

比較 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解與 CAMP 試驗鑑定 B 群鏈球菌的效能

陳柔¹ 鄭仕雯² 蔡文城^{3,4}

國立中興大學植物病理學系，台中市¹；慈濟大學醫學檢驗生物技術系，花蓮縣²；台美檢驗科技有限公司臨床微生物組，新北市³；國立陽明大學微生物及免疫學研究所，台北市，台灣⁴

摘要

行政院衛生福利部國民健康署公告之 B 群鏈球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌) 標準作業流程中, Carrot broth 係作為檢體中 GBS 的增菌及區分性鑑別之用, 其判別依據為呈現胡蘿蔔色, 表示 100% 為 GBS。檢驗室鑑定 GBS 最常用的試驗為 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗及鏈球菌血清分型試驗, 由於操作這些試驗各有其優缺點, 啟新公司 (CMP, 台灣) 利用 carrot broth 對 GBS 具有 100% 的特異性而將其配方加以改良, 成功地研發出鑑定用不含抗生素的 GBS-ID carrot broth。由於正確且快速地篩檢 GBS 具有臨床重要性, 為了瞭解鑑定用 GBS-ID carrot broth 的效能, 本研究以此培養基與 GBS 的其它鑑定方法, 包括 CAMP 試驗與 hippurate 水解進行效能包括敏感性 (sensitivity) 及特異性 (specificity) 的比較。以臨床分離株及標準菌株作為測試對象, 試驗菌株包括 120 株 β 溶血型 GBS, 其它 β 溶血型鏈球菌: 7 株 A 群鏈球菌 (GAS)、1 株 G 群鏈球菌 (GGS) 及其它非鏈球菌菌屬的菌種 32 株, 總共 160 株, 結果顯示 GBS-ID carrot broth、CAMP 試驗與 hippurate 水解試驗的特異性分別為 100%、77.5% 與 92.5%; 敏感性分別為 98.3%、100% 與 100%。綜合上述, GBS-ID carrot broth 鑑定 GBS 的效能顯然地優於 CAMP 及 hippurate 水解試驗, 值得臨床檢驗人員加以應用。

關鍵字: B 群鏈球菌、乙型鏈球菌、CAMP、hippurate 水解、GBS-ID carrot broth、敏感性及特異性

前言

B 群鏈球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*, 無乳鏈球菌, 乙型鏈球菌) 為革蘭氏兼性厭氧性雙球菌 (diplococci), 常存在於人體腸道、陰道、膀胱。帶有 GBS 的孕婦在分娩時新生兒通過產道常引起垂直傳染, 導致新生兒腦膜炎、敗血症和肺炎, 甚至死亡^[1,2]。美國、瑞典、英國等國

家, GBS 感染佔新生兒所有感染類別中約 22-60%。在 1970 年代, GBS 在美國新生兒感染的致死率高達 50%^[3], 因此, 美國疾病管制局 (Center for Disease Control and Prevention, CDC) 積極制定管理政策, 使新生兒 GBS 感染致死率成功地降至 1990 年代的 4%^[4-8]。該機構的公告建議懷孕 35~37 週孕婦需進行陰道及肛門拭子的 GBS 檢測, 若呈陽性, 則在周產期給予預防性抗生素, 將新生兒感染率降低 75% 以上^[9]。2008 年蘇等調查台灣北、中、南部地區 10 家醫院 35~37 週周產期孕婦陰道的 GBS, 結果發現帶菌率為 17.2%, 其中北部地區為 16.1%、中部地

*聯絡地址: 台美檢驗科技有限公司
24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城
電話: 886-(02)2298-1887
E-mail: wctsai@superlab.com.tw

區 18.3%、南部地區 16.7%^[10]。為了提倡優生保健政策，衛福部國民健康署從提升產前 GBS 檢查普及率著手，於 2014 年 4 月起將 GBS 的檢測納入健保給付^[11]，對生育低的台灣，顯然地，是一項重大的福利措施，值得其它開發中國家參考。

國民健康署公告的 GBS 檢驗流程^[12]建議以無菌棉棒拭子自陰道及/或直腸口採檢後，放入一般嗜氧檢體運送管(aerobic transport system)運送到檢驗室，檢驗人員取出拭子移種於 blood agar plate (BAP)，再將拭子插入選擇性培養基 Lim broth 或 carrot broth 選擇性培養液，在 35°C 培養，18-24 小時後觀察 BAP 是否有疑似 GBS 菌落或觀察 carrot broth 產生胡蘿蔔色，若培養後顯色，則不需移種 BAP。若無，則移種 Lim broth/carrot broth 至另一個 BAP，培養後再觀察。若有疑似菌落，則操作 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗或鏈球菌血清分型試驗，然後發出最終報告。

現在市面上有許多 GBS 增菌培養基產品，包括 Lim broth、GBS carrot broth (啟新，台灣)、StrepB carrot broth (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)及 GBS Medium (Northeast Laboratory Services, Winslow, ME)。兩種廠牌 carrot broth 相較於傳統的 Lim broth 增菌培養基，更可提高特異性及敏感性、簡化流程、並縮短鑑定時間^[9,13-15]。

GBS 檢測流程中，增菌前後均需移種 BAP，當長出疑似 GBS 菌落，需進一步加以鑑定，此將延長報告時間。為了及早發出報告，因此，一些廠家研發出區分性培養基包括 GBS carrot agar (CMP, 啟新, 台灣)^[16]、GBS Detect agar (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)^[17]及 CHROMagar StrepB (CHROMagar, 法國)^[18]。期能從生長菌落的顯色或溶血特性及能判斷出其為 GBS，但實際應用上，僅 GBS carrot agar 能夠達到

快速鑑定 GBS 的目標^[16]。

BAP 生長的疑似 GBS 菌落最常用的鑑定試驗為 CAMP 試驗、hippurate 水解試驗^[19-22]及鏈球菌血清分型試驗，由於 carrot broth 選擇性培養基對 GBS 具有 100% 的特異性，啟新公司將其配方加以改良，成功地研發出鑑定用不含抗生素的 GBS-ID carrot broth。為了瞭解鑑定用 GBS-ID carrot broth 的效能，本研究比較 GBS-ID carrot broth、CAMP 試驗及 hippurate 水解試驗對 GBS 鑑定的敏感性及特異性。

材料及方法

試驗菌種來源

供試的 GBS、*S. pyogenes* (GAS)、Group G Streptococci (GGS) 及非鏈球菌種/菌株共 160 株，除了 ATCC 標準菌株外，臨床測試菌種皆來自台美醫事檢驗所(新北市，台灣)。臨床菌株係從大台北地區各醫院產前檢查檢體中分離，而各種標準菌株則購自美國菌種保存中心(ATCC)的授權公司 MicroBioLogicals 公司 (MBL, 加拿大)。這些菌種/菌株保存於 -70°C 冷凍櫃中的 GermBank 菌種保存裝置 (啟新公司，台灣)。

菌種的特性及確認

進行試驗前，由 -70°C 的 GermBank 裝置取出庫存菌，除了嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)移種 chocolate agar 及退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)移種 BCYE α agar 外，所有其它菌種皆移種於 BAP，分別培養於 35°C 的適當環境，18~24 小時挑取單一菌落繼代培養兩次，觀察菌落特徵，若有懷疑，則進行必要的鑑定試驗，而 GBS 的確認試驗則包括在 BAP 上的菌落特徵、溶血狀況及染色抹片顯微鏡底下特徵，並配合 CAMP 試驗、Streptococcal grouping kit (DR0585A, Oxoid, UK) 之 latex serologic test 與 hippurate

水解試驗。若菌落溶血型為 β 溶血或不溶血，革蘭氏陽性球菌，觸酶陰性，且血清分群試驗符合 GBS，則做為測試菌。

GBS-ID carrot broth 試驗

GBS-ID carrot broth 配製 2 mL/試管，而有別於增菌用的 GBS carrot broth 4 mL/試管。操作時，以接種環挑取測試株的單一菌落接種 GBS-ID carrot broth，於 35°C 一般培養箱 18~24 小時，觀察顏色變化，並以 *S. agalactiae* (ATCC 12386) 為陽性對照及以 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 為陰性對照，判讀時，呈胡蘿蔔色或淡胡蘿蔔色為陽性，不變色為陰性（圖 1），GBS-ID carrot broth 弱陽性的判讀方式為以白紙為背景與陰性管同時觀察呈色。

CAMP 試驗^[19]

使用的培養基為 BAP (blood agar plate)，實驗進操作時，在 BAP 上先接種 β 溶血型的 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (金黃色葡萄球菌) 劃一橫線，再以試驗菌與前一劃線作垂直接種，直角交界處兩菌需相距 5~7 mm^[13]，於培養在 35°C，5% CO₂ 培養箱 18~24 小時，即可觀察是否有加強溶血現象。每次試驗皆以 *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) 作為陽性對照及以 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 為陰性對照（圖 2）。

Hippurate 水解試驗^[19-22]

接種大量新鮮試驗菌於含有 0.4 mL sodium hippurate (1%) 的試管中，於 35°C 一般培養箱培養 2 小時後，加 5 滴 ninhydrin reagent 再放回培養箱 10 分鐘，不可超過 30 分鐘，並進行觀察，*Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) 作為陽性對照；*Streptococcus pyogenes* (ATCC 14289) 最為陰性對照，呈現藍色為陽性，不變色極弱陽性為陰性（圖 3）。

上述培養基及試劑皆購自啟新生物科技有限公司（新北市，台灣）。

結果

本研究使用 120 株 β 溶血型 GBS 臨床菌株及其它非 GBS 菌株包括 7 株 GAS 與 1 株 GGS，以及其它菌株共 32 株，進行 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解及 CAMP 試驗以評估其等鑑定 GBS 的效能。結果指出 GBS-ID carrot broth 特異性為 100%；CAMP 試驗 77.5% (31/40)；Hippurate 水解為 92.5% (37/40)，GBS-ID carrot broth 特異性較其它兩者高；而敏感性方面，GBS-ID carrot broth 敏感性為 98.3% (118/120)（表 1），Hippurate 水解與 CAMP 試驗皆為 100% (120/120)。120 株 GBS 臨床菌株中有 22 株呈現弱陽性，但仍甚易與陰性結果區分（圖 1），其中有 2 株未產胡蘿蔔色。進行 CAMP 試驗時發現

表 1. 以 GBS-ID carrot broth 偵測 120 株 β 溶血型 GBS 臨床菌株之效能^a

GBS-ID carrot broth	傳統鑑定結果 ^b	
	陽 性	陰 性
陽 性	118	0
陰 性	2	40
菌株共計	120	40

^a GBS-ID carrot broth 的敏感性(sensitivity)為 98.3% (118/120)，而特異性(specificity)為 100% (40/40)，效能 (efficiency)為 98.8% (158/160)，陽性預測值(positive predictive value, PPV)100% (118/118)，陰性預測值(negative predictive value, NPV)95.2% (40/42)。^b 傳統鑑定結果代表 CAMP、hippurate 水解及 latex serologic test 三種試驗中至少有兩種呈現陽性為符合 GBS 的特性。



圖 1. 接種 GBS 至 GBS-ID carrot broth：由左至右分別為陰性、弱陽性及陽性反應。

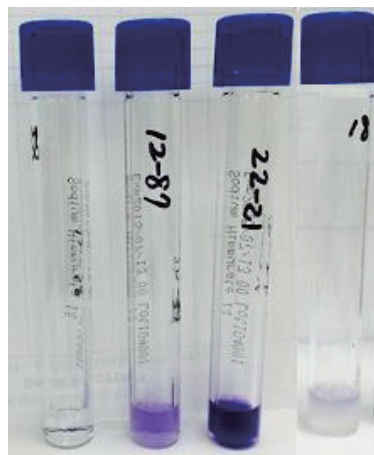


圖 2. GBS 的 Hippurate 水解試驗：由左至右分別為陰性、陽性、陽性及些微呈色(陰性)反應。

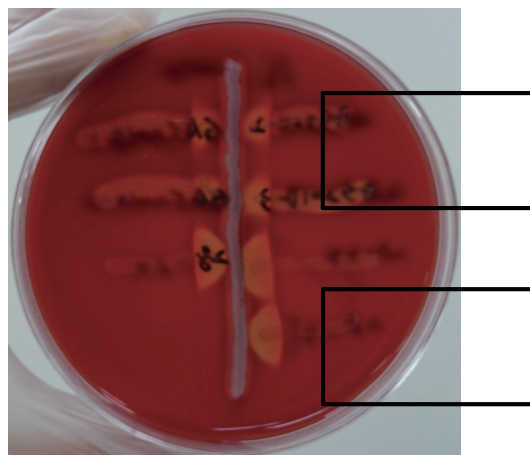


圖 3. CAMP 試驗：右上框為臨床 GAS 測試株，而右下框為 GBS 測試株，兩者皆有加強溶血的現象。

7 株 GAS 中有 1 株參考菌株(*Streptococcus pyogenes*, ATCC 19615)與 4 株臨床菌株呈現陽性。

討 論

不論早發型或晚發型 GBS 感染皆會造成新生兒嚴重的併發症，快速準確的篩檢 GBS 有其臨床上必要性。衛福部國民健康署公告的標準檢驗流程^[12]提到採檢棉棒移種 Lim broth 或 GBS carrot broth 增菌培養基的前後需移種 BAP，若有疑似菌落則進行 CAMP 試驗、Hippurate 水解試驗與鏈球菌血清學分型，然後發出鑑定報告。

以實際應用性比較 GBS-ID carrot broth、hippurate 水解及 CAMP 試驗，結果指出 hippurate 水解試驗操作上有其不便性，即必須接種大量菌落，而臨床上則常無法因應，必須以 BAP 再進行次培養，需多一天的時間以及增加培養基成本，另外進行一個試驗項目需 3~5 分鐘，培養 2 小時後，再加 ninhydrin reagent 反應 10~15 分鐘，雖一天即可顯示反

應結果，但時間分配必須精準。Hippurate 水解試驗之陽性呈現深藍色，但 160 株試驗菌株中有 5 株試驗菌株(3.1%)呈現淡藍色使判讀不易。CAMP 試驗操作時 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 與試驗菌直角交界處需相距 5~7 mm，若菌距太近也會有加強溶血的現象，吾等發現 7 株 GAS 菌株中有 5 株呈現 CAMP 陽性，需觀察其菌落為寬形溶血特徵才能與 GBS 區分，若臨床經驗不足則會有誤辦之情形(圖 3)，GBS-ID carrot broth 判讀容易，若為弱陽性，以白紙為背景與陰性管作對照即可區別(圖 1)，且弱陽性或呈現陰性之 β 溶血型 GBS 測試株呈色效果不隨培養環境及時間而改變，包括 35°C 一般培養箱、厭氧箱及 5% CO₂ 培養箱不同之培養環境。總之，本研究發現 GBS 測試菌株接種至 GBS-ID carrot broth，18~24 小時培養後即可達到呈色效果。

參考文獻

1. Schuchat A. Group B streptococcus. Lancet 1999; 353:

- 51-6.
- Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002; 347:233-9.
 - Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973; 82:707-18.
 - Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, et al. Prevention of perinatal group streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2002; 16:1-22.
 - CDC. Adoption of prenatal group B streptococcal disease prevention recommendations by prenatal-care providers—Connecticut and Minnesota. 1998. *MMWR Recomm Rep* 2000; 49:228-32.
 - CDC. Early-onset group B streptococcal disease, United States, 1998-1999. *MMWR Recomm Rep* 2000; 49:793-6.
 - CDC. Laboratory practices for prenatal group B streptococcal screening and reporting—Connecticut, Georgia, and Minnesota, 1997-1998. *MMWR Recomm Rep* 1999; 48:426-8.
 - Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41:25-32.
 - Jennifer V, Lesley M, Stephanie S. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59:1-23.
 - 蘇勳璧、謝保群、呂衍孟、吳昆哲、許權霖。台灣地區周產期 B 群鏈球菌感染評估。 *疫情報導* 2008; 24:336-48。
 - http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPNet/Portal/File/ThemeDocFile/201003020902046432/預防保健服務問答集_1010813.pdf
 - 行政院衛生署國民健康局。孕婦乙型鏈球菌(Group B *Streptococcus*)檢驗標準作業手冊 2002:1-6。
 - Schreckenberger P, Hsiung A, Marnell C, Terrile L, Soto Y, Miller M, Ilendo E, Nachum R, DiPersio J, Fairbanks L, Abbey G, Luper D, Phillips W, Peterson G, Hardy J. Evaluation of Strep B Carrot Broth™ and LIM broth methods for recovery of group B streptococci (GBS). Results of a multi-center trial. 2005. Abstracts of the Annual Meeting of the ASM (C-109).
 - Facklam R, Elliott J, Hsiung A. Y, Clasen R, Peterson G, Strickler S, Hardy J. Evaluation of accuracy of Strep B carrot broth™ in the detection of different serotypes of group B streptococci (GBS). A poster presentation at ASM 106th General Meeting, Orlando, FL. 2006.
 - Church D L, Baxter H, Lloyd T, Miller B, Elsayed S. Evaluation of Strep B carrot broth versus Lim broth for detection of group B *Streptococcus* colonization status of near-term pregnant women. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2780-2.
 - 鄭仕雯、陳柔、沈慧珊、歐宇祥、蔡文城。GBS Carrot Agar 鑑別 B 群鏈球菌的效能。 *檢驗及品保雜誌* 2014; 3:85-95。
 - GBS Detect - for the detection of non-hemolytic strains of Group B *Streptococcus* - for use with Carrot Broth. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/GBSDetect.html
 - CHROMagar. CHROMagar™ Strep B instructions for use. www.chromagar.com.
 - 蔡文城、蔡岳廷。實用臨床微生物診斷學，第十版。2011:571-658。九州圖書文物有限公司，台北，台灣。
 - Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In Versalovic JV, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. 2011:331-49. ASM press, Washington DC, U.S.A.
 - Winn W, Jr., Allen S, Janda W et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. 2006:683-8. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A.
 - MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. 2000: 35-56; 188-204. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A.

Comparison of the Efficacy of GBS-ID Carrot Broth, Hippurate Hydrolysis and CAMP Test for the Identification of Group B *Streptococcus*

Jou Chen¹, Shih-wen², Wen-cherng Tsai^{3,4}

¹Department of Plant Pathology, National Chung-Hing University, Taichung; ²Department of Medical Technology, Tzu Chi University, Hualien; ³Super laboratory, Ltd., New Taipei City; ⁴Institute of Microbiology and Immunology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

The standard laboratory method to test for Group B *Streptococcus* (GBS) promulgated by the Bureau of Health Promotion, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan, Taiwan, recommends that carrot broth be used to enrich and differentiate GBS in samples from preterm pregnant women. The identification of GBS is based on the presence of carrot-pigment, meaning that any appearance of this pigment is 100% due to the presence of GBS. The frequently used diagnostic methods to test for GBS in laboratories are the CAMP test, hippurate hydrolysis and the serological grouping of streptococci. Because of some disadvantages involved in conducting those methods, and because carrot broth can identify GBS with 100% specificity, we revised a carrot broth formula and thereby successfully developed an antibiotic-free GBS-ID carrot broth. It is clinically important to screen GBS rapidly and accurately. To understand the efficacy of the GBS-ID carrot broth for GBS identification,

we compared the efficacy (specificity and sensitivity) of the GBS-ID carrot broth, the CAMP test and hippurate hydrolysis. We used clinical isolates and reference strains including 120 strains of β -hemolytic GBS, other β -hemolytic species of *Streptococcus* (including 7 strains of group A and 1 strain of group G), as well as 32 other non-*Streptococcus* species. In total, 160 test strains were used. The results indicated that specificity rates for the GBS-ID carrot broth, the CAMP test and hippurate hydrolysis were 100%, 77.5% and 92.5%, respectively, whereas the sensitivity rates were 98.3%, 100% and 100%, respectively. Based on the above findings, we conclude that the efficacy of GBS-ID carrot broth is superior to that of the CAMP test and hippurate hydrolysis, and therefore worthy of application in clinical laboratories.

Key words: GBS-ID carrot broth, CAMP, Hippurate hydrolysis.

比較螢光單染法與螢光併用 Ziehl-Neelsen 法 對篩檢痰抹片正確性評估

蔡相宜¹ 林宛如¹ 吳佩真¹ 李秀霞^{1,2} 蔡岳廷^{1,2} 蔡文城^{2*}

台美醫事檢驗所¹；台美檢驗科技有限公司，新北市，台灣²

摘要

臨床檢體中結核菌的檢驗方法建議，當進行抹片檢體的抗酸性染色時，可先利用敏感性較高的螢光法 (fluochrome method, F method) 快速篩檢，若鏡檢呈陽性時，再以螢光併用 Ziehl-Neelsen 法 (F+ZN method) 進行染色，確認抹片結果是否為真陽性。為了瞭解螢光併用 Ziehl-Neelsen 法的必要性，因此吾等利用 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 5 月 31 日間所收集的 16,409 件檢體進行分析，在所有檢測檢體的培養結果中分枝桿菌的陽性率佔 8.9% (1,458/16,409)。整體而言，MTBC 與非結核分枝桿菌 (NTM) 的比例為 43.3% (631/1458)：56.7% (827/1458)。若依據螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性且培養陽性結果進行統計，則 MTBC 與 NTM 的比例為 61.9% (390/630)：38.1% (240/630)，此差異性係因為 MTBC 較容易由螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偵測出。另外快速生長 NTM、慢速生長 NTM 及未能鑑定 NTM 的比例分別為 15.8% (38/240) 77.5% (186/240) 與 6.7% (16/240)。又將抹片染色的檢測檢體進行與培養結果的相關性分析，結果指出螢光法的偽陽性高達 8.6%，螢光併用 Ziehl-Neelsen 法的偽陰性為 3.1%，偽陽性的結果可能導致病患可能接受不必要的藥物治療，將造成健康受損、經濟損失或導致分枝桿菌抗藥菌株的產生；而偽陰性的結果將造成流行病學上的問題。有鑑於兩種染色方法仍有其偵測極限，檢驗室仍有必要參考分生、免疫學等其它檢測方法，並以檢體培養結果做為診療的「金標準」。

關鍵字：螢光法、螢光併用 Ziehl-Neelsen 法

前言

分枝桿菌 (*Mycobacterium species*) 為抗酸性桿菌之一，細胞壁中有蠟樣層 (wax-like layer)，其 mycolic acids 是一種長鏈脂肪酸 (long-chain fatty acids)，具有耐受或抵抗酸性酒精的脫色。

常用的抗酸性染色方法有兩種：(i) auramine-rhodamine fluochrome method (以下

稱為螢光法)：以螢光顯微鏡觀察，抗酸菌在暗背景下將呈現橘黃色螢光菌體。(ii) 石碳酸複紅染色法 (carbolfuchsin method)：可分為 Ziehl-Neelsen method (熱染法) 及 Kinyoun method (冷染法)，兩種方法的染色步驟一樣，在光學顯微鏡下的菌體呈紅色，而背景呈藍色。

由於分枝桿菌包括結核分枝桿菌群 (*M. tuberculosis complex*, MTBC) 及非結核分枝桿菌 (non-tuberculous mycobacteria, NTM)，因此抗酸性染色抹片呈陽性並不一定代表 MTBC 的存在，而不能作為 MTBC 的確診；同樣地，抗酸性染色抹片陰性也不能解釋病

*聯絡地址：台美檢驗科技有限公司
24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城
電話：886-(02)2298-1887
E-mail：wctsai@superlab.com.tw

人沒有受到 MTBC 感染，因檢體中需 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ cfu/mL 菌體才能在抹片中被檢出，敏感性約 50-60%^[1]。檢驗室通常以培養結果作最後確診的「金標準」。然而 MTBC 在分枝桿菌分離培養基如 Lowenstein-Jensen (L-J) medium 或 Middlebrook 7H11 agar 的生長速度緩慢，常需 3~8 星期才能獲得結果，即使以 MGIT 自動偵測儀器接種培養，仍然費時 10 天左右才能獲得結果。為了即時診療，雖然抗酸性染色敏感性不高，但仍被建議作為臨床醫師初步診斷 MTBC 的參考，檢驗室需將鏡檢結果在 24 小時內提出報告。本研究為探討痰檢體抹片抗酸性染色的螢光法(F method)與螢光併用 Ziehl-Neelsen 法(F+ZN method)結果與培養的相關性，以驗證分枝桿菌檢體培養的必要性。

材料與方法

檢體來源

本研究期間為 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 5 月 31 日，共收集 16,409 件檢體進行抗酸性染色及培養，檢體來源為北部各醫療院所。

檢體抹片製作^[1]

先將載玻片標示患者姓名及病患編號後，隨即滴一滴 0.2% bovine serum albumin, Fraction V (BSA; CMP, Taiwan)，接著使用一支無菌滴管將經消化-去污染-濃縮的前處理後痰檢體沉澱物加以混合均勻，取一滴沉澱物與載玻片上的 0.2% BSA 混合，製成 1 x 2 cm 大小（需注意檢體分布的均勻度），然後將玻片移至加熱板上乾燥（沒有固定時間，以肉眼觀察為主）。

痰抹片的抗酸性染色^[2]

痰抹片的抗酸性染色首先以螢光法篩檢，以螢光顯微鏡 200 x 觀察，可疑菌體再以 400 x 確認。螢光法陽性的抹片再以螢光併用 Ziehl-

Neelsen 法進行染色，然後於光學顯微鏡下以 1,000 x 油鏡觀察，確認抹片結果是否為真陽性。

螢光法(F method)染色^[2-4]

將乾燥的玻片過火 2~3 次加以固定，冷卻 3~5 分鐘再進行螢光染色，首先將玻片加入第一劑 auramine-rhodamine（金胺 O-羅丹明）溶液，蓋滿整個玻片。靜置 15 分鐘（注意：不可加熱）。接著以二次水沖洗玻片，加入第二劑脫色劑(0.5% HCl-acid alcohol)（酸性酒精）（以 3% HCl-acid alcohol 稀釋六倍）並覆蓋整個玻片，進行脫色約 2 分鐘。假設玻片還可以看到殘存紅色時，再添加酸性酒精至完全脫掉紅色為止。一樣地，再以二次水沖洗玻片，將染色架之玻片置於試管架上。最後，抹片以加入稀釋 50 倍之第三劑 methylene blue（甲基藍）溶液進行染色，約 5~10 秒。（註：必須嚴格控制時間，若染色過久，將會抑制抗酸性菌的螢光）。馬上快速以二次水沖洗玻片，直到無藍色染劑出現為止。乾燥後以螢光顯微鏡 200 x 及 400 x 鏡檢。進行抹片染色時須同時操作陽性及陰性對照^[1,2]

螢光併用 Ziehl-Neelsen 法(F + ZN method)染色^[2-4]

螢光併用 Ziehl-Neelsen 法為將經螢光法染色後以螢光顯微鏡判斷結果陽性之抹片再以 Ziehl-Neelsen method 進行染色。首先以石碳酸複紅染液 (carbol-fuchsin) 覆蓋抹片區域後，以沾有 95% 酒精棉球的火燄於抹片下，緩慢移動加熱至玻片上的染色液冒出少許蒸氣，但不可沸騰或乾掉。讓染色液停留在玻片上 5 分鐘，不必再加熱。接著再以酸性酒精 (3% HCl-acid alcohol) 作用約 2 分鐘後水洗。若玻片仍可看到殘存紅色時，再添加酸性酒精 (3% HCl-acid alcohol) 至完全脫

掉紅色為止。最後以甲基藍 (methylene blue) 覆染 30~60 秒後水洗。乾燥後鏡檢，使用一般光學顯微鏡鏡檢(1,000 x)，觀察整個抹片至少 300 個視野，時間為 90 秒以上，以便確認抗酸菌是否為真陽性。

抗酸菌培養^[2-4]

將檢體經過消化-去污染-離心濃縮處理，經過處理後的檢體隨即接種在分枝桿菌培養基上。其中 L-J medium 接種後需鬆蓋，培養於 10% CO₂，35°C 培養箱數天，之後再將螺旋蓋鎖緊移至一般培養箱，5~7 天後觀察培養基上菌落生長情形，若無生長則隨後每週至少觀察一次，直到第 8 週。另外接種的 MGIT 培養管則置 BACTEC™ MGIT™ 960 系統裡，儀器會自動判讀至 42 天為止。

分枝桿菌分離率

分枝桿菌分離率的計算以實際在分離培養基(Lowenstein-Jensen medium 及 MGIT 管)長出 MTBC 及 NTM 的檢體數除以總檢體數。除了分離率外，並將依據是否操作抗酸性染色抹片分別計算培養結果的 MTBC 與 NTM 分離比例。

抗酸菌鑑定^[5]

若發現 L-J 上有疑似分枝桿菌菌落，則染色確認為抗酸菌後，再萃取 DNA，以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)擴增特定的目標片段 DNA 序列，再與 CMP™ MycoCheck 晶片上的 DNA 探針進行雜交反應(hybridization)，最後利用呈色位置判斷菌名。另外接種的 MGIT 培養管則置 BACTEC™ MGIT™ 960 系統裡，儀器會自動判讀至 42 天為止。培養期間若發現陽性，同樣地，亦以 CMP™ MycoCheck 晶片進行鑑定。生物晶片鑑定操作時皆攜帶陽性對照組(*M. tuberculosis* ATCC 25177 與實驗室培養出的非

結核分枝桿菌菌株)、陰性對照組(萃取 DNA 的 lysis buffer)。

結果

從 2014 年 1 月至 2014 年 5 月同時執行染色及培養之檢體數共 16,409 件，其中 MTBC 與 NTM 的比率為 43.3%(631/1,458)：56.7%(827/1,458)，此比例與以前的統計相近^[2]；統計其分枝桿菌之整體分離率，則 MTBC 與 NTM 的比例為 41.0% (936/2,285)：59.0% (1,349/2,285)。

螢光法染色陽性率為 1,081 件(6.6%，1,081/16,409)，而經螢光併用 Ziehl-Neelsen 法確認呈抗酸性陽性為 955 件(88.3%，955/1,081)，陰性 126 件(11.7%，126/1,081)。當分別以螢光法及螢光併用 Ziehl-Neelsen 法與培養結果比較，將可得到以下三種結果：(i) 螢光法陽性/螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性/培養陽性(真陽性)(ii) 螢光法陽性/螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性/培養陽性(螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偽陰性)及(iii)螢光法陽性/螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性/培養陰性(螢光法偽陽性)。

螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性為 955 件，且培養結果呈陽性為 597 件(63%，597/955)，陰性為 358 件(37%，358/955)；而螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性的 126 件中，培養陽性為 33 件(26%，33/126)，陰性為 93 件(74%，93/126)(表 1)。

本研究發現螢光法染色呈陽性者共有 630 件，培養陽性者共有 1,458 件，敏感性 43.2%，特異性 97.0%(表 2)。螢光併用 Ziehl-Neelsen 法呈陽性者 597 件，敏感性 40.9%，特異性 97.6%(表 3)。

由螢光併用 Ziehl-Neelsen 法與培養結果相關性統計可得知(i) 螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性/培養陽性(真陽性)：為 597 件(55.2%，597/1,081)。(ii) 螢光併用 Ziehl-

表 1. 螢光法及螢光併用 Ziehl-Neelsen 法與分離菌種的相關性

培養後的生長菌	染色方法及結果	螢光併用 Ziehl-Neelsen 法	
		螢光法	+
MTBC		+	+
<i>M. avium-intracellulare</i> (MAC)		+	+
<i>M. chelonae</i>		+	+
<i>M. fortuitum</i>		+	+
<i>M. gordonae</i>		+	+
<i>M. kansasii</i>		+	+
<i>M. neoaurum</i>		+	+
<i>M. scrofulaceum</i>		+	+
<i>M. abscessus</i>		+	+
其它 NTM		+	+
培養 56 天後分枝桿菌陰性		+	+
總計		+	+

表 2. 螢光法偵測痰檢體中分枝桿菌的效能

螢光染色結果	培養結果		培養檢體共計
	陽性	陰性	
陽性	630	451	1,081
陰性	828	14,500	15,328
螢光染色抹片共計	1,458	14,951	16,409

* 螢光法偵測分枝桿菌的敏感性為 43.2% (630/1,458)，特異性 97.0% (14,500/14,951)；陽性預測值(PPV)58% (630/1,081)，陰性預測值(NPV) 95%(14,500/15,328)，效能(efficiency) 92.2% (15,130/16,409)。

表 3. 螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偵測痰檢體中分枝桿菌的效能

螢光併用 Ziehl-Neelsen 法結果	培養結果		培養檢體共計
	陽性	陰性	
陽性	597	358	955
陰性	861	14,593	15,454
螢光併用 Ziehl-Neelsen 法抹片共計	1,458	14,951	16,409

* 螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偵測分枝桿菌的敏感性為 40.9% (597/1,458)，特異性 97.6% (14,593/14,951)；陽性預測值(PPV)62.5% (597/955)，陰性預測值(NPV) 94.4% (14,593/15,454)，效能(efficiency) 92.6% (15,190/16,409)。

表 4. 螢光法及螢光併用 Ziehl-Neelsen 法與培養結果的相關性

分析項目	比率
螢光法陽性 (件數)	1081
螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性且培養陽性件數 [真陽性率 (%)]	597(55.2%)
螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性但培養陽性件數 [螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偽陰性率 (%)]	33(3.1%)
螢光併用 Ziehl-Neelsen 法及培養皆陰性件數 [螢光法偽陽性率 (%)]	93(8.6%)
抹片件數	16,409
螢光法陰性，且螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性，但培養陽性件數 [陽性率 (%)]	828(5.0%)

Neelsen 法陰性/培養陽性（螢光併用 Ziehl-Neelsen 法偽陰性）為：33 件(3.1%，33/1,081)。
(iii) 螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陰性/培養陰性（螢光法偽陽性）為：93 件(8.6%，93/1,081)（表 4）。

討 論

本研究以螢光法、螢光併用 Ziehl-Neelsen 法的結果分別與培養結果比對，發現對分枝桿菌的檢測效能並無顯著差異(92.2%：92.6%)。螢光法的敏感性比螢光併用 Ziehl-Neelsen 法高 2.3% (43.2%：40.9%)，但螢光法的敏感性雖佳卻也容易受到許多因素影響而導致偽陽性^[2-4]。又螢光併用 Ziehl-Neelsen 法比螢光法的特異性增加 0.6% (97.0%：97.6%)，表面上看起來兩種方法的效能差不多，其原因可能為本研究的實驗室操作人員對痰檢體抹片的製作技術優良^[1]，且螢光法染色技術純熟及經驗豐富，能夠排除檢體基質的干擾之故。

另外螢光法陽性但培養陰性的比率為 41.7%，螢光併用 Ziehl-Neelsen 法陽性但培養陰性(33.1%)有效降低螢光法偽陽性(8.6%)。此證明疾病管制署公告的方法建議以螢光法進行初步篩選再以 Ziehl-Neelsen 法進行確認的有效性，確實可以降低螢光偽陽性。

本研究結果亦指出(i)在 16,409 件檢測檢體中，分枝桿菌的陽性率佔 8.9% (1,458/16,409)。(ii) 螢光法染色陽性抹片的檢體進行計算，指出 MTBC 與 NTM 的比例為 61.9% (390/630)：38.1%(240/630)，及(iii) 快速生長 NTM、慢速生長 NTM 及未能鑑定 NTM 的比率分別為 15.8%(38/240)，77.5% (186/240)與 6.7%(16/240)。雖然螢光法陽性

且培養陽性中 MTBC 與 NTM 的比例為 61.9% (390/630)：38.1% (240/630)，但同時執行染色及培養之檢體數 16,409 件中 MTBC 與 NTM 的比率卻是 43.3% (631/1458)：56.7% (827/1458)。螢光法染色陽性檢體中的 MTBC 比率較 NTM 高，主因為 MTBC 鏡檢下菌體形態容易被辨別所致。此可由 2013 年 1 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日台灣 31 家衛福部疾病管制署認可實驗室結果統計^[5] 得到驗證。該報告指出 MTBC 培養陽性/抹片陰性率中位數為 38.6%，而 NTM 培養陽性/抹片陰性率中位數則為 75.0%，此顯示出 MTBC 較易由螢光染色/抗酸性染色偵測出^[5]。另外，陳等^[6] 完整地分析台灣分枝桿菌類別及個別菌種的分離率指出 MTBC 與 NTM 的比例為 37.7%：62.3%，此數據與本研究所發現的比例相近。

參考文獻

1. 韓之諒、吳佩真、蔡相宜、林宛如、李秀霞、蔡文城。提升分枝桿菌檢測痰檢體染色抹片的製作良率。檢驗及品保雜誌 2014; 3:35-42。
2. 陸坤泰、林碧芬、吳竹蘭、彭建芳、薛博仁、蔡文城、鄧麗珍、蘇維鈞。結核菌檢驗手冊。2004: 35-42。行政院衛生署疾病管制局，台灣。
3. 蔡文城、蔡岳廷。實用臨床微生物診斷學，第十版。2011。九州圖書文物有限公司，台北。
4. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedure. In Versalovic JV, Carroll KC, Funke G, Gensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. 2011:472-502. ASM Press, Washington DC, U.S.A.
5. 台灣醫事檢驗學會。2014 年全國結核病實驗室品質監測、人員認證計畫與差異性比較」計畫。2014。台灣醫事檢驗學會，台灣。
6. 陳姿瑜、吳曉萍、李秀霞、謝賢修、蔡文城。完整地分析台灣分枝桿菌類別及個別菌種的分離率與藥敏型式。檢驗及品保雜誌 2013; 2:105-18。

A Comparison of the Accuracy of the Fluorochrome Method Versus a Fluorochrome Plus Ziehl-Neelsen Staining Method for Detecting Mycobacteria in a Sputum Smear

Shiang-Yi Tsai¹, Wan-Ru Lin¹, Pei-Chen Wu¹, Hsiu-Hsia Li^{1,2}, Yueh-Ting Tsai^{1,2},
Wen-cherng Tsai²

¹Timing Medical Laboratory, New Taipei City;

²Department of Microbiological Test, Super Laboratory, Ltd., New Taipei City, Taiwan

Abstract

One method of testing for mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) in clinical specimens recommends that a more sensitive fluorochrome method (F method) should be used when conducting an acid-fast staining method for the rapid screening of MTBC from a sputum smear. If the results of a microscopic examination are positive, the smear will be further stained by Ziehl-Neelsen method (F+ZN method) to confirm whether the positive finding for the smear is true. To understand the necessity of this F+ZN method, we conducted an analysis of 16,409 specimens received from January 1 to May 31, 2014, and found that the positive rate for mycobacteria was 8.9% (1,458/16,409). Among all the specimens we analyzed during the study period, the ratio of MTBC to NTM was 43.3% (631/1458) : 56.7% (827/1458). However, for both the F+ZN method and culture-positive specimens, the ratio of MTBC to NTM was 61.9% (390/630) : 38.1% (240/630). The discrepancy between the above ratios occurred because it is easier to detect the MTBC using the F+ZN method. Additionally, we found that

the ratios for rapidly growing NTM, slowly growing NTM and unidentified NTM were 15.8% (38/240), 77.5% (186/240) and 6.7% (16/240), respectively. Analyzing the relationship between different staining methods and culture results, we found that the false positive rate of the F method reached 8.6%, while the false negative rate of the F+ZN method was 3.1%. Generally, false positive results may cause patients to receive unnecessary treatments that could, in turn, result in negative health effects, economic losses for the patient, as well as inducing the production of drug-resistant strains. In contrast, false negative results will lead to epidemiological problems. In order to counteract the limitations of either staining method, laboratory workers should refer to molecular, immunological and other testing methods, and employ the specimen culture results as a gold standard for MTBC diagnosis and treatment.

Key word: Fluorochrome Method, Fluorochrome Plus Ziehl-Neelsen Method.

液態發酵樟芝菌絲體之致畸性試驗分析

李宜蓁¹ 王迪聖² 彭依婷³ 郭家芬⁴ 陳勁初^{1, 4*}

葡萄王生技股份有限公司, 中壢市¹; 進階生物科技股份有限公司, 新北市²;
葡眾企業股份有限公司, 台北市³; 實踐大學食品營養與保健生物學系, 台北市⁴, 台灣

摘要

本試驗參考衛生福利部健康食品安全性評估方法, 旨在評估高劑量(3500 mg/kg/day)樟芝菌絲體在懷孕母鼠及胎鼠之二期生殖與發育毒性。試驗物質以口服給予, 投予期間為胎鼠器官形成期(G6-G15)。試驗至少使用 80 隻懷孕 SD 母鼠, 分成四組(溶劑對照組, 低劑量組、中劑量組及高劑量組), 每組至少包含 20 隻懷孕母鼠。低、中及高劑量組分別投予試驗物質 1500、2500 及 3500 mg/kg/day, 溶劑對照組投予注射用水 10 mL/kg。試驗期間進行懷孕母鼠死亡率與臨床觀察, 體重與飼料消耗量之測量。母鼠於懷孕後第 20 天解剖, 進行母鼠檢查與胎鼠檢查, 評估試驗物質之致畸胎性及生殖與發育影響。試驗結果顯示, 沒有與試驗物質相關之動物死亡及臨床症狀。各劑量組懷孕母鼠平均體重及平均增重皆和對照組無統計差異。在飼料消耗量方面, 未發現與試驗物質相關之毒性證據。雖有部份統計差異, 但未超過正常參考值範圍。由 G6-G15 整個投藥期間數據分析, 低、中、高劑量組食物消耗量分別較溶劑對照組下降 7.2%、8.3% 及 12.6%, 此現象應非試驗物質毒性, 可能因試驗物質大量給予及其熱量影響, 取代了部分食物攝取量之故。在母體檢查部分, 解剖時未發現與試驗物質相關之肉眼病變。各項生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數、胎兒性別比值、重吸收數、著床前損失、著床後損失等參數, 組間均無統計差異且均落於正常參考範圍中。懷孕母鼠生殖參數於此部分中, 並未發現生殖毒性反應。胎鼠檢查部分, 包含外觀、內臟與骨骼檢查, 並未發現與試驗物質相關之發育毒性(致畸胎性)反應。依據試驗結果, 未發現明顯與試驗物質相關的二期生殖與發育毒性證據。本試驗懷孕母鼠之最小無毒性劑量 no-observed-adverse-effect level (NOAEL) 為 3500 mg/kg/day。試驗結果可供人體使用安全性依據之參考。

關鍵字:樟芝菌絲體; 致畸性試驗; 最小無毒性劑量

前言

牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*), 又名牛樟菇、樟菇、窟內菰、神明菇, 為多孔菌科 (*Polyporaceae*) 薄孔菌屬 (*Antrodia*) 的一種藥用真菌, 生長在中、低海拔的常綠闊葉大喬木的牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 上

^[1]。牛樟芝富含三萜類化合物、超氧歧化酶、腺苷、多醣體、 β -D-葡聚糖, 常用於保肝^[2]、抗炎^[3]、抗癌^[4]、抗氧化^[5]、抗疲勞^[6]及調節免疫系統^[7]。在傳統療法, 牛樟芝被喻為是一種「補肝良藥」^[8]。然而, 由於樟芝只專門寄生於台灣特有種的牛樟樹, 真菌又生長速度緩慢, 野生子實體牛樟芝正面臨被滅絕的危險之中。除了固態培養, 深層液體培養也已經成功大規模生產^[9]。深層發酵是一種快速、清潔衛生、可控制品質的生產方法並可用於從培養菌絲體生產特定有效物質, 例

*通訊地址: 葡萄王生技股份有限公司 陳勁初
桃園縣中壢市龍岡路三段 60 號
電話: (03) 4572121 ext. 294
Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

如: Antrosterol^[10]、4-acetylanthroquinonol B (4-AAQB)^[11]、Hepasim®^[12]、多醣 (polysaccharide)、苯環型化合物 (benzenoids)、琥珀酸和馬來酸衍生物 (succinic and maleic derivatives)、麥角固醇 (ergosterol) 及三萜類化合物 (triterpenoids)。功效性則有可預防四氯化碳誘導肝纖維化^[13]、特異性的殺死^[14]及抑制癌細胞生長^[15]、防止血清缺乏的PC12神經細胞凋亡^[16]、降低自發性高血壓^[17]、舒緩血管^[18]及抗B型肝炎病毒生長^[19]。目前，深層培養樟芝菌絲體作為一種功能性食品已經在市場上銷售超過 10 年，並考慮正式作為膳食補充劑。雖然樟芝的藥理作用已在體外 (*in vitro*) 和體內 (*in vivo*) 被證實。到目前為止樟芝菌絲體的安全性在 Ames 試驗、體外和體內染色體畸變試驗^[20]、28 天亞急性毒性試驗、90 天亞慢性毒性試驗^[21]及二期生殖與發育毒性試驗中^[22]，結果均未觀察到任何毒性症狀。其中在致畸胎試驗，陳等人所使用的最高劑量為 500 mg/kg/day 且未對胎鼠之內臟及骨骼部分做深入之探討。故本案擬對更高劑量，為其安全性評價提供依據，以提供未來產品開發時之劑量考量。本試驗以人體建議攝取量不含膠囊重為計算基礎，每日 3 粒為 1.26 克。成人以 60 公斤體重換算後，一倍劑量為 21 mg/kg/day。本試驗低、中及高劑量分別為人體建議攝取量之 71、119 及 167 倍（依據體重換算），其結果將可作為安全性評價之依據。

材料與方法

試驗物質

樟芝菌絲體為購自食品工業發展研究所生物資源與保存中心（新竹市，台灣）之 BCRC 35398 菌株經液體發酵而得，其發酵條件如下。

液態發酵條件

將培養於 potato dextrose agar (PDA) 平板上之樟芝菌絲體，擷取 1 cm 正方大小菌塊，接入 2-L 三角搖瓶中，培養溫度控制為 28 °C，震盪轉速為 120 rpm 條件下培養一週後，接入 500-L 發酵槽培養一週後，再接入 40 噸發酵槽培養 14 天。成熟的帶紅棕色菌絲體連同培養液體一起解壓濃縮、冷凍乾燥、研磨成粉末、儲存在室溫並用於本研究作為試驗物質。

成分分析

秤取樟芝菌絲體 1 g 分別加入 50 ml 甲醇（分析 Antrosterol 及 Sesamin）、50ml 水（分析 adenosine）及 70% 乙醇（分析 GABA）震盪搖勻後，經超音波震盪萃取 30 分鐘，離心 5000 rpm 五分鐘並以 0.45 μm 濾膜過濾後備用。樟芝菌絲體指標成分有 Antrosterol、GABA 及 Adenosine。其各自之高效液相層析儀分析條件如表 1。

試驗動物

180（60 隻雄鼠做為配種用與 120 隻雌鼠做為試驗使用）隻 Sprague-Dawley (SD) 大鼠經過至少 5 天適應，並由進階生技實驗動物中心完成檢疫後，才開始試驗配種。配種期時，一隻雄鼠與一隻雌鼠共飼養於一個不銹鋼吊籠中。配種完成後，雌鼠移回至飼育籠中。各飼育籠尺寸符合 *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*^[23]之建議。環境控制於溫度 21±2°C，相對溼度 55±20%。飼育室光照週期為 12 小時亮，12 小時暗，且無外界病媒存在。飼料為滅菌後之 Laboratory rodent diet 5010, (LabDiet, PMI® Nutrition International, USA)，而試驗期間皆不限飲水。

試驗設計

本生殖與發育毒性試驗依據衛生署健康

食品安全性評估方法進行，健康雌鼠配種後，依亂數分配於四個劑量組別。分組後以 student's t-test 比較對照組與各試驗物質處理組之平均體重，不具顯著差異。基本設計如表 2。

投藥當日新鮮配製低、中、高劑量組之試驗物質懸浮液。口服為人體使用之途徑，故本試驗以管餵食方式做為投予路徑。雌性動物依據配種期之交配行為，認定成功配種後，移出配種籠進行秤重及定義懷孕第零日 (G0) 並個別飼養。配種後，雌性動物於胎兒器官形成期 (G6 - G15) 每日給藥一次。母鼠懷孕期間，於 G0、3、6、9、12、15、18 及

20 記錄動物體重及飼料攝取量。在 G20，預計於產前犧牲之動物以二氧化碳進行安樂死，並儘快移出卵巢與子宮。所有懷孕動物於犧牲時均執行肉眼解剖檢查（包含死亡動物）。並檢查外觀、黏膜、胸腔及腹腔內所有組織與器官與其內容物。解剖時，記錄子宮含胎兒重量。子宮於取出母體後，胎兒檢查是否存活。個別胎鼠進行秤重，記錄性別，檢查外觀之異常與變異。記錄個別胎鼠身長（單位：mm）。外觀檢查後胎鼠以腹腔注射 Pentobarbital 進行安樂死。並依照其在子宮內之位置與序號執行後續之內臟或骨骼檢查。每胎中二分之一之胎鼠以 Bouin's solution 固

表 1. 樟芝菌絲體指標成分 Antrosterol、GABA 及 Adenosine 的高效液相層析儀分析條件+

指標成分	分離管柱	移動相	流速 (ml/min)	溫控 (°C)	偵測波長 (UV)	注射量 (µL)	分析時間 (min)
Antrosterol	Phenomenex Luna 5u C18 (2), 100A, 4.6 x 250 mm	A- CH ₃ CN B- MeOH A/B=5/95	1.0	40	270	10	15
GABA	LiChrosCART 250-4, RP-18e, 5µm	A- GABA(A) B- GABA(B) A/B=80/20	10	40	254	10	15
Adenosine	LiChrospher 100 RP-18e, 5µm, 250-4	A- MeOH B- 10mM KH ₂ PO ₄ A/B=10/90	1.0	40	254	10	25

表 2. 健康雌鼠配種後進行生殖與發育毒性試驗的四個劑量組別

組別	劑量 (mg/kg/day)	劑量濃度 (mg/mL)	劑量體積 (mL/kg)	動物數目
1 (控制組 ^a)	0	0	10	20♀
2 (低劑量組)	1500	150	10	20♀
3 (中劑量組)	2500	250	10	20♀
4 (高劑量組)	3500	350	10	20♀

^a 溶劑對照：注射用水。

定後執行頭顱與內臟檢查，並以 modified Wilson razor-blade 方式檢查軟組織之缺陷。每胎剩餘胎鼠，以 95% 酒精固定後，再以 KOH 處理，最後以 Alizarin Red S 與 Alcian Blue 染色，保存於甘油中以觀察並記錄各別胎鼠之骨骼骨化異常或變異。

數據分析與評估

數據以實驗結果之平均值 (Mean) \pm 標準誤差 (SD) 或百分比來表示。各試驗組別均獨立進行分析，並以變異數同質性檢定、常態分布和變異數分析來避免推論性之比較。以每胎 (litter) 做為試驗評估之計算單位。數據分析 (母鼠體重、增重、飼料消耗量、帶胎子宮重、胎兒體重/身長、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數及胎兒性別比值等) 採用 One-Way ANOVA 及 Dunnett's 檢定 (SPSS Ver. 12.0) 進行統計分析。各胎之著床前損失、著床後損失以及異常發生率 (外觀、內臟、骨骼異常) 則以 Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA method 進行。若 p 值小於 0.05 則具有顯著差異。

結果

成分分析

萃取物經由 HPLC 分析，並以三種指標成份的出現情形當質方面的品管。三種指標成份分別為 Antrosterol、GABA 及 Adenosine，其分析結果與各別標準品比較所得的滯留時間及含量各為 9.600 min; 3.908 mg/g、7.840 min; 6.127 mg/g 及 9.440min; 0.950 mg/g (圖未顯示)。

樟芝菌絲體對母鼠的影響

各組受孕鼠 0 天~20 天 體重變化呈現於圖 1，數據顯示樟芝菌絲體與陰性對照組相比，均無顯著性差異。各組受孕鼠 0 天~20 天 飼料攝取量變化呈現於圖 2，數據顯示在 G6-G9、G9-G12 期間，各劑量組於統計上低於溶劑對照組，且有輕微劑量相關性 ($P < 0.05$)。在 G12-G15，各劑量組低於溶劑對照組，且高劑量組 (7.35 ± 0.81) 和溶劑對照組 (8.08 ± 0.49) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。在 G15-G18 及 G18-G20，各劑量組低於溶

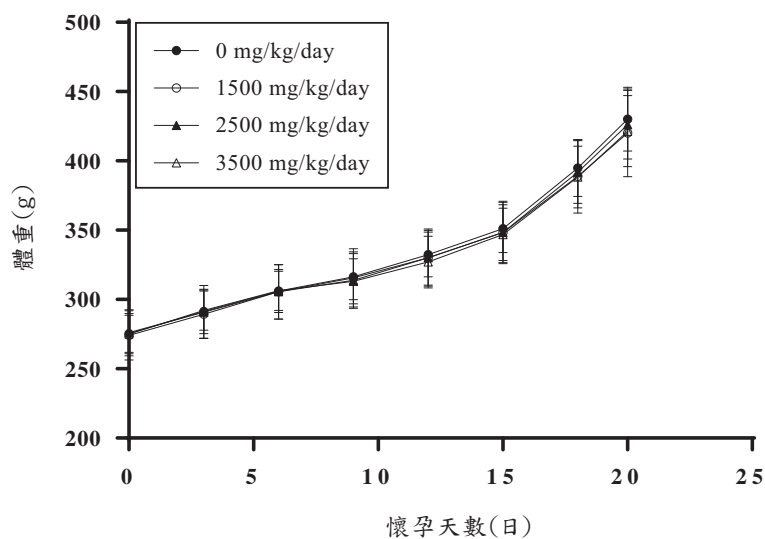


圖 1. 懷孕母鼠平均體重

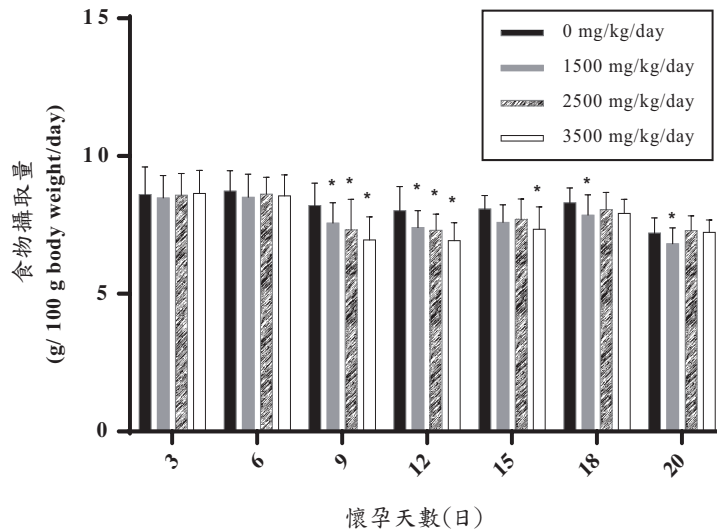


圖 2. 懷孕母鼠飼料消耗

劑對照組，而低劑量組 (7.86 ± 0.73 及 6.82 ± 0.57) 和溶劑對照組 (8.31 ± 0.53 及 7.21 ± 0.55) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。G20 後，所有母鼠於執行肉眼解剖檢查 (含胎盤外觀)，並未發現與試驗物質投予相關之肉眼病變 (結果未顯示)。

懷孕母鼠生殖毒性參數評估數據呈現於表 3。胎兒數及性別比率 (男/女) 為 366, 307, 380, 401 及 1.03 ± 0.48 , 1.07 ± 0.79 , 1.05 ± 0.69 , 1.05 ± 0.69 在 0, 1500, 2500, 和 3500 mg/kg/day 組別裡 (表 3)。胎兒數及性別比率似乎沒有受到的樟芝菌絲體劑量的影響，各劑量組與溶劑對照組間均無統計差異 ($P > 0.05$)，且數據都落在正常的參考範圍之內 (表 3)。其餘生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、活胎或死胎數、著床前損失、著床後損失等參數，組間均無統計差異 ($P > 0.05$)。

樟芝菌絲體對胎鼠的影響

胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查呈現於表 4。解剖觀察時，所有胎鼠均執行外觀檢查。同時測量體重與身長。並記所有外觀異常。在

胎鼠體重中，溶劑對照組與各劑量組間無統計差異 ($P > 0.05$)。雖然胎鼠身長在各劑量組於統計上高於溶劑對照組 (37.42 ± 1.72)，但全未超過正常參考值範圍 ($29.24-40.26$)。觀察胎數外觀時，低劑量組有一隻胎鼠觀察到有腦外露、軀幹短小及脊柱分裂等症狀，其餘各劑量組外觀檢查均無異常 (表 4)。但因隻胎鼠症狀發生率均位於正常參考範圍內，且無明顯劑量相關性 ($P > 0.05$)，所以可以評估外觀檢查未發現與試驗物質相關的致畸胎反應。

之後，每胎中二分之一之胎鼠執行內臟檢查。樣本於 Bouin's solution 固定後，進行相關頭顱與軟組織/臟器觀察，並觀察到中劑量組有心房中隔缺損但因落於正常參考值範圍內，因此可以推論胎鼠內臟檢查並未發現致畸胎反應。

最後，每胎中二分之一之胎鼠執行骨骼檢查。樣本於 Alizarin Red S 與 AlcianBlue 染色後，進行觀察胎鼠是否有顱蓋缺失、胸骨骨化不全、胸骨錯位、胸骨畸形、胸骨裂、胸骨未骨化、肋骨缺失、肋骨融合、肋骨多餘、頸椎骨化不全、頸椎中心軟骨分裂、頸

表 3. 懷孕母鼠生殖毒性參數評估

參 數	組別/劑量 (mg/kg/day)				正 常 參 考 範 圍
	溶劑對照組 0	低劑量組 1500	中劑量組 2500	高劑量組 3500	
配種確認動物數	27	28	27	29	-
懷孕動物數	24	23	26	29	-
配種率 (%)	88.9	82.1	96.3	100.0	62.5-100.0 ^b
有效動物數	24	22	26	28	-
帶胎子宮重 (g)	95.30±9.95	90.29±23.56	94.41±12.71	92.80±15.24	95.30±9.95
著床數	16.1±1.7	15.0±3.5	15.2±1.8	15.3±2.4	16.1±1.7
黃體數	16.4±1.7	15.3±2.5	15.7±1.6	16.0±1.8	16.4±1.7
活胎數	15.3±1.6	14.0±3.8	14.6±2.1	14.8±2.5	15.3±1.6
雄性胎鼠數	7.5±2.3	7.0±3.0	6.8±2.4	7.6±2.1	7.5±2.3
雌性胎鼠數	7.8±1.6	7.0±2.0	7.8±2.8	7.1±2.2	7.8±1.6
死胎數	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
重吸收數	0.8±0.9	1.0±1.8	0.5±0.9	0.6±0.6	0.8±0.9
雌雄比例 (M/F)	1.03±0.48	1.07±0.79	1.05±0.69	1.23±0.67	1.03±0.48
著床前損失 (%)	1.99±3.29	4.70±17.71	3.43±6.87	4.44±9.70	1.99±3.29
著床後損失 (%)	5.08±5.14	6.60±12.39	3.61±5.87	3.57±4.36	5.08±5.14

配種率 (%) = (懷孕動物數/配種確認動物數) x 100

著床前損失 (%) = (黃體數-著床數) / 黃體數 x 100

著床後損失 (%) = (著床數-活胎數) / 著床數 x 100

^aHistorical Control Data Rat CD® IGS, 2011. Level Biotechnology Inc.

^bHistorical Control Data Rat CD® IGS (crl:CD[SD]), 1996-2004. Charles River Laboratories Preclinical Service, Montreal.

椎骨異位、胸椎中心骨化對裂、胸椎中心啞鈴型、胸椎中心軟骨啞鈴型、胸椎中心畸形、胸椎中心軟骨骨裂、單側胸椎中心軟骨、胸椎骨異位、腰椎中心啞鈴型及腰椎中心骨化不全等症狀。本次試驗主要因為低劑量組一隻偶發的腦外露胎鼠，造成較多症狀。但其餘骨骼異常參數在溶劑對照組與各劑量組間無統計差異，且無劑量相關性或落於正常族群自然發生率中。故我們可以結論在胎鼠骨骼檢查中，並未發現致畸胎反應。

討 論

據統計，每年估計有 800 萬嬰兒（佔全球的 6%）出生時帶有嚴重的缺陷^[24]，其中

的 25% 為先天性遺傳或部分遺傳的嚴重缺陷，10% 為母體暴露於一些環境因素而導致孩童出生時帶有缺陷，然而，對於大多數重大出生缺陷（約 65%），病因是不明的^[25]。因此，為保障孕婦服用樟芝菌絲體之安全性以及胎兒的健康，致畸胎試驗相當重要。

此試驗將樟芝菌絲體經口服投予懷孕母鼠後，評估其對胚胎之影響及造成畸形胎的可能性。結果顯示，樟芝菌絲體對母鼠生殖或胚胎沒有負面影響。在試驗期間沒有發現任何動物死亡。母鼠在平均重量、臨床毒性症狀及解剖檢查，各劑量組與溶劑對照組均無統計差異。母鼠飼料消耗量顯示在 G6-G9、G9-G12 期間，各劑量組於統計上低於溶劑

表 4. 胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查

胎鼠檢查	組別/劑量 (mg/kg/day)				正 常 參 考 範 圍
	溶劑對照組 0	低劑量組 1500	中劑量組 2500	高劑量組 3500	
胎鼠重 (g)	4.06±0.30	4.26±0.30	4.21±0.27	4.22±0.30	2.67-4.75 ^a
胎鼠身長 (mm)	37.42±1.72	39.16±1.86*	38.94±1.50*	38.51±1.38*	29.24-40.26 ^a
總檢查數	366	307	380	401	-
外觀檢查數	366	307	380	401	-
內臟檢查數	177	147	184	193	-
骨骼檢查數	189	160	196	208	-
外觀異常 (%)					
腦外露	0.00±0.00	0.27±1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-5.00 ^b
軀幹短小	0.00±0.00	0.27±1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-4.00 ^c
脊柱分裂	0.00±0.00	0.27±1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-4.00 ^c
內臟異常 (%)					
心房中隔缺損	0.00±0.00	0.00±0.00	0.55±2.80	0.00±0.00	0.00-2.63 ^a
腎盂擴張	2.89±7.65	1.87±6.15	2.51±6.07	2.48±7.14	0.00-78.26 ^e
骨骼異常 (%)					
顱蓋缺失	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-5.00 ^b
胸骨骨化不全	10.13±14.48	13.88±19.09	13.54±18.52	11.04±14.63	4.0-62.5 ^c
胸骨錯位	0.00±0.00	0.76±3.55	0.48±2.45	0.45±2.36	0.0-5.0 ^b
胸骨畸形	0.00±0.00	0.00±0.00	0.48±2.45	0.00±0.00	0.0-27.8 ^e
胸骨裂	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0-21.74 ^e
胸骨未骨化	9.72±19.16	4.93±13.2	6.58±10.14	7.68±11.87	0.0-33.3 ^d
肋骨缺失	0.52±2.55	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-4.55 ^b
肋骨融合	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.0-4.2 ^c
肋骨多餘	10.62±22.26	7.33±12.06	8.88±17.36	11.18±21.38	0.00-24.17 ^a
頸椎骨化不全	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	-
頸椎中心軟骨分裂	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-4.35 ^e
頸椎骨異位	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	-
胸椎中心骨化對裂	1.64±5.77	1.07±3.48	0.55±2.8	0.96±3.52	0.00-41.17 ^a
胸椎中心啞鈴型	3.08±6.39	1.64±4.24	3.64±9.56	7.68±12.55	0.00-30.04 ^a
胸椎中心軟骨啞鈴型	0.00±0.00	2.02±9.48	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-70.00 ^e
胸椎中心畸形	0.00±0.00	0.00±0.00	1.54±7.84	0.00±0.00	0.0-13.6 ^c
胸椎中心軟骨骨裂	3.03±6.3	9.69±11.89	3.99±9.96	7.6 ±11.37	0.00-34.78 ^e
單側胸椎中心軟骨	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.0-4.3 ^c
胸椎骨異位	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00-0.45 ^b
腰椎中心啞鈴型	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.51±2.7	0.00-7.14 ^e
腰椎中心骨化不全	0.00±0.00	0.51±2.37	0.00±0.00	0.00±0.00	-

* p < 0.05; %: 胎發生率

^aHistorical Control Data Rat CD® IGS, 2011. Level Biotechnology Inc.^bHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 1996-2004. Charles River Laboratories Preclinical Service, Montreal.^cHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 2003-2005. Charles River Laboratories Preclinical Service, Pennsylvania.^dHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 2000-2006. Charles River Laboratories Preclinical Service, Ohio.^eHistorical Control Data CrI:CD® BR Rat, 1993. Charles River Laboratories.

對照組，且有輕微劑量相關性 ($P < 0.05$)。在 G12-G15，各劑量組低於溶劑對照組，且高劑量組 (7.35 ± 0.81) 和溶劑對照組 (8.08 ± 0.49) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。在 G15-G18 及 G18-G20，各劑量組低於溶劑對照組，而低劑量組 (7.86 ± 0.73 及 6.82 ± 0.57) 和溶劑對照組 (8.31 ± 0.53 及 7.21 ± 0.55) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。雖然有統計差異，但未超過正常參考值範圍。由 G6-G15 整個餵食樟芝菌絲體期間數據來看，低、中、高劑量組食物消耗量分別較溶劑對照組下降 7.2%、8.3% 及 12.6%，此現象應非樟芝菌絲體毒性，可能因樟芝菌絲體大量給予及熱量影響，取代了部份食物攝取量之故。動物飼料及樟芝菌絲體含熱量分別為 3.42 kcal/g 及 4.1 kcal/份。

在懷孕母鼠生殖毒性，各項生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數、胎兒性別比值、著床前損失、著床後損失等參數，組間均無統計差異。在低劑量組的胎鼠外觀有一隻胎鼠觀察到有腦外露、軀幹短小及脊柱分裂等症狀，其餘各劑量組外觀檢查均無異常。此隻胎鼠症狀發生率均位於正常參考範圍內，且無明顯劑量相關性。故外觀檢查未發現與樟芝菌絲體相關的致畸胎反應。在胎鼠內臟與骨骼檢查中，並未發現致畸胎反應。因此，根據本研究的條件下，樟芝菌絲體對懷孕母鼠之最小無毒性劑量“no-observed-adverse-effect level (NOAEL)”為 3500 mg/kg/day。

參考文獻

1. Chang TT, Chou WN. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycolog Res* 1995; 99:756-8.
2. Ker YB, Peng CC, Chang WL, Chyau CC, Peng RY. Hepatoprotective bioactivity of the glycoprotein, antrodan, isolated from *Antrodia cinnamomea* mycelia. *PLoS one*. 2014; 9:e93191.
3. Chen CC, Liu YW, Ker YB, Wu YY, Lai EY, Chyau CC *et al.* Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerged-cultured *Antrodia camphorata* mycelia. *J Agricul Food Chem* 2007; 55:5007-12.
4. Hsu YL, Kuo PL, Cho CY, Ni WC, Tzeng TF, Ng LT *et al.* *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:1249-57.
5. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS *et al.* Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J Agricul Food Chem* 2003; 51:3302-8.
6. Huang CC, Hsu MC, Huang WC, Yang HR, Hou CC. Triterpenoid-rich extract from *Antrodia camphorata* improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Evidence-based Complement Alternat Med: eCAM* 2012; 2012:364741.
7. Cheng PC, Huang CC, Chiang PF, Lin CN, Li LL, Lee TW *et al.* Radioprotective effects of *Antrodia cinnamomea* are enhanced on immune cells and inhibited on cancer cells. *Internat J Radiat Bio* 2014:1-12.
8. Ao ZH, Xu ZH, Lu ZM, Xu HY, Zhang XM, Dou WF. Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 194-212.
9. Liu DZ, Liang HJ, Chen CH, Su CH, Lee TH, Huang CT *et al.* Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. *J Ethnopharmacol* 2007; 113:45-53.
10. Huang GJ, Deng JS, Huang SS, Shao YY, Chen CC, Kuo YH. Protective effect of antrosterol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chem* 2012; 132:709-16.
11. Lin YW, Pan JH, Liu RH, Kuo YH, Sheen LY, Chiang BH. The 4-acetylanthroquinol B isolated from mycelium of *Antrodia cinnamomea* inhibits proliferation of hepatoma cells. *J Sci Food Aricul* 2010; 90:1739-44.
12. Nakamura N, Hirakawa A, Gao J-J, Kakuda H, Shiro M, Komatsu Y *et al.* Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor cell line. *J Natur Prod* 2003; 67:46-8.
13. Lin WC, Kuo SC, Lin WL, Fang HL, Wang BC. Filtrate

- of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* : WJG 2006; 12:2369-74.
14. Hseu YC, Chang WC, Hseu YT, Lee CY, Yech YJ, Chen PC *et al.* Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci* 2002; 71:469-82.
 15. Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC *et al.* Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Let* 2006; 231:215-27.
 16. Huang NK, Cheng JJ, Lai WL, Lu MK. *Antrodia camphorata* prevents rat pheochromocytoma cells from serum deprivation-induced apoptosis. *FEMS Microbiol Let* 2005; 244:213-9.
 17. Liu DZ, Liang YC, Lin SY, Lin YS, Wu WC, Hou WC *et al.* Antihypertensive activities of a solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* (Chang-chih) in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:23-30.
 18. Wang GJ, Tseng HW, Chou CJ, Tsai TH, Chen CT, Lu MK. The vasorelaxation of *Antrodia camphorata* mycelia: involvement of endothelial Ca (2+)-NO-cGMP pathway. *Life Sci* 2003; 73:2769-83.
 19. Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, Lu MK. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiol Let* 2002; 209:63-7
 20. Wu MF, Peng FC, Chen YL, Lee CS, Yang YY, Yeh MY *et al.* Evaluation of genotoxicity of *Antrodia cinnamomea* in the Ames test and the *in vitro* chromosomal aberration test. *In Vivo* 2011; 25:419-23.
 21. Chen TI, Chen CC, Lin TW, Tsai YT, Nam MK. A 90-day subchronic toxicological assessment of *Antrodia cinnamomea* in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:429-33.
 22. Chen TI, Chen CW, Lin TW, Wang DS, Chen CC. Developmental toxicity assessment of medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang et W.N. Chou (higher *Basidiomycetes*) submerged culture mycelium in rats. *Internat J Med Mushrooms* 2011; 13:505-11.
 23. Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996. The National Academies Press: Washington, DC, USA
 24. Christianson AH, CP; Modell, CB. March of dimes global report on birth defects: The hidden toll of dying and disabled children. 2006. White Plains, NY.
 25. Schardein J. Chemically Induced Birth Defects. 3rd ed. 2000. Taylor & Francis : New York.

Evaluating the Teratogenicity of *Antrodia Cinnamomea* Mycelium in Submerged Fermentation

I-Chen Li¹, Di-Sheng Wang², Yi-Ting Peng³, Chia-feng Kuo⁴, Chen, Chin-chu^{1, 4*}

¹Grape King Biotechnology Inc., Zhong-Li City; ²Level Biotechnology Inc., New Taipei City; ³Pro-partner Ltd., Taipei City; ⁴Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei City, Taiwan

Abstract

This study was conducted in accordance with the "Safety Evaluation Methods for Health Food (1999). DOH, Taiwan, R.O.C.". The purpose of this study was to evaluate the adverse effects in the pregnant rats, embryofetal development and teratogenicity after administration of the *Antrodia cinnamomea* mycelium, via oral gavage during the major embryonic organogenesis period (G6-G15). A total of 80 pregnant SD female rats were randomly divided into three treatment groups and a control group, each consisting of 20 pregnant female rats. Three doses of 1500 mg/kg/day (Low dose), 2500 mg/kg/day (Mid dose) and 3500 mg/kg/day (High dose) were selected for the study, whereas 10 mL/kg distilled water was served as the control. Examinations were conducted on pregnant rats and fetuses respects to mortality, body weights, body weights gains, food consumption and clinical observations. The pregnant females were gross necropsied on G20, followed by maternal and fetus examination, to evaluate the teratogenicity, reproductive, and developmental performance of *Antrodia cinnamomea* mycelium. The study results showed that no *Antrodia cinnamomea* mycelium-related animal death and abnormal clinical sign were noted. No statistical differences were noted in maternal mean body weight and maternal mean body weight gains. During the G6-G15 period, the feed intake of low, medium and high dose

groups decreased by 7.2%, 8.3% and 12.6%, respectively, when compared with the control group. However, such values were found to be within the normal range of rats, thus indicating the high-calorie *Antrodia cinnamomea* mycelium replacing parts of normal diet. In maternal gross necropsy, no *Antrodia cinnamomea* mycelium-related gross lesion was noted. Other parameters such as gravid uterus weight, implantation number, corpora lutea number, litter size, live or dead fetal number, male or female fetus number, fetal sex ratio (M/F), resorption number, pre-implantation loss and post-implantation loss, were all within the normal reference ranges and showed no significant difference when compared to the control group. In fetus examination, including external, visceral and skeletal evaluations, there were no significant changes between any of the *Antrodia cinnamomea* mycelium treated groups and the control group. Based on the study results, the no-observable-adverse-effect level (NOAEL) for pregnant female rats under the conditions of this study was 3500 mg/kg/day. All data generated from the study will provide safety criteria information for human exposure.

Key words: *Antrodia cinnamomea* mycelium; teratogenicity; no-observable-adverse-effect level (NOAEL).

比較亞急性口服毒性試驗對照組雌雄 Sprague-Dawley 大鼠血液及生化正常參考值

賴昱維¹ 藍文傑² 蔡岳廷²

輔仁大學食品科學系，新北市¹，台美檢驗科技有限公司，新北市，台灣²

摘要

健康食品在上市之前需經過安全性評估試驗，隨著試驗數量的累積，實驗室可藉由研究對照組大鼠血液及血清生化數據以了解不同飼養環境對大鼠正常生理的影響，直接增加數據判讀的準確度。本研究主要係收集台美檢驗科技有限公司於2013年1月至2014年7月所執行之大鼠28天亞急性口服毒性試驗共16件之對照組樣本數據進行統計分析。血液學分析數據結果顯示，平均紅血球容積(mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、單核球(monocyte)、嗜酸性球(eosinophil)及嗜鹼性球(basophil)之平均值與95%參考範圍沒有顯著性的差異($p>0.05$)。血清生化方面，麩草醋酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)、三酸甘油酯(triglyceride)、氯(chloride)在統計學上不具有顯著性的差異($p>0.05$)。血液學及血清生化數值與一般正常數值有相同之趨勢，但白蛋白(Albumin)、麩草醋酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)及磷(Phosphorus)與參考資料有差異，就算是相同品種在不同的環境下做實驗其病理數值還是有其差異性存在，為了減少實驗上的誤差建立自己實驗室的參考值範圍有其必要性。

關鍵字：28天亞急性口服毒性試驗、血液學分析、血清生化、參考值範圍、病理數值

前言

目前市面上健康食品の種類越來越多，為了維護民眾的健康安全，衛生福利部食品藥物管理署(TFDA)公佈了「健康食品安全性評估方法」對欲上市之健康食品的毒性做檢查，所有健康食品都需要通過評估才可以上市。健康食品共分四類，較常見的檢驗項目為第二與第三類，第二類像是魚油、紅麴萃取物或是人參萃取物等，須通過28天的亞急

性口服毒性試驗，這些物質的服用會導致不同病理數據的改變，為了要能正確的判讀毒性試驗的試驗結果，有必要去瞭解對照組的血液及生化正常值的範圍^[1,2]。

新的動物實驗室所使用的血液及生化實驗資料大多使用其他實驗室所做出來的值來做為正常值的參考，但實驗環境、儀器與動物來源的不同容易會讓大鼠的血液及生化數值產生變化，使用其他實驗室的數據當參考容易有誤差產生。因此，我們才會希望去建立屬於自己的大鼠血液及生化正常值參考範圍，本實驗室的實驗數據整合能有助於未來試驗人員判讀大鼠病理學上數值的差異，也能提供其它實驗室做參考。

*聯絡地址：台美檢驗科技有限公司
24890 新北市新莊區五工五路21號 蔡岳廷
電話：886-(02)2298-1887
E-mail：r91445202@gmail.com

材料與方法

試驗來源

試驗所使用的大鼠都是從樂斯科生物科技股份有限公司（南港區，臺北市）買入約 4 週齡 Sprague—Dawley (SD) 大鼠飼養地點台美實驗動物中心（新莊區，新北市），對照組會餵食水（高溫高壓滅菌之逆滲透水）或橄欖油（Sigma 公司，美國）由試驗物質之極性而定，極性試驗物質之對照組餵食水而非極性試驗物質反之。餵食飼料 MFG (Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan) 使用墊料 Beta Chip (Northeastern Products Crop, U.S.A.)

實驗動物與飼養環境

購入約 4 週齡之 SD 品系大鼠在檢疫房中經過 1 週的檢疫與適應期，觀察老鼠有無不良反應或被感染後 2 隻一籠飼養在經過高溫高壓滅菌之飼育籠內，雌雄大鼠分開在台美實驗動物中心經由合格之飼育員飼養，動物房環境控制在溫度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度 $55\pm 15\%$ 、換氣頻率：10~15 次/小時及 12 小時之光暗週期。無限制的提供經高溫高壓滅菌的逆滲透水，每週提供 500 克的飼料，並且每週結算剩餘飼料與老鼠體重。

臨床觀察

SD 大鼠依實驗的不同需要每天或每週秤重，來觀察大鼠體重的變化，並在每次秤重或投藥前觀察老鼠的活動力，皮膚有無紅腫、掉毛或發炎等病變，嚴重時更可能導致老鼠死亡，須隨時通報上級主管。眼睛也需在進入實驗室與實驗結束時使用檢眼鏡檢查眼睛內部構造。

血液學分析

SD 大鼠經過隔夜禁食後放入盒中通入二

氧化碳犧牲，從心臟採集血液樣本使用全自動血球分析儀 (XE—1800, Sysmex) 進行檢測，測其白血球數 (WBC)、紅血球數 (RBC)、血紅素量 (hemoglobin, Hb)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球容積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、血小板數 (platelet count)、嗜中性球 (neutrophil)、淋巴球 (lymphocyte) 及單核球 (monocyte)。另外用檸檬酸鈉抗凝血管收集血液並以全自動血液凝固分析儀 (CA—1500, Sysmex) 檢測凝血酶原時間 (prothrombin time, PT)。

血清生化分析

SD 大鼠經過隔夜禁食以二氧化碳犧牲，從心臟採集血液樣本室溫下靜置待其凝固，離心分離取上清液血清的部分使用血清生化分析儀 (7070 Autoanalyzer, Hitachi) 進行檢測，測其麩氨酸氨基轉氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、麩氨酸丙酸轉氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、總膽紅素 (total bilirubin)、血總蛋白質 (total protein)、白蛋白 (albumin)、球蛋白 (globulin)、血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐 (creatinine)、葡萄糖 (glucose)、三酸甘油酯 (triglyceride)、膽固醇 (cholesterol)、鈉離子 (sodium, Na)、鉀離子 (potassium, K)、鈣離子 (calcium, Ca)、氯離子 (chloride, Cl) 及磷離子 (phosphorus, P)。

數據整理與分析

實驗數據計算平均值 (mean) 及標準差 (standard deviation, S.D.) 製成表格，再利用 excel 做 F test 的變異數分析與 student T test 分析兩組之間的差異性，設 p 小於 0.05 作為顯著水準。

結 果

血液學分析

結果如表 1 所示，原公鼠與母鼠各為 160 隻，而母鼠因其中一組血液凝集而無法測量所以為 159 隻，網狀紅血球(reticulocyte)計數不是每組實驗都有測量所以公鼠樣本數為 120 隻母鼠樣本數為 119 隻，後面附有 95% 的參考範圍與最大值與最小值。在性別差異上，WBC、RBC、Hb、Hct、血小板、嗜中性球(neutrophil)、淋巴球、網狀紅血球計數與 PT 的數值在統計學上均有顯著性的差異($p < 0.05$)。MCV、MCH、MCHC、單核球、嗜酸性球(eosinophil)及嗜鹼性球(basophil)等六項數值在統計學上不具有顯著性的差異($p > 0.05$)。

血清生化分析

血清生化分析資料整理於表 2，公鼠與母鼠樣本數皆為 160 隻。在性別差異上，ALT、ALP、總膽紅素、總蛋白質含量、白蛋白、球蛋白、BUN、血清肌酸酐、葡萄糖、膽固醇、鈉、鉀、鈣及磷的數據在統計學上均具有顯著性的差異($p < 0.05$)，而AST、三酸甘油酯及氯在統計學上不具有顯著性的差異($p > 0.05$)。

討 論

血液學分析

血液分析結果(表 1)指出WBC、RBC、Hb、Hct、血小板、中性球、淋巴球、網狀紅血球計數與 PT 的數值在統計學上均有顯著性的差異($p < 0.05$)，且都是公鼠的數值大於母鼠。MCV、MCH、MCHC、單核球、嗜酸性球及嗜鹼性球的數值在統計學上不具有顯著性的差異($p > 0.05$)，前三項多是用做評估貧血種類的指標，紅血球與血液體積比如果太小就會容易產生貧血的現象，不會受到

性別所影響，後三項數值為免疫學方面的數值，當有發炎或是受傷身體啟動免疫系統來防止細菌感染或外物入侵，單核球、嗜酸性球及嗜鹼性球的數值才會上升，在一般的情況下此三項數值應該非常低，由表 1 也可以發現此現象，因此沒有顯著性的差異^[3]。

血清生化分析

血清生化分析結果顯示 ALT、ALP、總膽紅素、總蛋白質含量、白蛋白、球蛋白、BUN、血清肌酸酐、葡萄糖、膽固醇、鈉、鉀、鈣及磷 14 項在性別上具有顯著性的差異，與 Claudio P 等^[3]所做的研究數據具有相同之趨勢，但白蛋白、球蛋白、AST 與 Levine BS 所提出的大鼠血清生化正常參考範圍值有所差異(表 2)。結果指出白蛋白與球蛋白的比值偏高，白蛋白是在肝臟形成，在肝臟受損、製造不足或是由腎臟、腸道流失過多值會有下降的現象，球蛋白則是負責身體的免疫系統，當肝發炎時球蛋白數量會上升造成比值下降，比值上升為可以接受的現象。總膽紅素偏低，其主要來源為老舊紅血球經脾臟破壞後釋出，在肝臟進行化學反應後排入膽汁，如果肝細胞受損或是膽管阻塞會造成值的上升，值偏低代表功能正常。

由上述結果可知，大鼠的血液及血清生化數據會受到許多複雜的因素所影響，要整合出一個通用的參考資料十分困難，為了減少判定上的誤差並增加實驗報告的可信度，有必要建立自己實驗環境的標準值，往後更需要深入研究不同年齡、種別的參考範圍，以建立更完備的參考數據。

表 1 亞急性口服毒性試驗 Sprague-Dawley(SD)大鼠血液分析試驗對照組數據

Parameters (參數) ^a	Units (單位)	Male (公鼠)				Female (母鼠)			
		n	Mean±S.D. (平均參考 範圍)	Minimum value (極 小值)	Maximum value (極 大值)	n	Mean±S.D. (平均參考 範圍)	Minimum value (極 小值)	Maximum value (極 大值)
WBC	10 ³ /μL	160	12.3±3.6*	3.6	28.8	159	11.3±3.2*	3.4	25.6
RBC	10 ⁶ /μL	160	8.4±0.5*	6.9	9.7	159	8.3±0.5*	7.3	9.5
Hb	g/dL	160	16.4±0.7*	14.5	18.2	159	16.1±0.7*	14.6	17.8
Hct	%	160	50.4±2.3*	44.5	55.6	159	49.5±2.6*	43.8	57.0
MCV	fL	160	60.0±4.3	51.2	75.0	159	59.9±4.3	51.0	70.2
MCH	Pg	160	19.5±0.8	17.5	22.5	159	19.4±0.7	17.8	21.2
MCH	Cg/dL	160	32.5±1.3	27.8	35.0	159	32.6±1.5	29.3	35.5
Platelet	10 ³ /μL	160	854.0±191.4*	480.0	1598.0	159	912.4±198.3*	414.0	1456.0
Neutrophil	%	160	16.0±5.2*	7.0	36.3	159	14.2±6.0*	5.1	51.3
Lymphocyte	%	160	78.6±5.9*	58.0	90.	159	80.5±6.5*	44.5	91.8
Monocyte	%	160	4.2±1.6	0.0	8.0	159	4.0±1.5	0.1	10.7
Eosinophil	%	160	1.0±0.5	0.0	5.4	159	1.1±0.4	0.4	2.4
Basophil	%	160	0.2±0.1	0.0	0.4	159	0.2±0.1	0.0	0.9
Reticulocyte	%	120	2.4±1.0*	0.4	6.2	119	2.1±0.9*	0.2	4.3
Prothrombin time	sec.	160	15.2±2.7*	10.6	23.5	159	10.2±0.4*	9.6	13.4

^a 縮寫：Hb, hemoglobin；Hct, hematocrit；n, 樣本數

* $p < 0.05$ 表示不同性別在統計學上具有顯著性的差異。

表 2 亞急性口服毒性試驗 Sprague—Dawley 大鼠血清生化分析試驗對照組數據

Parameters (參數)	Units (單位)	Male (公鼠)				Female (母鼠)			
		n	Mean±S.D. (平均參考 範圍)	Minimum value (極 小值)	Maximum value (極 大值)	n	Mean±S.D. (平均參考 範圍)	Minimum value (極 小值)	Maximum value (極 大值)
AST	U/L	160	112.4±26.6§	56	196	160	103.9±20.8	64	176
ALT	U/L	160	36.1±10.9*	16	87	160	26.7±6.5*	13	63
ALP	U/L	160	166.9±42.5*	88	316	160	93.0±24.2*	44	163
Total protein	g/dL	160	6.3±0.5*	4.3	7.3	160	7.0±0.5*	5.6	8.4
Albumin	g/dL	160	4.2±0.3*§	2.8	5.0	160	4.7±0.4*	3.8	5.7
Globulin	g/dL	160	2.1±0.4*§	0.8	2.8	160	2.3±0.4*	1.5	3.1
BUN	mg/dL	160	12.4±2.0*	7.6	18.2	160	13.4±2.2*	7.2	19.6
Creatinine	mg/dL	160	0.5±0.1*	0.2	1.0	160	0.5±0.2*	0.3	1.2
Glucose	mg/dL	160	155.1±29.9*	98	220	160	129.8±28.4*	73	206
Triglyceride	mg/dL	160	54.8±19.4	25	132	160	53.2±19.8	25	132
Cholesterol	mg/dL	160	61.6±13.1*	36	100	160	82.8±18.1*	39	136
Na	meq/L	160	149.0±3.7*	130	154	160	147.2±2.1*	138	152
K	meq/L	160	6.8±0.9*	4.6	10	160	7.4±0.9*	5.8	10.2
Ca	mg/dL	160	11.6±0.7*	7.3	13	160	11.8±0.7*	9.0	13.1
Cl	meq/L	160	99.6±4.3	72	106	160	99.9±2.3	89	104
P	mg/dL	160	11.5±1.2*	8.1	15.5	160	10.7±1.2*	8.0	16.4

縮寫: BUN, blood urea nitrogen；Na, sodium；K, Potassium；Ca, calcium；Cl, Chloride；P, phosphorus；n, 樣本數

* 表示不同性別 $p < 0.05$ ，在統計學上具有顯著性的。

§ 表示與參考資料^[4] 有差異。

參考文獻

1. 行政院衛生福利部。健康食品安全性評估方法。1999。行政院衛生福利部，台灣。
2. 趙安莎，孫于蘭，周蓉，張立實。SD大鼠30天餵養試驗血液學指標和血清生化指標參考值探討。中國比較醫學雜誌。2003; 13:13-5.
3. Claudio P, Alberta AS. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exper Toxicol Pathol* 2006; 57: 213-9.
4. Levine BS. *Animal Clinical Pathology In: Handbook of Toxicology*, Derelanko MJ Hollinger MA, 2nd ed. 2001: 741-68. CRC Press LLC, Florida, USA.

A Comparison of the Hematology and Clinical Chemistry Values of Male and Female Control Rats as Measured by Subacute Oral Toxicity Test

Yu-wei Lai¹, Mun-Kit Nam², Yueh-Ting Tsai²

¹Department of Food Science, Fu Jen Catholic University, New Taipei City; ²Super Laboratory, Ltd., New Taipei City, Taiwan

Abstract

Health foods should be subjected to safety assessments before being launched on the market. By conducting a sufficient number of trials using control rats, the impact of different feeding environments on the physiological traits of rats can be evaluated by measuring the hematology and clinical chemistry values of the tested animals. This study was conducted by analyzing the data collected from the control rats used in sixteen 28-day subacute oral toxicity tests, which were carried out by Super Laboratory Co., Ltd., from January 2013 to July 2014. Analysis of the hematological data showed that there were no significant differences between the male and female control rats ($p>0.05$) in terms of mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), monocyte, eosinophil, and basophil levels. Clinical chemistry testing

revealed that there were also no significant differences between the male and female rats ($p>0.05$) with regard to aspartate aminotransferase (AST), triglyceride, and chloride levels. The hematology and clinical chemistry values of this study were similar to the values reported by Levine (2001) and Claudio *et al.* (2006), although the albumin, aspartate aminotransferase (AST), and phosphorus levels found in this study were significantly different from the values reported by those authors. The clinical pathological values for the same species exhibited discrepancies when the study was conducted under different environment. It is necessary for the laboratory to establish its own reference ranges for hematology and clinical chemistry tests.

Key word: Subacute oral toxicity tests, hematological data, clinical chemistry values.

大豆發酵液之免疫調節功效

劉千臻^{1*} 陳勁初^{2,3*} 張莉妮¹ 葉淑幸² 李金木^{1#}

中臺科技大學藥物科技研究所，臺中市¹；葡萄王生技股份有限公司，中壢市²；
實踐大學食品營養與保健生技學系，臺北市³，臺灣

摘要

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill, 亦稱黃豆)，研究證實它富含蛋白質、必需氨基酸、鈣、鐵、維生素 (A 與 B) 以及植物油等。本研究評估大豆發酵液對抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cells; APCs) 如樹突狀細胞 (dendritic cell; DC)、巨噬細胞 (macrophage) 和 B 細胞與 T 細胞之間所產生的作用及其相關細胞激素的產生。應用 BALB/c 小鼠餵食三種大豆發酵液劑量 (0.288、0.864、1.440 g/kg) 達二、四、六週，於服用後不同時間點 (24、72、120 小時) 進行犧牲取其脾臟細胞進行分析。研究結果顯示，大豆發酵液能明顯提升抗原呈獻細胞數量以及其上表面分子 CD8 α 、CD40、MHC class II (I-A/I-E) 等之表現增加，顯示餵食後能夠促使抗原呈獻細胞之成熟與活化，且可見與 T 細胞上之共同刺激分子相互作用。篩選對活化免疫細胞表現之結果最佳的高劑量 (1.44 g/kg) 大豆發酵液，應用 Real-time PCR 分析相關細胞激素 mRNA 之表現，研究發現能提升增強 BALB/c 鼠體內 T_{H1} 細胞激素 INF- γ 、IL-12 及巨噬細胞分泌 TNF- α 之表現，相對的抑制 T_{H2} 細胞所分泌細胞激素 IL-4 表現。研究結果顯示大豆發酵液促使免疫走向 T_{H1} 細胞免疫反應，能有效提升免疫力之功能。

關鍵字：大豆發酵液、免疫功效、抗原呈獻細胞、共同刺激分子、細胞激素

前言

惡性腫瘤位居國人十大死亡原因之首，要如何掌握健康、遠離疾病已成為大家所關切的課題了，而預防疾病的根本之道就是提升免疫力，因此調節免疫功能長久以來一直為許多營養保健食品的重要藥理作用。透過保健食品增強免疫力捍衛身體健康，免疫系統的存在主要保護宿主，抵抗外來的入侵者所導致的疾病。強而有力的免疫防禦機制能辨別外來的入侵者免受於其害，宿主的防禦

機制主要包含先天性和後天性免疫。

本實驗室先前應用表現 T_{H1} 及 T_{H2} 表面標記的基因轉殖小鼠模式，配合其細胞表面標記螢光染色的技術，對樟芝菌絲體多醣體的免疫療效及藥理特性做過研究，證實樟芝能增強小鼠體內 T_{H1} 的細胞數量及活性提升^[1]；此免疫提升之效果與樹突狀細胞及巨噬細胞等抗原呈獻細胞之活化存在相當密切的關係，其在體內免疫力之提升能提高小鼠對抗寄生蟲感染^[2]，研究結果顯示服用樟芝調節免疫細胞活性並增強免疫力。在前人的研究報告經驗中，已顯示促進抗原呈獻細胞，特別是樹突狀細胞的活化能達到提高生物體免疫力的效果^[2]。專業型的抗原呈獻細胞為樹突狀細胞 (DC)、巨噬細胞、B 細胞。其中樹突狀細胞是專職能力最強的抗原呈獻細胞，

* 劉千臻與陳勁初具相等貢獻度

通訊地址：中臺科技大學 藥物科技研究所
40601 台中市北屯區廬子路 666 號 李金木
電話：886-(04) 2239-4256
E-mail：kmllee@ctust.edu.tw

要比普通抗原呈獻細胞能力強 1,000 倍。未成熟的 DC 存在於非淋巴組織中，通過它們強大的吞噬和抗原處理能力捕獲抗原，然後經由血液或淋巴移入淋巴結、脾臟等 T 細胞區，轉變成為成熟的 DC，而失去處理抗原的能力，成為具有潛在免疫刺激能力的細胞，可呈獻抗原給 T 細胞^[3, 4]。

近年來許多研究證實具有高營養價值極其豐富天然食品的大豆(soybean)，是豆科(*Leguminosae*)大豆屬(*Glycine*)，一年生草本植物，在中國種植大豆已有 4,700 多年歷史，古籍裡所說五穀中的“菽”，就是指黃豆，於秦漢後改稱為“豆”。大豆能提供一系列對人體健康有益處如降血脂、抗膽固醇、抗動脈粥樣性以及免疫調節之功能^[5]，其大豆化學成分包括：黃酮素(isoflavones)、皂素(saponin)、植酸(phytic acid)、植物固醇(phytosterol)、酚酸(phenolic acid)及胰蛋白酶抑制物(trypsin inhibitor)^[6]是具高價值的成分。許多研究指出大豆蛋白質具增強免疫細胞功能如淋巴細胞增殖、自然殺手細胞活化及細胞激素的產生^[7]。在亞洲國家中，很普遍性的將大豆發酵製成醬油、納豆、豆豉及豆腐乳等食品，發酵作用可分解大分子物質，能增加易消化性，增進生物可利用性，而提高營養價值；同時發酵作用會使風味變好、產生些物質增進健康的功效，其已被證實發酵的納豆含高量維他命 E、超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)具抗氧化作用^[8]；豆豉水萃取物亦具抗氧化作用、降血糖作用^[9]。

葡萄王生技中心以 *Lactobacillus brevis* LB995 株及 *Bifidobacterium longum* GK995 株將大豆發酵轉化成具有高營養價值的大豆發酵液。過去研究發現可將 Brix 4 的豆漿的帶醣基大豆異黃酮 daidzin 及 genistin 在 24 小時內完全轉化成不帶醣基的 daidzein 及 genistein (資料未呈現)，因此嘗試評估此發酵液是否具調節免疫之功能性。本研究使用

Flow cytometry 與 Real-time PCR 技術分析 BALB/c 小鼠脾臟免疫細胞特異性指標與細胞激素之間的關係，探討大豆發酵液對 BALB/c 小鼠樹突狀細胞、巨噬細胞及 B 細胞等抗原呈獻細胞活化與其他免疫細胞之調控關係，瞭解其有無誘發提升免疫力之功能。

材料及方法

大豆發酵液調節 DC 及 Macrophage 等免疫細胞之分析實驗

取 BALB/c 小鼠作實驗，分實驗組與對照組。將 6-8 週齡之小鼠分成 27 組，每組 5 隻小鼠，27 組小鼠分別連續給予口服不同劑量之大豆發酵液(本實驗設計低、中、高三個劑量，即 0.288 g/kg、0.864 g/kg、1.440 g/kg)達二週、四週與六週，每日每隻口服劑量為餵食溶於 ddH₂O 的大豆發酵液冷凍乾燥粉末。每組小鼠在服完藥後分別於 24、48、120 小時犧牲，取脾臟細胞進行樹突狀細胞、巨噬細胞及 B 細胞表面與 T 細胞標記測定。對照組(5 隻 6-8 週小鼠)則餵食二次水取代大豆發酵液。實驗先以經 LPS 刺激之陽性組與對照組比較，將特定表面標記如 I-A/I-E (MHC class II)、CD40、CD8 α 、CD86、ICOS 等，區分為低度表現區及高度表現區(如 I-A/I-E^{LO}、I-A/I-E^{HI})，分析其高度表現區之統計值。

應用 Real-time-PCR 分析細胞激素 mRNA 之表現

使用小鼠(BALB/c)作實驗，分兩大組實驗組與兩組對照組。將 6-8 週齡之小鼠分組，每組 5 隻小鼠。其中 9 組小鼠分別連續給予口服大豆發酵液達二週、四週或六週，每日每隻口服劑量為參照前面研究結果之最佳劑量(1.440 g/kg)，餵食溶於 ddH₂O 的大豆發酵液冷凍乾燥粉末。每組小鼠在服完藥後(24、72、120 小時)犧牲取其脾臟細胞，利用 Real-

time PCR 偵測專一且定量的細胞激素基因表現，諸如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-12、IL-4、IL-10 等，以瞭解大豆發酵液對增進宿主體內免疫細胞之調控關係。對照組（5 隻 6-8 週小鼠）則餵食二次水取代大豆發酵液。

大豆醱酵液凍乾品的製備

大豆醱酵液經葡萄王生技股份有限公司製備提供，乃利用 *Lactobacillus brevis* LB995 株及 *Bifidobacterium longum* GK995 株醱酵經等比稀釋的大豆液(Brix 4)，添加 Sucrose (2.0%)、Yeast extract (1.0%)、Peptone (1.0%)，培養基的 pH 為 6.8。分別接入菌種量為 1.5%，攪拌器轉速 60 rpm，通氣量為 0.5 vvm，溫度控制於 33°C 恆溫，在 20 噸不鏽鋼槽體進行 16 噸液態醱酵 24 小時，加熱至 65°C 維持 1 小時後冷卻，將加熱後的菌液濃縮至 20 倍濃度，以冷凍乾燥方式乾燥後，即為大豆醱酵液凍乾品。

小鼠脾臟淋巴細胞分離

將小鼠犧牲後取脾臟，以 1 ml 針筒及 23 G 針頭用含 FCS 之 PBS (PBS + 5% FCS + 0.1% sodium azide) 沖出脾臟細胞，之後吸取細胞懸浮液至 15 ml 離心管，於 4°C、1,800 rpm 離心 3 分鐘，倒去上清液後加入 RBC lysis buffer (0.15 M NH₄Cl + 1.0 mM KHCO₃ + 0.1 mM Na₂EDTA) 以溶解紅血球，經離心後以 PBS 懸浮細胞液備用，調整細胞密度至所需。

流式細胞儀偵測細胞表面標記

將 10⁶ 細胞以 PBS 清洗後於 4°C、3,000 rpm 離心 5 分鐘，倒去上清液，加入 2.4 G2 Blocking 單株抗體 50 μ l，靜置冰上作用 10 分鐘。加入 PBS 清洗後離心，倒去上清液，以特殊螢光染色之單株抗體 (CD11b、CD11c、CD45R/B220、I-A/I-E、CD40、

CD8 α 、CD86、CD4 與 ICOS) 50 μ l 靜置冰上作用 30 分鐘。以 PBS 清洗後離心，最後加入 1 ml PBS 懸浮細胞液，再利用流式細胞儀(FACSCanto™, BD, USA) 測定樣本中不同類型細胞之螢光強度，並以 FCS Express V3 (DeNovo software™) 軟體進行分析。

純化脾臟細胞之 mRNA

將 10⁶ 細胞以 PBS 清洗後於 4°C、3,000 rpm 離心 5 分鐘，加入 Trizol (total RNA isolation reagent, invitrogen™, USA) 1 ml 後均勻混合，靜置 5~10 分鐘，加入 Chloroform 0.2 ml 後搖晃，於 4°C、12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液加入 Isopropanol 0.5 ml 後混勻，再於 4°C、12,000 rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液之後以 75% 酒精清洗 RNA 沈澱，完全移去上清液，以 DEPC 水溶解 RNA 沈澱，以分光光度計測 RNA 濃度及 260/280 比率。

即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real-Time Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, Q-PCR)

依照之前實驗基因表現量多寡，將樣本 cDNA 進行不同比例稀釋。取 4 μ l 稀釋之 cDNA 作為模板，加入 1 μ l 100 nM primer 及 5 μ l SYBR green master mix，總反應體積為 10 μ l。反應條件：95°C，3 min；95°C，10 sec；60°C，30 sec (41 個循環)；55°C，30 sec (81 個循環)；25°C，30 sec，PCR 產物以 iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 偵測，並帶入標準曲線公式計算其分子數。

結 果

流式細胞儀分析免疫細胞表面分子

一、樹突狀細胞

長期餵食小鼠大豆發酵液研究結果顯示，對脾臟的樹突狀細胞數量百分比(CD11c)，

及其上之 CD40^{HI}、CD8 α 、CD86 表現均有明顯活化的現象。圖 1 顯示餵食大豆發酵液後 DC 的數量百分比，在二週與四週的組別並無明顯變化，但餵食至六週時與陰性對照組(Normal)相比有顯著的差異($p < 0.001$)，表現量約在 $49.96 \pm 5.70\% \sim 58.94 \pm 3.82\%$ 間。DC 上亞群標記 CD8 α ，亦隨餵食大豆發酵液之時間增長提升其表現量，二週 24 小時表現量相對於陰性對照組而言稍低，但至二週 120 小時開始表現有明顯增加之趨勢，以高劑量之組別表現亮為最高，為 $18.48 \pm 2.64\%$ 且 $p < 0.001$ (圖 2)。CD40 代表 DC 的活化，可發現 CD40^{HI} 的表現趨勢和 CD8 α ^{HI} 的表現相同，都是在初期表現不明顯，但至二週 120 小時開始表現有明顯增加之趨勢，以高劑量之組別表現量為最高，為 $53.43 \pm 4.81\%$ 且 $p < 0.001$ 。此現象同樣維持至四週 120 小時 (圖 3)，至六週時其表現與 CD8 α 相同，下降為 $18.03 \pm 2.61\% \sim 33.19 \pm 6.39\%$ ，稍低於對照組，顯示主要 CD8 α ^{HI} 的細胞群表現 CD40。同樣的 CD86 亦代表 DC 成熟與活化的情形，且趨勢同樣為二週 24 小時未明顯表現($p < 0.001$)，但至二週 72 小時開始表現有明顯增加之趨勢直至四週，但於餵食大豆發酵液六週後表現下降為 $9.06 \pm 1.86\% \sim 17.34 \pm 2.10\%$ ($p < 0.001$) (圖 4)。

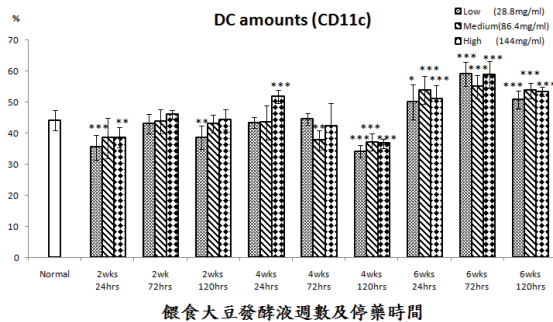


圖 1. 樹突狀細胞(CD11c⁺)數量表現百分比 (*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$)

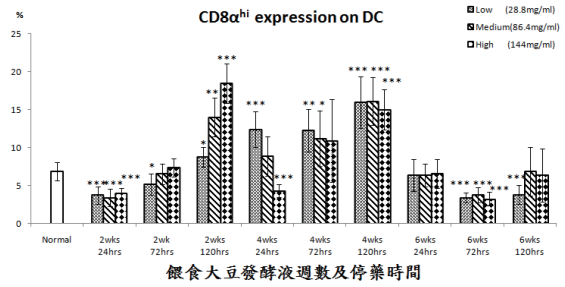


圖 2. 樹突狀細胞上 CD8 α 數量表現百分比

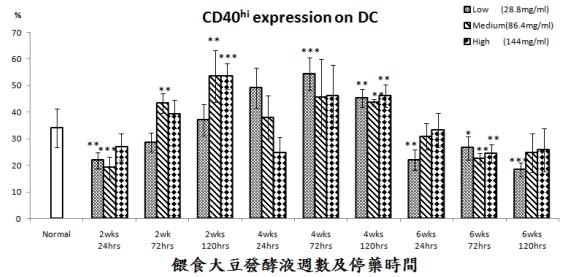


圖 3. 樹突狀細胞上 CD40 數量表現百分比

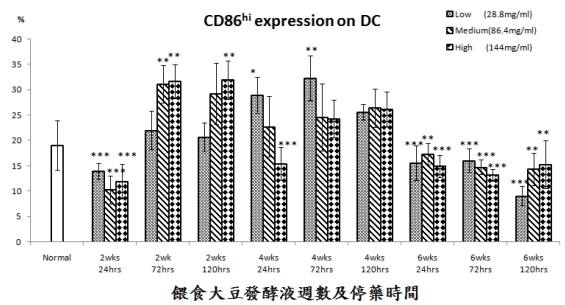


圖 4. 樹突狀細胞上 CD86 數量表現百分比

二、巨噬細胞

小鼠脾臟中巨噬細胞的部分，巨噬細胞的數量 (圖 5) 與樹突狀細胞 (圖 1) 的表現趨勢相同，在二週與四週的組別並無明顯變化，但餵食至六週時與陰性對照組相比有顯著的增加($p < 0.001$)。本實驗除了以 CD11b 作為數量標記外，亦觀察巨噬細胞上之 MHC class II (I-A/I-E) 表現 (圖 6)，發現 MHC class II 的表現隨餵食大豆發酵液之時間增加，但於六週時稍低。CD86 除了代表 DC

的活化，亦能在所有的抗原呈獻細胞上表現，因此在巨噬細胞上亦能觀察到在餵食大豆發酵液後的第二週開始，即能增加巨噬細胞上的 CD86 表現（圖 7）。與 DC（圖 4）相似的是，巨噬細胞上 CD86 的表現於四週 120 小時後亦開始明顯下降。

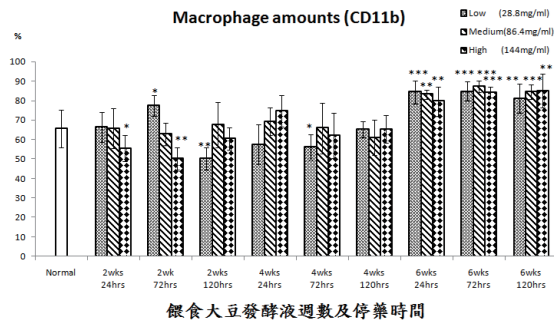


圖 5. 巨噬細胞(CD11b⁺)數量表現百分比

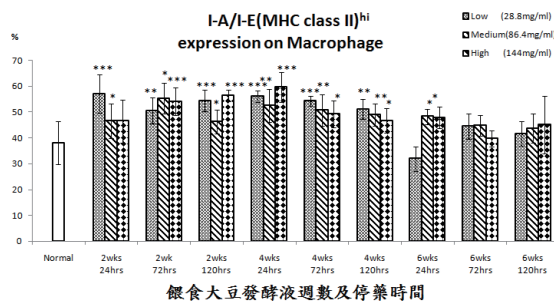


圖 6. 巨噬細胞上 IA-IE (MHC class II) 數量表現百分比

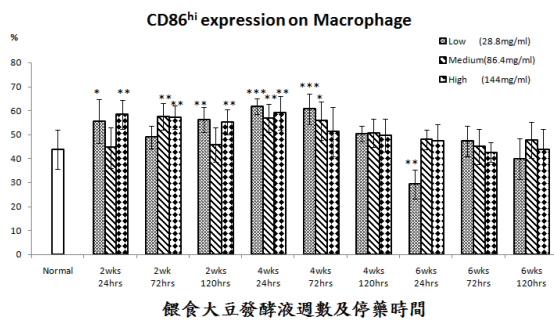


圖 7. 巨噬細胞上 CD86 數量表現百分比

三、B 細胞

B 細胞數量百分比亦同樣在長期餵食大豆發酵液後表現逐漸增加，並持續至六週，

其表現均高於對照組，且於四週時表現量為最高（圖 8）。雖其 MHC class II^{hi}之表現無明顯增加，但不同劑量之大豆發酵液相比，整體而言，以高劑量之大豆發酵液所得表現較佳（圖 9）。有趣的是，B 細胞上 CD86 的活化表現，與 DC 及巨噬細胞的表現趨勢相同，在餵食大豆發酵液六週後表現皆下降，至六週 120 小時出現顯著差異（圖 10）。

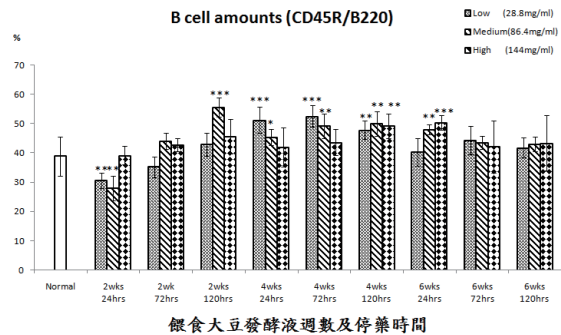


圖 8. B 細胞(CD45R/B220⁺)數量表現百分比

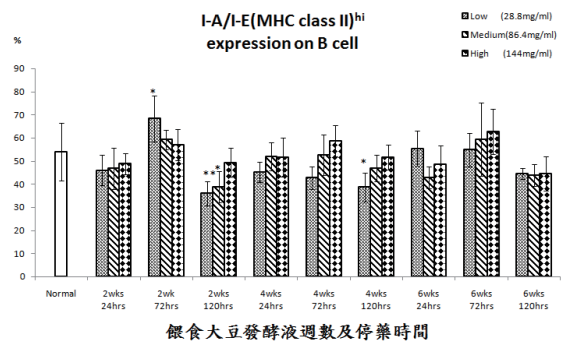


圖 9. B 細胞上 IA-IE (MHC class II) 數量表現百分比

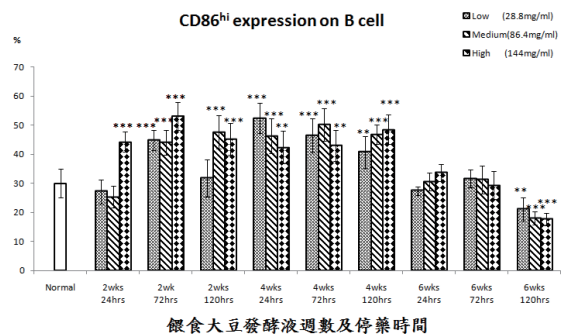


圖 10. B 細胞上 CD86 數量表現百分比

四、T 細胞

本研究同時檢視 T 細胞之表現。結果顯示，不論是 T_H 細胞($CD4^+$) (圖 11) 或是 T_c 細胞($CD8\alpha^+$) (圖 12) 之數量百分比，在餵食大豆發酵液的初期 (二週) 即升高，但隨著餵食大豆發酵液的時間增加， T_H 細胞($CD4^+$) 的數量略微下降至接近陰性對照組的數值，而 T_c 細胞($CD8\alpha^+$) 之數量百分比至餵食大豆發酵液六週後則稍低於陰性對照組。另外，我們亦在本實驗中觀察 (圖 13) T 細胞上之協同刺激分子 ICOS (inducible co-stimulator) 之表現，我們發現 $ICOS^{HI} CD4^+$ T 細胞上表現，在二週 24 小時並無差異 (除高劑量組別外)，至二週 72 小時始有明顯增加 ($p < 0.001$)，並持續四週結束，至六週時的表現則同陰性對照組並無顯著差異。

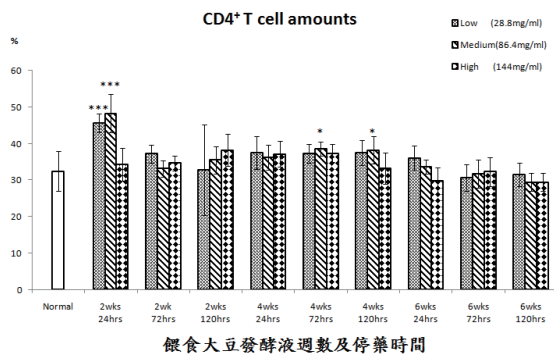


圖 11. T 細胞($CD4^+$)數量表現百分比

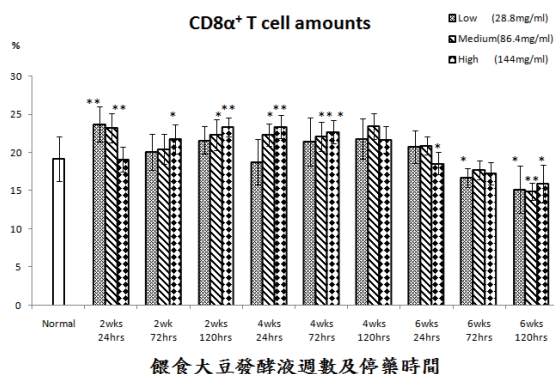


圖 12. T 細胞($CD8^+$)數量表現百分比

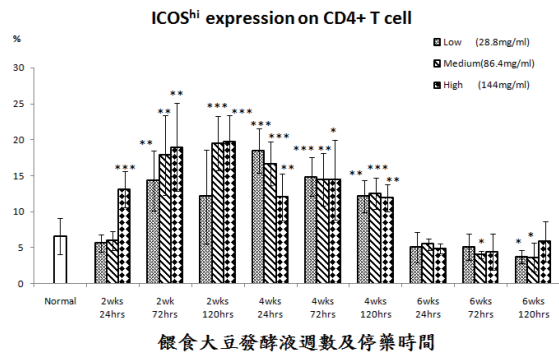


圖 13. T 細胞($CD4^+$)上 ICOS 數量表現百分比

細胞激素 mRNA 之表現

RT-PCR 產物以 iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 偵測 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12 等基因之 mRNA 表現，並扣除 reference genes 的數值後，可得到校正後的相對定量基因表現值(Normalized Fold Expression)。服食高劑量(1.44 g/kg)大豆發酵液的週數增加而 IL-12、IFN- γ 及 TNF- α 表現會隨著遞增。IFN- γ 在餵食高劑量大豆發酵液二週後其表現值未見上升，至四週時表現升高，以四週停藥 72 小時之表現值 5.30 ± 1.96 為最高。TNF- α 表現趨勢則以餵食六週後停藥 24 小時之表現值為最高。IL-12 各組平均表現值均較對照組高；亦以四週 IL-12 的表現隨停藥時間之增加遞增表現最高，整體而言，IL-12 的表現值均明顯高於對照組。IL-4 之表現在初期 (二週) 表現明顯，服用四週至六週時，未見增加趨勢，而有下降現象，另外發現當 IFN- γ 提升時，則 IL-6、IL-10 亦出現下降趨勢。本研究結果顯示大豆發酵液確實能增強小鼠體內 T_H1 細胞激素 IFN- γ 及巨噬細胞分泌的細胞激素 TNF- α 等表現，相對的亦抑制 T_H2 細胞所產生的細胞激素 IL-4 表現，這些基因表現和餵食大豆發酵液的時間有著相當的依存關係。研究結果顯示，若服用大豆發酵液時間愈久 (四週至六週後)，脾臟細胞中細胞激

素 INF- γ 、TNF- α 的表現更加顯著。(資料未呈現)

討 論

脾臟細胞富含專職抗原呈獻細胞(樹突狀細胞、巨噬細胞與 B 細胞)，它們具誘發先天性與適應性免疫，因此受許多研究學者的關注。首先，樹突狀細胞是具有獨特能力的抗原呈獻細胞，它可以啟動和調節免疫反應^[10, 11]，分化過程中 DCs 上表現 MHC class I、MHC class II 和共同刺激分子，有效提升呈獻能力且刺激 B 與 T 細胞增殖反應。特別是 T 細胞和樹突細胞相互作用誘發 T_{H0} 細胞分化趨向 T_{H1} 型或 T_{H2} 型細胞免疫反應^[12, 13]。研究結果顯示，餵食大豆發酵液四~六週後，皆能明顯增加抗原呈獻細胞的數量。本研究發現抗原呈獻細胞之 CD8 α 、CD40、CD86 表面分子於餵食大豆發酵液達六週後呈現下降趨勢，推測可能因抗原呈獻細胞在組織中的壽命只有 6-16 天，因此體內會不斷更新自身的巨噬細胞，而至六週時因細胞大量增生，由於新生的細胞上分子尚未被刺激活化，導致活化分子的表現值下降^[14]。CD11c⁺ 是 DC 上典型表現的分子，觀察長期餵食小鼠對脾臟的樹突狀細胞數量百分比(CD 11c⁺)有明顯的提升，DCs 上 CD8 α 的表現亦提升。小鼠脾臟細胞中 DCs 上 CD8 分為兩種型態為 CD8 α ⁺ / CD8 α ⁻ 兩群誘導 T_{H0} 的走向，如 CD8 α ⁺ 使 T_{H0} 的走向 T_{H1}；CD8 α ⁻ 使 T_{H0} 的走向 T_{H2}，CD8 α ⁺ DC 是主要產生 IL-12 細胞激素的細胞^[15]。文獻指出，CD8 α ⁺DC 上被活化後的 CD40 可與 CD4⁺T 細胞上的 CD154 相結合並促使 T 細胞的活化，使其趨向 T_{H1} 反應並分泌 INF- γ 、IL-2 等 T_{H1} 相關的細胞激素而非刺激 IL-4 分泌，以引發之後的細胞型免疫反應^[16, 17]，促使 T 細胞大量增生，增加其毒殺外來病原體的效用。Manickasingham 及 Sousa^[18]之研究亦顯示 CD8 α

⁺DC 比 CD8 α ⁻ DC 能生成較多的 peptide (MHC class II 複合物)，可進一步呈獻給淋巴組織中的 T 細胞。本實驗抗原呈獻細胞(巨噬細胞、B 細胞)上 MHC class II (IA/IE)均於餵食後明顯增加，當 MHC class II (IA/IE)有效被活化與 T 細胞交互作用，發現細胞激素 INF- γ 亦增加。

本研究中發現抗原呈獻細胞(樹突狀細胞、巨噬細胞及 B 細胞)上 CD86，於一開始的第二週 CD86 均明顯增加，表示餵食大豆發酵液後能活化抗原呈獻細胞，但隨著餵食時間增長，於餵食大豆發酵液四週 120 小時或六週後出現明顯下降。本次研究，CD86 在抗原呈獻細胞上的表現與 ICOS 在 CD4⁺T cell 上的表現與之前本研究室在對小鼠巴西蘑菇的研究中，我們發現 DC、巨噬細胞及 B 細胞上 CD86 的表現被抑制出現同樣的模式(unpublished data)。推測這些協同刺激分子與 T 細胞上 CD28、CTLA-4、ICOS 之間的交互作用有關^[19]。最初是由活化後 DC 上的 CD80/CD86 與 T 細胞上的 CD28 結合促使 T 細胞的活化並釋放 IL-2，而 T 細胞上的 CTLA-4 也隨之被 induce 生成，與 CD80/CD86 結合，因此 APC 上 CD86 的表現下降，其主要原因可能是 CTLA-4 參與調控平衡而抑制之。本次研究雖未觀察 CTLA-4 的表現，但其間的調控機轉在最近我們調查樟芝單一化合物—去氫硫色多孔菌酸(馬偕一號)之免疫調控作用研究中，被進一步證實。研究發現抗原呈獻細胞上表面分子 CD86 之表現可見隨餵食時間增長而下降。另一方面亦發現 T 細胞上 CTLA-4 之表現逐漸提升，此結果顯示抗原呈獻細胞誘發了 T 細胞上之共同刺激分子 CD28 之反應，促使 CTLA-4 之表現，進一步與 CD86 相互作用，參與調控了 T 細胞的活化反應^[20]。文獻上亦指出 CTLA-4 僅表現於活化 T 細胞且高親和力的與 CD80/CD86 結合，阻隔了 CD80/CD86 與

CD28 結合，若阻斷 CTLA4 與 CD80/CD86 的相互作用，則增強 T 細胞的增殖與 T_H2 細胞反應及分化^[21]。CD28 與 CTLA-4 分子對 T 細胞的活化反應會呈現相反作用^[22]。

於 T 細胞部分，餵食大豆發酵液的初期則能首先增加 T_H細胞(CD4⁺)之數量百分比，又於餵食四週時即能顯著提升樹突狀細胞上 CD40 之活化表現，CD40 的提升有利於 DC 成熟分泌 IL-12 細胞激素表現使趨向 T_H1^[23,24]。本研究發現 ICOS 在 CD4⁺T cell 上的表現甚早被誘發生成。實驗小鼠經餵食不同濃度大豆發酵液二週 72 小時起，ICOS 即呈現較對照組顯著增加表現的不同，直到四週 120 小時止各組表現皆如此。然，在第六週時，ICOS 在各組的表現急遽下滑，幾與對照組無異，甚至出現更低的表現。Riley 等人^[25]在調查 ICOS、CTLA-4 與 IL-2 對 T 細胞活化反應相互關係之研究報告中提出，ICOS 如同 CTLA-4 一樣，都是經由 T 細胞活化時被誘發出的表面分子，然而 CTLA-4 的表現不僅會阻止經由 CD28 促進的 T 細胞增殖以及 IL-2 的產生；CTLA-4 與 ligand 的結合，還可阻斷 ICOS 的共同刺激作用，除了抑制其對 T 細胞的增殖作用外，CTLA-4 亦會防止 ICOS 刺激 T 細胞產生 IL-4、IL-10 與 IL-13 等細胞激素。由此推測，本研究 ICOS 在後期（六週）的被抑制表現，應與 CTLA-4 的連結作用有關。有關兩者之間的相互關係，在未來的研究中值得作進一步觀察。在細胞激素的表現分析中，我們發現 IFN- γ 與 IL-12 mRNA 表現因服用大豆發酵液而上升，反之，IL-4 與 IL-10 mRNA 不但未見增加而有下降趨勢，這些細胞激素的表現趨勢似乎反應了 CD40 與 ICOS 共同刺激分子在抗原呈獻細胞與 T 細胞表面上的表現。綜合以上結果，得知小鼠餵食大豆發酵液後具明顯增加抗原呈獻細胞數量與其上共同刺激分子以及分泌 T_H 免疫細胞細胞激素，提升小鼠免疫力誘導 T_H1 細

胞免疫反應。

致 謝

本項研究工作承蒙行政院科技部經費贊助(NSC 97 - 2622 - B - 166 - 001 - CC1 ; NSC 98 - 2622 - B - 166 - 001 - CC1) ，謹致謝忱。

參考文獻

1. Cheng PC, Hsu CY, Chen CC, Lee KM. *In vivo* immunomodulatory effects of *Antrodia camphorata* polysaccharides in a T1/T2 doubly transgenic mouse model for inhibiting infection of *Schistosoma mansoni*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 227:291-8.
2. Chen YJ, Cheng PC, Lin CN, Liao HF, Chen YY, Chen CC, Lee KM. Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni*. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:458-67.
3. Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J Exp Med* 1988; 167:646-51.
4. Austyn JM, Larsen CP. Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 1990; 49:1-7.
5. Kamaly KM. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. *Food Research International* 1997; 30:675-682.
6. Kang J, Badger TM, Ronis MJ, Wu X. Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. *J Agric Food Chem* 2010; 58:8119-33.
7. Singh BP, Vij S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 2014; 54:171-9.
8. Hattori T, Ohishi H, Yokota T, Ohoami H, Watanabe K. Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*. *LWT - Food Science and Technology* 1995; 28:135-8.
9. Fujita H, Yamagami T, Ohshima K. Long-term ingestion of Touchi-extract, an α -glucosidase inhibitor, by borderline and mild type-2 diabetic subjects is safe and significantly reduces blood glucose levels. *Nutrition Research* 2003; 23:713-22.
10. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of

- dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
11. Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:21-5.
 12. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8:275-83.
 13. Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000; 192:405-12.
 14. Franc NC, White K, Ezekowitz RA. Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:47-52.
 15. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha⁺ and CD8alpha⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J Exp Med* 1999; 189:587-92.
 16. Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J Immunol* 2003; 170:727-34.
 17. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15:144-53.
 18. Manickasingham S, Sousa CR. Microbial and T cell-derived stimuli regulate antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *J Immunol* 2000; 165:5027-34.
 19. Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman. The B7 - CD28 superfamily. *nature* 2000; 2:116-26.
 20. Lee KM, Jhang LN, Chang TT. The Immunomodulatory Effect of Dehydroshurenic Acid (MMH01) from *Atrodia cinnamomea*. BIT's 4th Annual World Congress of Molecular Medicine 2014:300.
 21. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996; 184:2541-50.
 22. Matthew FK, James PA. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995; 182:459-65.
 23. Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EEM, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 2006; 177:7551-8.
 24. Toso JF, Lapointe R, Hwu P. CD40 ligand and lipopolysaccharide enhance the *in vitro* generation of melanoma-reactive T-cells. *J Immunol Methods* 2002; 259:181-90.
 25. Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T, June CH. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol* 2001; 166:4943-8.

The Immunomodulatory Effect of Soybean Fermented Fluid

Chien-Jou Liu^{1*}, Chin-Chu Chen^{2,3*}, Li-Ni Jhang¹, Shu-Xing Yeh³, Kin-Mu Lee^{1#}

¹ Institute of Pharmaceutical Science and Technology, Central Taiwan University of Science and Technology, Taichung ;

²Grape King Bio, Chung-Li City ; ³ Department of Food Science, Nutrition and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei, Taiwan

Abstract

Soy [*Glycine max* (L.) Merrill, also known as Soybean], is rich in protein, amino acids, calcium, iron, vitamin A & B as well as vegetable oil. This research investigates the immunomodulatory activities and the cytokines produced by soybean fermented fluid to antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DC), macrophage and B cell which interacted with T cells. Feeding BALB/c mice with three different concentrations of soybean fermented fluid (0.288, 0.864 and 1.440 g/kg) over a 2, 4, or 6-week period while taking spleen cells at 24, 72, or 120 hours after feeding for performing experiments. The results showed that soybean fermented fluid will increase the amounts and the expression of surface molecule CD8 α 、CD40、MHC class II (I-A/I-E) on APCs, indicating the maturation and activation of APCs and the interaction with T

cell's co-stimulatory molecules after feeding. The highest concentration of 1.44 g/kg obtained the best activation for immune cells as performed with further real-time PCR analysis of cytokine mRNA gene expression. The results showed that soybean fermented fluid can increase the expressions of T_H1 cytokine INF- γ IL-12 and macrophage secreting TNF- α in BALB/c mice with relative suppression of T_H2 cytokine IL-4. These data strongly suggest that soybean fermented fluid is able to increase the host immunity by inducing T_H1 immune responses.

Key words: soybean fermented fluid, immunomodulatory effect, antigen-presenting cells, co-stimulatory molecule, cytokine

高糖化血色素 HbA1c 引發心血管疾病的風險

邱淑玲^{1*} 陳家綺^{2*} 傅文玫^{3*} 李慶孝⁴ 林祐君² 陳尚廷²
鄭惠文⁵ 曾瑞壯⁶ 吳宇暉^{1,2,3#}

李綜合醫療社團法人苑裡李綜合醫院檢驗科，苗栗縣¹；李綜合醫療社團法人大甲李綜合醫院檢驗科，台中市²；中山醫學大學附設醫院癌症防治中心，台中市³；仁德醫護管理專科學校醫檢科，苗栗縣⁴；李綜合醫療社團法人大甲李綜合醫院護理部，台中市⁵；李綜合醫療社團法人大甲李綜合醫院醫療部，台中市⁶，台灣

摘要

糖尿病是台灣常見的慢性疾病之一，心血管疾病是糖尿病人醫療支出中最大的病因，且病患常常因併發心血管疾病而死亡。因此，本研究係以糖化血色素 (HbA1c) 為標準，檢測血中 cholesterol、triglyceride、Low-density lipoprotein (LDL-C)、C-reactive protein (CRP) 等心血管指標，來評估糖尿病患心血管疾病的風險。結果顯示，triglyceride 與 CRP，無論糖尿病控制良好與否，其平均值皆大於正常值。而 cholesterol、triglyceride、LDL-C 與 CRP 隨著 HbA1c 的值越高，其濃度也相對越高。總之，糖尿病患不但具有較高的心血管疾病風險，並且如果控制不良，其心血管疾病的風險也越高。

關鍵字：糖化血色素(HbA1c)、心血管疾病

前言

糖尿病(Diabetes mellitus)是一種血液中葡萄糖濃度上升的代謝綜合症，原因是由於胰島素分泌不足或身體對胰島素反應不良而造成，致使無法將血液中的葡萄糖代謝完全^[1]。近年來，隨著人口老化、生活型態及飲食方式改變，糖尿病已高居國人十大死因前四名^[2]，據估計台灣約有 8.5% 的人口罹患糖尿病，其病患人數已將近兩百萬人，而年齡大多數分布於四十歲以上，且最常於五十五歲以後病發^[2]。

糖尿病早期症狀並不明顯，多數患者發

現自己罹病並接受治療，通常已發病多時，糖尿病在初期便會對患者各組織器官之功能進行蠶食^[1]，在不知不覺中引發各種慢性併發症，令人疏於防範因此糖尿病，需要持續的醫療照顧和病人自我管理教育，以預防急性併發症和減少慢性併發症之風險。

近年來一些對於糖尿病相關研究指出糖尿病的併發症以心血管疾病致死率最高^[1]，因為血糖控制不良，易使得醣蛋白過多，並堆積於血管壁上，使其氧化壓力增加，造成脂質氧化；此時若血脂異常，則其血管壁受損程度會更嚴重，長期下來會造成動脈血管病變所引發的心血管疾病。

目前對於糖尿病的監測，主要是用糖化血色素(HbA1c)來作為評估。依據國際糖尿病聯盟與中華民國糖尿病學會，目前對 HbA1c 的建議值均定為 <6.5%，小於 6.5% 代表控制良好^[3]。因此本研究係以糖尿病病人為研究對象，探討 HbA1c 與 cholesterol、triglyceride、

*邱淑玲、陳家綺及傅文玫具有相同貢獻度

#通訊地址：李綜合醫療社團法人大甲李綜合醫院檢驗科
台中市大甲區八德街2號 吳宇暉

電話：04-26862288 轉 3236,3128

E-mail：c89026eehospital.com.tw

low-density lipoprotein (LDL-C)、C-reactive protein (CRP)等心血管疾病風險評估生物標誌因子之相關性進行分析，以了解HbA1c與心血管風險間的關係，並作為預防心血管疾病產生的參考。

材料與方法

樣本來源

本研究為回溯性研究，收集2012年2月至2013年12月至本院就診的糖尿病患，總計236人，其中女性154人，病患平均年齡62.9歲。

分析項目

包含了糖尿病控制評估指標的HbA1c，以及心血管生物標誌的cholesterol、triglyceride、LDL-C、CRP四項。

分析儀器

在HbA1c部份，使用全自動的Primus分析儀，以HPLC分析法檢測人類血中的HbA1c含量。而在cholesterol、triglyceride、LDL-C、CRP部份，則是使用Hitachi 7180生化分析儀。

檢測項目的參考值

在HbA1C部分，其正常值為小於6.5%。而在心血管指標部分，cholesterol 的值為小於220 mg/dl，triglyceride 為小於130 mg/dl，LDL-C 為小於140 mg/dl，CRP 則是小於0.3 mg/dl。

統計分析

將病患之HbA1c分為三組，分別是<6.5%，6.5~9.0%，大於9.0%。病患基本資料部分以敘述性統計分析，以SPSS統計軟體針對結果進行分析，除計算平均值外，同時計算其95%信賴區間。

結果

在參與研究的236名糖尿病患中，有41人的HbA1c \leq 6.5%，佔17.4%，而HbA1c大於9.0的患者有71人，佔了30.1%。而在性別部份，女性的糖尿病患人數較多，有154人，佔65.3%。而在年齡與HbA1c間的關係部分，平均年齡為62.9歲，其中HbA1c>9.0%的平均年齡為61.9歲是三組中最低者（表1）。在HbA1c與心血管相關生物標誌部分，罹患糖尿病的病人，其triglyceride與CRP皆高於正常值（表2）。在不同HbA1c濃度病患的分組中，HbA1c 9.0%的糖尿病患，其

表 1. 病患基本資料

	全部	>9.0%	6.5~9.0%	<6.5%
人數(人)	236	71(30.1%)	124(52.5%)	41(17.4%)
性別	女：154人(65.3%) 男：82人(34.7%)	女：47人(66.2%) 男：24人(33.8%)	女：80人(64.5%) 男：44人(35.5%)	女：27人(65.8%) 男：14人(34.2%)
年齡(歲)	62.9 \pm 12.9	61.9 \pm 12	63.13 \pm 12.7	64 \pm 15.1

表 2. 不同生物標誌的濃度檢測值

項目	Cholesterol	Triglyceride	LDL-C	CRP
平均值	193.3 \pm 46.6	172.2 \pm 159.5	118.4 \pm 38.9	0.82 \pm 1.36
95%信賴區間	(187.3~199.2)	(151.8~192.5)	(113.4~123.4)	(0.68~0.99)

cholesterol、triglyceride、LDL-C 及 CRP 皆高其它兩組的患者（表 3）。

討 論

隨著人口老化、飲食習慣，以及生活習慣的改變，無論是在台灣或是全世界，糖尿病都是重要的疾病。2011 年，全球有 3 億 6 千萬人罹患糖尿病，預計到 2030 年，全世界會有 5 億 5 千萬人罹患糖尿病^[4]。而在台灣，糖尿病患者人數大幅增加，從 2000 年的 70 萬 7 千人，到 2012 年的將近 200 萬人，而糖尿病近年來也高居台灣十大死因前四名^[2]，第二型糖尿病佔所有糖尿病患九成以上。糖尿病是一種慢性疾病，需要持續的醫療照顧和病人自我管理教育，以預防急性併發症和減少慢性併發症之風險。

在評估糖尿病患對於疾病控制的評估上，雖然測量血糖較為方便，但是血糖值僅能代表在一極短時間內糖尿病的控制情形，可能受到飲食、運動、疾病、藥物等因素影響，而有上下起伏。而 HbA1c 是血紅素與糖類結合而成的，合成過程是緩慢的，而且是相對不可逆的，持續存在於紅血球 120 天的生命期中，其合成速率與紅血球所處環境中糖的濃度成正比，可以正確反應最近 2-3 個月的血糖控制狀況，且不像血糖值測定受到很多因素影響而有起伏變化。因此對於糖尿病患病情的控制，HbA1c 就成為評估的重要指標。

根據台灣國家衛生研究院的研究發現，糖尿病與性別有明顯差異。男、女性糖尿病的盛行率分別是 3.7% 與 6.3%，女性是男性的 1.7 倍^[5]。而在本研究的糖尿病病患中，女性（154 人）是男性（82 人）的 1.87 倍，也顯示出了明顯的性別差異。

由於糖尿病可以併發大血管產生病變，因此病患若是能夠控制糖尿病病情，就可以減少併發症的發生。在歐洲的研究顯示，第二型糖尿病患者每降低 1% 的糖化血色素，可以降低總死亡率 14%、心肌梗塞發生率 14%、心衰竭發生率 16%、腦中風發生率 12%^[6]。

血脂與糖尿病之間息息相關。當糖尿病患的血糖控制不好時，除了可引起代謝障礙外，還可經由透過升高血管內皮的第 8 因子相關抗原和血管內皮生長因子引起血管內皮損傷，增加細胞凋亡^[7,8]，進而增加急性心臟疾病、心絞痛、腦中風的機會^[9]。英國的研究顯示，每升高 1% 的 HbA1c，在未來 10 年內發生缺血性心臟疾病的危險性提高 20%，微血管疾病提高 200%。相對的，如果 HbA1c 值在 7-11% 之間每降低 1%，併發症的危險性可降低達 40%^[6,10]。

在 CRP 與 HbA1c 間的關係，2003 年在墨西哥的研究^[11]顯示，糖尿病合併代謝症候群的患者，其 CRP 較糖尿病無代謝症候群的患者為高。另外一篇以糖尿病患五年內死亡率與 CRP 間的研究發現，五年內存活者的

表 3. 糖化血色素(HbA1c)與心血管相關生物標誌的相關性

檢測項目		HbA1C: >9.0%	HbA1C: 6.5.0%	HbA1C: <6.5%
Cholesterol	平均值	203.3±20.5	194.6±19.6	187.2±12.5
	95%信賴區間	(198.5~208.1)	(191.2~198.1)	(183.4~191.0)
Triglyceride	平均值	207.6±35.2	173.2±22.9	147.5±32.7
	95%信賴區間	(199.4~215.8)	(169.2~177.2)	(137.5~157.8)
LDL-C	平均值	121.4±18.7	117.2±11.0	114.8±10.5
	95%信賴區間	(117.1~125.8)	(115.3~119.1)	(111.6~118)
CRP	平均值	1.32±2.37	0.67±0.85	0.37±0.52
	95%信賴區間	(0.77~1.87)	(0.52~0.82)	(0.21~0.53)

CRP 濃度較死亡者為低^[12]。在本研究發現，無論糖尿病控制良好與否，其 CRP 皆高於正常值，且糖尿病控制不佳的病患，其 CRP 更是明顯高於控制良好的病患。

本研究發現，糖尿病患的 triglyceride 與 CRP 平均值皆大於正常值。如果依照糖尿病的控制狀況來看，HbA1c 越高，無論是 cholesterol、triglyceride、LDL-C 與 CRP，其平均值也越高。

對於糖尿病患而言，雖然具有較高的心血管疾病風險。但是如果控制不良，則可能會有更高的心血管疾病風險。因此，對於糖尿病患者而言，除了血糖的控制外，如果能夠控制糖尿病的病情，就能降低心血管危險因子，進而降低心血管疾病的發生率。

參考文獻

- 許惠恒。糖尿病的疾病生理學及流行病學。糖尿病衛教人員核心課程教材。2010:1-13。中華民國糖尿病衛教學會，台北。
- 行政院衛生福利部。死因統計。2012。行政院衛生福利部，台灣
- 許惠恒。監測。糖尿病衛教人員核心課程教材。2010:113-27。中華民國糖尿病衛教學會，台北。
- Lai MS. National health insurance and the way leading to better diabetes care in Taiwan. Is there a role of comprehensive analyses of the claims data? J Formosan Med Ass 2012; 111:587-8.
- 張新儀。國家衛生研究院電子報。2011:393-4.
- UK Prospective Diabetes Study(UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352:837-53.
- King GL, Kunisaki M, Nishio Y *et al* Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. Diabetes 1996; 45:105-8
- Parzer SMB, Wagner L, Pettermann M *et al*. High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. Diabetes. 1995; 44:1323-7.
- Tseng LN, Tseng YH, Jiang YD, Chang CH, Chung CH, Lin BJ, Chuang LM, Tai TY, Sheu WHH. Prevalence of hypertension and dyslipidemia and their associations with micro- and macrovascular diseases in patients with diabetes in Taiwan: an analysis of nationwide data for 2000-2009. Formosan Med Ass 2012; 111:625-36.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329:977-86.
- Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Relation of C-reactive protein to features of the metabolic syndrome in normal glucose tolerant, impaired glucose tolerant, and newly diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabet Met 2003; 29:65-71.
- Bruno G, Fornengo P, Novelli G, Panero F, Perotto M, Segre O, Zucco C, Deambrogio P, Bargerò G, Perin PC. C-reactive protein and 5-year survival in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. Diabetes 2009; 58:926-33.

High HbA1c Lead to Cardiovascular Disease Risk

Shu-Ling Chiou^{1*}, Chia-Chi Chen^{2*}, Wen-Mei Fu^{3*}, Ching-Hsiao Lee⁴, You-Jung Lin²,
Shang-Yan Chen² Cheng Hui Wen⁵, Jui-Chuang Tseng⁶, Yu-Hui Wu^{1,2, 3#}

¹Department of Laboratory Medicine, Yuan-Li Lee's General Hospital, Lee's Medical Corporation, Miaoli; ²Department of Laboratory Medicine, Da-Jia Lee's General Hospital, Lee's Medical Corporation, Taichung; ³Chung Shan Medical University Hospital, Cancer Treatment And Prevention Center, Taichung; ⁴Medical Technology, Jen-The Junior College of Medicine, Nursing and Management, Miaoli; ⁵Department of Nursing, Da-Jia Lee's General Hospital, Lee's Medical Corporation, Taichung; ⁶Department of Medicine, Da-Jia Lee's General Hospital, Lee's Medical Corporation, Taichung, Taiwan

Abstract

Diabetic mellitus is one of the common chronic diseases in Taiwan. Cardiovascular disease is the etiology of the biggest medical expenses in patients with diabetes, and patients with diabetes often die due to concurrent cardiovascular diseases. Therefore, this study used HbA1c as a standard and evaluated the risks of cardiovascular diseases for patients with diabetes by investigating their cardiovascular indices such as cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and C-reactive protein (CRP). The results showed that no matter whether the diabetes is under well control or

not, the average values of triglyceride and CRP are both higher than the normal values. In addition, the concentrations of cholesterol, triglyceride, LDL-C and CRP are higher in accordance with the concentration of HbA1c. We conclude that patients with diabetes not only have higher cardiovascular risks, but also have even higher cardiovascular risks if the diabetes control is poor.

Key words: Glycosylated hemoglobin, HbA1c, Cardiovascular disease

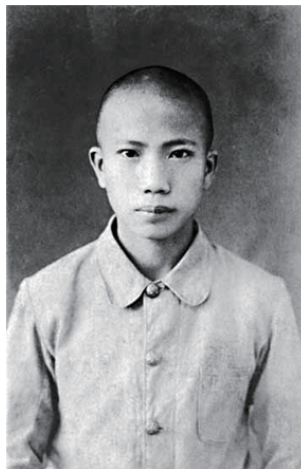
蚊子博士連日清 年近九旬仍遠赴非洲力戰瘧疾

連日清 教授

-
- 簡介：連日清，台北市人，1927年12月17日生
- 學歷：台灣省立師範學院英語學系畢業 教育學士
日本長崎大學醫學博士
- 經歷：日本台北帝國大學熱帶醫學研究所熱帶病學科職員，國立台灣大學熱帶醫學研究所職員，國軍陸軍第一軍團翻譯官，台灣省瘧疾研究所技佐、技士、技正、技正兼第一組主任，美國海軍第二醫學研究所醫學研究員，台灣省傳染病研究所技正兼病媒昆蟲組主任，中華民國駐玻利維亞共和國昆蟲醫學技術團團長，行政院衛生署預防醫學研究所技正兼病媒昆蟲組組長，以十職等（簡任級）退休，國防醫學院預防醫學研究所特聘顧問，西非聖多美普林西比民主共和國防瘧計畫主持人，國防醫學院榮譽教授（在國立及私立多所大學兼任教授授課多達40年）
- 專長：蚊蟲分類學，衛生昆蟲學，病媒管制，蜻蜓分類學
-

● 蚊子博士少年時啟蒙恩師---大森南三郎教授

我在日治時代1927年12月17日出生於台北市大稻埕。小時候家境清寒，母親生了十三男二女，我是老大，必須幫忙分擔家計；十五歲時，就讀台北的公學校高等科二年級（相當於初二），到台北帝國大學熱帶醫學研究所熱帶病學科擔任臨時雇工。在那裡，我遇見了轉變我一生命運的貴人---大森南三郎教授，他當時是昆蟲（瘧蚊）研究室的主任。由於我在學的成績很優秀，他便大力奔走，讓我在工作之餘，繼續念夜校---私立成淵中學。



1942 連日清十五歲 高等科畢業。由於家境清寒，必須分攤家計，進入台北帝大熱帶醫學研究所當臨時雇工。

在大森南三郎研究室那幾年，是我一生的轉捩點。當時我擔任大森主任的打字助理，透過打字，學會了許多昆蟲學的相關字語與學問。每當訪客來，他就要我停止打字，並用心地聆聽。訪談內容廣泛有趣，如調查瘧蚊的知識、蚊蟲如何鑑定、分類上容易犯錯的地方、野外採集的注意事項等等。經由這些談話與平日的相處，大森南三郎的治學哲理、研究精神與處事態度，在潛移默化中影響了我的一生。



昆蟲研究室的主任大森南三郎成為改變連日清一生命運的恩師，他鼓勵連日清在困境中要努力向學。

有一次大森南三郎應日本軍方徵召赴南洋當防瘧顧問，農業試驗所的森山忠光被調來代理他的職務，我問他：「我工作做完的時候，可不可以自己練習鑑定蚊蟲？」森山忠光答應了，並拿出十片蚊子幼蟲的玻片標本給我。雖然我已經在研究室工作了兩年，但一直擔任打字工作，這是我第一次使用顯微鏡。我已經熟記大森南三郎教別人使用顯微鏡的技巧，也知道必須上、下調整焦距才可以觀察及判斷幼蟲的立體構造及長毛的位置。對照著大森老師編著的日文“南方產瘧蚊檢索表”，我仔細地把十種蚊蟲鑑定出來。並將結果給森山忠光看，他嚇了一大跳，因為全部答對了！森山心裡認為我可能作弊，於是又不動聲色地再拿十片玻片給我，並在一旁觀察。我再次的鑑定，結果又完全正確無誤。森山忠光喜出望外，等大森南三郎出差回來，立即向他報告。而大森想不到在他身旁的打字助理居然具有蚊蟲鑑定的天賦，馬上決定將我升為技術人員！當我十七歲，仍就讀成淵夜校三年級時，已成為正式職員，從此走上「與蚊共舞一輩子」的生涯。

台灣光復後，我服務的單位改制成國立台灣大學熱帶醫學研究所，大森教授返回日本，我繼續留任。由於南京的動亂，中央機關有幾個月發不出薪餉。我必須負擔家計，只好辭職另找工作，考上了薪水優厚的台灣水泥公司打字員，晚上繼續進修省立台北補習學校高三班，一年後考取台灣省立師範學院英語學系，即現在的國立臺灣師範大學英語系。當時為了升學，放棄高薪，與父親起了很大的衝突，但在若干年後，反而讓父親引以為傲。

● 引領我走向蚊蟲研究生涯的幾位貴人

師範大學畢業後，考取了陸軍第一軍團翻譯官，退伍前遇見影響我這一生的第二位貴人——台灣省瘧疾研究所的陳錫煊醫師，原本我想以當英文老師為職業，蚊蟲研究當成業餘興趣，經過他的極力遊說，我投身加入對抗瘧疾的行列。1955年1月，以技術人員任用條例，進入瘧

疾研究所；從最低職位委任十三級技佐做起，隨後十一年間升任技士、技正、技正兼昆蟲組主任。1965年11月，世界衛生組織宣布台灣為第一個瘧疾根除國，成為百年來台灣公共衛生史上最大的成就。



1965 屏東縣潮州鎮瘧疾研究所的醫學昆蟲研究室，原為日本神社官舍。

1966年5月，瘧疾研究所昆蟲組由屏東縣潮州鎮遷移至台北南港，當時瘧疾已根除。當我在工作與人事上遇到瓶頸時，位於台北的美國海軍第二醫學研究所（U.S. Naval Medical Research Unit, No.2 簡稱 NAMRU-2）寄生蟲學系高樂士博士(Dr. J.H. Cross)正在尋找研究瘧疾原蟲的研究員，恰巧這個工作可以擴展我的研究觸角到東南亞，讓我很心動。高樂士博士與瘧疾研究所曾柏村所長展開拉鋸戰，最後所長同意放人，但是要求我繼續在瘧疾研究所兼職為聘用研究員。高樂士博士後來才發現我對於蚊蟲分類也非常“厲害”；喜出望外，從此連昆蟲部分也一併交給我來管理了！



1977 NAMRU-2（美國海軍第二醫學研究所）赴印尼爪哇調查。
攝於 US NAMRU-2 分所內，右 4 高樂士博士，右 2 連日清。

在這段期間，我仍與我的日本恩師大森教授保持聯絡，他認為我應該取得一個專業方面的博士學位。我的本科系是英語系，該如何取得呢？他認為日本學者都知道我有多篇生物學方面

的論文發表，所以建議我在“長崎熱帶醫學雜誌”發表蚊蟲分類論文，就可以取得乙類基礎學研究的醫學博士學位。1969年5月，我以二十七種新蚊蟲論文五篇，獲得日本醫學博士學位。在我有生之年，一再受到這位貴人的提拔相助，真是三生有幸！

1979年1月，中美斷交，我於2月自美國海軍第二醫學研究所離職，結束為期十三年多豐富的東南亞研究生涯，邁向另一個事業高峰。

當時台灣省瘧疾研究所已經改制為台灣省傳染病研究所，所長請我回去繼續主持病媒昆蟲組。兩年後應外交部託付重任，遠赴南美玻利維亞共和國擔任“昆蟲醫學技術團團長”協助當地政府防治瘧疾以及其他昆蟲引起的疾病。正當研究與防治開始有成效時，我國與玻利維亞斷交，只好於1985年8月撤團回國。由於在當地已拓展了我的研究視野，並且進行了許多在台灣無法實現的野外實驗新方法，讓我頗有收穫。



1982 於玻利維亞 Chapare 地區採集瘧蚊幼蟲。

1993年2月，我因年滿六十五歲，自“衛生署預防醫學研究所”退休，隨即被國防醫學院預防醫學研究所聘為顧問，至今仍在職。

另有一位貴人促成了我在各大專院校的教學生涯，那就是國防醫學院的許雨階(James O. K. Khaw)醫師。我在瘧疾研究所時，他力邀我至國防醫學院講課，當時必須從屏東坐火車北上來授課。我由兼任講師當起，逐漸升為副教授、正教授，連續教了許多年，並於2009年，獲聘為國防醫學院的榮譽教授，至今仍有時應邀授課。許雨階醫師退休後，美國海軍第二醫學研究所邀請他擔任顧問，他的辦公室恰巧就在我的辦公室隔壁，真是有緣。

● 集結畢生功力，遠赴非洲力戰瘧疾

2003年7月起，奉外交部之命，成立“防瘧小組”赴西非聖多美執行瘧疾防治計畫。當時我已七十六歲，但是外交部認為沒有人比我更適合這個任務，沒想到一做就過了十一年，至今已年屆八十七歲了！由於世界衛生組織在非洲始終無法將瘧疾根除，因此，從2000年起改變策略為“擊退瘧疾”(Roll Back Malaria-RBM)計畫，其目標是希望到2010年時，感染率與死亡率降低至一半左右。由於聖多美只有兩個島國，所以我把目標訂在「根除」；使用消滅瘧蚊的“屋內噴灑藥劑”（即是我在台灣防治登革熱成功的“亞滅寧”），並非世界衛生組織用的 DDT，這

在非洲是首例。此防治效果非常顯著，在初步的試驗區--普林西比小島，使用三個月後，就讓該島過去被瘧疾病患擠得水洩不通的醫院，變成門可羅雀！發揮了九成的作用。2006年，抗瘧計畫實行三年多後，聖多美的瘧疾感染率降到百分之三左右，而且前一年完全沒有瘧疾死亡病例，“蚊子外交”的成果非常顯著。該年9月20日，聖多美梅尼士總統在紐約舉行的聯合國大會中讚譽台灣，感謝台灣以卓越的技術協助聖國防瘧，獲得顯著的成效，並呼籲聯合國重視台灣人民的人權，讓台灣在聯合國可以有一席之地。2007年3月12日，我以協助西非聖多美抗瘧有成，獲頒衛生署一等衛生獎章。其後於2008年至2010年間，國合會自動將“防瘧小組”換成一批年輕人去協助聖多美政府，但成效不彰；因此，外交部於三年後，又邀請我繼續接手執行至今。由於我已在聖多美建立當地的防瘧實驗室及工作人員，因此，我可以在台灣遙控，不必親自坐鎮。今年1月，馬總統曾赴聖多美訪問，並於九月發言時提到，過去聖多美瘧疾盛行率在47%左右，經過我帶隊多年的努力，讓瘧疾盛行率降到4%，這是連世界衛生組織都無法完成的任務。我並不以此為滿，希望能在有生之年繼續替非洲防治瘧疾。



2006.4.6 於聖多美 連日清手持該國總統梅尼士頒發的獎狀，與屋內殘效噴灑工作領隊們合影。

● 矢志將台灣的蚊蟲分類整理完全，一生致力於蟲媒疾病的防治

目前在台灣，瘧蚊亞科有15種，巨蚊亞科有2種，家蚊亞科有12屬，120多種。台灣光復之前，英國人與日本人一共發表台灣的蚊蟲僅有60種（15種瘧蚊及45種其它蚊蟲）。日本人走後，我認為台灣人應該把自己的蚊蟲研究清楚，所以把這件事當成一生的抱負，堅持留在台灣，用一輩子的時間來整理台灣的蚊蟲分類。截至目前為止，我所完成的台灣蚊蟲資料庫一共約有一百四十種，其中由我發現命名的蚊蟲共有二十九種。

我同時研究分類與生態，因為要防治病媒蚊蟲，一定要對牠的野外生活習性瞭若指掌，才能一舉殲滅。早期的瘧疾根除是從1946至1964，總共進行了十八年，我幾乎參與了後期的十年，憑藉的就是我對瘧蚊的徹底了解，所以我也可以算是瘧疾根除的功臣之一。

過去日本腦炎在台灣肆虐的嚴重性僅次於瘧疾，直至1968年實施日本腦炎預防接種以後，病例才減少很多。日本腦炎的病媒是家蚊，當我在瘧疾研究所的時候，藉著對蚊蟲的了解，分辨出三種可能傳播日本腦炎的病媒蚊，並發表了一些相關的野外調查報告；至於實驗室的研究

報告，幾乎都是與美國海軍第二醫學研究所一起發表的，後來駐於夏威夷大學“太平洋生物醫學研究中心”的羅森(Leon Rosen)博士也加入研究；透過這幾個機構合作，將台灣的日本腦炎的問題研究做得很透徹。

登革熱目前在台灣的蟲媒疾病中，已晉升為第一名；究其原因，與病媒蚊孳生猖獗及疫苗的開發不易有很大的關係。台灣的登革熱病媒蚊，北部以白線斑蚊為主，南部以埃及斑蚊為主。這兩種斑蚊雖然都以容器來進行繁殖，但他們的生態習性有顯著的不同：白線斑蚊大部分棲息於野外，而埃及斑蚊則喜歡棲息於住家內外，這就是為什麼南部比北部容易流行的主要原因之一。民國 76 年期間，屏東與高雄爆發了登革熱大流行，我奉命帶隊赴南部展開一連串的調查與防治，依據我長年累積的經驗，使用“綜合防治”法，結合數種治本與治標的辦法，針對病媒的習性與生態各方面加以擊破，終於防治成功。民國八十一年，我以協助防治南部登革熱有成效，獲得衛生署頒發二等衛生獎章。

● 熱愛昆蟲分類與生態學，帶領學生進入昆蟲研究的殿堂

由於我對蚊蟲分類與生態學的興趣，引發我對其它昆蟲研究的興趣，尤其是雙翅目昆蟲。台灣雙翅目昆蟲的分類及生態研究，是我畢生花費最多時間與精力鑽研的，包括：蚊蟲、蛾蠅、蠓、蚋、虻、蠅等，我均廣為涉獵。

我投入較多心血在研究蠓科(Ceratopogonidae)昆蟲的分類，台灣早期少有人作此研究。有關鈇蠓屬蠓亞科，日本人只報告了一種(台灣蠓蠓)。於 1982 年，我開始接觸這類昆蟲後，就對牠產生興趣，進而將台灣的蠓科調查得非常透徹。就台灣的“蠓蠓”而言，我報告了二十四種，其中有十三種為新種。由於“庫蠓”會傳播疾病，所以報導較多；我的指導學生陳錦生，其博士論文提出台灣的庫蠓屬約有六十種；其後又與其他人追加報告，目前總數已達七十一種，其中有三個新種。

至於台灣的白蛉子，只有我在做研究，已報告者有四種，另有六種尚未發表報告。在台灣只有一種 *Phlebotomus kiangsuensis* (江蘇白蛉)會吸食人血。幸而台灣的白蛉子並不會傳播任何疾病，所以我認為它在台灣並不構成大問題。

另外比較有趣的是，我帶領學生研究台灣原尾目昆蟲。原尾目是生活在落葉底下之腐植土中的微小透明昆蟲，當時在台灣沒有任何學者採集過。因此，我請教曾在陽明山採集，並發表三個新紀錄種的日本學者馬場金太郎醫生，而找到研究這種昆蟲的方法。我的博士班學生陳錦生(畢業後赴東海大學任教於生物系)用這種研究方法，順利地指導他的學生趙仁方完成以原尾目分類的博士論文，文中發表了四十幾種台灣的原尾目昆蟲。因此，我可以說是台灣研究原尾目的始祖。

我在 1968 年間，因為認識了日本學者松木和雄，而對蜻蜓產生了濃厚的興趣。蜻蜓的幼蟲與成蟲都會捕食蚊子，是蚊蟲的天敵，很值得研究；於是我與松木和雄合作了二十幾年，共同研究蜻蜓的生態與分類。我們合作的台灣蜻蜓採集報告由 1977 年開始陸續發表，直至松木和雄返回日本後仍繼續整理發表。1991 年 12 月，他發表了最後一篇合作報告，這 14 年間總共發表了約三十篇報告，它在我的“研究成果目錄”兩百多篇報告中，佔了很重的份量。

另外在 1978 年，荷蘭的昆蟲分類專家 Dr. Lieftinck 應“Asian Ecological Society”（亞洲生態學會）之聘來台灣，與我及農試所應用動物系主任馬駿超合作，撰寫一本對台灣蜻蜓分類很有幫助的書“Catalogue of Taiwanese Dragonflies (Insecta: Odonata)”，這本書寫了兩、三年才完成，於 1984 年出書。書中記錄至 1982 年底為止，台灣的蜻蜓共有 14 科、78 屬、135 種（現已增加為 140 種）。

當松木和雄離開後，台灣又有一批後起之秀接棒研究台灣的蜻蜓。在台北林試所服務的葉文琪與在賞鳥協會服務的林緯原（平日喜愛採集蜻蜓），時常登門拜訪我，成了忘年之交。葉文琪經過這些年與我的接觸，已發表了多篇有關蜻蜓的報導，成了這方面的專家。民國八十九年“台灣蜻蜓郵票專冊——溪流蜻蜓”的郵票規劃計畫，就是由我與葉文琪所負責；而該年十月十一日的「蜻蜓郵票特展」，也邀請我們二人作專題演講。昆蟲攝影家張永仁也是我的好友，他也經常拿他所拍攝的蜻蜓圖片來請教我。我很慶幸已培育出一批新的接班人，自己可以退居幕後了。

● 練就十八般武藝，對抗台灣的公共衛生“害蟲”

如果要說到我最有用的“功夫”，莫過於我在傳染病研究所昆蟲組時，靠經驗練就的一身絕學了。昆蟲組的主要任務雖然是以研究蚊蟲傳播的疾病為主，例如瘧疾、日本腦炎、登革熱，但舉凡家庭之類的疑難雜症也會找上門來，所以昆蟲組的人員必須具備十八般武藝，才有辦法處理民眾發生的各種狀況。他們研究的對象不只是昆蟲類的蚊子、蒼蠅、螞蟥、蛇、蝻、跳蚤、蟑螂等，還包括不屬於昆蟲類的危害人體與家畜的動物通稱為害蟲(pest)，例如引起恙蟲病的恙蟲，引起皮膚炎的果樹毒蛾及擬天牛，跑進人的眼睛、鼻子、耳朵的菸甲蟲，体液對皮膚有毒的隱翅蟲，會螫人的針蟻，就連老鼠也列為研究對象。所以害蟲防治(pest control)也是我的一項專長，並且在各大學及政府機構開課講授。

● 牽手採蚊蟲，結縭一甲子

我最後要感謝的人是我的賢內助——簡寶桂女士。她一直是我的幕後推手，從結婚以後就沒有過好日子。新婚蜜月時，她就陪著我徒步到深山裡抓蚊子；此後因為我常常必須出差採集，她得自己一個人照顧這個家跟撫養孩子，還得抽空飼養我放在家中研究的昆蟲，甚至要犧牲自己的血來餵蚊子。周末我想出去採集昆蟲時，她是我的最佳助手，鑑別一般蚊子的能力也練到差我不遠了。我赴玻利維亞的三年多，她帶著稚子前來陪我工作約兩年，甚至在當地當起義工。她也曾經陪著我遠赴西非聖多美，體驗當地的風土民情，一點都不怕那是瘧疾疫區。樂觀進取，笑口常開是她的最佳寫照。遺憾的是，她已於今年五月過世了；在此我要感謝她：謝謝她鼓勵我走這一行！謝謝她陪伴我走這一生！這輩子能娶到那麼好的太太，真是我的福氣！



1953.3.9 連日清與簡寶桂於三重老家結婚。

歷年來獲頒獎項

- 1963年9月18日，蒙 蔣介石總統召見，接受五十一年度政務軍事機關特保最優人員的表揚。
- 1992年11月27日，以防治台灣南部的登革熱有功而獲頒衛生署二等衛生獎章。
- 1997年5月25日，獲選為台北市立成淵高中建校第一百周年第一屆傑出校友。
- 2007年3月12日，以協助西非聖多美抗瘧有成，獲頒衛生署一等衛生獎章。
- 2008年6月5日，獲選為國立師範大學第八屆傑出校友。
- 2010年9月25日，榮獲第二十屆特殊醫療貢獻獎。
- 2011年10月25日，榮獲馬英九總統頒發三等景星勳章（為國家的最高榮譽獎章）。

相關出版著作

1. Lieftinck MA, Lien JC (連日清), Maa TC (馬駿超). Catalogue of Taiwanese Dragonflies (Insecta: Odonata). 1984:1-81.
2. 周欽賢、連日清、王正雄。1985。醫學昆蟲學。1985:1-458。南山堂出版社，台北，台灣。
3. 連日清。台灣蚊種檢索。2004:1-178。藝軒圖書出版社，台北，台灣。
4. 周欽賢、連日清、王正雄。2005年。醫學昆蟲與病媒防制（修訂版）。2005:1-658。南山堂出版社，台北，台灣。
5. 連秀美。蚊子博士連日清。2007:1-325。遠流出版社，台北，台灣。

論文數量

共有 221 篇論文，其中蚊子的 119 篇，蠓的 25 篇，蜻蜓的 33 篇。

論文代表作:

1. Koidsumi K, Lien JC. Formosan derris as an anopheline larvicide. Chin Rev Trop Med 1948; 1: 47-58.
2. Lien JC. Mosquitoes of Taiwan: Genus *Toxorhynchites* Theobald. J Med Ent 1965; 2:1-16.
3. Lien JC, Cross JH. *Plasmodium (Vinckeia) watteni* sp. n. from the Formosan giant flying squirrel,

- Petaurista petaurista grandis*. J Prasi 1968; 54:1171-4.
4. Lien JC, Kosman L, Partono F, Joesoef A, Kosin K Cross JH. A brief survey of mosquitoes in North Sumatra, Indonesia. J Med Ent 1975; 12:233-9.
 5. Lien JC, Kawengian BA, Partono F, Lami B, Cross JH. A brief survey of the mosquitoes of South Sulawesi, Indonesia, with special reference to the identity of *Anopheles barbirostris* (Diptera: Culicidae) from the Margolembo area. J Med Ent 1977; 13:719-27.
 6. 連日清。本省產蚊蟲生態及其防治。中央研究院動物研究所舉辦「昆蟲生態與防治」研討會講稿集。1978:37-69。
 7. Rosen L, Lien JC, Shroyer DA, Baker R, Lu LC. Experimental vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex tritaeniorhynchus* and other mosquitoes. Am J Trop Med Hyg 1989; 40:548-56.
 8. Rosen L, Lien JC, Lu LC. A longitudinal study of the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult and larval *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in Northern Taiwan. Am J Trop Med 1989; 40:557-60.
 9. Lien JC. Taxonomic and ecological studies on the biting midges of the subgenus *Lasiohelea*, genus *Forcipomyia* from Taiwan. J Taiwan Mus 1989; 42:37-77.
 10. Tseng LF, Chang W, Conceicao Ferreira M, Wu C, Sacramento Rampao H, Lien JC. Rapid control of malaria by means of indoor residual spraying of alphacypermethrin in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. Am J Trop Med Hyg 2008; 78:248-50.
 11. Lien JC, Lin CC, Tseng LF. A new species of the genus *Coquillettidia* (Diptera, Culicidae) from the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. J Nat Taiwan Museum 2008; 61:55-60.
 12. Lien JC, Lin CC. *Mimomyia (Etorleptomyia) mediolineata* (Theobald, 1904), a mosquito new to the Democratic Republic of Sao Tome and Principe, West Africa. J Nat Taiwan Museum 2009; 62:65-74.

