

健康食品之護肝保健功效評估方法

89 年 7 月 31 日衛署食字第 0890003826 號公告

92 年 8 月 29 日衛署食字第 0920401629 號公告修正

105 年 4 月 25 日衛署食字第 1031304063 號公告修正

肝臟是人體最大的器官，也是機能最複雜的代謝器官。肝臟在醣類、脂質、蛋白質、維生素、激素、膽汁等物質代謝中扮演重要作用；除此之外，肝臟還有分泌、排泄、生物轉化等方面的功能。肝細胞含有豐富的胜肽，並合成許多胜肽和某些凝血因子，儲存和釋放造血因子，參與血液凝固和造血過程。肝臟有解毒功能，對動物有重要保護作用。當肝功能損傷時會造成代謝障礙，並影響其他臟器的功能，嚴重則危及生命。肝臟具有肝動脈和門靜脈的雙重血液供應，並擁有大量血竇，肝細胞膜能直接與血液接觸，同時肝細胞膜的通透性又較大，故肝細胞與血液進行活躍有效的物質交換。很多有毒物質易引起肝細胞損傷，肝臟具有強大再生和代償能力，對輕度或局限性損傷往往不致造成肝功能障礙。肝臟對各種致病因子的反應方式，主要是肝實質細胞和星狀細胞增生與肝實質細胞的變性和壞死，以及肝間質的滲出和增生。當肝細胞壞死，而剩餘肝細胞再生的情況下，則發生纖維增生導致肝硬化。在肝硬化時使靜脈血流受阻，導致肝靜脈與門靜脈壓上升，促進肝內動靜脈吻合支（arteriovenous anastomosis）的形成，致使肝細胞供血減少，進而發生變性或壞死、纖維增生，形成惡性循環，肝硬化更加嚴重，甚至變成肝癌。當肝嚴重損傷，且代償能力顯著減弱時，則出現嚴重肝功能障礙稱肝功能不全，進一步發展則肝功能衰竭，引起中樞神經系統功能障礙，出現肝昏迷。

導致肝功能異常的可能原因包括病毒、酒精、自體免疫、遺傳、肝膽腫瘤或感染、藥物等。常見的肝臟疾病類型為脂肪肝（fatty liver）、肝炎、肝硬化（liver cirrhosis）及肝癌，嚴重者可危及生命。根據衛生福利部資料統計，肝癌是全球第三大致死癌症，在台灣近五年來則是徘徊在第一、二大之致死癌症。75-90% 肝癌的發生與慢性肝病如肝硬化、病毒性肝炎及脂肪肝等有極大之關聯性。根據 2005 年 Bataller 和 Brenner 在臨床調查期刊（Journal of Clinical Investigation）發表之文

獻回顧中提及肝纖維化 (liver fibrosis) 源自於慢性肝損傷的結果，且伴隨著細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 的堆積，而 ECM 堆積為許多不同類型肝病共同特徵。在工業化的國家，引起肝纖維化的原因主要有慢性 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染、酗酒及非酒精性脂肪肝。ECM 堆積形成的纖維傷疤造成肝臟結構的異常，而其後肝細胞再生衍生小結節，即定義為肝硬化。肝硬化因引發肝細胞的機能障礙與肝臟組織對血流的抗阻而造成肝功能不全與肝門脈高血壓。由於肝實質組織在崩解萎縮後，被富含膠原纖維組織取代，所以在組織學上，肝纖維化過去被認為是一種被動而不可逆的過程，目前則以損傷與癒合模式看待因慢性肝損傷造成的肝纖維化。早在 1970 年代即有臨床報告指出末期肝纖維化具有可逆的潛力。然而，直到 1980 年代肝星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC) 被發現是肝臟中主要產生膠原纖維的細胞後，肝纖維化方才逐漸受到關注。肝星狀細胞被稱為肝脂肪細胞、肝竇邊細胞或 Ito 細胞，在慢性肝病期間會被活化而獲得產生纖維的能力。

根據台灣肝病防治學術基金會調查發現脂肪肝已是台灣國人普遍的肝臟問題，罹患比率高達 40%，是國人嚴重的健康問題。脂肪肝的定義為肝細胞中脂肪含量高於 5%，以往需應用肝臟的切片診斷，因而不易發覺，近年來由於腹部超音波為非侵入性檢查，加上以超音波診斷脂肪肝的準確度高而逐漸普及，現今已有以腹部超音波診斷取代肝臟切片之趨勢。臨床統計，國人脂肪肝的盛行率約在 21~25% 之間，遠高於 B 型肝炎的 15 ~ 20% 及 C 型肝炎之 2 ~ 4%，現今已知造成脂肪肝的可能原因包括肥胖、高三酸甘油酯血症、血糖代謝異常（如糖尿病）、飲酒、C 型肝炎及藥物所導致等六大因素，前三者皆與肥胖有關，後三者則屬於酒精性、病毒性及化學藥品所引發的脂肪肝。有 76.3% 體重過重者患有脂肪肝，且其嚴重程度與肥胖息息相關，所有重度脂肪肝的患者，體重都過重，中度脂肪肝患者則有近八成體重過重。此外，脂肪肝罹患率亦和飲酒頻率具顯著相關性。脂肪肝雖然不會對生命造成立即危害，不過卻是健康的一個重要警訊，酗酒、肥胖及高血脂等都是造成脂肪肝的危險因子，若未及時改善或治療，可能進而造成肝硬化、肝癌或引發心臟或腦血管等併發症。

脂肪肝，顧名思義就是肝臟有過多的脂肪堆積。正常的肝臟中，脂質所佔重量應低於肝臟總重量之 5%，可能的機制包括肝細胞合成過多的脂肪酸或血液中的脂肪酸運送至肝臟，肝細胞無法代謝三酸甘油酯以及過多醣類運送至肝臟被大量轉成三酸甘油酯儲存等。而堆積過多脂肪酸在超音波下常呈現白亮的影像，很容易和正常的肝臟或肝臟旁邊的腎臟對比而區分出來，除超音波外，電腦斷層（CT）也很容易因肝臟顯像度降低而被診斷出來。脂肪肝屬於慢性肝病，只要針對原因加以控制與治療，便可使傷害降到最低或完全痊癒。肥胖而且有脂肪肝的患者若成功予以減肥，以超音波掃描可見其脂肪肝之嚴重度明顯減輕，甚至連 aspartate aminotransferase/alanine amino- transferase（AST/ALT）值也降至正常範圍內。而糖尿病與高三酸甘油酯血症之血糖與血脂控制亦能使患者之脂肪肝減輕。酒精性脂肪肝（alcoholic fatty liver disease, AFLD）則需控制飲酒及攝取均衡飲食以減緩之。

不同的病因會使肝臟發生不同程度的病變或損傷，影響的性質與程度也可能有所不同。本評估方法列舉 5 項不同（四氯化碳、乙醯胺基苯酚、硫代乙醯胺、酒精液態飼料、高脂飼料）誘導肝臟產生病變的動物試驗模式，若有食品能減少該病變危害風險，宣稱其功效時需同時註明其誘導方法與病變型態，以區別其差異性。

壹、針對四氯化碳誘導化學性肝損傷

一、前言

本評估方法主要是以四氯化碳（ CCl_4 ）誘導大鼠慢性肝損傷的實驗模式，探討不同試驗樣品之處理對於大鼠慢性肝損傷之影響。四氯化碳誘導肝損傷之原理，主要是因四氯化碳受肝微粒酵素活化成三氯甲烷自由基，然後與蛋白質結合導致蛋白質合成受阻，並引起脂質分解代謝失調，造成肝細胞內三酸甘油酯蓄積，另外三氯甲烷自由基形成過氧化物，導致脂質過氧化而使得肝細胞膜損傷，造成肝中酵素滲出及細胞病變而壞死。

二、實驗項目與實驗方法

（一）執行單位與執行人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與肝臟生理代謝相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗必須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

(二) 實驗設計：

建議實驗動物採用雄性 SD 或 Wistar 大鼠，起始體重約 250 克，每組至少 8 隻。動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。動物之飼養宜在恆溫 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，避免誤差值過大。本評估試驗之實驗組別應包括 1. 正常對照組：攝取正常飲食；2. 負控制組：動物給予 CCl_4 處理，攝取正常飲食；3. 試驗組：動物給予與負控制組完全相同之 CCl_4 處理，並分別另給予 2 種以上不同劑量之試驗樣品，其中一組的劑量必須相當於人體的建議攝取量，且於 CCl_4 誘導肝損傷前一星期即開始給予試驗樣品。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

1. 試驗方法：

本評估方法係採 Lin 等人 (1993) 之以 CCl_4 誘導大鼠產生慢性肝損傷的實驗模式，本方法中之 CCl_4 使用劑量僅供參考。實驗前將大鼠依體重以逢機法平均分配至各組，動物至少分成 4 組，每組至少 8 隻：

- (1) A 組為正常對照組：於腹腔 (intraperitoneal, I.P.) 注射或經口 (peroral, per os, P.O.) 管餵橄欖油或玉米油 + 去離子水 (P.O.)；
- (2) B 組為負控制組 (肝損傷組)：以 I.P. 注射 (40% CCl_4 ／橄欖油或玉米油) 或經口管餵 (20% CCl_4 ／橄欖油或玉米油) + 去離子水 (P.O.)，劑量如試驗步驟所建議；
- (3) 試驗組至少 2 組 (C、D 組)，視實驗設計需要可再增加組別：I.P. 注射 (40% CCl_4 ／橄欖油或玉米油) 或 P.O. 灌食 (20% CCl_4 ／橄欖油或玉米油) + 2 種以上不同劑量之試驗樣品 (P.O.)，其中之一劑量須與換算的人類建

議攝取量相同。

2. 試驗步驟：

A 組腹腔注射橄欖油或玉米油 (0.1 mL/100 g bw) 或管餵橄欖油或玉米油 (0.5 mL/rat); B~D 組腹腔注射 40% CCl₄/橄欖油或玉米油 (0.1 mL/100 g bw) 或管餵 20% CCl₄/橄欖油或玉米油 (0.5 mL/rat), 每週 2 次 (相隔 3-4 天), 於肝炎誘導 1 小時後管餵試驗樣品, 以減少藥物與樣品互相影響。A、B 組每日管餵去離子水, C、D 組則於 CCl₄ 誘導肝損傷前 1 星期開始每日給予試驗樣品 (前後共為期 9 週)。

所有實驗動物分別於 CCl₄ 誘導肝損傷開始的前 1 週、第 0 週、第 1、3 及 6 週進行採血, 採血前 8~12 小時禁食, 並於投予試驗樣品或去離子水後 4 小時, 以尾部採血方式檢測肝臟的生化功能: AST (GOT)、ALT (GPT)、三酸甘油酯 (TG)、膽固醇、白蛋白。最後於 CCl₄ 誘導肝損傷第 8 週結束時, 秤重後全部犧牲, 可從頸動脈、心臟或腹大動脈採血檢驗肝臟生化功能, 並剖腹取肝臟標本, 秤重後從最大右葉肝割取 2-3 塊 1 公分見方之組織塊, 固定於 10% 的中性福馬林 (formalin) 液中, 再以石蠟包埋、切片、貼附在載玻片上後, 分別進行蘇木紫-伊紅染色 (haematoxylin-eosin stain, H&E stain)、膠原蛋白的特殊染色, 如 Masson's trichrome 染色或其他適合之染色方法染色, 以進行病理學觀察。另外將其餘肝臟進行抗氧化成分 GSH, 以及 GPx、GRd、SOD、catalase 等酵素活性之檢測。

3. 實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

以管灌 (gavage feeding) 方式給予受試樣品時, 一般的認知, 身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性, 明顯超過與其體重之相關性。然而, 要精確測量其體表乃非常不易, 而即使在同一物種 (species) 內之體表, 其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算, 且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異, 因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性; 或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers），而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量（/kg bw/d）的 6.2 倍作為大鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來源。

（三）實驗測定項目：

在進行相關成分或酵素活性之分析方面：測定時，可參考以下建議之方法，亦得使用有學理根據之適當方法或具公信之市售套組進行分析。

1. 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

- （1）AST (GOT)
- （2）ALT (GPT)
- （3）TG
- （4）膽固醇
- （5）白蛋白

2. 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

- （1）Glutathione (GSH)
- （2）Glutathione peroxidase (GPx)
- （3）Glutathione reductase (GRd)
- （4）Superoxide dismutase (SOD)
- （5）Catalase (CAT)
- （6）TG

(7) 膽固醇

(四) 肝功能生化指數的檢測：

所採之大鼠血液樣品在室溫下放置約 1 小時，使其凝結，再利用冷凍離心機於 4°C 下以 $14,000 \times g$ 離心 5 分鐘，分離出血清。再以血液自動生化分析儀檢測肝功能生化指數，包括 AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇 cholesterol 等，其中 AST (GOT) 及 ALT (GPT) 檢測原理是依據 Reitman 與 Frankel (1957) 及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986) 的標準方法。並進行肝臟抗氧化功能相關之成分或酵素活性之分析如下。另必須測定肝臟 TG、膽固醇、肝重/體重 (%) 等肝臟脂肪堆積指標。

1. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 濃度之分析

參考 Reed 等人 (1980) 的方法。取肝組織約 0.3 克，加入 9 倍 (v/w) 的 50 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，均質 1 分鐘，得肝組織均質液樣品。肝組織均質後，迅速取均質液 400 μ L 加入等量 10% 過氯酸 (perchloric acid, PCA) 混合後，靜置 40 分鐘，使 PCA 能將樣品中還原態麩胱甘肽 (GSH) 充分溶出後，於 4°C 下，以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液待測。至於沉澱部分則加入 1 mL 1N NaOH 溶解，再移液至微量離心管中以分析蛋白質。另取 8.5 mg 之還原態麩胱甘肽及 7.2 mg 之氧化態麩胱甘肽所製備好的標準品與上述所得之樣品各 400 μ L，加入 40 μ L 碘乙酸 (iodoacetic acid, IAA: 100 mM)，使還原態麩胱甘肽與 IAA 結合後，給予還原態麩胱甘肽多攜帶一負電荷，以便在高效能液相層析儀 (HPLC) 分析中能比 GSSG 早分離出來；再緩慢加入碳酸氫鉀 (KHCO_3) 直到不再起泡為止，此時已中和酸而成微鹼性，以便可在 HPLC 中分析。然後置於暗處 15 分鐘後，再加入 440 μ L 3% 2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluorobenzene, FDNB) 振盪混合使與硫元素反應成黃色物質，而此黃色物質可在紫外光偵測器 (UV detector, $\lambda=365 \text{ nm}$) 中被偵測出來。之後經 8 小時的冷藏，再以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液並以注射筒過濾器 (syringe filter: 4 mm filter unit, 0.45 μ m Nylon) 濾除雜質。最後以高效能液相層析儀進行分析。

2. 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性分析

此酵素之分析主要是依據 Lawrence 與 Burk (1976) 所發表之方法。活性測定係以過氧化氫 (H_2O_2) 為受質。還原態麩胱甘肽 (GSH) 經由麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 之催化可將過氧化氫還原，而還原態麩胱甘肽則變成氧化態麩胱甘肽，然後氧化態麩胱甘肽則利用麩胱甘肽還原酶 (GRd) 與 NADPH 將其還原回還原態麩胱甘肽。取肝組織均質液樣品 5 μL 及 95 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，加入 0.8 mL 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 之反應混合液 (含 1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/mL GRd 及 1 mM GSH)，在室溫下靜置 5 分鐘，再加入 0.1 mL 2.5 mM 過氧化氫後，以分光光度計在 340 nm 下測 3 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少之速率，間接求出麩胱甘肽過氧化酶的活性，而以去離子水 5 μL 當作空白組。本活性 (specific activity) 測定以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

3. 麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase, GRd) 活性分析

麩胱甘肽還原酶活性分析是依據 Bellomo 等人 (1987) 的方法。分析時取 10 μL 肝組織均質液樣品及 90 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 加入 0.9 mL 含有 1.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，再以分光光度計在 340 nm 下測 5 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少的速率，其中以 10 μL 之去離子水作為空白組。本活性 (specific activity) 測定以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

4. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性分析

實驗參照 Marklund 與 Marklund (1974) 所描述之方法進行，將肝組織用冰生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 M sucrose、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 打碎使成 10% 之均質液 (homogenate)。高速離心 30 分鐘 ($13,600 \times g$)，取上清液 50 μL ，再加上 Tris-cacodylic acid buffer (pH 8.2, 50 mM) 100 μL 。溶液再加上超純水，使體積成為 980 μL ，再加上鄰苯三酚 (pyrogallol) 20 μL (0.2 mM)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於 420 nm 測量吸光值 (A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量

5 分鐘，計算 $\Delta A/\Delta T$ 。分析過程中以 SOD 標準品，作出標準曲線 (standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50% 時之酵素量，定為一單位 (U)；肝組織 SOD 活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單位量表示 (U per milligram of protein)。

5. 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性分析

實驗參照 Aebi (1984) 所描述之方法進行。將肝組織用冰生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成 10% 之均質液 (homogenate)。離心 ($700 \times g$) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1%) 成為儲備均質液 (stock homogenate, S.H.)。取 S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼值至 pH 7 成為稀釋均質液 (dilute homogenate, D.H.)。取 D.H. 2 mL 加入 1 mL H_2O_2 (0.03 M)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於溫控 $25^\circ C$ 、波長 240 nm 之條件下測量吸光值 (A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = (2.3/\Delta t) \log(A1/A2)$$

Δt : 時間間隔 (15 秒鐘)；

A1: T1 時段，樣品之吸光值-空白吸光值；

A2: T2 時段，樣品之吸光值-空白吸光值。

肝組織 CAT 活性：以每單位蛋白質所含反應速率 K 表示之 (K/mg protein)。

6. 蛋白質濃度之測定

實驗參照 Lowry 等人 (1951) 之方法進行。取適量蛋白質樣品，並以 1 N NaOH 調整使其最終體積為 100 μL ，加入 200 μL 去離子水及 100 μL 反應混合液 (25% Na_2CO_3 : 2% Na-K-tartarate : 1% $CuSO_4$ = 8 : 1 : 1, v/v/v)，然後在室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 mL Folin reagent (Folin : H_2O = 1 : 19.5, v/v) 後於 $37^\circ C$ 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以 660 nm 下測其吸光值 ($25^\circ C$)。然後將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

(五) 組織病理切片觀察：

在 8 星期試驗結束時，將所有大鼠均予以犧牲，採血後，將最大右葉肝臟割取一塊約 1 公分見方的組織塊，放入 10% 的中性福馬林中固定，做進一步的病理切片與染色。進行 H&E 染色以觀察肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等慢性肝損傷變化；亦可做膠原蛋白的特殊染色，例如 Masson's trichrome 染色或其他適合之染色方法，以便評估肝纖維化程度。

進行慢性肝損傷之組織病理學的比較時，可採用 Jonker 等人 (1992) 的半定量方法，測定肝細胞發炎的程度、脂質變性、肝細胞壞死及膽管增生等慢性肝損傷。評估分數是由 "0" 到 "4" 分，其中 "0" 代表沒有 (absent)；"1" 代表少量 (trace)；"2" 分代表輕微 (weak)；"3" 分代表中等程度 (moderate)；"4" 分代表極嚴重 (strong)。而對肝纖維化的半定量分析，則可以依據 Ruward 等人 (1989) 及 Gabriele 等人 (1997) 的方法，將肝纖維化區分為以下五個等級："0" 分代表正常肝組織、沒有任何肝纖維化；"1" 分代表有膠原的增生，但沒有形成中隔 (在中央靜脈或門脈區有放射狀纖維增生)；"2" 分代表在中央靜脈和門脈區二者間，形成不完全的中隔 (此中隔彼此沒有交會)；"3" 分代表形成完整的中隔，中間彼此交會，並將肝實質分割成許多節片斷，但此中隔尚很薄；"4" 分代表形成完全的中隔，且中隔變厚，亦即完全的肝硬化。

另外，為了避免觀察時主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行病理染色。至於病理的半定量分析之評估，則應由獸醫病理醫師，在不清楚本實驗設計的情況下進行單盲判讀，對所有切片進行評分比較，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。病理切片之照片應提供高解析度之彩色圖檔；照片應統一以中央靜脈 (central vein, CV) 或門靜脈 (portal vein, PV) 為中心拍照，若為各組之間的比較，顯微鏡的放大倍率須一致。

1. 組織包埋和切片

將最大右葉肝割取的約 1 公分見方的組織塊，置入 10% 的中性福馬林中固定其組織形態及結構，接著以不同濃度之乙醇 (30、50、70、95、99.5%) 與二甲苯 (xylene) 進行脫水與透明化化步驟，再以熱石臘溶液取代二甲苯，最

後將組織以石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成 5 μm 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於 37°C 烘乾後用做進一步的病理染色。

2. 蘇木紫－伊紅 (haematoxylin-eosin, H&E) 染色法

將肝臟組織切片置入二甲苯 30 分鐘脫蠟，再依序置於 99.5、95、70、50 及 30% 之乙醇各 30 分鐘以進行復水，最後浸泡於蒸餾水 10 分鐘後即可進行染色。首先浸泡蘇木紫 30 秒染細胞核，再用蒸餾水清洗數分鐘，接著使用伊紅染色 2-5 分鐘，再用蒸餾水清洗數分鐘。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50、70、95 及 100% 乙醇各 2 次，每次 30 秒，再以二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

3. Masson's trichrome 染色法

切片先經二甲苯的脫蠟和酒精復水後，將處理過的切片放在 Bouin 氏溶液中固定 7 分鐘，然後水洗約 10 分鐘至切片上黃色消失，再將切片以 Weigert's iron hematoxylin 溶液染色 10 分鐘，用溫的流水洗 10 分鐘，再用蒸餾水稍沖洗切片；再以 Biebrich scarlet-acid fuchsin solution 染 7 分鐘，用蒸餾水稍沖洗切片，用 phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution 染 5 分鐘，用蒸餾水稍沖洗，再用 aniline blue solution 染 5 分鐘，以作對比染色，用蒸餾水再稍沖洗之，置於 1% acetic acid solution 染 3 分鐘，後用蒸餾水稍沖洗切片。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50% 乙醇中 30 秒、70% 乙醇中 30 秒、95% 乙醇中 20 秒、100% 乙醇中 20 秒、100% 乙醇中 30 秒，再用二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

(六) 實驗數據統計分析：

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)。本評估方法必須進行組間的統計比較分析，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's

multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

三、評估方法之測定項目原則

(一) 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必測：AST (GOT)、ALT (GPT)

選測：TG、膽固醇、白蛋白

(二) 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

必測：Glutathione (GSH)、Glutathione peroxidase (GPx)、Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT)、TG、膽固醇

選測：Glutathione reductase (GRd)

(三) 病理切片觀察

必測：H&E 染色

下列三染色法選一必測：

1. Masson's trichrome 染色法

2. Sirius red 染色法

3. 銀染色法 (silver stain)

(四) 必測：記錄慢性實驗期間動物每週體重、肝重/體重(%)、死亡率及其他相關之測定項目。

四、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值，病理切片觀察結果，並加上其他相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，加以綜合評估判斷。

五、宣稱、廣告與產品標示

受試產品進行以本評估方法推薦之試驗方法，且獲得明確之有效結果時，得向

健康食品之護肝保健功效評估方法

中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的「經動物實驗，攝取本產品有助於延緩四氯化碳誘導之化學性肝損傷或降低其危險因子」或其他相近具科學依據的詞句之宣稱、廣告或產品介紹。

貳、針對常用止痛藥物乙醯胺基苯酚誘導化學性肝炎損傷

一、前言

乙醯胺基苯酚 (*N*-acetyl-*p*-aminophenol, APAP)，為常見解熱鎮痛藥物成分，過量使用會造成肝腎損傷。根據美國 1998-2007 年統計，乙醯胺基苯酚使用過量是急性肝衰竭病患最主要病因，而其代謝主要是經由肝臟解毒酵素系統，主要包括三部分：(1) 經由 Phase II 解毒酵素 sulfotransferase 行 sulphation 代謝成 APAP-sulfate 的型式，此作用佔 APAP 解毒代謝 30%；(2) 經由 Phase II 解毒酵素 UDP-glucuronosyltransferase 行 glucuronidation 代謝成 APAP-glucuronide 的型式，此部分佔 APAP 解毒代謝 55%。APAP-sulfate 與 APAP-glucuronide 親水性較高，可經由尿液或膽汁排出體外；(3) 其餘的 15% APAP 經由 Phase I 解毒代謝，為 cytochrome P450 酵素群的氧化作用，主要酵素為 CYP2E1，其次為 CYP1A2、CYP2A6 與 CYP3A4。一般在 APAP 安全劑量下，APAP 經 CYP2E1 代謝後，形成具肝毒性之代謝產物 NAPQI (*N*-acetyl-*para*-benzoquinone imine) 只佔少數，並且可以利用 Phase II 解毒酵素 glutathione *S*-transferase 與 GSH 結合形成不具毒性的代謝產物 APAP-glutathione，再代謝成 mercapturic acid、APAP-cysteine 與 APAP-NAC 等型式由尿液排除。但若服用高劑量 APAP 時，Phase II 代謝路徑會達飽和，增加 CYP2E1 的氧化作用，代謝出大量的 NAPQI，細胞內 GSH 耗盡，累積在肝臟中的 NAPQI 進一步與細胞質或粒線體中的蛋白質結合或共價修飾，而造成 mitochondrial permeability transition (MPT)，改變滲透性使粒線體膜去極化，並形成粒線體內膜的孔洞，氧化磷酸化受阻而無法製造能量 (ATP)，同時也使得粒線體內粒子釋放出來，造成粒線體腫脹破裂。因此，隨著 MPT 作用，粒線體釋放出超氧化物 (superoxide)，經超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 作用生成過氧化氫 (hydrogen peroxide)，則會將 APAP 氧化成 semiquinone 自由基的形式，可能更增加超氧化物所造成之毒性作用。

本評估方法採用 400 mg/kg bw 劑量之 APAP 誘導雄性 BALB/c 小鼠產生慢性肝炎損傷，其第一週血液生化值 ALT (GPT) 與 AST (GOT) 之參考值為 150-450

IU/L，且因其肝臟組織病理切片符合人類病理進展，所以此 BALB/c 小鼠實驗模式可作為健康食品護肝保健功效之評估方法。BALB/c 小鼠血液正常生化數值：ALT 為 53.30 ± 3.57 IU/L；AST 為 104.94 ± 20.14 IU/L。

二、實驗項目與實驗方法

（一）執行單位與執行人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與肝臟生理代謝相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗必須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

（二）實驗設計：

建議實驗動物採用雄性 BALB/c 小鼠，起始體重約 20~25 克，每組至少 10 隻。動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。動物之飼養宜在恆溫（ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，避免誤差值過大。本評估試驗之實驗組別應包括：1.正常對照組：攝取正常飲食；2.負控制組：動物給予 APAP 處理，攝取正常飲食；3.正控制組：同負控制組，並另加 N-acetylcysteine (NAC) 治療處理；4.試驗組：動物給予與負控制組完全相同之 APAP 處理，並分別另給予 2 種以上不同劑量之試驗樣品，其中一組的劑量必須相當於人體的建議攝取量，且於 APAP 誘導肝損傷前一星期即開始給予試驗樣品。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

1. 試驗方法：

本評估方法係採以 APAP 誘導小鼠產生慢性肝損傷的實驗模式，本方法中之 APAP 使用劑量僅供參考。實驗前將小鼠依體重以逢機法平均分配至各組，動物至少分成 5 組，每組至少 10 隻：

（1）A 組為正常對照組：腹腔（intraperitoneal, I.P.）注射生理食鹽水 + 經口

(peroral, per os, P.O.) 管餵去離子水；

(2) B 組為負控制組 (肝損傷組)：400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 去離子水 (P.O.)；

(3) C 組為正控制組：400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 600 mg NAC/kg bw (P.O.)；

(4) 試驗組至少 2 組 (D、E 組)，視實驗設計需要可再增加組別：400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 2 種以上不同劑量之試驗樣品 (P.O.)，其中之一劑量須與換算的人類建議攝取量相同。

2. 試驗步驟：

A 組腹腔注射生理食鹽水 (0.6 mL/30 g bw)；B~E 組腹腔注射 400 mg APAP/kg bw (0.6 mL/30 g bw)，每週 2 次 (相隔 3-4 天)，於肝炎誘導 1 小時後管餵試驗樣品或 NAC，以減少藥物與樣品互相影響。A、B 組每日管餵去離子水；C 組每日管餵 NAC (600 mg/kg bw)，在 D、E 組則於 APAP 誘導肝損傷前 1 星期開始每日給予試驗樣品 (前後共為期 9 週)。

所有實驗動物於 APAP 誘導肝損傷開始的前 1 週、第 0 週、第 1、3 及 6 週進行採血，採血前 8~12 小時禁食，並於投予試驗樣品或去離子水、NAC 後 4 小時，以眼窩或臉頰採血方式檢測肝臟的生化功能：AST (GOT)、ALT (GPT)、三酸甘油酯 (TG)、膽固醇。最後於 APAP 誘導肝損傷第 8 週結束時，秤重後全部犧牲，可從心臟或腹大動脈採血檢驗肝臟生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後將最大右葉肝割取約 0.5 公分見方之組織塊，固定於 10% 的中性福馬林 (formalin) 液中，以石蠟包埋、切片、貼附在載玻片上後，分別作蘇木紫-伊紅染色 (haematoxylin-eosin stain, H&E stain) 以進行病理學觀察。另將其餘肝臟分別進行抗氧化成分 GSH，以及 GPx、GRd、GST、SOD、catalase 等酵素活性之檢測。

3. 實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

以管灌 (gavage feeding) 方式給予受試樣品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種 (species) 內之體表，其與體重間

並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers），而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量（/kg bw/d）的 12.3 倍作為小鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來源。

（三）實驗測定項目：

在進行相關成分或酵素活性之分析方面：測定時，可參考以下建議之方法，亦得使用有學理根據之適當方法或具公信之市售套組進行分析。

1. 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

- （1）AST (GOT)
- （2）ALT (GPT)
- （3）TG
- （4）膽固醇

2. 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

- （1）Glutathione (GSH)
- （2）Glutathione peroxidase (GPx)
- （3）Glutathione reductase (GRd)
- （4）Glutathione S-transferase (GST)

(5) Superoxide dismutase (SOD)

(6) Catalase (CAT)

(7) TG

(8) 膽固醇

(四) 肝功能生化指數的檢測：

所採之小鼠血液樣品在室溫下放置約 1 小時，使其凝結，再利用冷凍離心機於 4°C 下以 $14,000 \times g$ 離心 5 分鐘，分離出血清。再以血液自動生化分析儀檢測肝功能之生化指數，包括 AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇等，其中 AST (GOT) 及 ALT (GPT) 檢測原理是依據 Reitman 與 Frankel (1957) 及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986) 的標準方法。並進行肝臟抗氧化功能相關之成分或酵素活性之分析如下。另必須測定肝臟 TG、膽固醇、肝重/體重 (%) 等肝臟脂肪堆積指標。

1. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 濃度之分析

參考 Reed 等人 (1980) 的方法。肝組織精秤 0.5 克，加入 9 倍 (v/w) 的 50 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，均質 1 分鐘，得肝組織均質液樣品。肝組織均質後，迅速取均質液 400 μ L 加入等量 10% 過氯酸 (perchloric acid, PCA) 混合後，靜置 40 分鐘，使 PCA 能將樣品中還原態麩胱甘肽 (GSH) 充分溶出後，於 4°C 下，以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液待測。至於沉澱部分則加入 1 mL 1 N NaOH 溶解，再移液至微量離心管中以分析蛋白質。另取 8.5 mg 之還原態麩胱甘肽及 7.2 mg 之氧化態麩胱甘肽所製備好的標準品與上述所得之樣品各 400 μ L，加入 40 μ L 碘乙酸 (iodoacetic acid, IAA: 100 mM)，使還原態麩胱甘肽與 IAA 結合後，給予還原態麩胱甘肽多攜帶一負電荷，以便在高效能液相層析儀 (HPLC) 分析中能比 GSSG 早分離出來；再緩慢加入碳酸氫鉀 (KHCO_3) 直到不再起泡為止，此時已中和酸而成微鹼性，以便可在 HPLC 中分析。然後置於暗處 15 分鐘後，再加入 440 μ L 3% 2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluorobenzene, FDNB) 振盪混合，使與硫元素反應成黃色物質，而此黃色物質可在紫外光偵測器 (UV detector,

$\lambda=365\text{ nm}$) 中被偵測出來。之後經 8 小時的冷藏，再以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液並以注射筒過濾器 (syringe filter: 4 mm filter unit, 0.45 μm Nylon) 濾除雜質，最後以 HPLC 進行分析。

2. 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性分析

此酵素之分析主要是依據 Lawrence 與 Burk (1976) 所報告之方法，活性測定係以過氧化氫 (H_2O_2) 為受質。還原態麩胱甘肽 (GSH) 經由麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 之催化可將過氧化氫還原，而還原態麩胱甘肽則變成氧化態麩胱甘肽，然後氧化態麩胱甘肽則利用麩胱甘肽還原酶 (GRd) 與 NADPH 將其還原回還原態麩胱甘肽。取肝組織均質液樣品 5 μL 及 95 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，加入 0.8 mL 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 之反應混合液 (含 1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/mL GRd 及 1 mM GSH)，在室溫下靜置 5 分鐘，再加入 0.1 mL 2.5 mM 過氧化氫後，以分光光度計在 340 nm 下測 3 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少之速率，間接求出麩胱甘肽過氧化酶的活性，而以去離子水 5 μL 當作空白組。本活性 (specific activity) 測定以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

3. 麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase, GRd) 活性分析

麩胱甘肽還原酶活性分析是依據 Bellomo 等人 (1987) 的方法。分析時取 10 μL 肝組織均質液樣品及 90 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 加入 0.9 mL 含有 1.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，再以分光光度計在 340 nm 下測 5 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少的速率，其中以 10 μL 之去離子水作為空白組。本活性 (specific activity) 測定以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

4. 麩胱甘肽硫轉移酶 (glutathione S-transferase, GST) 活性分析

麩胱甘肽硫轉移酶活性分析是依據 Habig 等人 (1974) 的方法。分析時取 5 μL 肝組織均質液樣品及 880 μL 的反應試劑含有 pH 7.0 的 100 mM 磷酸鉀緩衝液及 100 mM GSH，加入 95 μL 的 20 mM PPB (pH 7.0)，最後加 20 μL 的 50 mM CDNB 利用分光光度計以 340 nm 於 25°C 測定 5 分鐘內之 GSH-CDNB conjugate form 合成速率，其中以 10 μL 之去離子水作為空白組。本活性 (specific activity) 測定以

nmol GSH-CDNB conjugate formed /min/mg protein 表示。

5. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性分析

實驗參照 Marklund 與 Marklund (1974) 所描述之方法進行，將肝組織用冰生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 M sucrose、1 mM EDTA、10 nM Tris-HCl, pH 7.4)，均質使成 10% 之均質液 (homogenate)。高速 (13,600 × g) 離心 30 分鐘，取上清液 50 μl，再加上 tris-cacodylic acid buffer (pH 8.2, 50 mM) 100 μL。溶液再加上超純水，使體積成為 980 μL，再加上鄰苯三酚 (pyrogallol) 20 μL (0.2 mM)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於 420 nm 測量吸光值 (A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量 5 分鐘，計算 $\Delta A/\Delta T$ 。分析過程中以 SOD 標準品，作出標準曲線 (standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50% 時之酵素量，定為一單位 (U)；肝組織 SOD 活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單位量表示 (U/mg protein)。

6. 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性分析

實驗參照 Aebi (1984) 所描述之方法進行。將肝組織用冰生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，均質使成 10% 之均質液 (homogenate)。離心 (700 × g) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1%) 成為儲備均質液 (stock homogenate, S.H.)。取 S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼值至 pH 7 成為稀釋均質液 (dilute homogenate, D.H.)。取 D.H. 2 mL 加入 1 mL H₂O₂ (0.03 M)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於溫控 25 °C、波長 240 nm 之條件下測量吸光值 (A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = (2.3/\Delta t) \log(A1/A2)$$

△t：時間間隔 15 秒鐘；

A1：T1 時段，樣品之吸光值 - 空白吸光值；

A2：T2 時段，樣品之吸光值 - 空白吸光值。

肝組織 CAT 活性，以每單位蛋白質所含反應速率 K 表示之 (K/mg protein)。

7. 蛋白質濃度之測定：

實驗參照 Lowry 等人(1951)之方法進行。取適量蛋白質樣品，並以 1 N NaOH 調整使其最終體積為 100 μ L，加入 200 μ L 去離子水及 100 μ L 反應混合液（25% Na_2CO_3 : 2% Na-K-tartrate : 1% CuSO_4 = 8 : 1 : 1, v/v/v），然後在室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 mL Folin reagent（Folin : H_2O = 1 : 19.5, v/v）後於 37°C 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以 660 nm 下測其吸光值（25°C）。將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

（五）組織病理切片觀察

在 8 星期試驗結束時，將所有小鼠均予以犧牲，採血後，將最大右葉肝臟割取約 0.5 公分見方的組織塊，放入 10% 的中性福馬林中固定，做進一步的病理切片與染色。進行 H&E 染色以觀察肝細胞的受損、脂肪變性、壞死等慢性肝損傷變化。

進行慢性肝損傷之組織病理學的比較時，可採用 Jonker 等人（1992）的半定量方法，測定肝細胞發炎的程度、脂質變性、肝細胞壞死及膽管增生等。評估分數是由”0”到”4”分，其中”0”分代表沒有（absent）；”1”分代表少量（trace）；”2”分代表輕微（weak）；”3”分代表中等程度（moderate）；”4”分代表極嚴重（strong）。

另外，為了避免觀察時主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行病理染色。至於病理的半定量分析之評估，則應由獸醫病理醫師，在不清楚本實驗設計的情況下進行單盲判讀，對所有切片進行評分比較，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。病理切片之照片應提供高解析度之彩色圖檔；照片應統一以中央靜脈（central vein, CV）或門靜脈（portal vein, PV）為中心拍照，若為各組之間的比較，顯微鏡的放大倍率須一致。

1. 組織包埋和切片

將最大右葉肝割取的約 0.5 公分見方的組織塊，置入 10% 的中性福馬林中固定其組織形態及結構，接著以不同濃度之乙醇（30、50、70、95、99.5%）與二甲苯（xylene）進行脫水與透明化化步驟，再以熱石臘溶液取代二甲苯，最後將組織

以石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成 5 μm 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於 37°C 烘乾後用做進一步的病理染色。

2. 蘇木紫-伊紅 (haematoxylin-eosin, H&E) 染色法

將肝臟組織切片置入二甲苯 30 分鐘脫蠟，再依序置於 99.5、95、70、50 及 30% 之乙醇各 30 分鐘以進行復水，最後浸泡於蒸餾水 10 分鐘後即可進行染色。首先浸泡蘇木紫 30 秒染細胞核，再用蒸餾水清洗數分鐘，接著使用伊紅染色 2-5 分鐘，再用蒸餾水清洗數分鐘。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50、70、95 及 100% 乙醇各 2 次，每次 30 秒，再以二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

(六) 實驗數據統計分析：

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負、正控制組間的比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)。本評估方法必須進行組間的統計比較分析，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負、正控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

三、評估方法之測定項目原則

(一) 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必測：AST (GOT)、ALT (GPT)

選測：TG、膽固醇

(二) 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

必測：Glutathione (GSH)、Glutathione peroxidase (GPx)、Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT)

選 測：Glutathione reductase (GRd) 、Glutathione S-transferase (GST)、TG、
膽固醇

(三) 病理切片觀察

必測：H&E 染色

選測：冷凍切片 Oil-Red 染色

(四) 必測：記錄慢性實驗期間動物每週體重、肝重/體重(%)、死亡率及其他相關之測定項目。

四、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值，病理切片觀察結果，並加上其他相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，加以綜合評估判斷。

五、宣稱、廣告與產品標示

受試產品進行以本評估方法推薦之試驗方法，且獲得明確之有效結果時，得向中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的「經動物實驗，攝取本產品有助於延緩乙醯胺基苯酚誘導之化學性肝炎損傷或降低其危險因子」或其他相近具科學依據的詞句之宣稱、廣告或產品介紹。

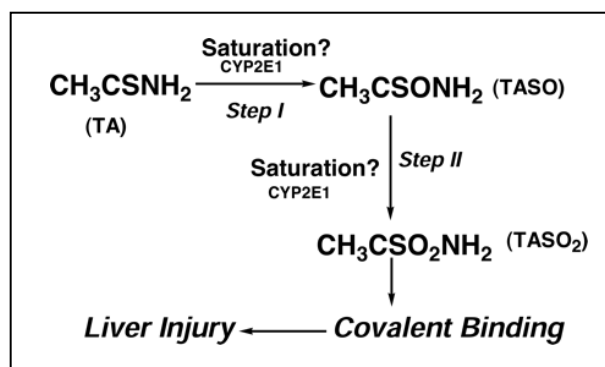
參、針對應用硫代乙醯胺誘導肝纖維化之慢性肝損傷

一、前言

在 1950 年代即有以硫代乙醯胺 (thioacetamide, TAA) 餵飼大鼠誘導肝損傷之報告，而且 TAA 在大(小)鼠所誘導肝損傷之病理變化類似人類的肝損傷病變，因此，得以 TAA 誘導肝纖維化作為化學性肝損傷動物模式。

TAA 是一種可以用不同方式造成急性或慢性肝損傷的選擇性毒性物質，所造成的病變處於肝臟的小葉中心，這與許多毒性物質在人所造成的肝損傷區域相同。另外，並非 TAA 本身直接造成之肝損傷，而是因其在體內的代謝產物攻擊肝臟所造成。使用 TAA 的優點有很多，如 TAA 因其半衰期短，所以可以很快造成急性的肝臟毒性，但是 TAA 所造成的急性致死性與一些較傳統之肝毒性物質如：四氯化碳、乙醯胺基苯酚和三氯甲烷有所區別，TAA 從給予動物到致死約有 3.5 到 7 天的時間，可以觀察肝細胞壞死到肝衰竭死亡的病變過程，而其他較傳統之肝毒性物質，若是給予致死劑量，則在 12~24 小時左右的時間即會造成動物死亡，因此不利觀察。

此外，TAA 具有高度肝特異性的毒性，除非在一超高之劑量才會也造成腎臟傷害，否則 TAA 僅會造成肝臟損傷。TAA 進入動物體中經由混合功能氧化酶系統 (mixed function oxidase system) 可代謝產生 acetamide 與 TAA-S-oxide (圖一)，TAA-S-oxide 再經由 cytochrome P450 monooxygenase 轉變為一具高活性化學物質 TAA-S-dioxide，TAA-S-dioxide 會與組織大分子作共價鍵結，進而破壞肝細胞，並造成氧化壓力 (oxidative stress) 與肝壞死。因氧化壓力造成肝星狀細胞活化與形態改變，這些活化和形態改變包括有促進增生之能力、促進生成和降解細胞外基質、促進化學趨向性與促發炎的能力，最後若 TAA 所造成的肝細胞壞死持續進行，則會演變成肝纖維化，甚至出現節結。



圖一 TAA 在肝臟的代謝路徑

研究指出，給予 SD 大鼠不同劑量（50, 150, 300 或 600 mg/kg bw）之 TAA，之後於 0~96 小時內觀察其肝損傷與修復之情況，他們以血清中 ALT 之濃度判斷肝損傷程度，發現前 3 個較小劑量（50, 150, 300 mg/kg）之肝損傷程度並沒有劑量上的差異，而且老鼠也不會死亡。給予 600 mg/kg 的老鼠一開始，其肝損傷之程度反而明顯低於其他三組，但隨時間之增加（> 48 小時），給予 600 mg/kg 的老鼠其肝損傷程度也隨之增加，而且給予 600 mg/kg 的老鼠死亡率達 90%。另外 1995 年也有報導指出 TAA 所造成血清學中脂肪酸變化與肝硬化病人相似，皆會因肝臟合成脂肪酸能力下降而造成血清中脂肪酸含量減少。

TAA 造成肝損傷於 1951 年即有學者研究，至今已有許多 TAA 誘導不同肝損傷之動物研究，其中有極大部分是用以評估預防或治療肝損傷之討論，因此以 TAA 誘導肝損傷用以評估健康食品之護肝功能是極為有效之方法。

二、實驗項目與實驗方法

（一）執行單位與執行人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與肝臟生理代謝相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗必須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

(二) 實驗設計：

建議實驗動物採用雄性 SD 或 Wistar 大鼠，起始體重約 250 克，每組至少 8 隻。動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。動物之飼養宜在恆溫 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，避免誤差值過大。本評估試驗之實驗組別應包括 1.正常對照組：攝取正常飲食；2.負控制組：動物給予 TAA 處理，攝取正常飲食；3.試驗組：動物給予與負控制組完全相同之 TAA 處理，並分別另給予 2 種以上不同劑量之試驗樣品，其中一組的劑量必須相當於人體的建議攝取量，且於 TAA 誘導肝損傷前一星期即開始給予試驗樣品。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

1. 試驗方法：

本評估方法係採以 TAA 誘導大鼠產生慢性肝損傷的實驗模式，本方法中之 TAA 使用劑量僅供參考。實驗前將大鼠依體重以逢機法平均分配至各組，動物至少分成 4 組，每組至少 8 隻：

- (1) A 組為正常對照組：腹腔 (intraperitoneal, I.P.) 注射生理食鹽水 + 經口 (peroral, per os, P.O.) 管餵去離子水；
- (2) B 組為負控制組 (肝損傷組)：100 mg TAA/kg bw (I.P.) + 去離子水 (P.O.)；
- (3) 試驗組至少 2 組 (C、D 組)，視實驗設計需要可再增加組別：100 mg TAA/kg bw (I.P.) + 2 種以上不同劑量之試驗樣品 (P.O.)，其中之一劑量須與換算的人類建議攝取量相同。

2. 試驗步驟：

A 組腹腔注射 0.5 mL 生理食鹽水；B~D 組腹腔注射 100 mg TAA/kg bw (0.5 mL/30 g bw)，每週 3 次 (可分別在週 1、週 3 及週 5 注射)，於肝炎誘導 1 小時後管餵試驗樣品，以減少藥物與樣品互相影響。A、B 組每日管餵 0.5 mL 去離子水；C、D 組則於 TAA 誘導肝損傷前 1 星期開始每日給予試驗樣品 (前後共為期 9 週)。

所有實驗動物於 TAA 誘導肝損傷開始的前 1 週、第 0 週、第 1、3、6 週進行採血，採血前 8~12 小時禁食，並於投予試驗樣品或去離子水後 4 小時，以尾部採血方式檢測肝臟的生化功能：AST (GOT)、ALT (GPT)、三酸甘油酯 (TG)、膽固醇、白蛋白。最後於 TAA 誘導肝損傷第 8 週結束時，秤重後全部犧牲，從心臟或腹大動脈採血檢驗肝臟生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後將最大右葉肝割取 2-3 塊 1 公分見方之組織塊，固定於 10% 的中性福馬林 (formalin) 液中，再以石蠟包埋、切片、貼附在載玻片上後，分別進行蘇木紫-伊紅染色 (haematoxylin-eosin stain, H&E stain)、膠原纖維的特殊染色，如 Masson's trichrome 染色或其他適合之染色方法來進行病理學觀察。

3. 實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

以管灌 (gavage feeding) 方式給予受試樣品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種 (species) 內之體表，其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法 (Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers)，而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量 (/kg bw/d) 的 6.2 倍作為大鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來

源。

(三) 實驗測定項目：

在進行相關成分測定時，可參考以下建議之方法，亦得使用有學理根據之適當方法或具公信之市售套組進行分析。

1. 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

(1) AST (GOT)

(2) ALT (GPT)

(3) TG

(4) 膽固醇

(5) 白蛋白

所採之大鼠血液樣品在室溫下放置約 1 小時，使其凝結，再利用冷凍離心機於 4°C 下，以 14,000 × g 離心 5 分鐘，分離出血清。再以血液自動生化分析儀檢測肝功能生化指數，包括 AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇等，其中 AST (GOT) 及 ALT (GPT) 檢測原理是依據 Reitman 與 Frankel (1957) 及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986) 的標準方法。另必須測定肝重/體重 (%) 等指標。

(四) 組織病理切片觀察：

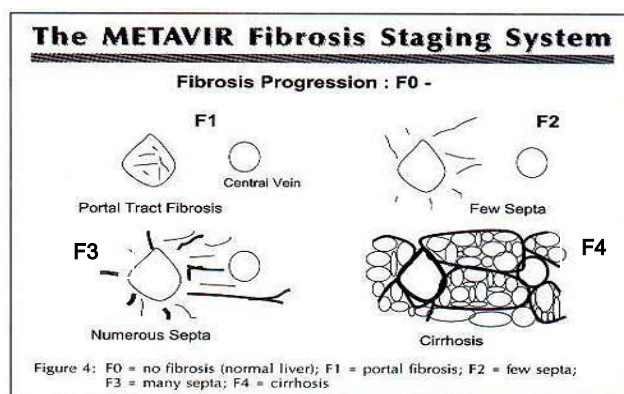
在 8 星期試驗期結束時，將所有大鼠均予以犧牲，採血後，將最大右葉肝臟割取約 1 公分見方的組織塊，放入 10% 的中性福馬林中固定，做進一步的病理切片與染色。進行 H&E 染色，以觀察肝細胞的受損、壞死、纖維化等慢性肝損傷變化，並進行膠原蛋白的特殊染色，例如 Masson's trichrome 染色或其他適合之染色方法，以便評估纖維化程度。

肝炎與肝硬化的評估可依國際通用的肝炎組織學活動性指數 (histology activity index, HAI score) 分析，把肝炎活性依門脈區，門脈周邊，及肝小葉區各別分析，給予 0~10 分的評估分數，其總和代表肝炎活性 (表一)。肝纖維化

則依 Metavir score 分為 5 級（圖二），包括：F0：沒有肝纖維化，F1：門脈纖維化，F2：少量纖維間壁，F3：許多纖維間壁，F4：肝硬化。為了避免觀察時主觀上的偏差，所有的組織病理切片都由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行病理染色。至於病理的半定量分析之評估，則應由獸醫病理醫師，在不清楚本實驗設計的情況下進行單盲判讀，對所有切片進行評分比較，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。病理切片之照片應提供高解析度之彩色圖檔；照片應統一以中央靜脈（central vein, CV）或門靜脈（portal vein, PV）為中心拍照，若為各組之間的比較，顯微鏡的放大倍率須一致。

表一 肝炎組織學活動性指數

門脈發炎	分數
沒有門脈發炎	0
輕微門脈發炎(<1/3)	1
中度門脈發炎(1/3~2/3)	3
重度門脈發炎(>2/3)	4
肝小葉區發炎	
沒有肝小葉區發炎	0
輕微肝小葉區發炎(佔肝小葉區<1/3)	1
中度肝小葉區發炎(佔肝小葉區 1/3~2/3)	3
重度肝小葉區發炎(佔肝小葉區>2/3)	4
門脈周邊發炎	
沒有門脈周邊發炎	0
輕微零碎性壞死(小於門脈周邊 10%)	1
中度零碎性壞死(小於門脈周邊 50%)	3
重度零碎性壞死(大於門脈周邊 50%)	4
中度零碎性壞死加上橋狀壞死	5
重度零碎性壞死加上橋狀壞死	6
多小葉壞死	10



圖二 Metavire score 分析肝纖維化。F0：沒有肝纖維化，F1：門脈纖維化，F2：少量纖維間壁，F3：許多纖維間壁，F4：肝硬化。

1. 組織包埋和切片

將最大右葉肝割取的約 1 公分見方的組織塊，置入 10% 的中性福馬林中固定其組織形態及結構，接著以不同濃度之乙醇（30、50、70、95、99.5%）與二甲苯（xylene）進行脫水與透明化步驟，再以熱石蠟溶液取代二甲苯，最後將組織以石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成 5 μm 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘乾後可做進一步的病理染色。

2. 蘇木紫－伊紅（haematoxylin-eosin, H&E）染色法

將肝臟組織切片置入二甲苯 30 分鐘脫蠟，再依序置於 99.5、95、70、50 及 30% 之乙醇各 30 分鐘以進行復水，最後浸泡於蒸餾水 10 分鐘後即可進行染色。首先浸泡蘇木紫 30 秒染細胞核，再用蒸餾水清洗數分鐘，接著使用伊紅染色 2-5 分鐘，再用蒸餾水清洗數分鐘。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50、70、95 及 100% 乙醇各 2 次，每次 30 秒，再以二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

3. Masson's trichrome 染色法

切片先經二甲苯的脫蠟和乙醇復水後，將處理過的切片放在 Bouin 氏溶液中固定 7 分鐘，然後水洗約 10 分鐘至切片上黃色消失，再將切片以 Weigert's

iron hematoxylin 溶液染色 10 分鐘，用溫的流水洗 10 分鐘，再用蒸餾水稍沖洗切片；再以 Biebrich scarlet-acid fuchsin solution 染 7 分鐘，用蒸餾水稍沖洗切片，用 phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution 染 5 分鐘，用蒸餾水稍沖洗，再用 aniline blue solution 染 5 分鐘，以作對比染色，用蒸餾水再稍沖洗之，置於 1% acetic acid solution 染 3 分鐘，後用蒸餾水稍沖洗切片。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50% 乙醇中 30 秒、70% 乙醇中 30 秒、95% 乙醇中 20 秒、100% 乙醇中 20 秒、100% 乙醇中 30 秒，再用二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

4. Gomori 網狀纖維染色法

(1) 試劑的配製：

取 10% 硝酸銀 3 份，加入 10% 的氫氧化鉀 1 份，混合後產生大量的黑色沉澱物，倒去表面的液體，保留下沉澱物，加入 0-20 倍或更多的蒸餾水進行沖洗，連續沖洗 3 次。待沉澱物清晰則可。用濃氨水逐滴加到溶液中。使沉澱物逐步溶解。待見沉澱物剩少數幾顆時，再取 10% 的硝酸銀液加入數滴，至溶液再現渾濁為止。再用氨水將其溶解，然後稀釋 10-15 倍，即可使用。平時保存於 4℃ 冰箱中。

(2) 操作步驟：

首先將切片脫蠟，以蒸餾水沖洗後，用 0.5% 高錳酸鉀溶液氧化 5 分鐘，再以自來水沖洗，繼用蒸餾水洗，用 2% 草酸漂白切片 2 分鐘，自來水洗，蒸餾水洗，接著用 2% 硫酸鐵銨媒染 5 分鐘，水洗，蒸餾水洗，滴入鹼性銀溶液浸染 3-5 分鐘，蒸餾水洗數次，再以 10% 甲醛液還原 5-10 分鐘，水洗 2 分鐘，用核固紅染色 10-15 分鐘，水洗 10 分鐘後，以不同級酒精與二甲苯逐次脫水，最後以中性樹膠封片。此染色法結果會顯示網狀纖維為黑色，膠原纖維為黃棕色，而核為紅色。

(五) 肝臟膠原蛋白的定量：

因為每 7.46 克膠原蛋白中含有 1 克之 hydroxyproline，因此測量

hydroxyproline 的含量，即可求得膠原蛋白試樣的原始濃度。先以 chloramine T 將 hydroxyproline 氧化成 pyrrole，並進一步與 Erlich's reagent 反應呈色，藉由分析試樣中 hydroxyproline 含量即可推算試樣中膠原蛋白的含量。首先將 hydroxyproline 酸解，使樣品最後溶於 6N HCl，並置於長玻璃管中，於 110°C 恆溫烘箱中反應 24 小時，室溫下冷卻後，將長玻璃管蓋子打開，進行真空乾燥，約需時 5-7 天，待試樣完全乾燥，加入 citric phosphate buffer 回溶後，分裝於 96 孔免疫酵素分析測定盤（96 well ELISA plate）中，於 55°C 烘箱中反應 60 分鐘。再將待測試樣及不同濃度的標準液各取 80 μ L 加入 96 孔免疫酵素分析測定盤中，再加入 125 μ L chloramine T solution，室溫下混合均勻後，靜置反應 20 分鐘，在每個孔中加入 Erlich's reagent 125 μ L，混合均勻後，以矽膠片包覆 96 孔免疫酵素分析測定盤並固定之。在 75°C 水浴槽中反應 16 分鐘後，小心取出測定盤，迅速置入冰水浴中 5 秒鐘，將盤外冰水拭去，立刻移至自動免疫酵素分析儀（ELISA reader），測定 550 nm 吸光值。以所測得標準液的吸光值對濃度作標準曲線後反推計算試樣中 hydroxyproline 濃度。

膠原蛋白濃度 = Hydroxyproline 濃度 $\times$ 7.46。

（六）實驗數據統計分析：

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善（ $p < 0.05$ ）。本評估方法必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA（analysis of variance）比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之變化結果，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善（ $p < 0.05$ ）。本評估方法必須進行組間的統計比較

分析，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及該試驗樣品與正常對照組及負控制組間的功效比較。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

三、評估方法之測定項目原則

(一) 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必測：AST (GOT)、ALT (GPT)

選測：TG、膽固醇、白蛋白

(二) 病理切片觀察

必測：H&E 染色

且下列三染色法選一必測：

1. Masson's trichrome 染色法

2. Gomori 網狀纖維染色法

3. Sirius red 染色法

(三) 肝臟組織

選測：肝臟膠原蛋白 (collagen) 定量分析

(四) 必測：記錄慢性實驗期間動物每週體重、肝重/體重 (%)、死亡率及其他相關之測定項目。

(五) 得增加測定其他適當的肝纖維化指標，例如 MMP-2、TIMP-1 等項目。

四、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值、病理切片觀察結果，並加上其他相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，加以綜合評估判斷。

五、宣稱、廣告與產品標示

受試產品進行以本評估方法推薦之試驗方法，且獲得明確之有效結果時，得

健康食品之護肝保健功效評估方法

向中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的宣稱、廣告或產品介紹，例如僅降低 ALT 或 AST 者，不得廣泛宣稱能預防或改善肝纖維化，或誤導以為亦可改善肝硬化或肝癌之功效。凡能降低血清 ALT、AST 及減少組織切片肝纖維化狀況的產品，得宣稱、廣告或介紹「經動物實驗，攝取本產品有助於延緩硫代乙醯胺誘導之肝纖維化或降低其危險因子」或其他相近具科學依據的詞句。

肆、針對應用酒精液態飼料誘導酒精性脂肪肝

一、前言

飲酒是人類共通的行為，各種族雖有不同的飲酒文化，卻同樣會因飲酒過量而產生各種併發症，在許多國家裡酗酒已成為重大的問題。致於，每日要喝多少酒才會對肝臟造成傷害呢？一般而言，長期每日攝取 80 克酒精即可能造成肝臟損傷；而對病毒性肝炎（例如慢性 B 型肝炎）患者，酒精會加劇肝臟的傷害。酒精性肝病變可分成酒精性脂肪肝、酒精性肝炎及酒精性肝硬化。臨床上，酒精性脂肪肝患者之肝功能檢查（例如 AST、ALT）可能仍正常或僅輕度異常。急性酒精性肝炎，臨床上並不常見，它的症狀包括發燒、疲倦、厭食、體重減輕、肝臟腫大且壓痛、黃疸、白血球升高、營養不良等現象，實驗室血液生化檢查可發現明顯肝臟發炎現象（AST/ALT 值上升）。酒精性肝硬化的特點是小結節性肝硬化，病人可出現門脈高壓，食道與/或胃靜脈瘤出血，甚至腹水之情形。

脂肪肝在臨床上，一般區分為酒精性與非酒精性脂肪肝，而酒精性肝病變（alcoholic liver disease, ALD）一直是臨床上經常發現的典型脂肪肝形成病因，就至今研究文獻尚未完全瞭解酒精導致肝臟病變的病理機制，因此酒精性肝病變的動物模式的開發與建立對於此領域研究發展更顯重要性。ROS 可經由許多路徑造成肝臟損傷，一項應用小鼠實驗模式的研究發現短時間攝入大量酒精會導致肝細胞損傷，主要是由於粒線體 DNA 耗損及脂質過氧化而啟動肝細胞凋亡與壞死，尤以單一劑量 5 g/kg bw 的酒精劑量攝入，會造成單股 DNA 的裂解，此現象會自酒精攝入後 1 小時持續上升至 6 小時達到最高點。其機制為粒線體內脂質過氧化氫的形成而造成粒線體氧化功能損傷，進而導致還原態麩胱甘肽（GSH）耗損，以致使得肝臟對過氧化傷害的保護功能降低。但大量急性的酒精攝取較不符合人類對於酒精攝取的行為，因此慢性酒精攝入的實驗動物模式則較類似人類的酒精攝取行為。

C57BL/6 為 C57 black 6，通常會被簡稱為 C57 或 B6，毛色為黑色，屬於近交品系的實驗小鼠，此種小鼠被廣泛使用是因其具有易配種生育且強健，經常應

用於一般研究、飲食誘發性研究、基因剔除動物模式研究、安全試驗研究及免疫相關研究。此品系於 1921 年由 Dr. Little 取自 Miss Lathrop 的種原，利用 57 系母鼠與 52 系公鼠配種而來；1937 年育成旁系（6 系與 10 系）。目前最廣為研究人員使用的品系 C57BL/6，而 C57BL/6 (B6) 在國內是使用量第二的近交品系鼠，在美國其使用量則為第一位（佔 14%），常用被當作標準的近交品系使用，可避免遠交品系的個體差異性，且其易造成具有酒精成癮性與飲食誘導疾病的應用。

根據相關研究指出，給予 C57BL/6 (B6) 小鼠酒精液態飼料 4 週後觀察其肝損傷之情況，其肝臟重與體重比例顯著性增加，且其血液生化值中 AST (GOT)、ALT (GPT)、三酸甘油酯 (TG) 及膽固醇都明顯高於控制組，而肝臟組織切片亦呈現嚴重脂質堆積現象，現今已知酒精造成肝臟脂肪堆積之機制主要起因於乙醇經轉化為乙醛再轉變為乙酸過程中，一連串的反应抑制了粒線體功能造成脂質代謝紊亂，延緩 TG 的輸出而在肝細胞堆積。此外肝細胞的脂質變性亦可引發相關免疫反應，而酒精代謝所造成的毒性則會破壞肝細胞存活而造成死亡，繼而造成肝炎發生。

酒精對肝臟慢性傷害的研究文獻中所使用的實驗動物模式主要是長期餵飼 Lieber-DeCarli Diet 來誘導酒精性肝病變 (Lieber 與 DeCarli 是首先以動物模式證實酒精對於肝臟的毒性效果而命名)，他們是應用飼料成分中原由碳水化合物提供動物所需總能量之 36% 的部份，以酒精取代而成之液態飼料來誘導慢性酒精性肝臟損傷。試驗結果顯示實驗動物發展為脂肪肝，且伴有肝臟之三酸甘油酯與膽固醇含量上升，而控制組動物則仍保有正常的肝臟 (即非因年齡等因素造成脂肪肝)。此一應用 Lieber-DeCarli Diet 誘導肝病變之實驗動物模式，已成為主要的誘發酒精性脂肪肝動物模式，且沿用至今。

二、實驗項目與實驗方法

(一) 執行單位與執行人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客

觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與肝臟生理代謝相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗必須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

(二) 實驗設計：

建議實驗動物採用雄性 8-10 週齡之 C57BL/6 (B6) 小鼠，起始體重約 20 克，每組至少 10 隻。動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。動物之飼養宜在恆溫 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，避免誤差值過大。本評估試驗之實驗組別應包括 1. 正常對照組：攝取正常飲食；2. 負控制組：攝取 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料；3. 試驗組：動物給予與負控制組完全相同之 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料處理，並分別另給予 2 種以上不同劑量之試驗樣品，其中一組的劑量必須相當於人體的建議攝取量，且於 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料誘導肝損傷前一星期即開始給予試驗樣品。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

1. 試驗方法：

本評估方法係採以 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料誘導 C57BL/6 (B6) 小鼠酒精性脂肪肝損傷的實驗模式，本方法中之 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料配方僅供參考（表一），亦可選擇其他適當市售流質酒精飼料。

表一 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料配方（僅供參考）

Liquid diet data		
Ingredient	Control Liquid Diet	Ethanol Liquid Diet
	g/ Liter of Diet #710027	g/ Liter of Diet #710260
Casein (100 Mesh)	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5
Olive Oil	28.4	28.4
Safflower Oil	2.7	2.7
Maltose Dextrin	115.2	25.6
Cellulose	10	10
Salt Mix #210011	8.75	8.75
Vitamin Mix #310011	2.5	2.5
Choline Bitartrate	0.53	0.53
Xanthan Gum	3	3
	Lieber and DeCarli Alcoholism-Clinical and Experimental Research 6, 523-531 (1982)	
	Note: This diet contains 1.0 Kcal/ml. of which 35% are fat derived, 47% are derived from carbohydrate and 18% are derived from protein.	Note: This diet contains 1.0 Kcal/ml. of which 35% are fat derived, 11% are derived from carbohydrate, 18% are derived from protein, and 36% are derived from ethanol.
	DIRECTIONS: Quantity sufficient to one liter with water 221.78 grams of Diet #710027 and mix for thirty seconds in a blender.	DIRECTIONS: To 132.18 grams of Diet #710260 add: (1) Ethanol (67.3 ml of 95% Ethanol) and (2) Quantity Sufficient to one liter with cold water and mix for thirty seconds in a blender.

實驗前將性成熟 C57BL/6 (B6) 小鼠依體重以逢機法平均分配至各組，動物至少分成 4 組，每組至少 10 隻：

- (1) A 組為正常對照組：自由進食正常飼料 + 經口 (peroral, per os, P.O.) 管餵去離子水
- (2) B 組為負控制組(肝損傷組):自由進食 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料 + 經口 (P.O.) 管餵去離子水
- (3) 試驗組至少 2 組 (C、D 組)，視實驗設計需要可再增加組別：自由進食 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料 + 2 種以上不同劑量之試驗樣品 (P.O.)，其中之一劑量須與換算的人類建議攝取量相同。

2. 試驗步驟：

A 組(正常對照組)自由進食正常飼料;B~D 組動物自由進食 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料，以誘導肝損傷(試驗前 1 週需逐步增加酒精飼料中酒精含量讓實驗動物適應含酒精之液態飼料)。A、B 組每日管餵去離子水；C、D 組則於 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料誘導肝損傷前 1 星期開始每日給予試驗樣品(前後共為期 5~7 週)。

所有實驗動物於餵食酒精飼料的前 1 週與第 0 週，採血前 8~12 小時禁食，並於投予試驗樣品或去離子水後 4 小時，以眼窩或臉頰採血方式檢測肝臟的生化功能：AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇、葡萄糖。最後於酒精飼料誘導肝損傷第 4~6 週結束時，秤重後全部犧牲，可從心臟或腹大動脈採血檢驗肝臟生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後比較其肝重/體重比，並將最大右葉肝割取約 0.5 公分見方之組織塊，固定於 10% 的中性福馬林 (formalin) 液中，石蠟包封切片後分別作蘇木紫—伊紅染色 (haematoxylin-eosin stain, H&E stain) 來進行組織病理學觀察。另外，利用其餘肝臟進行檢測抗氧化成分 GSH 與 GPx、GRd、SOD、catalase 等酵素活性及肝臟 TG、膽固醇含量變化。

3. 實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

以管灌 (gavage feeding) 方式給予受試樣品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種 (species) 內之體表，其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法 (Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers)，而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量 (/kg bw/d) 的 12.3 倍作為小鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來源。

(三) 實驗測定項目：

在進行相關成分或酵素活性之分析方面：測定時，可參考以下建議之方法，亦得使用有學理根據之適當方法或具公信之市售套組進行分析。

1. 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

(1) AST (GOT)

(2) ALT (GPT)

(3) TG

(4) 膽固醇

(5) 葡萄糖

2. 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

(1) Glutathione (GSH)

(2) Glutathione peroxidase (GPx)

(3) Glutathione reductase (GRd)

(4) Superoxide dismutase (SOD)

(5) Catalase (CAT)

(6) TG

(7) 膽固醇

(四) 肝功能生化指數的檢測：

所採之小鼠血液樣品在室溫下放置約 1 小時，使其凝結，再利用冷凍離心機於 4℃ 下以 14,000 x g 離心 5 分鐘，分離出血清，再以自動生化分析儀檢測肝功能生化指數，如 AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇等，其中 AST (GOT) 及 ALT (GPT) 檢測原理是依據 Reitman 與 Frankel (1957) 及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986) 的標準方法。並進行肝臟抗氧化功能相關之成分或酵素活性之分析如下。另必須測定肝臟 TG、膽固醇、肝重/體重 (%) 等肝臟脂肪堆積指標。

1. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 濃度之分析

參考 Reed 等人 (1980) 的方法。取肝組織約 0.3 克，加入 9 倍 (w/w) 的 50 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，均質 1 分鐘，得肝組織均質液樣品。肝組織均質後，迅速取均質液 400 μ L 加入等量 10% 過氯酸 (perchloric acid, PCA) 混合後，靜置 40 分鐘，使 PCA 能將樣品中還原態麩胱甘肽 (GSH) 充分溶出後，於 4°C 下，以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液待測。至於沉澱部分則加入 1 mL 1 N NaOH 溶解，再移液至微量離心管中以分析蛋白質。另取 8.5 mg 之還原態麩胱甘肽及 7.2 mg 之氧化態麩胱甘肽所製備好的標準品與上述所得之樣品各 400 μ L，加入 40 μ L 碘乙酸 (iodoacetic acid, IAA: 100 mM)，使還原態麩胱甘肽與 IAA 結合後，給予還原態麩胱甘肽多攜帶一負電荷，以便在 HPLC 分析中能比 GSSG 早分離出來；再緩慢加入碳酸氫鉀 (KHCO_3) 直到不再起泡為止，此時已中和酸而成微鹼性，以便可在高效能液相層析儀 (HPLC) 中分析。然後置於暗處 15 分鐘後，再加入 440 μ L 3% 2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluorobenzene, FDNB) 振盪混合使與硫元素反應成黃色物質，而此黃色物質可在紫外光偵測器 (UV detector: $\lambda=365$ nm) 中被偵測出來。之後經 8 小時的冷藏，再以 $1,800 \times g$ 離心 3 分鐘，取上層液並以注射筒過濾器 (syringe filter: 4 mm filter unit, 0.45 μ m Nylon) 濾除雜質。最後以 HPLC 進行分析。

2. 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性分析

此酵素之分析主要是依據 Lawrence 與 Burk (1976) 所報告之方法。活性測定係以過氧化氫 (H_2O_2) 為受質。還原態麩胱甘肽 (GSH) 經由麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 之催化可將過氧化氫還原，而還原態麩胱甘肽則變成氧化態麩胱甘肽，然後氧化態麩胱甘肽則利用麩胱甘肽還原酶 (GRd) 與 NADPH 將其還原回還原態麩胱甘肽。取肝組織均質液樣品 5 μ L 及 95 μ L 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，加入 0.8 mL 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 之反應混合液 (含 1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/mL GRd 及 1 mM GSH)，在室溫下靜置 5 分鐘，再加入 0.1 mL 2.5 mM 過氧化氫後，以分光光度計在 340 nm 下測 3 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少之速率，間接求出麩胱甘肽過氧化酶的

活性，而以去離子水 5 μL 當作空白組。本活性 (specific activity) 測定以 $\text{nmol NADPH/min/mg protein}$ 表示。

3. 麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase, GRd) 活性分析

麩胱甘肽還原酶活性分析是依據 Bellomo 等人 (1987) 的方法。分析時取 10 μL 肝組織均質液樣品及 90 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 加入 0.9 mL 含有 1.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，再以分光光度計在 340 nm 下測 5 分鐘 (25°C)，計算 NADPH 減少的速率，其中以 10 μL 之去離子水作為空白組。本活性 (specific activity) 測定以 $\text{nmol NADPH/min/mg protein}$ 表示。

4. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性分析

實驗參照 Marklund 與 Marklund (1974) 所描述之方法進行，將肝組織用冰生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 M sucrose、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 打碎使成 10% 之均質液 (homogenate)。高速離心 30 分鐘 ($13,600 \times g$)，取上清液 50 μL ，再加上 Tris-cacodylic acid buffer (pH 8.2, 50 mM) 100 μL 。溶液再加上超純水，使體積成為 980 μL ，再加上鄰苯三酚 (pyrogallol) 20 μL (0.2 mM)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於 420 nm 測量吸光值 (A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量 5 分鐘，計算 $\Delta A / \Delta T$ 。

分析過程中以 SOD 標準品，作出標準曲線 (standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50% 時之酵素量，定為一單位 (U)；肝組織 SOD 活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單位量表示 (U per milligram of protein)。

5. 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性分析

實驗參照 Aebi (1984) 所描述之方法進行。將肝組織用生理食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴生理食鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成 10% 之均質液 (homogenate)。離心 ($700 \times g$) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1%) 成為儲備均質液 (stock homogenate, S.H.)。取 S.H. 加入

適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼值至 pH 7 成為稀釋均質液 (dilute homogenate, D.H.)。取 D.H. 2 mL 加入 1 mL H_2O_2 (0.03 M)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於溫控 25°C、波長 240 nm 之條件下測量吸光值 (A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = (2.3 / \Delta t) \log(A_1 / A_2)$$

Δt : 時間間隔 (15 秒鐘)；

A1: T1 時段，樣品之吸光值-空白吸光值；

A2: T2 時段，樣品之吸光值-空白吸光值。

肝組織 CAT 活性，以每單位蛋白質所含反應速率 K 表示之 (K/mg protein)。

6. 蛋白質濃度之測定

實驗參照 Lowry 等人 (1951) 之方法進行。取適量蛋白質樣品，並以 1 N NaOH 調整使其最終體積為 100 μL ，加入 200 μL 去離子水及 100 μL 反應混合液 (25% Na_2CO_3 : 2% Na-K-tartrate: 1% $\text{CuSO}_4 = 8:1:1$, v/v/v)，然後在室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 mL Folin reagent (Folin: $\text{H}_2\text{O} = 1:19.5$, v/v) 後於 37°C 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以 660 nm 下測其吸光值 (25°C)。將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

(五) 組織病理切片觀察：

1. 組織包埋和切片

從最大右葉肝割取的約 0.5 公分見方之組織塊，置入 10% 的中性福馬林中固定其組織形態及結構，接著以不同濃度之乙醇 (30、50、70、95、99.5%) 與二甲苯 (xylene) 進行脫水與透明化化步驟，再以熱石蠟溶液取代二甲苯，最後將組織以石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成 5 μm 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於 37°C 烘乾後用做進一步的病理染色。

2. 蘇木紫－伊紅 (haematoxylin-eosin, H&E) 染色法

將肝臟組織切片置入二甲苯 30 分鐘脫蠟，再依序置於 99.5、95、70、50 及 30% 之乙醇各 30 分鐘以進行復水，最後浸泡於蒸餾水 10 分鐘後即可進行染色。首先浸泡蘇木紫 30 秒染細胞核，再用蒸餾水清洗數分鐘，接著使用伊紅染色 2-5 分鐘，再用蒸餾水清洗數分鐘。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50、70、95 及 100% 乙醇各 2 次，每次 30 秒，再以二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

3. 病理切片之判讀

本評估方法將肝組織進行 H&E 染色，以方便觀察肝細胞的受損、脂肪堆積、壞死等慢性肝損傷之變化；或以冷凍切片 Oil-Red 染色觀察肝細胞脂肪油滴的堆積程度。為了避免觀察主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行病理染色。至於病理的半定量分析評估，則應由獸醫病理醫師，在不清楚本實驗設計的情況下進行單盲判讀，對所有切片進行評分比較（評分表如表二），最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。病理切片之照片應提供高解析度之彩色圖檔；照片應統一以中央靜脈（central vein, CV）或門靜脈（portal vein, PV）為中心拍照，若為各組之間的比較，顯微鏡的放大倍率須一致。

（六）實驗數據統計分析：

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善（ $p < 0.05$ ）。本評估方法必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（亦即試

驗的起始值、結束值)之變化結果，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)。本評估方法必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

三、評估方法之測定項目原則

(一) 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必測：AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇

選測：葡萄糖

(二) 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

必測：Glutathione (GSH)、Glutathione peroxidase (GPx)、Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT)、TG、膽固醇

選測：Glutathione reductase (GRd)

(三) 病理切片觀察

必測：H&E 染色

選測：冷凍切片 Oil-Red 染色

(四) 必測：記錄實驗期間動物每週體重、肝重/體重 (%)、死亡率及其他相關之測定項目。

四、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值、病理切片觀察結果 (參考表二)，並加上其他相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，加以綜合評估判斷。

表二 病理切片評估

脂肪肝	脂肪（脂質油滴）堆積於肝臟中比例
正常	0%
輕微	< 10%
中度	10~33%
嚴重	33~66%
極嚴重	66~100%

五、宣稱、廣告與產品標示

受試產品進行以本評估方法推薦之試驗方法，且獲得明確之有效結果時，得向中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的宣稱、廣告或產品介紹。凡能降低血清 ALT、AST，並能減少組織切片之肝脂肪堆積的產品，得宣稱、廣告或介紹「經動物實驗，攝取本產品有助於延緩經酒精誘導所引起之脂肪肝或降低其危險因子」或其他相近具科學依據的詞句；但僅降低 ALT/AST 者，不得廣泛宣稱能預防或改善脂肪肝。本方法之試驗產品不得宣稱或擴大解釋其具有『解酒』之功效。

伍、 針對高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝

一、前言

近年來許多研究指出，給予 C57BL/6 (B6) 小鼠高脂飼料並監測其體重變化於 12 週後其體重即有明顯之差異，並於 17 週後觀察其肝損傷之情況，其肝臟重與體重比例顯著性增加，且其血液生化值中 AST (GOT)、ALT (GPT)、三酸甘油酯 (TG) 及膽固醇都明顯高於控制組，而肝臟組織切片亦呈現嚴重脂質堆積現象，且肝臟組織中的 GPx 及 SOD 亦呈現顯著性差異，現今已知高脂飼料造成肝臟脂肪堆積之機制主要起因於過多的游離脂肪酸持續被腸道吸收後運送至肝臟儲存與堆積，一連串的脂質代謝反應抑制了粒線體功能造成脂質代謝紊亂，肝臟細胞脂質氧化能力下降且延緩 TG 的輸出而在肝細胞堆積，而胰島素抗阻之作用亦伴隨之產生。此外，肝細胞的脂質變性使相關氧化傷害之酵素活性增加以去除多於自由基產生，若引發相關免疫反應便會破壞肝細胞存活而造成死亡，繼而造成脂性肝炎產生。

二、實驗項目與實驗方法

(一) 執行單位與執行人：

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠與肝臟生理代謝相關之專業背景與研究經驗或著作；試驗必須事先經過執行單位之動物試驗委員會審查通過。

(二) 實驗設計：

建議實驗動物採用雄性 8-10 週齡之 C57BL/6 (B6) 小鼠，起始體重約 20 克，每組至少 10 隻。動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。動物之飼養宜在恆溫 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、亮暗各 12 小時之動物房。飼養或處理時應避免動物驚嚇，且每次必須前後一致，避免誤

差值過大。本評估試驗之實驗組別應包括 1.正常對照組：攝取正常飲食；2.負控制組：攝取高脂飼料；3.試驗組：動物給予與負控制組完全相同之高脂飼料處理，並分別另給予 2 種以上不同劑量之試驗樣品，其中一組的劑量必須相當於人體的建議攝取量，且於高脂飼料誘導肝損傷前一星期即開始給予試驗樣品。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

1. 試驗方法：

本評估方法係採以高脂飼料誘導 C57BL/6 (B6)小鼠產生非酒精性脂肪肝損傷的實驗模式，本方法中之高脂飼料僅供參考（表一），亦可選擇其他適當市售高脂飼料。實驗前將 C57BL/6 (B6)小鼠依體重以逢機法平均分配至各組，動物至少分成 4 組，每組至少 10 隻：

- (1) A 組為正常對照組：自由進食正常飼料（脂肪含量 5-6%）+ 經口（peroral, per os, P.O.）管餵去離子水；
- (2) B 組為負控制組（肝損傷組）：自由進食高脂飼料（建議脂肪熱量百分比 45~60%）+ 去離子水（P.O.）；
- (3) 試驗組至少 2 組（C、D 組），視實驗設計需要可再增加組別：自由進食高脂飼料（脂肪含量必須與控制組同）+ 2 種以上不同劑量之試驗樣品（P.O.），其中之一劑量須與換算的人類建議攝取量相同。

2. 試驗步驟：

A 組（正常對照組）自由進食正常飼料（例如 AIN-93 或適當之市售飼料）；B~D 組動物自由進食高脂飼料，以誘導肝損傷。A、B 組每日管餵去離子水；C、D 組則於高脂飼料誘導肝損傷前 1 星期開始每日給予試驗樣品（前後共為期 18 週或有可信賴之期刊文獻所建議之期限【申請時，須附參考資料】）。

所有實驗動物於餵食高脂飼料的前 1 週與第 0 週及餵食高脂飼料期間（如第 8、11 及 14 週）須定期進行採血，採血前 8~12 小時禁食，並於投予試驗樣品或去離子水後 4 小時，以眼窩或臉頰採血方式檢測肝臟的生化功能：AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇、葡萄糖。最後試驗於預期可誘導肝損傷成功時結束，秤重後全部犧牲，並可從腹大動脈或心臟採血，以供檢驗肝臟生化

功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後比較其肝重/體重%，並將最大右葉肝割取 約 0.5 公分見方之組織塊，固定於 10%的中性福馬林（formalin）液中，然後以石蠟包埋、切片、貼附在載玻片上後，分別以蘇木紫－伊紅染色（haematoxylin-eosin stain, H&E stain）來進行組織病理學觀察。另外，利用其餘肝臟進行 TG 與膽固醇含量變化之檢測。

表一 誘發肥胖或脂肪肝之高脂肪飼料配方（僅供參考）

<i>The “Original” High Fat Diets for Diet Induced Obesity</i>						
Formulas						
Product #	D12450B		D12451		D12492	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	19.2	20	24	20	26.2	20
Carbohydrate	67.3	70	41	35	26.3	20
Fat	4.3	10	24	45	34.9	60
	Total	100		100		100
	kcal/gm	3.85	4.73		5.24	
Ingredient	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12	3	12
Corn Starch	315	1260	72.8	291	0	0
Maltodextrin 10	35	140	100	400	125	500
Sucrose	350	1400	172.8	691	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225	25	225
Lard*	20	180	177.5	1598	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0				
FD&C Red Dye #40			0.05	0		
FD&C Blue Dye #1					0.05	0
Total	1055.05	4057	858.15	4057	773.85	4057
Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.						
*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.95 mg/gram.						
D12450B -						
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 19						
Cholesterol (mg)/kg = 18						
D12451 -						
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 168.6						
Cholesterol (mg)/kg = 196.5						
D12492 -						
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 232.8						
Cholesterol (mg)/kg = 300.8						

3. 實驗動物與人體間試驗劑量之換算：

如欲以管灌（gavage feeding）方式給予受試樣品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種（species）內之體表，其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改

變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers），而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量（/kg bw/d）的 12.3 倍作為小鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之試驗樣品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應附其明確之資料來源。

（三）實驗測定項目：

在進行相關成分測定時，可參考以下建議之方法，亦得使用有學理根據之適當方法或具公信之市售套組進行分析。

1. 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

- （1）AST (GOT)
- （2）ALT (GPT)
- （3）TG
- （4）膽固醇
- （5）葡萄糖

2. 肝功能生化指數及血脂的檢測

所採之小鼠血液樣品在室溫下放置約 1 小時，使其凝結，再利用冷凍離心機於 4℃ 下以 15,700 × g 離心 5 分鐘，分離出血清。再以血液自動生化分析

儀檢測肝功能生化指數，如血清 AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇等，其中 AST (GOT)及 ALT (GPT)檢測原理是依據 Reitman 與 Frankel (1957) 及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986) 的標準方法。另必須測定肝臟 TG、膽固醇、肝重/體重 (%) 等肝臟脂肪堆積指標。

(四) 組織病理切片觀察：

試驗結束時，將所有小鼠均予以犧牲，採血後，將最大右葉肝臟割取約 0.5 公分見方的組織塊，置入 10% 的中性福馬林中固定其組織形態及結構，接著以不同濃度之乙醇 (30、50、70、95、99.5%) 以及二甲苯 (xylene) 進行脫水與透明化步驟，然後以熱石蠟溶液取代二甲苯，最後將組織以石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成 5 μ m 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於 37 °C 烘乾後用做進一步的病理染色。

1. 蘇木紫－伊紅 (haematoxylin-eosin, H&E) 染色法

將肝臟組織切片置入二甲苯 30 分鐘脫蠟，再依序置於 99.5、95、70、50 及 30% 之乙醇各 30 分鐘以進行復水，最後浸泡於蒸餾水 10 分鐘後即可進行染色。首先浸泡蘇木紫 30 秒染細胞核，再用蒸餾水清洗數分鐘，接著使用伊紅染色 2-5 分鐘，再用蒸餾水清洗數分鐘。完成染色過程後進行脫水步驟，依序放置於 50、70、95 及 100% 乙醇各 2 次，每次 30 秒，再以二甲苯進行透明化 2 次，最後以蓋玻片封存。

2. 組織病理學的觀察：

本評估方法將肝組織進行 H&E 染色，以方便觀察肝細胞的受損、脂肪堆積、壞死等慢性肝損傷之變化；或以冷凍切片 Oil-Red 染色觀察肝細胞脂肪油滴的堆積程度。為了避免觀察主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行病理染色。至於病理的半定量分析評估，則應由獸醫病理醫師，在不清楚本實驗設計的情況下進行單盲判讀，對所有切片進行評分比較 (評分表如表二)，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。病理切片之照片應提供高解析度之彩色圖檔；照片應統一以

中央靜脈 (central vein, CV) 或門靜脈 (portal vein, PV) 為中心拍照，若為各組之間的比較，顯微鏡的放大倍率須一致。

(五) 實驗數據統計分析：

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)。本評估方法必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

選擇適當的生物統計方法分析，比較試驗組於試驗前、後上述各指標值（亦即試驗的起始值、結束值）之結果變化，以及試驗組與正常對照組及負控制組間的比較是否具統計上之顯著改善 ($p < 0.05$)。本評估方法必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 同時比較各組別間之差異，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及相對於正常對照組及負控制組該試驗樣品是否具有明確的改善功效。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝臟或可降低其中某項危險因子之功能。

三、評估方法之測定項目原則

(一) 血清或血漿：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必測：AST (GOT)、ALT (GPT)、TG、膽固醇、葡萄糖

(二) 肝臟：測定各種相關成分或酵素活性

必測：TG、膽固醇

選測：Glutathione (GSH)、Glutathione peroxidase (GPx)、Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT)、Glutathione reductase (GRd)

(三) 病理切片觀察

必測：H&E 染色

選測：冷凍切片 Oil-Red 染色

(四) 必測：記錄慢性實驗期間動物每週體重、肝重/體重(%)、死亡率及其他相關之測定項目。

(五) 其他相關之測定項目由送審單位自行評估是否需要執行。

四、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值、病理切片觀察結果(參考表二)，並加上其他相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，加以綜合評估判斷。

表二 脂肪肝的評估

脂肪肝	脂肪(脂質油滴)堆積於肝臟中比例
正常	0%
輕微	<10%
中度	10~33%
嚴重	33~66%
極嚴重	66~100%

五、宣稱、廣告與產品標示

受試產品進行以本評估方法推薦之試驗方法，且獲得明確之有效結果時，得向中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的宣稱、廣告或產品介紹，凡能降低血清 ALT、AST，並能減少組織切片之肝脂肪堆積的產品，得宣稱、廣告或介紹「經動物實驗，攝取本產品有助於延緩經高脂飼料誘導所引起之脂肪肝或降低其危險因子」或其他相近具科學依據的詞句。但若僅降低 ALT/AST 者，不得廣泛宣稱能預防或改善脂肪肝，本方法之試驗產品不得宣稱或擴大解釋具有『減肥』之功效。