(N=6)、OVA/FA(N=5)、OVA/NP(N=5)，時間為一天 6 小時，連續暴露 7 天。

3.3.1 奈米微粒特性檢驗

在奈米微粒呼吸暴露期間，每天以掃瞄式電移動度粒徑分析儀(Scanning Mobility Particle Sizer, SMPS)監測暴露腔內微粒粒徑及數目濃度。SMPS 由微分式電移動度分徑儀(Differential Mobility Analyzer, DMA, Model 3081, TSI, Inc.)及微粒凝結計數儀(Condensation Particle Counter, CPC, Model 3022, TSI, Inc.)兩部分組合而成。其原理是在 DMA 中微粒經過輻射源帶電後，電壓隨著時間變化，量測範圍切割為數十間隔，篩選特定粒徑微粒進入 CPC；CPC 內有一正丁醇儲槽，微粒通過時，正丁醇蒸氣因過飽和而凝結至微粒上，粒徑增大至可以偵測的程度，以垂直方向通過雷射光束，產生散射現象，利用光偵測器(photo detector)偵測散射的次數即可測得各間隔內微粒之數目，並換算為重量濃度及面積濃度。

奈米銀微粒之形態分析，是使用台大化工系之掃瞄式電子顯微鏡(Scanning electron microscopy; Nova™ NanoSEM 230, FEI Company)，其最高解析度為 1nm，內建 X 光能譜散佈分析儀(energy dispersive X-ray spectroscopy; EDS)可同時分析微粒之元素成分。奈米微粒先以濾紙匣收集於濾(47mm, Pall)，之後置於石墨載體上，由於觀察表面需導電，因此在真空狀態下於檢體表面鍍上一層金屬鉑(Pt)，

SEM 原理是電子鎗產生高能電子束，經過透鏡聚焦於檢體上，進行二度空間的掃描，偵測散射的電子，訊號經過放大處理後即可成像觀察。EDS 原理則是由於原子的內層電子受到外來能量激發而脫離原子時，外層電子快速遷降至內層而釋放出兩能階差能量，可能以 X 光的形式釋出；由於各元素之能階差不同，因此分析此 X 光的能量或波長即可鑑定檢體的組成元素。

另外，奈米微粒之成份亦同時使用台大職衛所之感應耦合電漿放射光譜儀 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ; ICP-MS) 分析，對金屬的偵測極限達 ppt，可作定性、定量分析；採集微粒方法與前述相同，將檢體濾紙先進行硝化前處理，再以 ICP-MS 分析。其原理是高溫的感應耦合電 (ICP) 把熱能傳遞到分析元素，產生離子化樣品，根據它們的電荷和質量分離，利用質譜儀去偵測離子物種，從而獲得每種元素同位素的資訊。

而重量濃度方面，除了由 SMPS 換算之外，亦有使用濾紙秤重的方式與 SMPS 換算結果作比較。奈米產生系統後端連接濾紙匣 (濾紙固定於內部)，後方接 pump 以 5 Lpm 流量抽氣約 7.7 小時，濾紙在採樣前後皆放置於防潮箱乾燥 24 小時，並用微量天平秤重，最後將採樣後秤重結果減去採樣前秤重結果，即得到實驗微粒重量。

3.4 呼吸道阻力測試

呼吸道阻力作為氣喘程度的生理指標，需於奈米銀微粒呼吸暴露後進行量測。為進行呼吸道阻力測試，於暴露後連續三天進行 challenge，以鼻腔灌注 (intranasal instillation, IN) 方式讓小鼠吸入 200 μ L OVA (100 μ g/40 μ L)，以誘發氣喘輕度反應。之後使用 barometric whole body pletysmography (Buxco Electronics) 測量 AHR (airway hyperresponsiveness)，AHR 以 Penh 值表示；此方法可讓小鼠保持於清醒狀態，測量其呼吸道阻力改變，且可於不同時間點重複進行量測。

將小鼠置於 Pletysmographs 內，使用其部件 transducer 和 preamplifier 測量

baseline 的 Penh 值，作為表示 Penh 值相對增加之基本值；之後使小鼠分別依序吸入不同濃度之霧化 Methacholine 以刺激其呼吸道收縮反應，從低至高濃度分別為 0 mg/ml(PBS)、5 mg/ml、10 mg/ml、25 mg/ml，每次吸入時間為三分鐘，完全抽走霧化 Methacholine 後，即開始記錄小鼠之呼吸道阻力變化，以計算在不同刺激程度之 Penh 值。最後以 Penh 的相對增加比例 (relative increase ratio) 表示，即 $\text{Penh}_{\text{methacholine}}/\text{Penh}_{\text{baseline}}$ 。

3.5 肺泡灌洗液

小鼠於呼吸道阻力測試後 24 小時進行犧牲，先以前述方式於小鼠臉頰採血檢測 IgE 抗體濃度，隨後用腹腔注射方式以 50mg/kg 的 pentobarbital 進行麻醉。將小鼠固定於犧牲台上，以剪刀剖開喉部表皮及肌肉露出氣管，切開氣管後以採血軟針置於氣管內固定，用 PBS 溶液灌洗。肺泡灌洗共三次，第一次使用針筒把 1cc PBS 溶液灌入肺臟，來回沖洗三次。第一管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)共 1cc，用離心管收集後暫置於冰上，於 4°C 的狀態以 1000 rpm 離心 10 分鐘，分裝其上清液 150 μ l 及 40 μ l 分別用於檢測 150 μ l cytokine (IL-13)、總蛋白含量(total protein)，餘下肺泡灌洗液保留。第二、三次肺泡灌洗方法相同，使用針筒把 1cc PBS 溶液灌入肺臟，來回沖洗三次，第二、三次的肺泡灌洗液收集於第二支離心管內，共 2cc。至此將第一管留下的肺泡灌洗液混入第二支離心管內，兩管均勻混合後，得到包含全部細胞的肺泡灌洗液，用於評量肺部發炎及傷害指標，取 100 μ l 測量總死亡細胞數，取 200 μ l 進行血球分類計數，另取 40 μ l 測總蛋白含量。而評量氣喘程度的生理指標，則分別取肺泡灌洗液 40 μ l 測 IgE 抗體及 150 μ l 測細胞因子(IL-13)濃度。

3.5.1 肺泡灌洗液中總死亡細胞數

總死亡細胞數的計算必須在肺泡灌洗液取得後儘快完成，以確保活細胞不會逐漸凋亡，增加死細胞數目，而造成計算上的誤差。將100 μ l 肺泡灌洗液與100 μ l trypan blue 染劑1:1均勻混合後，取100 μ l注於血球計數盤(Hemocytometer)(圖3)計數，並蓋上蓋玻片(Coverslip)。血球計數盤上有二個九宮格空間，每個九宮格空間被平均細分為9個1 mm²大小之正方形，其中位於四個角落之正方形再被細分為16個小格，深度皆為0.1 mm。當九宮格空間上方被蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為1 mm² x 0.1 mm = 1 x 10⁻⁴ ml。由於死亡細胞的細胞膜通透性改變，因此trypan blue 染劑可以進入細胞而呈色，活細胞無法被染劑染色，因此呈現為透明狀。

使用顯微鏡觀察時，會計算五個大正方形內之染色細胞數目，再除以大方格數，求得一個大正方形內之平均染色細胞數目，乘以稀釋倍數2，再除以1 x 10⁻⁴ ml，即為每 ml 中之死亡細胞數目(細胞數/ml)。

計算公式：

$$\text{死亡細胞總數/ml} = (\text{五個正方形之染色細胞數}/5) \times \text{稀釋倍數}2 / 10^{-4}$$

3.5.2 肺泡灌洗液中血球分類計數

取得 200 μ l 肺泡灌洗液後，需要用離心機將細胞固定於玻片上，用顯微鏡觀察並分別計算嗜中性白血球(neutrophil)、單核白血球(monocytes)、淋巴細胞(lymphocyte)及嗜酸性白血球(eosinophil)之比率。其中嗜中性白血球及單核白血球皆為肺部發炎及傷害指標，嗜酸性白血球則是氣喘程度的生理指標。先將肺泡灌洗液震盪均勻後，使用低速細胞離心機(cytospin)以 600rpm 離心 5 分鐘，再以熱風吹玻片背面使細胞熱固定，以劉氏染劑(Liu's stain)染色，先用一體積染劑

A(stain A)染 30 秒，再用二體積染劑 B(stain B)染 90 秒，以清水輕輕沖洗，靜置風乾後即可用顯微鏡觀察。每個檢體皆會重複製作二片玻片，每片玻片會計算總共 200 個細胞，並按前述四種細胞進行分類，同一檢體的二片玻片結果在計算平均後，即可得該種細胞佔總細胞之百分比。

計算公式(以嗜中性白血球為例)：

嗜中性白血球比率(%)=(二片玻片中嗜中性白血球總數/2)/ 200 個細胞 x 100%

3.5.3 肺泡灌洗液中細胞因子 IL-13

細胞因子 IL-13 是氣喘程度的生理指標，使用 Mouse IL-13 ELISA Set(R&D Systems, Inc.)進行檢測。

Assay Procedure 檢測程序：

1. 把 reagents, standard dilutions, control 及 samples (150µl 肺泡灌洗液)準備好。
2. 把 plate frame 從鋁箔包取出，餘下的重新密封。
3. 將 50µl Assay diluent RD1-14 加入每個 microwells(微孔)。(RD1-14 含有不溶物質，使用前先震盪)
4. 把 50µl *2 的 standard、sample 和 control 加到適當的 wells；密封 plate，輕輕拍打邊框 1 分鐘及培養於室溫 2 小時。
5. 沖洗 wells，每個 well 用 400µl 的 wash buffer 去洗 5 次；洗完最後一次後，把 plate 倒置和印在吸水紙上，盡量去掉任何殘留液體，以免殘留液體稀釋下一個藥劑。
6. 將 100µl Mouse IL-13 Conjugate 加入每個 well。密封 plate 及培養於室溫 2 小時。
7. 重複第 5 步的吸/洗。
8. 將 100µl Substrate Solution 加入每個 well。避光及培養於室溫 30 分鐘。

(Substrate reagent A+B 等體積配製，須在配製後 15min 內使用，反應後失效)

9. 將 100 μ l Stop Solution 加入每個 well。輕輕拍打邊框使混合均勻。

10. 在 30 分鐘內停止反應，讀 450nm 的吸光值。

3.5.4 肺泡灌洗液中總蛋白數

Total protein 是肺部發炎及傷害指標，使用 Bio-Rad Protein Assay(BIO-RAD，1-800-4BIORAD)進行檢測。

Assay Procedure 檢測程序：

1. 用 BSA(Bovine serum albumin)配製檢量線，共 5 個濃度分別為 0、0.2、0.4、0.6 及 0.8 mg/ml。
2. 將準備好的標準品和 sample 各 10 μ l 注入適當的 well。
3. Rad protein 染劑與水以 1：4 比例混合。
4. 之後將 200 μ l Rad protein 染劑加入 well，靜置 5 分鐘以上，不超過 1 小時。
5. 讀 595nm 的吸光值。

3.6 血液中的 IgE 抗體濃度

Immunoglobulin E 是氣喘程度的生理指標，使用 Mouse IgE ELISA Set(BD Biosciences)進行檢測。

Assay Procedure 檢測程序：

1. 把 Capture Antibody 稀釋於 Coating Buffer，coat 100 μ l 在 wells 上。密封 plate 及培養於 4 $^{\circ}$ C 過夜。
2. 第二天吸洗 wells，每個 well 用 300 μ l 以上的 wash buffer 去洗 3 次。洗完最後一次後，把 plate 倒置和印在吸水紙板上，盡量去掉任何殘留 buffer。

3. 每個 well 用至少 200 μ l 檢測稀釋液(Assay Diluent)填滿，不密封，培養於室溫 1 小時。
4. 重複第 2 步的吸/洗。
5. 準備好用 Assay Diluent 稀釋的標準品和 sample。Control 稀釋 50 倍，Asthma sample 稀釋 250 倍。
6. 用 pipette 將各 100 μ l 的標準品、sample 和 control 注入到適當的 wells；密封 plate 及培養於室溫 2 小時。
7. 重複第 2 步的吸/洗，總共洗 5 次。
8. 將已準備好的 Working Detector (Detection Antibody+ SAv-HRP reagent) 100 μ l 加入每個 well；密封 plate 及培養於室溫 1 小時。
9. 重複第 2 步的吸/洗，總共洗 7 次。
10. 將 100 μ l 基質溶液(Substrate Solution)加入每個 well；不密封，培養於黑暗處、室溫 30 分鐘。(Substrate reagent A+B 等體積配製，須在配製後 15min 內使用，反應後失效)
11. 將 50 μ l 停止溶液(Stop Solution)加入每個 well。
12. 在 30 分鐘內停止反應，讀 450nm 的吸光值。

3.7 組織病理切片

4 組實驗動物(PBS/FA、PBS/NP、OVA/FA、OVA/NP)犧牲後，各取每組編號為 1 之小鼠肺臟進行組織病理檢驗(lung histology)。肺臟保存於福馬林固定 3 天，之後送至台灣大學醫學院實驗動物中心 (National Taiwan University, College of Medicine, Laboratory Animal Center) 製作病理組織切片；使用 H&M 染色、組織包埋(蠟)、蠟切片及拍照，並轉送雙和醫院作結果判讀。

3.8 統計分析

實驗數據皆以平均值加減標準差(mean \pm SD)表示，各組之間數據使用 t-test 分析之間差異。P<0.05 視為達到統計上的顯著差異。



第四章 結果

4.1 微粒產生暴露系統

本次實驗目的是探討奈米銀微粒的呼吸暴露毒性，其中奈米銀微粒是由微粒產生暴露系統中的高溫爐，利用蒸發/冷凝原理所產生。先以氮氣除去系統內微粒，再由高溫爐加熱銀粉，溫度經過調整測試後可達 1100°C，使用 6 lpm 的載流氮氣將銀蒸氣帶往下游之冷卻管，銀蒸氣凝結成奈米粒徑氣膠，之後進入稀釋管，「產生—稀釋」氮氣比例如表 2 所示，選擇分別以 2.5 lpm 氮氣和 2.5 lpm 氧氣(按空氣中氮、氧比例)進行混合及稀釋，粒徑及濃度穩定後導入兩個全身性呼吸暴露腔進行暴露，並同時監測微粒粒徑、數目濃度、溫度、濕度及氧氣濃度，如表 2、3 所示，實驗連續 7 天(6 小時/天)，暴露組所暴露之奈米微粒幾何平均粒徑為 32.78nm，標準差為 2.08；數目濃度為 1.40×10^6 顆/立方公分，換算為質量濃度及表面積濃度則分別為 3.34 mg/m^3 、 $1.56 \times 10^4 \text{ mm}^2/\text{m}^3$ ，暴露期間之微粒產生結果皆維持穩定(表 4)，且呈鐘型單峰分佈(圖 2、3)。除了使用 SMPS 換算質量濃度外，亦有用 5 lpm 流量採樣於濾紙上 7.7 小時，其實際質量濃度為 0.53 mg/m^3 (表 5)。

4.2 奈米微粒成分分析

以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察，可看出採集到的微粒皆附著於濾紙纖維上，並由於產生微粒濃度高及採樣時間長，易聚集成葡萄串狀，如圖 4 所示。同時用 X 光能譜散佈分析儀 (EDS)分析微粒之元素成分，可知除了 Teflon 濾紙本身成分—碳和氟以外，僅有銀(Ag)此一元素，因此可推論實驗中所暴露的奈米微粒為奈米銀微粒(表 6、圖 5)。

根據美國 EPA，Method IO-3.5 文獻中提出，Al、Pb、As、Ba、Cd、Cr、

Co、Cu、Mn、Ni、Ag、Tl、Zn 等 20 種元素，為大氣及周界中較常見之重金屬粒狀污染物，因此以感應耦合電漿放射光譜儀(ICP-MS)分析奈米微粒採樣濾紙中的成分，發現元素銀(Ag)的濃度 2581.1 $\mu\text{g/L}$ 遠比其他金屬元素(皆低於 200 $\mu\text{g/L}$)高，其中 Mn、Co、Se、As、Cd 及 Ba 因回收率差而無法量測。

4.3 氣喘疾病生理指標

在前章提及 IgE、IL-13 及嗜酸性白血球比率作為氣喘程度的生理指標；於建立氣喘模式小鼠時，需在致敏期結束後採血，檢測 IgE 抗體的濃度是否有增加。因此將健康和氣喘模式兩組實驗小鼠(n=10、11)，用 ELISA 測得其 IgE 濃度分別為 $1.00 \times 10^3 \pm 3.40 \times 10^2 \text{ ng/ml}$ 及 $6.02 \times 10^3 \pm 2.61 \times 10^3 \text{ ng/ml}$ (表 7、圖 6(a))，可見氣喘組 IgE 濃度明顯高於健康組，且有達到統計上顯著差異，說明氣喘模式已建立成功。

奈米銀微粒呼吸暴露後，為評估氣喘程度變化，再次檢測血清中 IgE 濃度，四組實驗小鼠檢測結果如表 8、圖 6(b)所示，誘發氣喘體質小鼠的 IgE 濃度 OVA/FA($2.67 \times 10^4 \pm 3.45 \times 10^4 \text{ ng/ml}$)、OVA/NP($6.11 \times 10^4 \pm 7.61 \times 10^4 \text{ ng/ml}$)明顯比健康小鼠 PBS/FA ($5.25 \times 10^2 \pm 1.06 \times 10^2 \text{ ng/ml}$)、PBS/NP($1.66 \times 10^3 \pm 1.20 \times 10^3 \text{ ng/ml}$)高；而且在暴露 OVA 的氣喘小鼠組之間，可觀察到暴露奈米銀微粒組(OVA/NP)的 IgE 濃度明顯比暴露過濾空氣組(OVA/FA)高，而健康小鼠組間則沒有明顯差異。

此外，亦有使用動物犧牲後收集之肺泡灌洗液，進行 IL-13 濃度檢測，發現趨勢與 IgE 結果相似，皆是氣喘小鼠 OVA/FA($14.83 \pm 13.81 \text{ pg/ml}$)、OVA/NP($28.04 \pm 26.27 \text{ pg/ml}$)明顯比健康小鼠 PBS/FA($2.79 \pm 1.41 \text{ pg/ml}$)、PBS/NP($5.55 \pm 1.82 \text{ pg/ml}$)高，可是並沒有達到統計上顯著(表 8、圖 7)。

血球分類計數中的嗜酸性白血球比率，同樣使用肺泡灌洗液計算，與前述之氣喘生理指標趨勢類似，都是氣喘小鼠 OVA/FA($41.65 \pm 19.83\%$)、OVA/NP(45.81

$\pm 13.76\%$)明顯比健康小鼠 PBS/FA($4.80 \pm 2.53\%$)、PBS/NP($18.55 \pm 8.09\%$)高，而且 OVA/NP 組與 PBS/FA 組間比率有統計上顯著差異；另外健康小鼠組間，有奈米銀微粒暴露小鼠(PBS/NP)的比率比暴露過濾空氣的(PBS/FA)高，亦有達到統計上顯著差異(表 9、圖 8)。

4.4 呼吸道阻力

在奈米銀微粒呼吸暴露後，測量小鼠之呼吸道阻力(AHR)以評估肺功能，小鼠分別依序吸入濃度為 0、5、10 及 25 mg/ml 之霧化 Methacholine 以刺激其呼吸道收縮反應，測得 Penh 值如表 10(a)所示；最後 AHR 以 Penh 的相對增加比例表示，因此從表 10(b)、圖 9，可看出健康小鼠組(PBS/FA、PBS/NP)的呼吸道阻力無明顯差異，氣喘小鼠組(OVA/FA、OVA/NP)則相對比較高，且 OVA/NP 組的呼吸道阻力遠比其他 3 組高，而且當受到越高濃度(0 到 25 mg/ml)的 Methacholine 刺激，其差距越明顯。

4.5 肺部發炎指標

連續 7 天奈米銀呼吸暴露及呼吸道阻力測試後，犧牲動物並收集檢體，其中肺泡灌洗液用於計算各項指標，包括總死亡細胞數、血球分類計數中單核白血球、嗜中性白血球比率及總蛋白濃度，以上皆為肺部發炎及傷害指標。總死亡細胞數於動物犧牲後隨即計算，得到 OVA/FA ($1.42 \times 10^5 \pm 6.85 \times 10^4$ 顆/ml)、OVA/NP ($1.98 \times 10^5 \pm 9.31 \times 10^4$ 顆/ml)兩組細胞數皆比 PBS/FA ($6.00 \times 10^4 \pm 5.88 \times 10^4$ 顆/ml)、PBS/NP ($1.30 \times 10^5 \pm 3.28 \times 10^4$ 顆/ml)兩組高，且 OVA/NP 組分別與 PBS/FA、PBS/NP 組達到統計上差異(表 9、圖 10)。

在血球分類計數的嗜中性白血球比率部分，反而是健康小鼠組 PBS/FA ($4.8 \pm$

2.3%)及 PBS/NP($8.9 \pm 5.8\%$)比較氣喘小鼠組 OVA/FA 組($2.7 \pm 0.9\%$)及 OVA/NP 組($3.4 \pm 2.1\%$)為高，但未有達到統計上顯著差異(表 9、圖 11)。

單核白血球比率部分，則與總死亡細胞數趨勢相反，是氣喘小鼠 OVA/FA ($53.95 \pm 19.64\%$)、OVA/NP ($48.63 \pm 12.88\%$)比率明顯比健康小鼠 PBS/FA ($89.60 \pm 4.68\%$)、PBS/NP ($70.30 \pm 13.81\%$)低，而且 OVA/NP 組與 PBS/FA 組間比率有統計上顯著差異；另外健康小鼠組間，有奈米銀微粒暴露小鼠(PBS/NP)的比率比暴露過濾空氣的(PBS/FA)低，亦有達到統計上顯著差異(表 9、圖 12)。

總蛋白濃度可判斷細胞受損程度，但四組之間 PBS/FA(0.39 ± 0.22 mg/ml)、PBS/NP(0.41 ± 0.15 mg/ml)、OVA/FA(0.46 ± 0.12 mg/ml)和 OVA/NP(0.43 ± 0.22 mg/ml)皆無統計上顯著差異(表 9、圖 13)。

4.6 組織病理切片

實驗動物犧牲後，採集其肺部組織進行 H&E 染色，發現 PBS/FA 組小鼠支氣管及肺部血管周邊，有局部輕微的淋巴漿細胞浸潤(lymphoplasmacytic infiltrate)現象(圖 14(a)、15(a))。PBS/NP 組則有中度瀰漫性支氣管發炎(bronchiocentric interstitial inflammatory infiltrate)現象，並伴隨有淋巴細胞、組織細胞及嗜中性白血球增多(圖 14(b)、15(b))。OVA/FA 組觀察到輕度瀰漫性支氣管發炎現象，並伴隨有淋巴細胞、組織細胞、漿細胞、嗜中性及嗜酸性白血球，及肺泡內巨噬細胞輕微增加(圖 16(a)、17(a))。OVA/NP 組則是觀察到中度的瀰漫性支氣管發炎，伴隨有淋巴細胞、漿細胞及嗜酸性白血球，及肺泡內巨噬細胞明顯增加的現象(圖 16(b)、17(b))。

第五章 討論與建議

本研究將 BALB/c 小鼠分為健康(PBS)和氣喘模式(OVA)兩組，其中 OVA 組使用卵蛋白誘發氣喘，測試 IgE 濃度證明氣喘模式已建立。之後利用蒸氣冷凝法產生奈米銀微粒，連續 7 天的暴露中，暴露組(PBS/NP、OVA/NP)所暴露到的平均粒徑為 32.78nm，質量濃度為 3.34 mg/m³；經過濾紙採樣比較，發現 SMPS 會高估質量濃度，並導致我們低估奈米銀微粒實際的毒性影響。另外，可觀察到在健康組間，分別在嗜酸性白血球比率、嗜中性白血球比率及總死亡細胞數三個生理指標中，PBS/NP 相比 PBS/FA 皆有上升趨勢；而在氣喘組間，則在 IgE(呼吸暴露後)、IL-13、呼吸道阻力及總死亡細胞數這些生理指標中，OVA/NP 相比 OVA/FA 皆有上升趨勢。而且肺部病理組織切片的結果也顯示，無論是健康組還是氣喘組，經過奈米銀暴露後的發炎反應會較強烈。但過去也有研究顯示奈米銀微粒在氣喘小鼠體內為抗氧化/發炎作用[53, 69]，因此仍需要進一步的研究釐清奈米銀微粒對氣喘疾病的作用趨勢及其機制。

5.1 奈米微粒產生及暴露系統

目前已知的奈米微粒產生方法不少，例如噴霧乾燥法，其優點為簡單快速，但產生的微粒粒徑頗大，且易膠結，不符奈米粒徑之定義；電噴霧法所產生的微粒必須為非電解質之可溶物質；火焰燃燒法可產生高純度、具特定形態的奈米微粒，但必須為金屬氧化物，各產生方法皆有其限制。另一方面，雖然蒸發冷凝法系統複雜且技術需求高，但能長時間穩定產生高濃度單一粒徑微粒，因此最適合作為動物呼吸毒理研究之用。過去奈米銀毒理研究以細胞及口服實驗居多，然而該暴露方式與實際暴露情況不同，其毒理結果難以推論實際暴露風險，因此呼吸暴露實驗有其必要性。

本研究架設以蒸發冷凝為原理之奈米產生系統，將銀粉質量、高溫爐溫度、

升溫時間、微粒濃度穩定所需時間、攜帶氣體(氮氣)流量、稀釋氮氣流量、稀釋氧氣流量及冷卻器溫度量化，經過微調各參數，得到可長期產生穩定高濃度奈米銀微粒之條件；以此操作條件下，用 SMPS 監測連續 7 天所產生的奈米銀微粒，粒徑平均為 32.78nm，數目濃度為 1.40×10^6 顆/立方公分，質量濃度則為 3.34 mg/m^3 ，以探討對氣喘小鼠之毒理影響。此外，於呼吸暴露前，同時使用 SMPS 及鐵氟龍濾紙採樣，得到 SMPS 質量濃度結果為 3.05 mg/m^3 ，濾紙則換算得到實際質量濃度為 0.53 mg/m^3 ，SMPS 質量濃度比濾紙的高 5.7 倍，即 SMPS 有高估現象。Sioutas 等人於 1999 年進行 SMPS 及鐵氟龍濾紙採樣結果的比較，以噴霧方式產生單一粒徑的聚苯乙烯乳膠(polystyrene latex)氣膠，採樣結果以質量濃度單位($\mu\text{g/m}^3$)比較，可知微粒粒徑在 300-500nm 時，SMPS 與濾紙採樣的平均濃度結果接近；但是當微粒粒徑少於 300nm 時，SMPS 的平均濃度會比濾紙採樣高估 1.5-1.6 倍，另外在 50nm 粒徑下，SMPS 的平均濃度會比濾紙採樣的結果高 63.2% [70]。本實驗室也曾使用濾紙採樣奈米氧化鋅微粒比較質量濃度的結果，發現 SMPS 同樣會高估 1.03-1.66 倍 [71]。

此結果符合本實驗發現 SMPS 測量質量濃度會高估的現象，但高估倍數為 5.7 倍，推測可能原因其一是由於微粒種類不同，其物化特性影響微粒經過 SMPS 輻射源時帶電分布，從而影響粒徑量測及重質換算的結果 [70]；另外，一般 SMPS 在計算粒徑及質量濃度時會假設微粒為圓球狀，根據 SMPS 軟體使用手冊，其原理為直接計數微粒體積濃度，再用微粒密度換算其質量濃度，公式如下：

$$m = \rho v \quad [1]$$

$$M = \sum_l^u m \quad [2]$$

m = 每波段的質量加權濃度 (mass weighted concentration per channel)； ρ = 微粒密度 (particle density)； v = 每波段的體積加權濃度 (volume weighted concentration per channel)； M = 總質量濃度 (total mass concentration)； l = 波段下限 (lower channel boundary)； u = 波段上限 (upper channel boundary)

另外根據 Kim 等人於 2009 年對膠結奈米微粒通過纖維濾紙的研究[72]，使用 DMA 及 APM (Aerosol Particle Mass Analyzer)換算微粒之質量濃度，其公式如下：

$$m = \frac{qV}{r_c^2 \omega^2 \ln(r_2/r_1)} \quad [3]$$

m：微粒質量(mass of particles)；q：電荷量(charge)；V：電壓(voltage)； ω ：旋轉頻率(rotation frequency)； r_1 ：內電極半徑(radii of the inner electrode)； r_2 ：外電極半徑(radii of the outer electrode)； r_c ： r_1 、 r_2 之平均值(average of r_1 and r_2)

從以上公式可知，質量濃度主要以體積濃度及微粒密度換算所得。由於本實驗之 SEM 結果無法確定微粒之準確形狀，假設微粒為非圓球狀，則 SMPS 以微粒直徑計算體積時會導致質量高估情況，或是微粒因膠結而形成不規則的形狀，如鏈狀，也會導致 SMPS 誤將膠結後形狀的長度當作微粒直徑來換算，同樣會造成質量高估[73]。除此之外，由於產生的奈米銀微粒質量頗小，在濾紙採樣過程中微粒彈跳，以及移動濾紙時微粒掉落的問題無法完全避免，亦可能造成濾紙採樣結果的低估。

過去大部分實驗在收集微粒進行物化特性分析時，都會使用電子顯微鏡觀察形狀，其中以掃描式電子顯微鏡(SEM)和穿透式電子顯微鏡(TEM)這二種最常用，其中 SEM 可觀察微粒之立體形狀，加上可同時用 X 光能譜散佈分析儀(EDS)分析微粒之元素成分，因此選擇用 SEM 及 EDS 來觀察微粒構型及成分。採集於濾紙纖維上的微粒聚集成葡萄串狀，受限於放大倍率，僅可確定微粒為奈米粒徑，另外配合 EDS 分析結果顯示奈米微粒成分僅有銀，因此可證明實驗中所暴露的奈米微粒為奈米銀微粒。

5.2 氣喘疾病及肺部發炎指標

過去許多毒理實驗，皆有使用嗜中性白血球比率、單核白血球比率作為奈米微粒對肺部造成發炎程度的評估[2, 74, 75]，總蛋白濃度則常用於評估細胞受損

程度[76]；而過去氣喘相關的研究也多使用 IgE、IL-13、AHR 及嗜酸性白血球比率作為氣喘程度的生理指標[58]。IgE 是過敏性氣喘進行 Th2 免疫反應過程中，由 B 細胞分泌的 IgE，在實驗致敏期結束後，可觀察到氣喘組 IgE 濃度明顯比健康組高且達到統計上顯著，證明氣喘動物模式已建立成功。另外，建議可使用針對 OVA 特異性的 IgE ELISA Kit (OVA-Specific Mouse IgE ELISA Kits) 測量 IgE 濃度，可更準確了解因暴露 OVA 而引起之 IgE 上升程度。

5.2.1 奈米銀微粒對健康小鼠之呼吸毒理作用

本研究發現奈米銀微粒對健康小鼠進行呼吸暴露後，在一些肺部發炎生理指標上有觀察到不良健康反應。暴露奈米銀微粒後，嗜酸性白血球比率、嗜中性白血球比率及總死亡細胞數跟沒有暴露組相比有增加趨勢，但僅有嗜中性白血球比率有達到統計上的顯著。過去使用健康大鼠進行奈米銀呼吸暴露的研究不少，大鼠暴露 15nm 奈米銀微粒 28 天(6 小時/天, 5 天/週)後，發現在低暴露劑量 1.73×10^4 particle/cm³, $0.48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 下，可觀察到總蛋白濃度、單核白血球比率皆沒有差異，另外嗜酸性白血球比率和嗜中性白血球比率有明顯上升，且達到統計上的顯著[2, 77]。在氣喘小鼠暴露聚苯乙烯奈米微粒的研究中，可發現健康小鼠暴露奈米微粒後，嗜酸性白血球和嗜中性白血球比率有統計上顯著的上升[78]。另外 Stebounova 於 2011 年使用 5nm、 $3.3 \text{ mg}/\text{m}^3$ 的奈米銀微粒暴露雄性小鼠 10 天(4 小時/天, 5 天/週)，在暴露後 0 週及 3 週後犧牲的肺泡灌洗液中，均可發現總細胞數、嗜中性白血球數兩項發炎指標，與控制組比較有達到統計上顯著的增加，而總蛋白濃度同樣沒有差異[4]。

雖然嗜酸性白血球比率的上升普遍與過敏反應有關，但於健康組仍觀察到其上升，參考 Cho 等人對大鼠以氣管灌注方式暴露奈米氧化鋅溶液的研究，發現肺泡灌洗液中嗜酸性白血球濃度同樣會上升，且達到統計上的顯著。推論可能是由於嗜酸性白血球因血管通透性改變而進入肺泡間質(alveolar interstitium)，造成

組織受損，從而釋放到支氣管及肺泡空間內[79]。過去奈米銀之相關研究結果與本研究趨勢一致，說明奈米銀微粒對於健康小鼠確實會造成輕微呼吸道發炎反應。

5.2.2 奈米銀微粒對氣喘小鼠之呼吸毒理作用

過去針對氣喘小鼠暴露奈米銀微粒的研究非常缺乏，Park 等人用霧化方式對雌性 C57BL/6 氣喘小鼠暴露奈米銀微粒，觀察到肺部組織中的 IL-13 和肺泡灌洗液中嗜酸性白血球比率、嗜中性白血球比率、總細胞數及呼吸道阻力這些生理指標，在氣喘小鼠暴露後反而有下降趨勢，除嗜中性白血球比率外，皆有達統計上的顯著，推估可能是由於奈米銀微粒透過減低 NF- κ B 活性及其他發炎細胞激素的表現，以調節氧化壓力的產生，從而導致呼吸道發炎反應及呼吸道阻力降低[53]，而且透過外用及口服實驗，證明奈米銀晶體有抗氧化或抗發炎的特性[80, 81]；同時，也有針對奈米粒徑二氧化鈦暴露氣喘雌性 BALB/c/Sca 小鼠的研究，可發現肺泡灌洗液中嗜酸性白血球、巨噬細胞、IL-13 和呼吸道阻力有下降趨勢，其中嗜酸性白血球和巨噬細胞的下降有達到統計上的顯著[69]。可能是由於奈米微粒能抑制肺部呼吸道及組織發炎、黏液過度分泌，以及避免第二型過敏免疫反應的發生[78]。

另一方面，Hussain 等人使用 TDI 誘發雄性 BALB/c 小鼠氣喘後，口咽暴露二氧化鈦奈米微粒，卻發現呼吸道阻力及肺泡灌洗液中嗜酸性白血球有上升趨勢，同時肺泡灌洗液中總細胞數、嗜中性白血球和巨噬細胞，皆有達到統計上顯著的增加[52]。奈米微粒誘發發炎反應的機制未有明確結論，推測可能的主要原因是奈米微粒造成的氧化壓力，在氣喘病理機轉中起重要作用，並已證明奈米微粒能引起支氣管上皮細胞產生氧化壓力[82]，此外，微粒造成的上皮細胞受損會導致呼吸障礙，從而增加對過敏原之易感性[83]。此結果與本研究的趨勢相似，但與前述暴露奈米銀及二氧化鈦的結果卻相反。目前在過去的研究中，既有抑制或誘

發發炎反應的論述，但有關奈米銀微粒與免疫系統的互動仍未明確，需進一步的研究釐清其作用機制(表 11)。

在本實驗的氣喘組間，可發現 IgE(呼吸暴露後)、IL-13、呼吸道阻力及總死亡細胞數這些生理指標中，暴露奈米銀後皆有上升趨勢，但卻未達統計上顯著，此現象推測是由於氣喘模式中致敏劑劑量下調不足所致。

本研究氣喘模式是參考台大臨醫所江伯倫教授實驗室，進行氣喘藥物的研究而建立之動物模式[84]，由於是用作治療氣喘藥物的研究，因此模式中的致敏程度比較強烈。BALB/c 小鼠於第 0、14、21 和 28 天以腹腔注射(IP)方式注入 25 μ g/200 μ l 的致敏劑—OVA(第 0 天為 50 μ g /200 μ l)及佐劑—Al(OH)₃(4mg)以誘發過敏性氣喘反應；而健康小鼠則是注射 200 μ l PBS 及佐劑-Al(OH)₃(4mg)。最後量測呼吸道阻(AHR)前，連續三天進行 challenge，以鼻腔灌注(IN)方式讓小鼠吸入 40 μ l OVA(100 μ g/40 μ L)，誘發輕度氣喘反應。

我們參考 Pichavant 及 Nials 等人整理關於氣喘動物模式誘發的文獻[85, 86]，將致敏劑施打次數下調，小鼠在第 1 和第 8 天以 IP 方式分別注入 50 μ g/200 μ l 和 25 μ g/200 μ l 的 OVA 及 Al(OH)₃(4mg)共 2 次，以誘發過敏性氣喘反應；健康小鼠則同樣是 IP 200 μ l PBS 及 Al(OH)₃(4mg)。最後量測 AHR 前的 challenge，也同樣是連續三天，以 IN 方式暴露小鼠 200 μ l OVA(100 μ g/40 μ L)，以誘發氣喘反應。在調整氣喘模式致敏劑劑量後，引發之氣喘反應仍稍為強烈，導致奈米銀之呼吸毒理影響不易觀察。

5.3 組織病理切片

過去有不少研究以觀察組織切片的方式，直接了解實驗過程所導致的病理變化，本實驗於每組實驗小鼠中，隨機保留一個未進行肺泡灌洗之肺部作組織切片，觀察到 PBS/FA 組小鼠支氣管及肺部血管周邊，有局部輕微的淋巴漿細胞浸潤現象，而暴露奈米銀微粒後，則可看到中度瀰漫性支氣管炎症，伴隨淋巴細胞、組

織細胞及嗜中性白血球增多。Kim 等人使用奈米銀口服暴露大鼠 28 天，導致中央靜脈週邊膽管增生及發炎細胞浸潤，包括嗜酸性白血球[29]。過去曾餵食小鼠奈米銀微粒，並觀察到肝臟有淋巴細胞浸潤的發炎反應[87]。

在 OVA/FA 組可觀察到輕度瀰漫性支氣管發炎現象，伴隨有淋巴細胞、組織細胞、漿細胞、嗜中性及嗜酸性白血球，及肺泡內巨噬細胞輕微增加。而氣喘小鼠暴露奈米銀微粒後，則是觀察到更嚴重的瀰漫性支氣管發炎，並伴隨各種發炎指標細胞的明顯增加。過去 S. Hussain 等人對氣喘小鼠口咽暴露 TiO₂ 及 Au 奈米微粒懸浮液，可在組織切片觀察到水腫、上皮受損及發炎現象，即使肺內較低的奈米微粒劑量，已可造成氣喘小鼠產生肺部發炎及肺功能下降[52]。

5.4 肺泡灌洗液中總死亡細胞數及血球分類之計數

在前面第三章的部分已提及有被 trypan blue 染色之細胞為死亡細胞，由於本研究在計算細胞總數時未有將未染色細胞一起計數，因為得到之染色細胞數僅能作為死亡細胞總數計算。因此本實驗使用死亡細胞總數計算公式如下：

$$\text{死亡細胞總數/ml} = (\text{五個正方形之染色細胞數}/5) \times \text{稀釋倍數} / 10^{-4}$$

建議以後再進行相關細胞計算時，應分別計數染色與未染色細胞分別之總數，以求得細胞死亡率，並計算出準確之血球分類總數，可避免因細胞總數不夠多，而導致以比率表示時之統計結果無意義。其相關計算公式如下：

$$\text{細胞總數/ml} = (\text{五個正方形之染色及未染色細胞數}/5) \times \text{稀釋倍數} / 10^{-4}$$

$$\text{細胞死亡率(\%)} = \text{染色細胞數} / \text{染色及未染色細胞總數} \times 100\%$$

血球分類總數(以嗜中性白血球為例)：

$$\text{嗜中性白血球數 (\#/ml)} = (\text{二片玻片中嗜中性白血球總數}/2) / 200 \text{ 個細胞} \times \text{細胞總數}$$

5.5 結論及建議

本次實驗結果在多個肺部發炎指標及氣喘生理指標上，都有觀察到明顯上升趨勢，但皆未達統計上顯著，為避免因樣本數不足而導致統計不顯著，建議可嘗試增加每組動物數量。另一方面，由於誘發氣喘及呼吸道阻力測試前進行 challenge，會需要使用致敏劑(OVA)，此劑量是參考關於氣喘藥物研究調整所得，因此劑量較高，且實驗結果顯示氣喘生理指標都有明顯上升，甚至不易觀察奈米銀之影響，證明在下調致敏劑劑量的情況下，氣喘模式仍可建立成功。因此建議應繼續往下調整致敏劑(OVA)劑量，以符合未來應用於使用氣喘動物模式之微粒相關呼吸毒理研究。

本實驗是針對氣喘模式小鼠的奈米銀呼吸毒理實驗，利用蒸氣冷凝法產生奈米銀微粒，在連續 7 天的呼吸暴露期間，此系統能夠長時間穩定輸出高濃度且單一粒徑之奈米銀微粒，可應用在長期研究。過去也有不少慢性氣喘的研究，多觀察到嗜酸性白細胞炎症及呼吸道阻力上升等現象[88-90]，且發現奈米微粒可引起呼吸道上皮細胞產生氧化壓力，並導致細胞受損及發炎反應的發生[52, 82]，但同時亦有研究顯示奈米銀微粒對氣喘小鼠反而有抗發炎作用，通過抑制細胞激素及其他發炎因子的活性，從而減低氣喘反應的表現[53, 69, 78]。目前奈米銀微粒對氣喘模式小鼠的毒性影響趨勢仍未有一致的結論，估計此影響差異是由於動物品系的不同、奈米微粒種類及粒徑、微粒之物化特性(例如購買的奈米溶液可能含添加劑等)、暴露途徑及暴露時程等因素所造成[53]，因此未來可嘗試結合奈米銀微粒，以本研究建立之奈米產生系統，進行慢性或亞慢性呼吸毒理研究，以釐清長時間暴露所造成的毒性影響，及奈米銀與免疫系統的作用機制。

第六章 參考文獻

1. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, et al: **Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles.** *Toxicological Sciences* 2009, **108**:452-461.
2. Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, et al: **Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats.** *Inhal Toxicol* 2007, **19**:857-871.
3. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, et al: **Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles.** *Particle and Fibre Toxicology* 2010, **7**.
4. Stebounova LV, Adamcakova-Dodd A, Kim JS, Park H, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, Thorne PS: **Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model.** *Part Fibre Toxicol* 2011, **8**:5.
5. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C: **Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.** *Inhalation Toxicology* 2004, **16**:437-445.
6. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Van De Meent D, et al: **Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.** *Nanotoxicology* 2009, **3**:109-138.
7. Scheringer M, MacLeod M, Behra R, Sigg L, Hungerbuhler K: **Environmental risks associated with nanoparticulate silver used as biocide, Household and Personal Care Today.** *Household Pers Care Today* 2010, **1**:34-37.
8. Nowack B: **Nanosilver Revisited Downstream.** *Science* 2010, **330**:1054-1055.
9. Donaldson K, Li XY, Macnee W: **Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury.** *Journal of Aerosol Science* 1998, **29**:553-560.
10. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdorster G, Ziesenis A: **Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low.** *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 2002, **65**:1513-1530.
11. Ferin J, Oberdorster G, Penney DP: **Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1992, **6**:535-542.
12. Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy SC, Meacher D, Sioutas C, Misra C, Mendez LB, Kleinman A: **Particulate matter in polluted air may increase**

- biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology* 2005, **26**:133-140.**
13. Lea MC: **On Allotropic Forms Of Silver.** *Am J Sci* 1889, **37**:476-491.
 14. Gottschalk F, Scholz RW, Nowack B: **Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: Methodology and an application to engineered nano-TiO₂ particles.** *Environmental Modelling & Software* 2010, **25**:320-332.
 15. Nowack B, Krug HF, Height M: **120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers.** *Environmental Science & Technology* 2011, **45**:1177-1183.
 16. Zhang H, Smith JA, Oyanedel-Craver V: **The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers.** *Water Res* 2012, **46**:691-699.
 17. Zhu X, Bai R, Wee K-H, Liu C, Tang S-L: **Membrane surfaces immobilized with ionic or reduced silver and their anti-biofouling performances.** *Journal of Membrane Science* 2010, **363**:278-286.
 18. Chen Y, Zheng X, Xie Y, Ding C, Ruan H, Fan C: **Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings.** *J Mater Sci Mater Med* 2008, **19**:3603-3609.
 19. Lee JH, Mun J, Park JD, Yu IJ: **A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials.** *Nanotoxicology* 2012, **6**:667-669.
 20. Lee JH, Kwon M, Ji JH, Kang CS, Ahn KH, Han JH, Yu IJ: **Exposure assessment of workplaces manufacturing nanosized TiO₂ and silver.** *Inhalation Toxicology* 2011, **23**:226-236.
 21. Miller A, Drake PL, Hintz P, Habjan M: **Characterizing exposures to airborne metals and nanoparticle emissions in a refinery.** *Ann Occup Hyg* 2010, **54**:504-513.
 22. 張振平, 陳春萬: **不同型態奈米微粒之製作與細胞株或動物暴露系統開發與測試研究.** 2009.
 23. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC: **In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells.** *Toxicological Sciences* 2005, **88**:412-419.
 24. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ: **In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.** *Toxicology in Vitro* 2005, **19**:975-983.
 25. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ: **Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species.** *Journal of Physical Chemistry B* 2008, **112**:13608-13619.
 26. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM: **Interactions of silver nanoparticles**

- with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, **236**:310-318.**
27. Hsin YH, Chena CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ: **The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells.** *Toxicology Letters* 2008, **179**:130-139.
28. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K: **Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism.** *Toxicology in Vitro* 2010, **24**:872-878.
29. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, et al: **Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats.** *Inhalation Toxicology* 2008, **20**:575-583.
30. Jeong GN, Jo UB, Ryu HY, Kim YS, Song KS, Yu IJ: **Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats.** *Archives of Toxicology* 2010, **84**:63-69.
31. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K: **Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles.** *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010, **30**:162-168.
32. Quadros ME, Marr LC: **Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles.** *Journal of the Air & Waste Management Association* 2010, **60**:770-781.
33. Oka Y, Mitsui M, Kitahashi T, Sakamoto A, Kusuoka O, Tsunoda T, Mori T, Tsutsumi M: **A Reliable Method for Intratracheal Instillation of Materials to the Entire Lung in Rats.** *Journal of Toxicologic Pathology* 2006, **19**:107-109.
34. 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.** *Toxicological Sciences* 2000, **55**:24-35.
35. Leong BKJ, Coombs JK, Sabaitis CP, Rop DA, Aaron CS: **Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats.** *Journal of Applied Toxicology* 1998, **18**:149-160.
36. Park EJ, Choi K, Park K: **Induction of Inflammatory Responses and Gene Expression by Intratracheal Instillation of Silver Nanoparticles in Mice.** *Archives of Pharmacal Research* 2011, **34**:299-307.
37. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J: **Pulmonary and Systemic Distribution of Inhaled Ultrafine Silver**

- Particles in Rats.** *Environmental Health Perspectives* 2001, **109**:547-551.
38. Gumbleton M: **Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, **49**:281-300.
39. Yu LE, Yung LYL, Ong CN, Tan YL, Balasubramaniam KS, Hartono D, Shui GH, Wenk MR, Ong WY: **Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats.** *Nanotoxicology* 2007, **1**:235-242.
40. Sung JH, Ji JH, Song KS, Lee JH, Choi KH, Lee SH, Yu IJ: **Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles.** *Toxicol Ind Health* 2011, **27**:149-154.
41. Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, et al: **Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats.** *Inhalation Toxicology* 2007, **19**:857-871.
42. J. L. A. F, Immunology. ftEAoAaC: **Allergy: an epidemic that must be stopped.** *Brussels: European Academy of Allergology and Clinical Immunology* 2006.
43. 吳家興, 林瑞雄, 謝貴雄: **台灣北部國中學生氣喘盛行率調查.** *中華衛誌* 1998, **17**:214-225.
44. Weinmayr G, Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Buchele G, Cookson WO, Garcia-Marcos L, Gotua M, Gratziau C, van Hage M, et al: **Atopic sensitization and the international variation of asthma symptom prevalence in children.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**:565-574.
45. Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R: **Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis.** *Science* 2002, **296**:490-494.
46. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT: **Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals.** *The Journal of Experimental Medicine* 1993, **178**:2123-2130.
47. Busse WW, Lemanske RF, Jr.: **Asthma.** *N Engl J Med* 2001, **344**:350-362.
48. von Klot S, Wolke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz J, Kreyling WG, Wichmann HE, Peters A: **Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles.** *European Respiratory Journal* 2002, **20**:691-702.
49. Wichmann HF, 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.** *Rep Health Eff Inst* 2000, **98**:5-86.
50. Boulet LP, Lemiere C, Gautrin D, Cartier A: **New insights into occupational asthma.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007, **7**:96-101.

51. Bello D, Herrick CA, Smith TJ, Woskie SR, Streicher RP, Cullen MR, Liu YC, Redlich CA: **Skin exposure to isocyanates: Reasons for concern.** *Environmental Health Perspectives* 2007, **115**:328-335.
52. Hussain S, Vanoirbeek JAJ, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LCJ, Martens JA, Dinsdale D, Boland S, Marano F, et al: **Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model.** *European Respiratory Journal* 2011, **37**:299-309.
53. Park HS, Kim KH, Jang S, Park JW, Cha HR, Lee JE, Kim JO, Kim SY, Lee CS, Kim JP, Jung SS: **Attenuation of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver nanoparticles.** *International journal of nanomedicine* 2010, **5**:505-515.
54. Jang S, Park JW, Cha HR, Jung SY, Lee JE, Jung SS, Kim JO, Kim SY, Lee CS, Park HS: **Silver nanoparticles modify VEGF signaling pathway and mucus hypersecretion in allergic airway inflammation.** *Int J Nanomedicine* 2012, **7**:1329-1343.
55. 鄭福田 李林: **可控制奈米微粒產生技術開發.** *勞工安全衛生研究季刊* 2009, **第17卷**:第153-162頁.
56. Jung JH, Oh HC, Noh HS, Ji JH, Kim SS: **Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area.** *Journal of Aerosol Science* 2006, **37**:1662-1670.
57. Ji JH, Jung JH, Yu IJ, Kim SS: **Long-term stability characteristics of metal nanoparticle generator using small ceramic heater for inhalation toxicity studies.** *Inhalation Toxicology* 2007, **19**:745-751.
58. Demokritou P, Buchel R, Molina RM, Deloid GM, Brain JD, Pratsinis SE: **Development and characterization of a Versatile Engineered Nanomaterial Generation System (VENGES) suitable for toxicological studies.** *Inhalation Toxicology* 2010, **22**:107-116.
59. Teleki A, Wengeler R, Wengeler L, Nirschl H, Pratsinis SE: **Distinguishing between aggregates and agglomerates of flame-made TiO₂ by high-pressure dispersion.** *Powder Technology* 2008, **181**:292-300.
60. Mädler L, Pratsinis SE: **Bismuth Oxide Nanoparticles by Flame Spray Pyrolysis.** *Journal of the American Ceramic Society* 2002, **85**:1713-1718.
61. Madler L, Kammler HK, Mueller R, Pratsinis SE: **Controlled synthesis of nanostructured particles by flame spray pyrolysis.** *Journal of Aerosol Science* 2002, **33**:369-389.
62. Shimada M, Wang W-N, Okuyama K, Myojo T, Oyabu T, Morimoto Y, Tanaka I, Endoh S, Uchida K, Ehara K, et al: **Development and Evaluation of an Aerosol Generation and Supplying System for Inhalation Experiments of**

- Manufactured Nanoparticles.** *Environmental Science & Technology* 2009, **43**:5529-5534.
63. Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA, et al: **Asthma outcomes: Biomarkers.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012, **129**:S9-S23.
64. 游妙娟: 奈米氧化鋅微粒於自發性高血壓大鼠之呼吸毒理研究. 國立台灣大學職業醫學與工業衛生研究所碩士論文 2008.
65. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD: **Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production.** *Inflamm Res* 2009, **58**:845-854.
66. <Resolution of bronchial hyperresponsiveness.pdf>.
67. <A Murine IL-4 Receptor Antagonist That Inhibits IL-4- and IL-13-Induced Responses Prevents Antigen-Induced Airway Eosinophilia and Airway Hyperresponsiveness.pdf>.
68. <Airway Subepithelial Fibrosis in a Murine Model of Atopic Asthma.pdf>.
69. Rossi E, Pylkkanen L, Koivisto A, Nykasenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H: **Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model.** *Particle and Fibre Toxicology* 2010, **7**:35.
70. Sioutas C: **Evaluation of the Measurement Performance of the Scanning Mobility Particle Sizer and Aerodynamic Particle Sizer.** *Aerosol Science and Technology* 1999, **30**:84-92.
71. Ho M, Wu KY, Chein HM, Chen LC, Cheng TJ: **Pulmonary toxicity of inhaled nanoscale and fine zinc oxide particles: mass and surface area as an exposure metric.** *Inhal Toxicol* 2011, **23**:947-956.
72. Kim SC, Wang J, Emery MS, Shin WG, Mulholland GW, Pui DYH: **Structural Property Effect of Nanoparticle Agglomerates on Particle Penetration through Fibrous Filter.** *Aerosol Science and Technology* 2009, **43**:344-355.
73. Liu Z, Kim SC, Wang J, Shin WG, Fissan H, Pui DYH: **Measurement of Metal Nanoparticle Agglomerates Generated by Spark Discharge Using the Universal Nanoparticle Analyzer (UNPA).** *Aerosol Science and Technology* 2012, **46**:333-346.
74. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB: **Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles.** *Toxicol Sci* 2007, **97**:163-180.
75. Cho WS, Duffin R, Poland CA, Duschl A, Oostingh GJ, Macnee W, Bradley M,

- Megson IL, Donaldson K: **Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs.** *Nanotoxicology* 2012, **6**:22-35.
76. Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Kim J, et al: **Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles.** *Inhal Toxicol* 2008, **20**:567-574.
77. Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, Chung KH, Yu IJ: **Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats.** *Toxicology Letters* 2008, **182**:24-28.
78. Hardy CL, LeMasurier JS, Belz GT, Scalzo-Inguanti K, Yao J, Xiang SD, Kanellakis P, Bobik A, Strickland DH, Rolland JM, et al: **Inert 50-nm polystyrene nanoparticles that modify pulmonary dendritic cell function and inhibit allergic airway inflammation.** *J Immunol* 2012, **188**:1431-1441.
79. Cho WS, Duffin R, Howie SE, Scotton CJ, Wallace WA, Macnee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K: **Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes.** *Part Fibre Toxicol* 2011, **8**:27.
80. <Anti-inflammatory effect of topical.pdf>
81. Bhol KC, Schechter PJ: **Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis.** *Br J Dermatol* 2005, **152**:1235-1242.
82. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon JC, Marano F: **Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount.** *Toxicology* 2009, **260**:142-149.
83. Murphy SA, BeruBe KA, Pooley FD, Richards RJ: **The response of lung epithelium to well characterised fine particles.** *Life Sci* 1998, **62**:1789-1799.
84. 王友正: **研究納美芬與納美芬酮之抗發炎效果以減緩氣喘之呼吸道發炎反應.** 臺灣大學口腔生物科學研究所學位論文 2009.
85. Pichavant M, Goya S, Hamelmann E, Gelfand EW, Umetsu DT: **Animal models of airway sensitization.** *Curr Protoc Immunol* 2007, **Chapter 15**:Unit 15 18.
86. Nials AT, Uddin S: **Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge.** *Dis Model Mech* 2008, **1**:213-220.
87. Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, Ryu G, Myung H: **Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to**

- nano-sized or micro-sized silver particles.** *Biotechnol Lett* 2008, **30**:1893-1899.
88. Leigh R, Ellis R, Wattie J, Southam DS, de Hoogh M, Gauldie J, O'Byrne PM, Inman MD: **Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002, **27**:526-535.
89. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Ellis R, Inman MD, Jordana M: **Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **169**:378-385.
90. Lee SY, Kim JS, Lee JM, Kwon SS, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH, Kim YK: **Inhaled corticosteroid prevents the thickening of airway smooth muscle in murine model of chronic asthma.** *Pulm Pharmacol Ther* 2008, **21**:14-19.



表 1. 奈米銀微粒呼吸及食入暴露之文獻回顧

Ref.	animal	method	doses	results
Sung ,Ji et al. 2007 2008	SD rat Male and female	inhalation 13-15 nm 6 h/day, 5 days/week, 4 weeks	fresh-air control, 1.73×10^4 particle/cm ³ , $0.48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 1.27×10^5 particle/cm ³ , $3.48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 1.32×10^6 particle/cm ³ , $61.24 \mu\text{g}/\text{m}^3$	goblet cells containing neutral mucins (lung)↑ % of neutrophils, eosinophils ↑(low dose)
Sung et al. 2008 Sung et al. 2009	SD rat Male and female	inhalation 18-19 nm 6 h/day, 5 days/week, 13 weeks	fresh-air control, 0.66×10^6 particle/cm ³ , $49 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.0×10^9 nm ² /cm ³ 1.43×10^6 particle/cm ³ , $133 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 2.5×10^9 nm ² /cm ³ 2.85×10^6 particle/cm ³ , $515 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 5.0×10^9 nm ² /cm ³	bile duct hyperplasia liver inflammation ↑ Total protein ↑(high dose ,female)
Sung et al. 2010	SD rat Male and female	inhalation 18-20 nm 4 h	fresh-air control, 0.94×10^6 particle/cm ³ , $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 1.64×10^6 particle/cm ³ , $135 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 3.08×10^6 particle/cm ³ , $750 \mu\text{g}/\text{m}^3$	no significant difference

Stebounova et al. 2011	C57Bl/6 mice male	inhalation 5 ± 2 nm 4 h/day, 5 days/week, 2 weeks	Exposure group 3.3 mg/m ³	Particle-laden macrophages ↑ total cell, macrophage, neutrophils↑ (minimal pulmonary inflammation)
Kim et al. 2010	F344 rats Male and female	Oral 56 nm 13 weeks	vehicle control, low-dose (30 mg/kg), middle-dose (125 mg/kg) high-dose (500 mg/kg)	slight liver damage bile-duct hyperplasia (necrosis, fibrosis,pigmentation) Total protein , monocytes↑ (female)

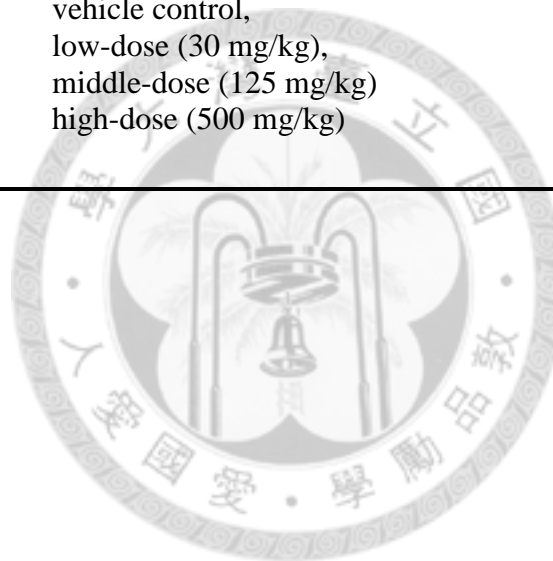


表 2. 呼吸暴露操作條件測試

Operation Conditions				
Furnace Temp (°C)	1100	1100	1100	1100
Carrier N ₂ (lpm)	2	4	6	8
Dilution O ₂ (lpm)	2.4	2.5	2.5	2.44
Dilution N ₂ (lpm)	6.5	4.5	2.5	0.5
Dilution rate	5.45	2.75	1.83	1.37
Measurements				
O ₂ conc. (%)	20.2	20.9	21.4	20.9
Temp. (°C)	23.8	23.7	23.7	23.8
Humidity (%)	15	11	9	8
Average conc.				
Geo. Mean(nm)	46.15	50.41	47.25	41.80
Geo. Std. Dev.	1.93	2.13	2.23	2.26
Number conc. (#/cm ³)	1.45E+06	1.49E+06	1.53E+06	1.61E+06
Mass conc. (mg/m ³)	4.51	9.01	9.17	8.34
Surface conc. (mm ² /m ³)	2.24E+4	3.47E+4	3.48E+4	3.17E+4

表 3. 奈米銀呼吸暴露操作條件及平均暴露濃度

Operation Conditions		
Exposure duration	6hr/day for a week	
Furnace heating temperature (°C)	1100	
Chiller temperature (°C)	3	
Carrier N ₂ (lpm)	6	
Dilution O ₂ (lpm)	2.5	
Dilution N ₂ (lpm)	2.5	
Silver powder (g)	26.77	
Measurements		
SMPS	TSI DMA3081	CPC3022
Average conc.	control	exposure
Mean(nm)		43.89
Geo. Mean (nm)		32.78
Geo. Std. Dev.		2.08
Number conc. (#/cm ³)	8.29E+02	1.41E+06
Mass conc. (mg/m ³)	0.00923	3.34
Surface conc. (mm ² /m ³)	30.30	1.56E+04
O ₂ conc. (%)	20.19	20.56
Temp. (°C)	25.40	25.56
Humidity (%)	61.86	

表 4. 暴露期間平均粒徑及濃度

	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
Geo. Mean (nm)	37.68	34.29	34.76	32.7	30.94	30.78	28.28
Geo. Std. Dev.	2.09	2.09	2.06	2.1	2.08	2.07	2.06
Number conc. (#/cm ³)	1.41E+06	1.55E+06	1.44E+06	1.33E+06	1.39E+06	1.37E+06	1.38E+06
Mass conc. (mg/m ³)	4.16	4.08	3.71	3.29	2.98	2.81	2.34
Surface conc. (mm ² /m ³)	1.91E+04	1.87E+04	1.71E+04	1.52E+04	1.42E+04	1.35E+04	1.18E+04

表 5. 以 SMPS 及濾紙採樣奈米銀微粒質量濃度之比較

	SMPS	Filter
Mass conc. (mg/m ³)	3.05	0.53

表 6. 奈米銀微粒使用 X 光能譜散佈分析儀 (EDS)分析之元素成分

Element	Weight%
C	16.62
F	75.65
Ag	7.73
Totals	100.00

表 7. 致敏期結束後，健康和氣喘模式小鼠之 IgE 濃度

group	N	IgE(ng/ml)
control	10	1002.43±340.02
asthmatic	11	6016.36±2608.96

表 8. 奈米銀微粒呼吸暴露後之 IgE 及 IL-13 濃度

	IgE (post-exposure) (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
PBS/FA	5.25E+02±1.06E+02	2.79±1.41
PBS/NP	1.66E+03±1.20E+03	5.55±1.82
OVA/FA	2.67E+04±3.45E+04	14.83±13.81
OVA/NP	6.11E+04±7.61E+04	28.04±26.27

表 9. 肺泡灌洗液中總死亡細胞數、血球分類計數中單核白血球、嗜中性白血球比率及總蛋白濃度

	total cell (#/ml)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Eosinophil (%)	Macrophage (%)	total protein (mg/ml)
PBS/FA	6.00E+04 ± 5.88E+04	4.75±2.33	0.85±0.65	4.80±2.53	89.60±4.68	0.39±0.22
PBS/NP	1.30E+05 ± 3.28E+04	8.90±5.76	2.25±1.39	18.55±8.09	70.30±13.81	0.41±0.15
OVA/FA	1.42E+05 ± 6.85E+04	2.70±0.87	1.70±0.27	41.65±19.83	53.95±19.64	0.46±0.12
OVA/NP	1.98E+05 ± 9.31E+04	3.38±2.09	2.19±1.14	45.81±13.76	48.63±12.88	0.43±0.22

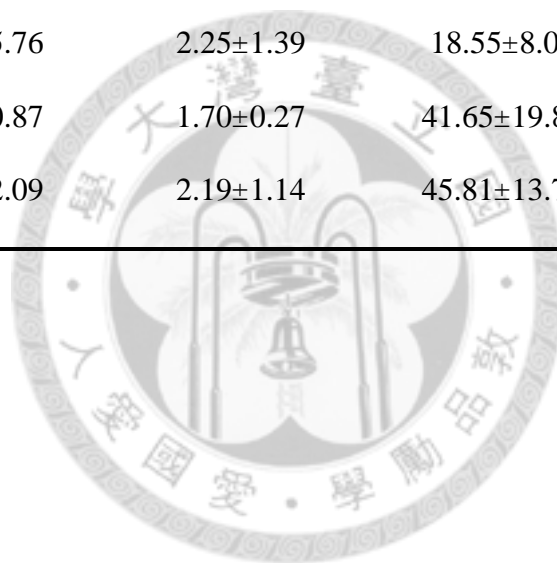


表 10. 實驗小鼠呼吸暴露後之呼吸道阻力測試結果

a) methacholine 濃度單位為 mg/ml

(a) Penh 值

	N	baseline	Mch0	Mch5	Mch10	Mch25
PBS/FA	5	0.43±0.08	0.68±0.29	0.72±0.23	1.27±0.83	2.65±1.41
PBS/NP	5	0.93±0.69	0.44±0.11	0.90±0.70	1.87±1.64	4.92±2.33
OVA/FA	5	0.60±0.21	0.97±0.82	2.05±1.65	3.65±2.99	5.34±3.69
OVA/NP	5	0.45±0.10	0.49±0.10	1.84±2.30	3.75±2.86	8.10±4.73

(b) Penh 值相對增加比例

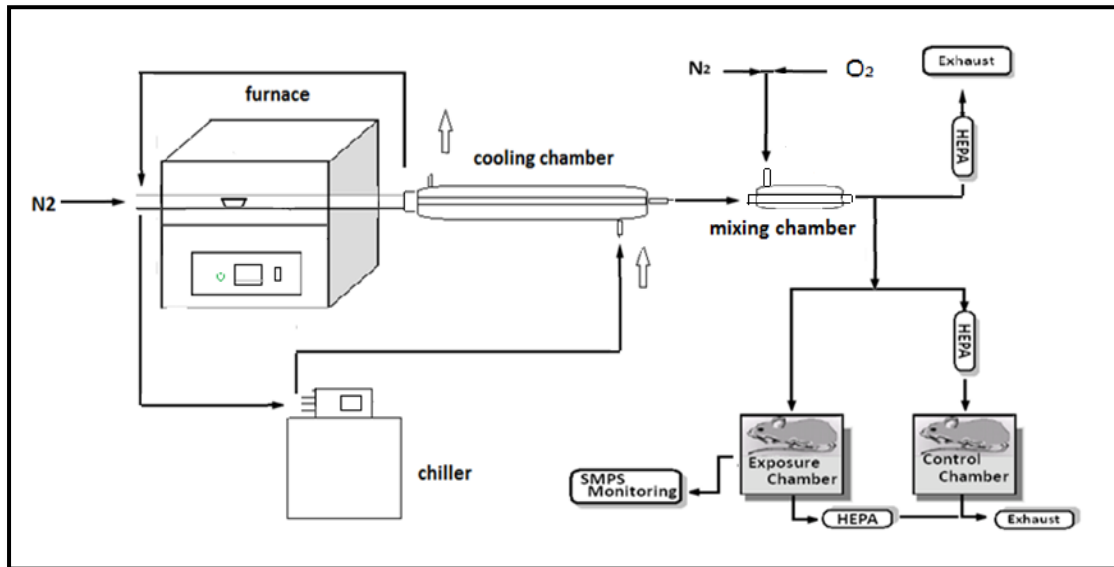
	Mch0/ baseline	Mch5/ baseline	Mch10/ baseline	Mch25/ baseline
PBS/FA	1.57	1.66	2.95	6.15
PBS/NP	0.47	0.96	2.01	5.31
OVA/FA	1.61	3.39	6.05	8.85
OVA/NP	1.10	4.09	8.35	18.03

表 11. 不同奈米微粒對過敏性氣喘小鼠之呼吸毒理研究

References	Animal	Material	Methods	Results
My study	BALB/c mice female	Ag	Inhalation 33nm 3.34 mg/m ³ 6hr/day 7 days	Serum: IgE ↑ BALF: IL-13, total cell, AHR ↑
Hussain et al.	BALB/c mice male	TiO ₂	Oropharyngeal aspiration 15 nm 40 ml NP suspensions 0.8 mg/kg 1 day	BALF: eosinophils, total cell * macrophages*, neutrophils*, AHR ↑
Park et al.	C57BL/6 mice female	Ag	Nebulizer 20ppm 40 mg/kg 5 days	Lung: IL-13*↓ BALF: % of eosinophils*, neutrophils, total cell* AHR *↓
Rossi et al.	BALB/c/Sca mice female	TiO ₂	Dispenser 10 ± 2 mg/m ³ 2hr /time thrice a week 4 weeks	BALF: % of eosinophils*, macrophages*, IL-13, AHR ↓

* statistically significant

(a)



(b)



圖 1. 奈米微粒產生及全身暴露系統

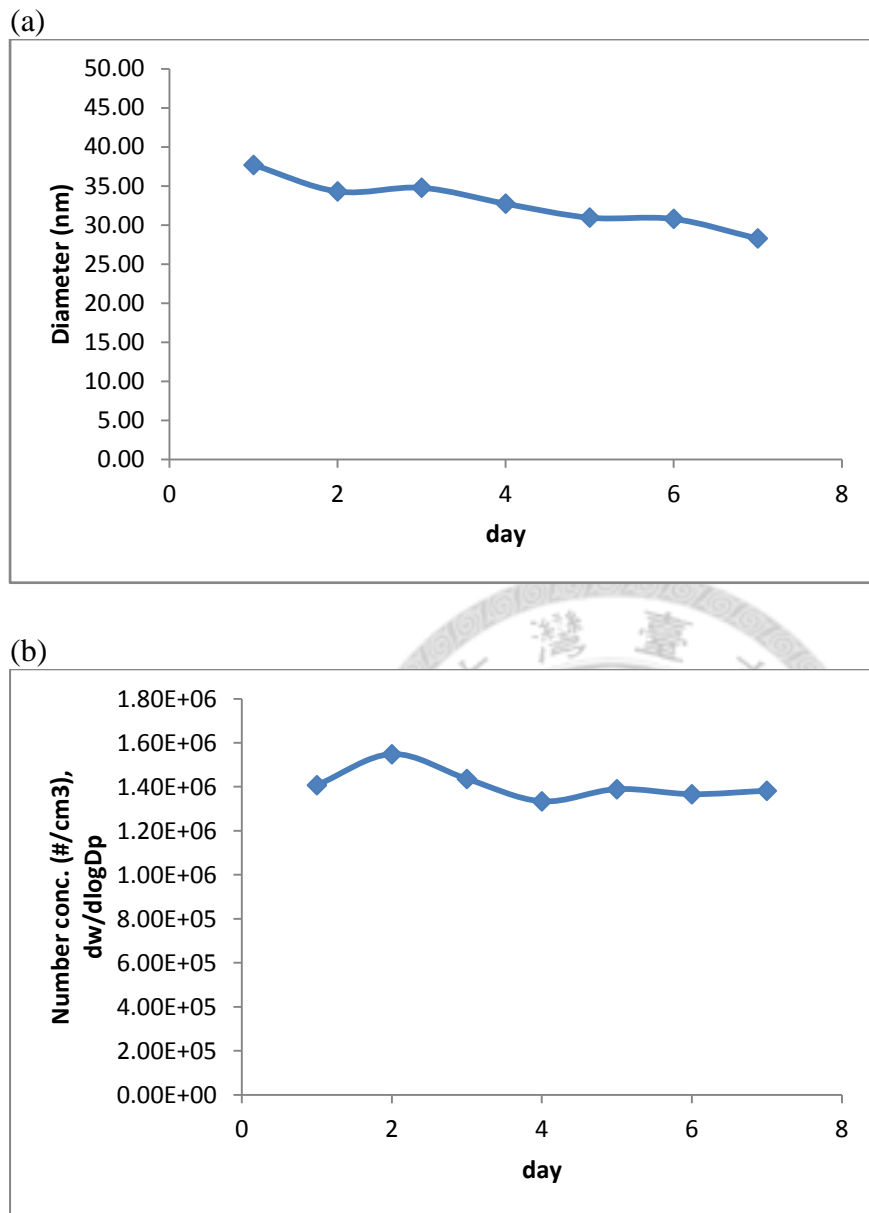
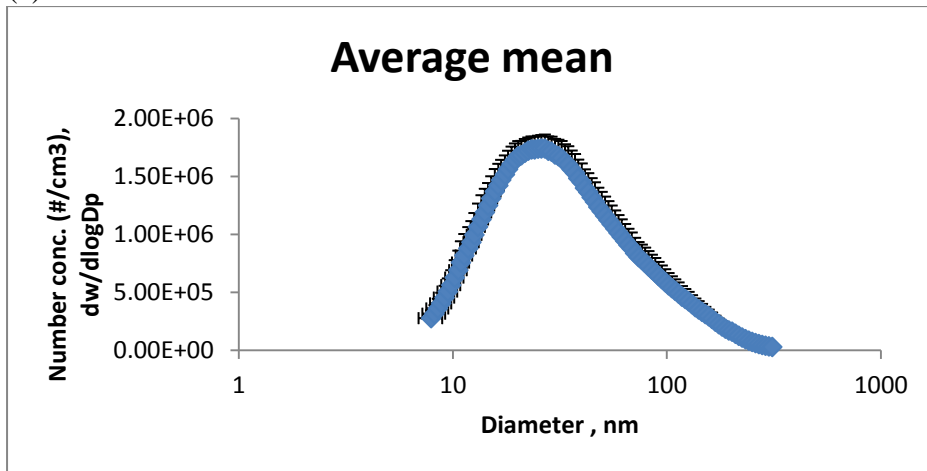
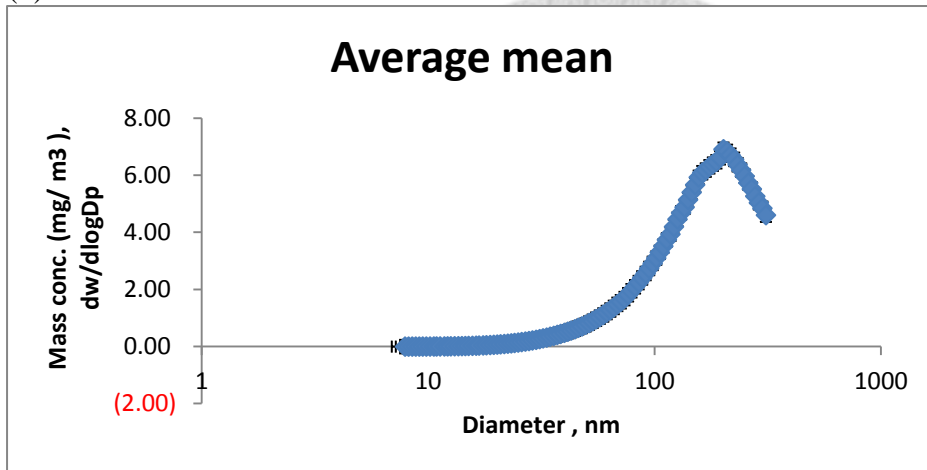


圖 2. 實驗期間奈米銀微粒產生系統穩定性
 (a)粒徑分布，(b) 數目濃度分布

(a)



(b)



(c)

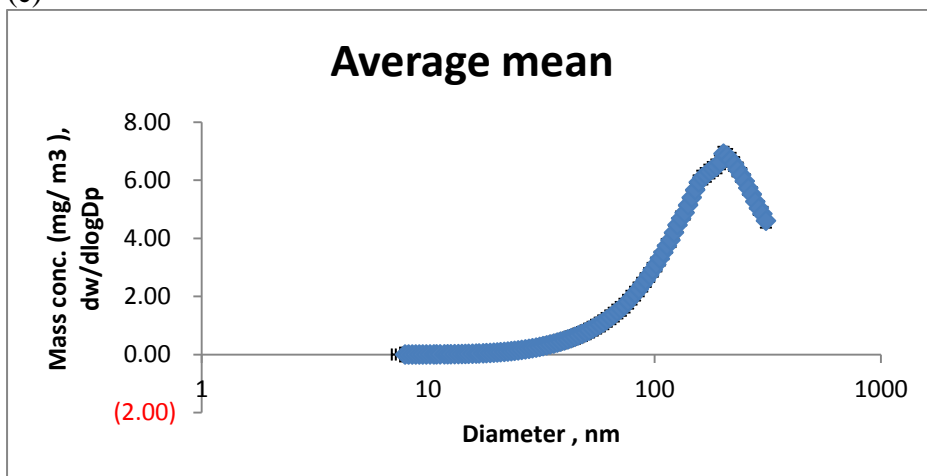
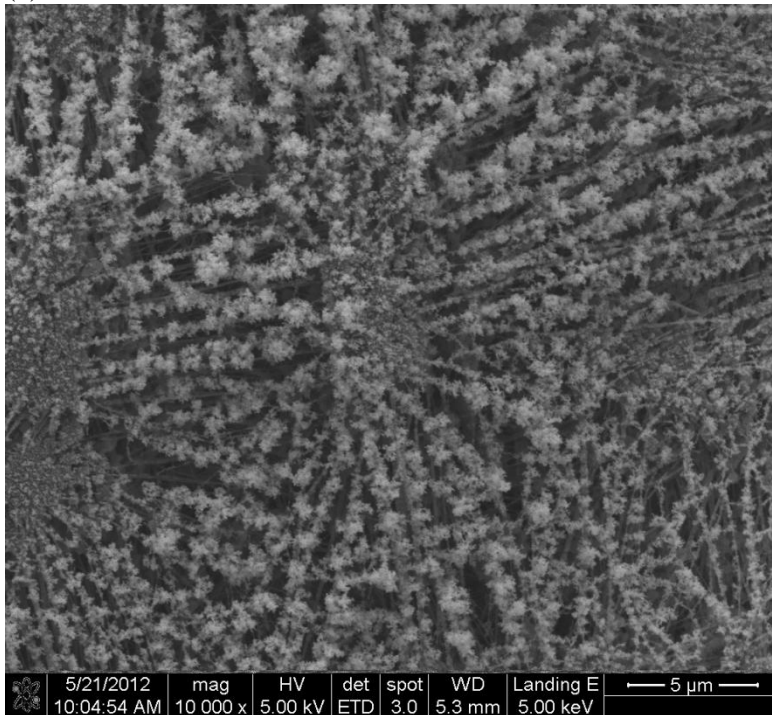


圖 3. 連續一週呼吸暴露期間之微粒平均暴露濃度
(a) 數目濃度，(b) 質量濃度，(c) 表面積濃度

(a)



(b)

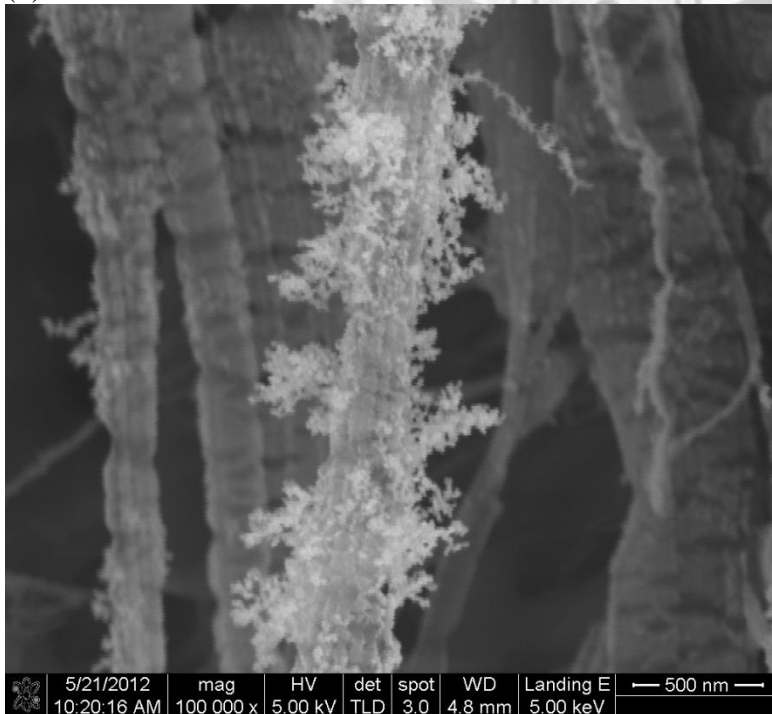


圖 4. 奈米銀微粒在掃瞄式電子顯微鏡(SEM)下觀察結果
(a)一萬倍倍率，(b)十萬倍倍率

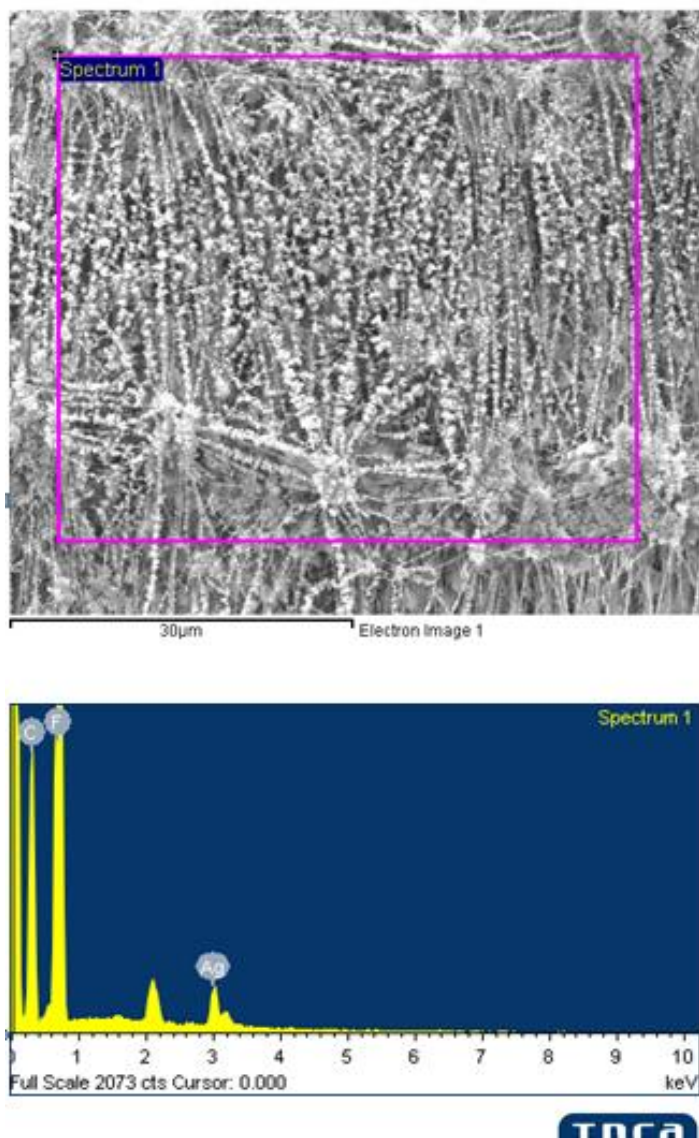


圖 5. 奈米銀微粒使用 X 光能譜散佈分析儀 (EDS)分析之元素成分結果

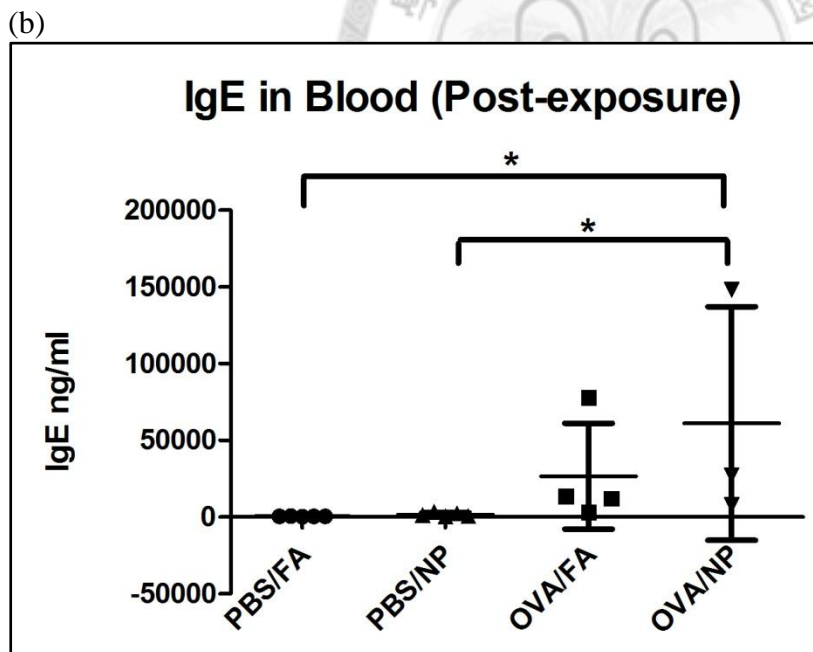
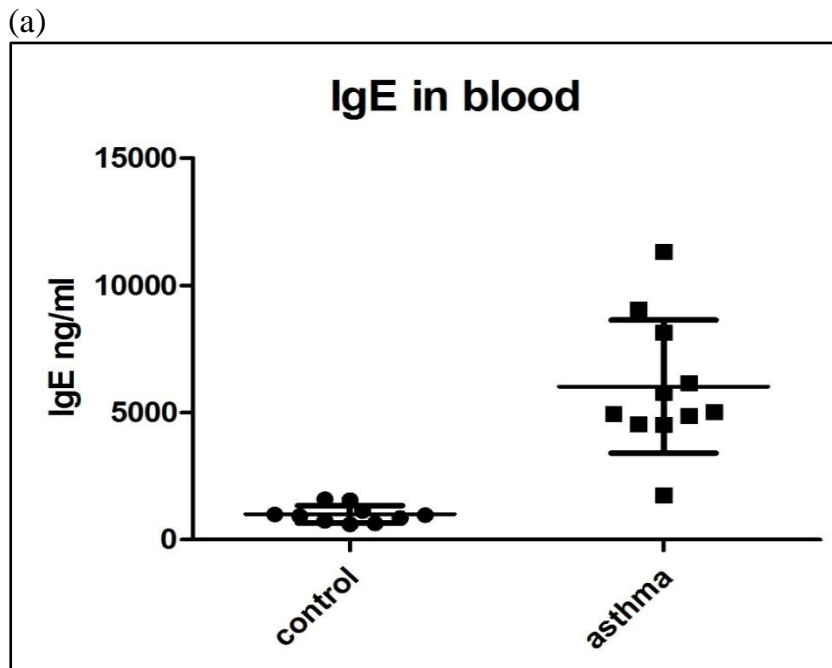


圖 6. 血液中免疫球蛋白 IgE 抗體濃度
(a)呼吸暴露前 (證明氣喘模式建立), (b)奈米銀微粒呼吸暴露後
* p-value<0.05
** p-value<0.01

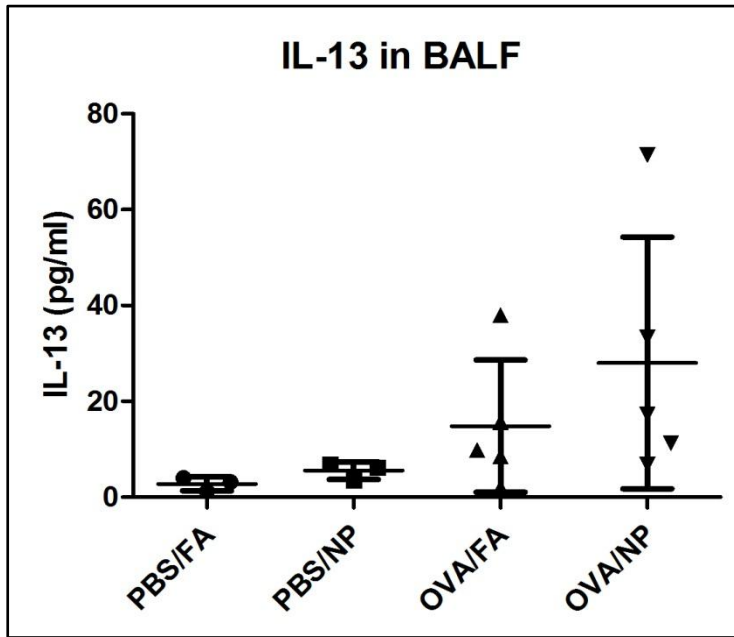


圖 7. 肺泡灌洗液中細胞激素 IL-13 濃度

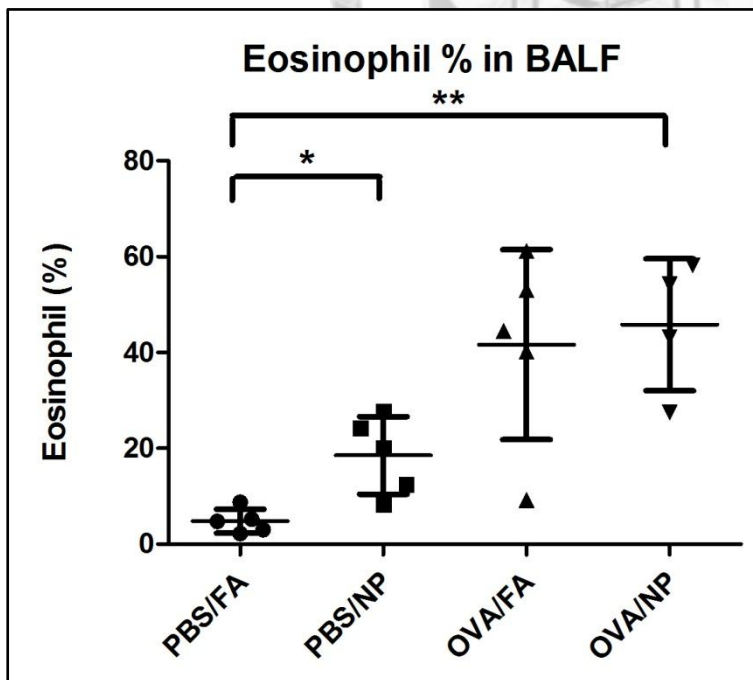


圖 8. 嗜酸性白血球在肺泡灌洗液中比率

* p-value<0.05

** p-value<0.01

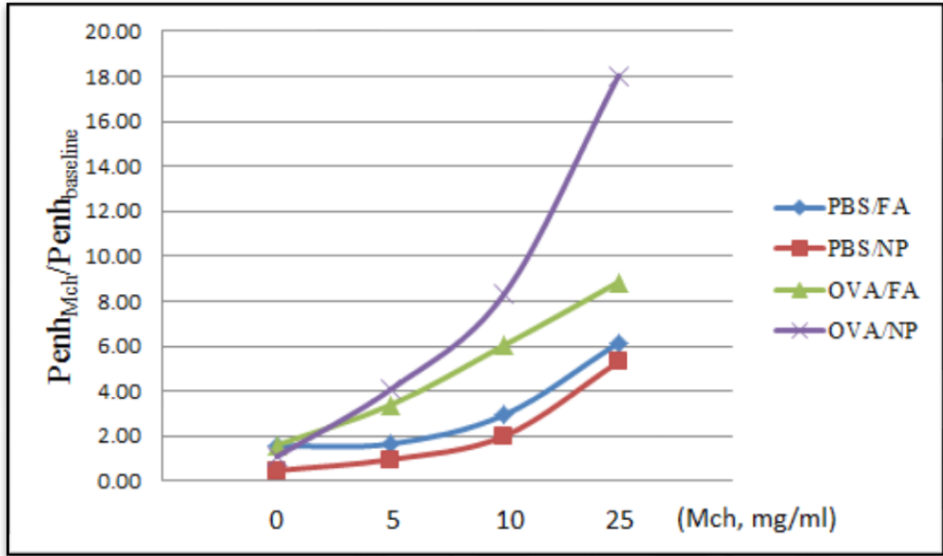


圖 9. 呼吸道阻力 AHR 之 Penh 值相對增加比例
*Mch : Methacholine



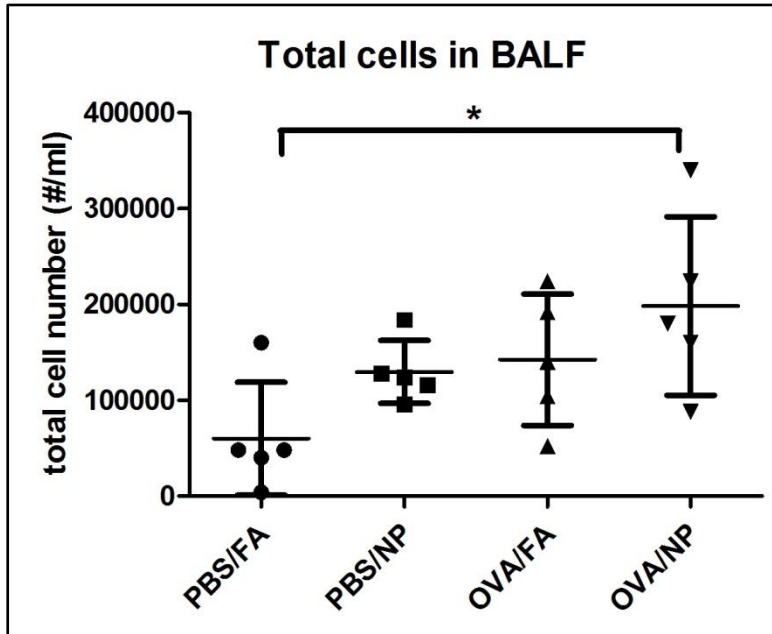


圖 10. 肺泡灌洗液中總死亡細胞數
* p-value<0.05

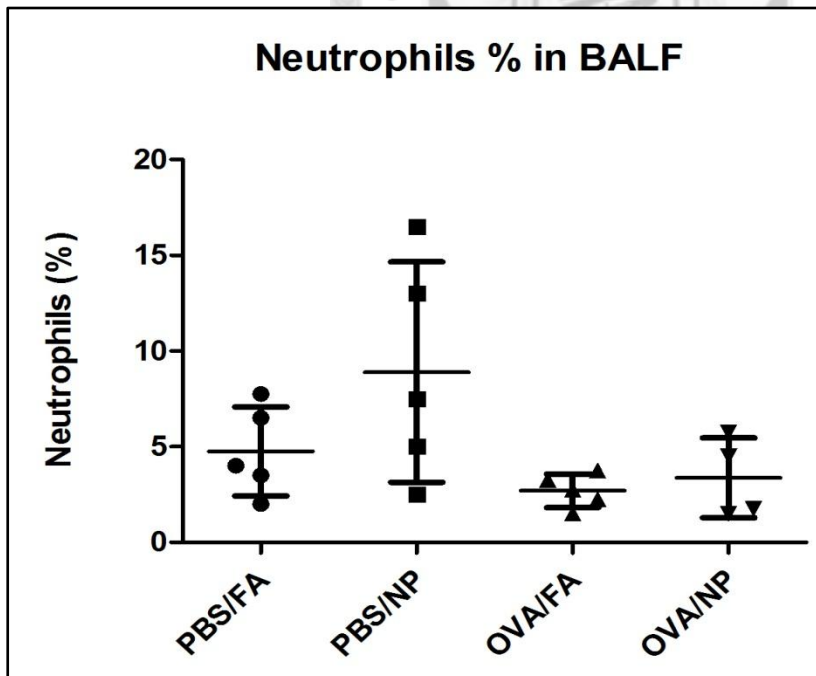


圖 11. 嗜中性白血球在肺泡灌洗液中比率

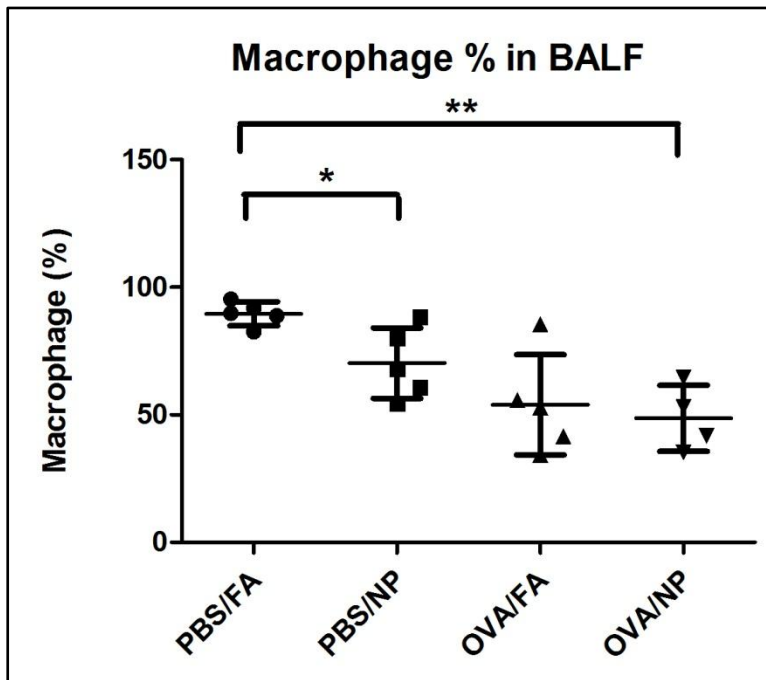


圖 12. 單核白血球在肺泡灌洗液中比率

* p-value<0.05

** p-value<0.01

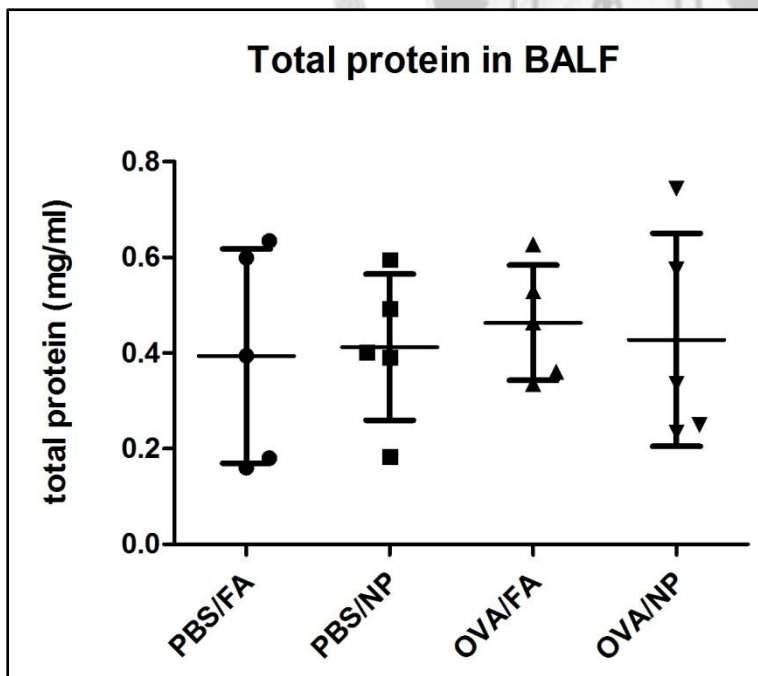
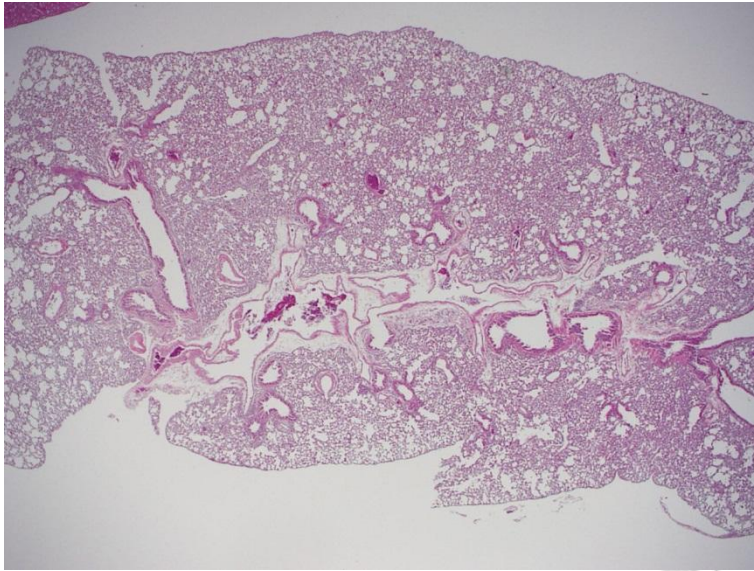


圖 13. 肺泡灌洗液中總蛋白濃度

(a)



(b)

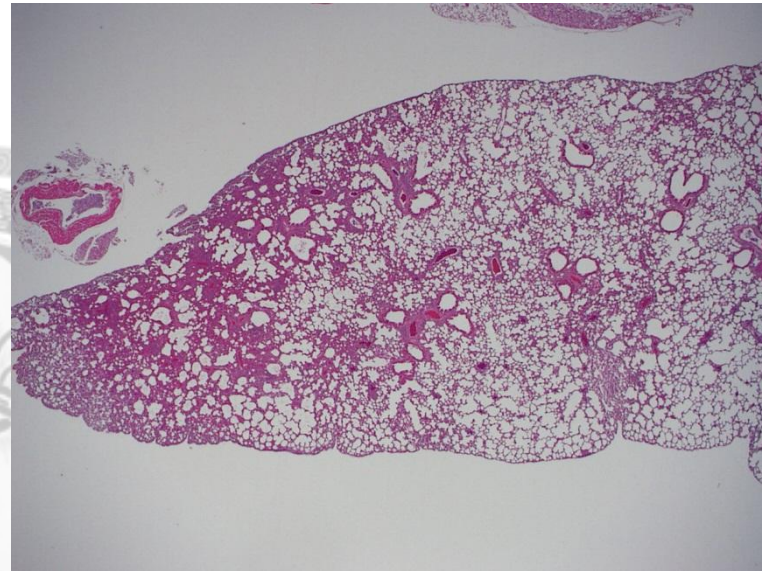
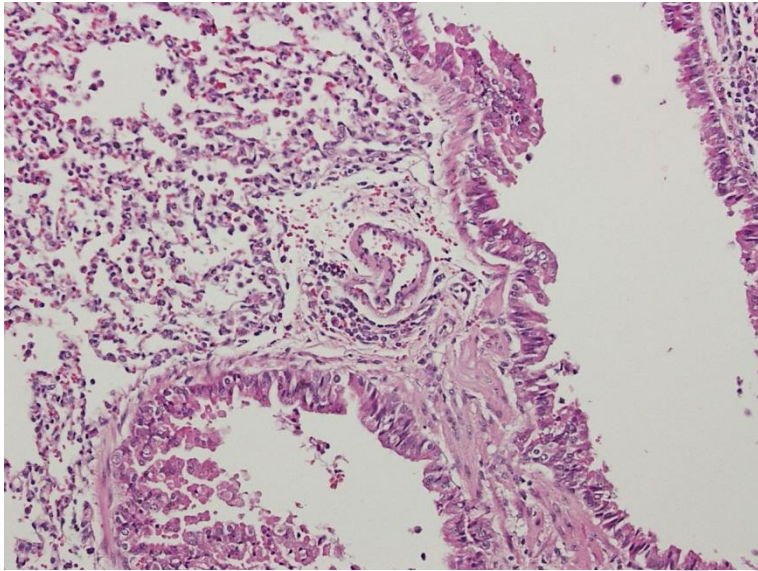


圖 14. PBS 健康組小鼠肺部組織切片(倍率為 20X)

(a) (b)分別為 PBS/FA 組及 PBS/NP 組

(a)



(b)

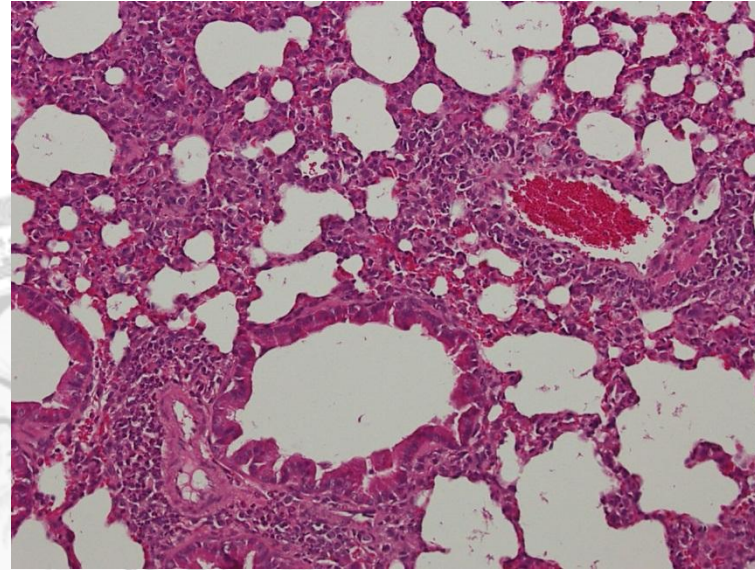
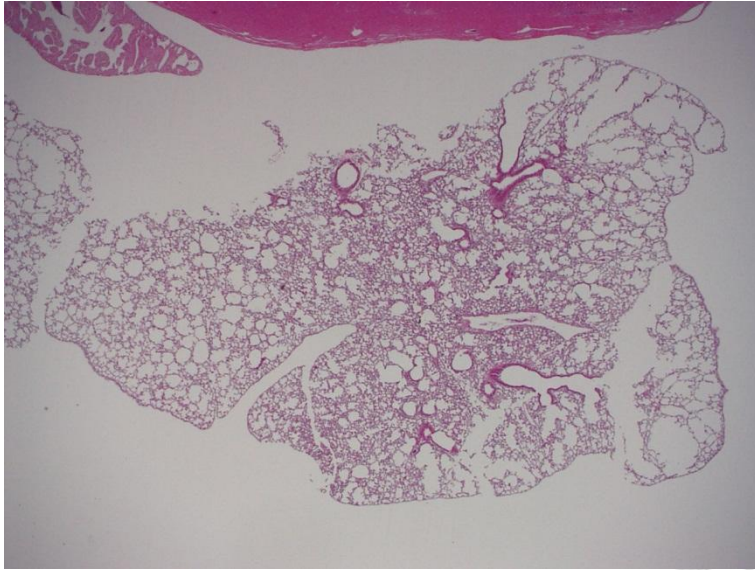


圖 15. PBS 健康組小鼠肺部組織切片(倍率為 200X)
(a) (b)分別為 PBS/FA 組及 PBS/NP 組

(a)



(b)

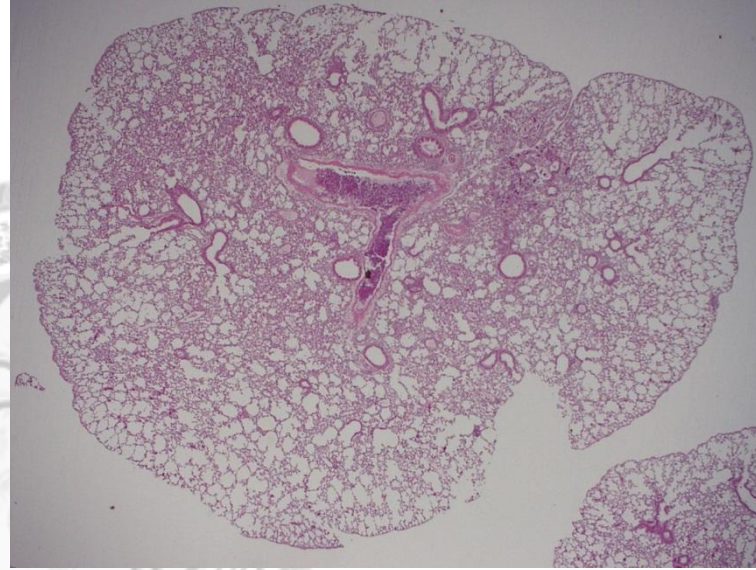
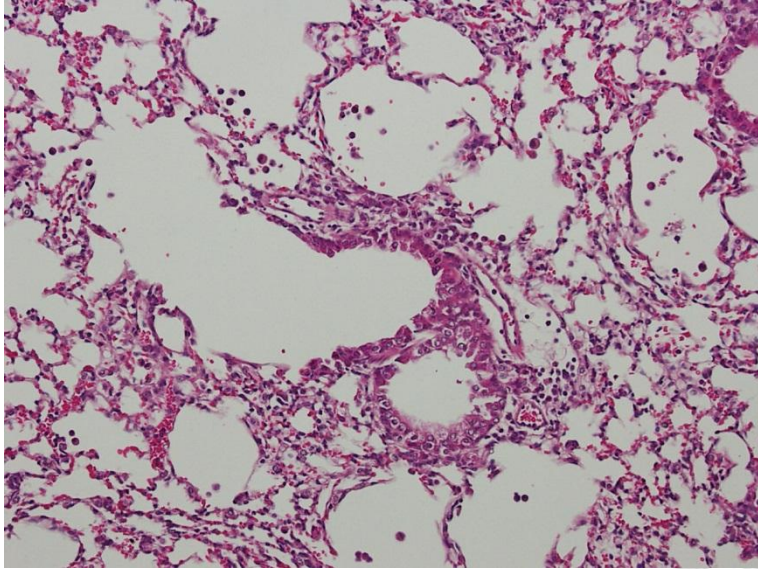


圖 16. OVA 氣喘組小鼠肺部組織切片(倍率為 20X)

(a) (b)分別為 OVA/FA 組及 OVA/NP 組

(a)



(b)

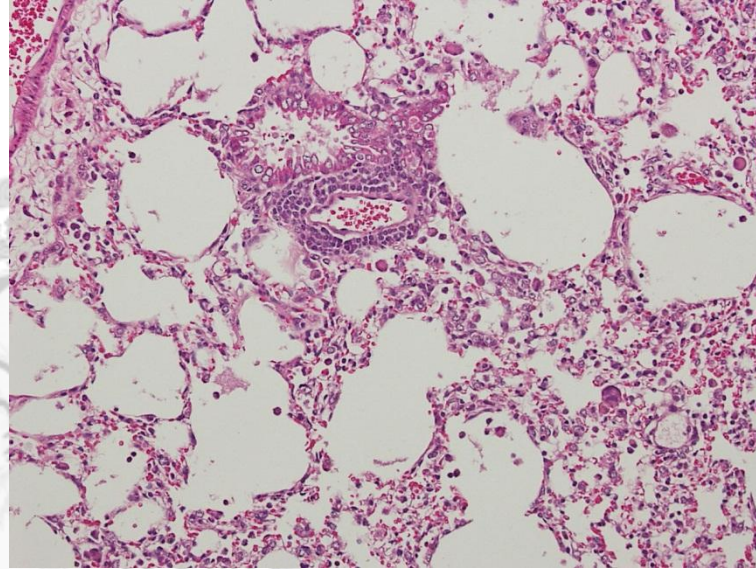


圖 17. OVA 氣喘組小鼠肺部組織切片(倍率為 200X)
(a) (b)分別為 OVA/FA 組及 OVA/NP 組