

第六章 試驗方法

廖俊旺

生物醫學研究機構所需的實驗動物，除了機構自己繁殖或自野外捕獲之外，經常需要由機構外購入。目前國內部分大學^{*1}、研究機構^{*2}有生產實驗動物對外供應；另外，也可以由商業實驗動物繁殖場獲得^{*3}。若需使用到國內沒有生產供應的實驗動物，則可由國外各大學、研究機構^{*4}或實驗動物繁殖場引進^{*5}。

為及時做好各項動物接收準備工作，購買及接收實驗動物，盡可能由各機構的動物管理部門統一辦理。通常此一部門配置有具實驗動物專業知識與熟悉作業程序的人員，這有助於購買及接收作業的順利施行。除可以避免由管理不良或動物品質不佳的繁殖場或供應商引進動物，還可使所購入的動物受到最妥善的照顧。若是研究者自行購買及接收實驗動物，則應主動諮詢各該機構動物管理部門以請求協助，並遵守相關規定。

實驗動物繁殖場或供應商是否有建立完善健康監測系統，關係著所供應實驗動物品質之良莠，由建立嚴格健康監測及品質保證的供應者取得實驗動物，才能確保研究結果的一致性與正確性。

除了實驗特殊需求，例如：各實驗動物繁殖場沒有生產的特殊品系、基因轉殖/剔除、或是未離乳的實驗動物，必須由機構自己繁殖外，通常以外購較為經濟與方便。若衡量生產成本與為維持動物品質所必須的投資，從專業繁殖場購買實驗動物是較由機構自行繁殖為理想的作法，且所獲得的實驗動物品質也有一定的保障。

*1 台灣大學；陽明大學；國防大學；成功大學

*2 中央研究院；國家實驗動物中心；農委會畜產試驗所；農委會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

*3 樂斯科生物科技

*4 美國國家衛生研究院（National Institute for Health）；傑克森實驗室（Jackson Laboratories）

*5 Charles River Laboratories；Harlan；Taconic；CLEA

第一節 動物之取得

蔡倉吾

一、微生物狀態

動物品質可依其體內所攜帶的微生物形式而分級。在購買動物時前，研究者/訂購者要先確定實驗所需動物的等級，及瞭解實驗動物生產/供應商是否能提供適合的實驗動物。

一般級實驗動物體內的微生物並未確認，其種類與數目不明。此類實驗動物只需飼養於開放式環境，適用一般飼養管理程序即可，不必特別規範，也不需有障壁保護設計（圖 6.4-A）。籠舍、器材、飼料與墊料等的可直接供給使用，不需經過高壓高溫滅菌過程。

動物生產/供應商可以依訂購者需求，生產與供應不同微生物潔淨度的動物，這類的實驗動物可以分三等級：一、無菌動物（Germfree or Axenic animal）；二、已知菌動物（Defined flora or gnotobiotic animal）；及三、無特定病原動物（Specific Pathogen Free animal, SPF animal）。這三種類的實驗動物都需要飼養於有障壁設計的環境（圖 6.1-B）。籠舍、器材、飼料與墊料等均需經過高壓高溫滅菌過程才可使用。

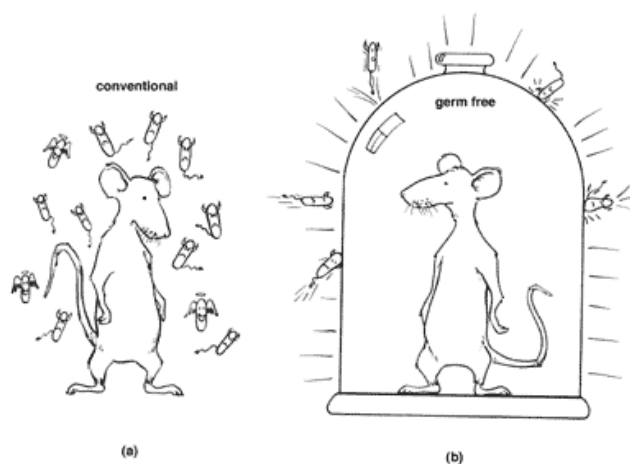


圖 6.1 A 非障壁環境；B 障壁環境

（一）、無菌動物

此級動物體內不帶有任何以現行檢驗方法可偵測到的細菌、病毒、寄生蟲和其他微生物，需在完全無菌的環境下飼養、繁殖，例如隔離箱（Isolator）（圖 6.2）的使用。因為此級動物之腸道缺乏對身體有益的細菌以幫助消化，所以經常發生消化道方面的障礙。

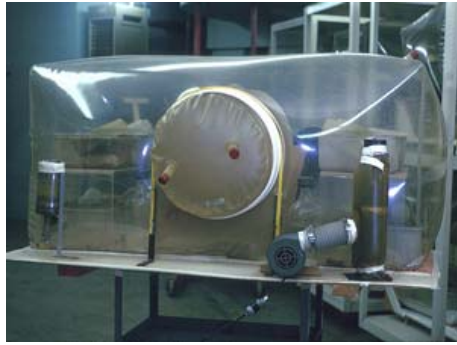


圖 6.2 動物隔離箱

(二)、已知菌動物

此級動物體內幾乎為無微生物存在的狀態，是在無菌動物體內引入已知幾種有助於消化的無害細菌而成，所以能避免類似在無菌動物所發生的消化道障礙。為防止非所欲引入的其他微生物意外入侵，所以需要在隔離狀態下飼養、繁殖與操作，例如使用隔離箱設備。

(三)、無特定病原動物

此級動物體內不得帶有某些「特定致病微生物」，即所謂的 SPF 動物。各動物生產/供應商對「特定致病微生物」的定義與範圍不盡相同，購買動物時須注意此差異。因為不同來源的動物體內有不同的微生物狀態，若需將由不同的生產/供應商購買來的無特定病原動物直接一起飼養於同一場所時，要先確定各該生產/供應商所定義的 SPF 項目，避免將不同 SPF 項目的動物混養。

二、運輸

實驗動物運送需使用有空調設備之專用運輸車或貨車(圖 6.3)，國內的國家實驗動物中心或樂斯科生物科技公司等即配備有此種車輛，將動物運送到訂購者所指定的動物飼養場所。自行到各大學或研究機構提領動物，或是委託快遞公司代為提領者，應使用或要求提供具空調設備的運輸工具運送，不可使用一般貨車或自用驕車行李箱。若是由國外進口動物，則應要求航空公司、海關或代為提領的公司，避免將動物任意放置於無空調設備的場所，及使用無空調設備的運輸車。



圖 6.3 動物運輸車

依動物保護法第九條規定，中央訂定動物運送辦法（草案），規範經濟動物運送，若以經濟動物做為實驗動物者，需遵守是項規範。另外，在實驗動物之來源、適用範圍及管理方法（草案）中，亦有實驗動物運輸的規範，包括運輸籠/盒/箱的材質、規格，每籠/盒/箱可裝動物數，運送途中需填加飼料、飲水的次數及溫度需求範圍等。

（一）、運輸標準

運輸容器必須通風，有充足的空間以方便動物站立、躺下及迴轉。動物用在運輸旅程的時間盡可能縮短，以減少緊迫對動物造成傷害。

動物在機場、車站、貨運站暫存或等待轉運、接送時，其放置區的溫度、清潔、通風都需要有規範。各機構可以與有經驗與信用之專業報關、運輸公司簽訂合約，委託他們協助辦理報關手續、領取動物並直接送到各機構，這比由各機構派員自行辦理及接運動物節省時間與金錢。接送車必須有空調設備，以提供動物舒適的環境，若使用小轎車運送，不要將動物放在無空調管路的行李箱。

（二）、啮齒類及家兔

啮齒類與家兔等實驗動物，可以使用構造堅固的紙箱（圖 6.4）運送，紙箱外側要有小突出設計，避免紙箱堆疊時阻塞通氣孔，另也有金屬或塑膠材質的運輸箱。供應商必須提供動物在運輸途中所需的食物與飲水，有廠商開發一種混合飼料與飲水混合的產品，使用甚為方便，還能避免運送途中因震動造成飲水管漏水淹死動物的危險；另外還有其他精心設計的產品可以利用，例如具防漏小活塞設計的丟棄式飲水袋，能讓動物在運送途中有充足的飲水可用。



圖 6.4 動物運輸紙箱，注意紅色部分即突出處

（三）、犬、貓、豬、靈長類

大型動物，例如犬、貓，可以使用特別設計，有個別隔間的車輛運輸，此方式不使用運輸籠；也可以使用傳統塑膠、玻璃纖維、不銹鋼或鋁製的運輸籠，其內則配置可裝飼料與水的容器。

豬與靈長類動物通常使用不銹鋼運輸籠（圖 6.5），製作不銹鋼籠的鋼條直徑除需能承受動物重量外，還要注意間距是否過大而容易被撐開；門的開關也要有預防動物自行開啟、脫逃的設計。



圖 6.5 運輸籠

三、動物接收

各機構動物中心或動物飼養場所,需要規劃一區域用以接收新購入的實驗動物。動物送抵機構並經接收後,要儘速處理,避免長時間留置在接收室。負責接收的人員首先要檢查運輸籠/箱/盒外觀是否完好,如有任何損壞,則需依標準作業程序處理;其次,再核對訂單與發票,若送達的動物籠/箱/盒數量都無誤即簽收確認。注意,此時尚不可開封。

完成簽收,裝動物的動物籠/箱/盒先以適當之消毒劑擦拭後移到檢疫室準備開箱,由獸醫或是經過訓練的專業人員先進行初步檢查。檢查內容依不同生產/供應商而異。各機構可依據動物生產/供應商提供的動物健康監測記錄,機構本身對動物的要求等,事先制訂適合的初步檢查標準作業程序。

初步檢查首先要確認送達的籠/箱/盒內的動物數量、性別、重量、品種是否與籠/廂/盒上標籤或通知單上記載事項相符,若有錯誤,需依各機構所訂之標準作業程序處理。

四、健康檢查



圖 6.6 動物外觀檢查

動物要轉移至各機構的籠舍飼養前,需檢查(圖 6.6)是否有掉毛、外傷、下痢、異常分泌物等症狀。品種、品系、年齡、性別、生產/供應商及動物數量等資料都要記錄於確認卡。更詳盡者,也有將體重、毛色及特殊標誌等一併記錄在卡上。若發現動物體重減輕,要注意是否因為脫水或是運送失誤所致,健康檢查過程若發現任何不正常則需依標準作業程序處置,例如要向使用動物的研究者或負責的主管報告。

(一)、死亡動物



圖 6.7 死亡動物

開箱後，若發現有動物死亡(圖 6.7)，則必須依標準作業程序處置，將屍體取出丟棄或送檢驗以確認死因，並向相關人員報告。

(二)、動物移至籠舍

動物不要在運輸籠/箱/盒中停留過長的時間。在完成健康檢查後，如未發現問題，動物應盡快由運輸籠/箱/盒轉移至機構用來飼養動物的滅菌乾淨籠舍，然後在檢疫室做檢疫與適應。

五、檢疫

新引進的動物需要時間來恢復運輸所致之緊迫及適應新環境，並且確認未帶來病原。在此段期間，動物中心專業人員可以仔細評估動物健康狀況。

檢疫期是一段在隔離區域進行密集健康評估的日程，時間長短依據動物生產/供應者的紀錄、動物品系及各機構的需求而異，可以從幾天到數個月。不同來源或品種，除非已確定其健康狀態，應飼養於不同檢疫房。檢疫期間不得在動物體進行實驗，此期間主要是用來觀察動物是否有疾病徵兆、評估動物健康狀態、建立基礎生理數據。必要時，可進行預防注射或治療發病的動物。但除非特殊情形，發病動物通常不施予治療。

(一)、動物疾病狀態

飼養在檢疫室的動物，其健康狀態不確定，工作人員例行清理與飼養作業時，應該先清理與飼養其他已確定健康狀態的動物室，最後才清理檢疫室。檢疫可以在某一特別隔離的空間進行，或是直接在預定長期飼養該動物的動物房進行（此即檢疫/適應/實驗都在同一動物房的模式）。通過檢疫後，即可讓動物適應環境準備進行實驗（檢疫與適應分開）；也可以檢疫與適應同時進行。

(二)、適應

動物適應是指將動物放置在與將來實驗時要飼養的空間有相同光線、溫度、噪音、清潔方式及物質條件的環境，以便讓動物熟悉與適應。適應的功用有：

1. 適應期有助於減少實驗時緊迫的發生。
2. 緊迫動物會引致某些賀爾蒙分泌高於正常水準，例如腎上腺賀爾蒙的分泌，會對正常血液學生理與血清生化數據有重大影響，亦影響實驗結果的正確性

六、健康維護

一旦動物完成檢疫與適應，即可開始進行實驗程序，動物飼養人員及獸醫師則要繼續追蹤及觀察動物的健康狀況。

各機構應依設施規模與動物種類，建立一套品質確認與健康監測的標準作業程序，以確保動物維持健康狀況。包括動物從供應商送抵時的接收、開箱、初步檢查、檢疫適應、預防注射，以及定期疾病檢測等。例如犬貓的定期預防注射及寄生蟲檢查；靈長類的結核病檢查；齧齒類的微生物確認與衛兵鼠運用等。

第二節 試驗設計與方法

廖俊旺

有品質優良的實驗動物，為動物試驗設計基本要求。一個好的試驗設計與方法可得到正確的數據與結果，作為正面判讀方向。試驗設計與方法需包括有三個重要觀念，即試驗動物及處理方式、對特殊動物之特別處理及觀察或測試項目。試驗設計與方法（Experimental Design and Methodology）正確與否影響研究結果甚鉅，首先必須清楚確認並瞭解研究問題之所在，並預期達成欲追求的目標，必須是實際的並且可達成的。另外，慎選合適的實驗模式，實驗可能是以活體外試驗（in vitro）模式先行探討，例如經由細胞或微生物培養方式，或使用少數動物活體試驗（in vivo）作為研究的前試驗對象。

（一）、研究計畫

研究主持人在確認研究方向後，接著選擇合適之試驗模式，再提出一個完整的研究計畫。研究計畫內容通常包含以下幾個重點：

1. 事先詳細瀏覽目前所有之相關資訊及知識，一般稱為文獻探討。藉由網路檢索文獻資料，或從教科書或科學期刊的書面內容中（圖 6.8），粗略得到已知與欲研究問題的任何相關資訊，同時必需確認未進行之實驗，未有人作過相同或相似的研究。因為進行相同重覆的試驗，不僅是浪費時間與金錢，同時亦會犧牲許多無辜動物的寶貴生命。
2. 若決定需以動物作為試驗模式時，首先應預估及確認試驗過程中，可能需考慮使用的動物數目、種類、年齡、性別及品系等。
3. 對於實驗假設（hypothesis）須有清楚的假設基本問題所在，並可足以解釋欲研究問題的核心。
4. 實驗的操作必須是慎密的，且有一步步的試驗流程與記錄，並描述試驗收集數據及評估的方法，如組間之統計分析方法與判讀標準，一般以 p 值小於 0.05 作為具統計分析之顯著性差異。
5. 描述試驗操作過程中對人可能造成的副作用或潛在的危害，如使用放射線物質實驗須經行政院原子能委員會認可；毒性化學實驗須經行政院環境保護署認可。
6. 描述試驗標準操作方法（SOP），預估所有試驗所需經費，包括購買動物、動物飼養及管理，及動物照顧人員的薪資。

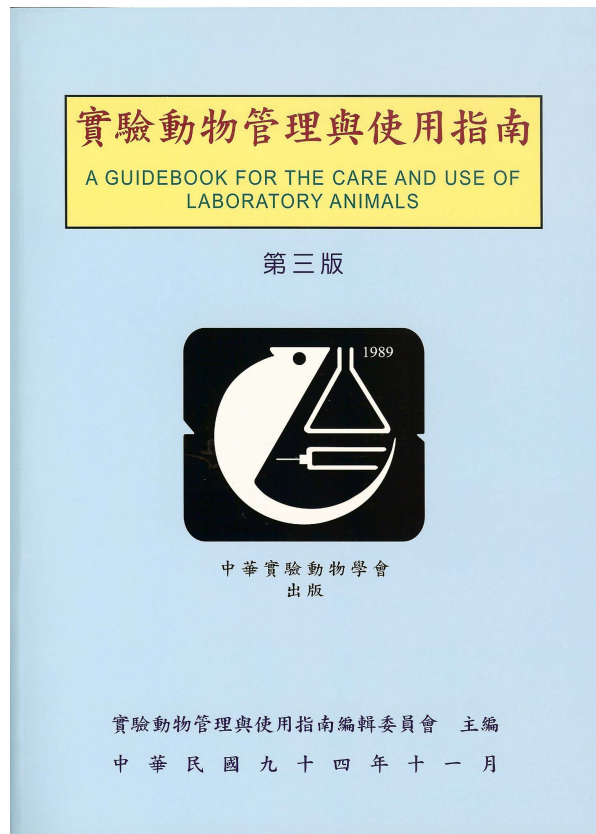


圖 6.8 實驗動物管理與使用指南

使用動物作為研究模式，實驗動物使用與操作均依據中華實驗動物學會及農委會出版之『實驗動物管理與使用指南』試驗規範進行，並需填寫『動物實驗申請表』。依農委會規定填寫動物實驗申請表，內容必需包括項目有：

1. 申請人：包括聯絡電話及 E-mail 通訊住址。
2. 單位名稱：申請人隸屬之單位。
3. 計畫/課程/試驗名稱：類別包括醫學研究類、藥物及疫苗類、健康食品類、農業研究類、教學訓練類、其他類別等。
4. 經費來源：由國科會、農委會或其他委託研究計畫等。
5. 執行期限：說明實驗所需期限為一年或連續性計畫
6. 負責進行動物實驗之相關人員資料：需說明參與人員之參與動物實驗年數、教育與訓練經歷。
7. 實驗所需之動物：包括動物種別、品系使用數量、動物來源動物飼養場所，保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。
8. 如飼養場所不是動物中心時，說明飼養場所之設備與飼養管理措施。若是託養於所屬。機構之外的場所，原則上須提供該場所經核准營業之證明文件。
9. 動物飼養：由動物中心專人負責、由實驗室人員負責或由託養場所負責。

10. 簡述本研究之目的與本實驗使用之動物其需求數量之必要性。
11. 說明實驗中所進行之動物實驗內容、方法、劑量與步驟（含動物保定、投藥、注射、麻醉、手術及術後照顧等），並簡述使動物痛苦降至最低的方法。
12. 說明實驗結束後動物之處置方式（含復原處置、安樂死及屍體處理方法）。
13. 有無進行危險性實驗，如生物危險（含感染性物質、致癌藥物）、放射線及化學危險（含毒物）實驗。如屬生物危險實驗，請陳述：（1）進行危險物品實驗施用之方法、途徑及場所。（2）針對實驗人員、實驗動物以及周邊人畜環境所採行之保護措施。（3）實驗廢棄物與屍體之處理方式。
14. 如屬放射線或毒性化學危險實驗，說明本案向主管機關之申請狀況。
15. 最後由申請人保證以上所填資料完全屬實。並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。由申請人簽名及單位主管簽名負責。

○○○○○○動物實驗管理小組審查同意書（範例）
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
○○○○○○○○○○○○○○（機構英文名）

計畫書編號(IACUC Protocol No) : _____
同意書編號(Approval No) : _____

計畫申請人：_____ 職 稱：_____
單 位：_____ 飼養及應用地點：_____/_____
計畫名稱：_____

本「動物實驗計畫書」業經動物實驗管理小組 實質形式審查通過。本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	飼養及應用期間
○○	○○隻	○年○月○日至○年○月○日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) .

Protocol Title : _____
Protocol No : _____
Period of Protocol : Valid From: _____ To: _____ (mm/dd/yyyy)
Principle Investigator (PI) : _____

動物實驗管理小組召集人：_____ 日期：_____

IACUC Chairman: _____ Date: _____

圖 6.9 動物試驗審查同意書

填寫『動物實驗申請表』並簽名完成後，逕向該機構之『動物實驗管理小組』提出研究計畫審核，經書面審核通過，且已核發審查同意書（圖 6.9），提撥研究經費後，即可開始進行研究計畫。

二、對照組、偽對照組與試驗組

一個試驗中需包括有一組或多組的對照組、偽處理組或溶劑對照組、與試驗組。對照組因未經試驗物質處理，可作為試驗組與陽性藥劑對照組之比較對照標準。偽處理組通常會以滅菌水或生理鹽水注射投予，可確認該注射方式對動物並不會引起不良反應（偽處理組，即相同注射處理方式，但不含試驗藥劑或物質），或可使用一組陽性藥劑對照組，加以印證實驗步驟之重覆性及正確性。

（一）、變異數

實驗過程中任何因子可改變或影響實驗結果，稱之為變異數。變異數諸如：特殊的操作技術、動物品系、年齡、性別及飼養環境等。實驗中應避免加入已知變異數，動物技術操作人員在未知變異數中，扮演相當重要的角色。因此，實驗中應加入動物飼養標準操作準則，以減少未知變異數對實驗的影響。

為減少未知變異數的影響，通常使用同源性高或相同的動物進行同一實驗，如使用小鼠，除非特別需要，應以小鼠作為未來實驗對象，以方便比較其結果之差異性。另外，動物繁殖過程、品系、性別、年齡及體重均需考慮。

環境的影響因子，如飼料、飼育盒、室內溫濕度及微生物感染存在與否，均需儘可能相同。可見任何未知因子均會影響實驗的結果。

（二）、非故意因子

實驗動物操作技術人員應儘量避免非故意因子發生，以免影響實驗中未知的變數。因操作技術的錯誤而影響實驗結果，常見如：

1. 改變動物的品系或混雜飼養：常見大鼠與小鼠混養一起，因大鼠與小鼠對病原之抵抗力不同，混養可能因帶病原，引起他種動物之感染。
2. 未注意到動物性別鑑定：常見雌雄鼠混養，母鼠生育造成生理之變化，影響試驗結果之一致性。
3. 稱重或藥劑處理錯誤：常見稱藥天平水平未調整及校正，影響稱藥之準確性。如藥劑經口服強迫餵食（gavage）方式，投予藥劑體積量為 10 ml/kg body weight，但常發現操作人員忽略試驗動物體重變化或個體體重不同，以所有處理組動物均餵食相同藥劑體積量，可能發生個體處理藥劑量不同，而影響同組間個體對試驗物質結果之表現。
4. 記錄不確實：試驗藥劑濃度配製換算失誤，或取藥及稱藥不確實，臨床觀察未有及時記錄，倘發現試驗結果與前次不符時，均可能因無記錄而無法追溯試驗過程是否有瑕疵。
5. 室內溫度及光照不穩定：一般大鼠或小鼠之環境溫度為 18-26°C，每日光照為 12 小時明暗週期，週期過長或過短，均可影響動物體內生理值之衡定。

6. 飼料、墊料或飼育盒不合適：諸如一般放置恆溫環境下之新鮮飼料需 2 天更換，以免因放置過久未更換，滋生黴菌或其他雜菌生長（圖 6.10），引起感染。同時墊料之使用亦視動物數不同，需經常更換，以降低尿液產生氨氣濃度。
7. 不當操作飼育盒或設備，增加過多的噪音：倘噪音超過 80 分貝，易影響試驗動物之正常生理狀態。
8. 任意改變飼料或標準配方：雖然目前並未知每種動物最合適之飼料組成配方，但可考慮使用老字號品牌，且有公開飼料組成配方之動物飼料，作為試驗之基礎飼料，可有效掌握試驗數據之判讀。
9. 對個別動物有偏愛之心：常因飼養人對個別動物之喜愛與特別照顧，常無意中增加個體對試驗物質之變異性。



圖 6.10 滋生黴菌的飼料

三、動物試驗模式

實驗動物與人具有許多相似之處，如狗、大鼠（圖 6.11）的肌肉生理學及生理活性與人非常相似。藉由實驗動物之研究結果，進而推估應用於人體，此類動物試驗均可稱之為動物模式。以動物模式作為研究，作為探討疾病與正常生理狀況，由這些研究所得相關資訊，有助益於動物及人。動物模式的要求必需是接近於人體狀況的研究，目前雖有約 30% 的人體試驗應用於生物醫學研究，但對於特殊試驗仍有其限制性。科學家們花很長的時間研發並建立動物模式，但選擇何種動物疾病模式作為研究，通常需考慮實際上的問題，如經費、動物的取得、飼養動物設施、技術操作人員及其他因素等。但最重要的，仍在於選擇一個最佳動物模式作為研究對象，以解決目前研究問題所在。

一般而言，效能及安全性評估之主要程序中，以動物實驗佔最重要位置。藥物或食品開發前，均需先進行動物實驗後，才可進行人體臨床試驗。目前國內頗具發展潛力生物科技產業之開發，如衛生署於 1999 年二月，針對健康食品之開發，制定「健康食品管理法」，此法可說對大部分機能性食品的開發與管理，奠定良好基礎。衛生署已公告部分健康食品在效能及安全性評估項目、準則及規範，並陸續研訂其他保健功效評估的項目。



圖 6.11 實驗動物鼠

(一)、自發性與誘發性動物模式

動物模式可分為先天性或誘發性模式。先天性動物模式 (natural models) 即指本身先天性或自發性疾病，如松鼠猴易患動脈硬化症 (atherosclerosis)，動脈硬化症為人類普遍發生疾病，因脂肪易堆積於動脈之血管內膜層，藉由研究松鼠猴之先天性動物疾病模式所得結果，同樣可推估於人體作用情形。其他動物疾病模式如，蒙古沙鼠易患癲癇症 (epilepsy) 及部份品系小鼠易罹患糖尿病 (diabetes)。

(二)、誘發性疾病動物模式

即以人為方式誘發疾病的產生，如腫瘤細胞可藉由注射方式接種到動物體內。已知化學物質可能誘發癌症發生，常見以香煙內特定未知成份經由吸入方式，作為誘發腫瘤發生作用之研究。列舉幾種動物模式包括介紹應用於藥物與保健植物糖尿病效能評估之 Black Kaliss (C57BL/KsJ) 小鼠，和以 streptozotcin (STZ) 與 nicotinamide 誘導之非胰島素依賴型(NIDDM)大鼠及以 STZ 誘導之胰島素依賴型 (IDDM) 錢鼠 (musk shrew mouse) 等三種糖尿病效能測試之動物模式。另以化學物致癌過程：誘發期 (initiation) 及促發期 (promotion) 二階段理論，經由部分切肝術 (partial hepatectomy) 建立中短期 (medium-term) 誘導肝癌之動物模式，利用動物模式提升醫學及生物科技之發展。

(三)、調節血糖效能之動物模式

目前糖尿病動物模式大致可分為：基因遺傳及以藥物或飲食誘發糖尿病等三大類 (Ito *et al.*, 2001; Takeshita *et al.*, 2001)，常作為藥用與保健植物之效能性評估，如冬蟲夏草發酵液等 (Lee and Park, 2000; Lo *et al.*, 2004)。

糖尿病動物模式：

1. 遺傳自發性血糖小鼠 Black Kaliss：

C57 BL/KsL 或稱為 C57 Kaliss 小鼠是由 Diabetes ($Lepr^{db}$) 及 Obse 肥胖小鼠 (Lep^{ob})，經由近親交配 (inbred) 繁殖而得。此種小鼠具有遺傳性自發性高血糖，其血糖濃度高 (280~350 mg/dl vs. 115 ± 5 mg/dl 對照組)，此型小鼠適於糖尿病第二型—非胰島素依賴型 (NIDDM) 實驗，但此種動物模式繁殖鼠隻後代，其帶遺傳自發高血糖鼠隻比例僅約 30% 左右 (Takeshita *et al.*, 2001)。

2. 化學物誘導糖尿病動物模式，此可分為兩種方式：

- (1) Streptozotocin (STZ) 為一種 glucosamine 衍生物，由 *Streptomyces acromogenes* 分離所得之毒素，具有破壞胰臟蘭氏小島 β -cell 作用，可作為誘發 IDDM 藥劑之一。衛生署公告健康食品調整血糖效能評估方法亦以 STZ 注射加上 nicotinamide 誘導方式，適合胰島素依賴型第一型糖尿病效能評估模式 (DOH, 1999; Masiello *et al.*, 1998)，所誘發出之動物呈現吃多、喝多、尿多及體重急劇下降等症狀 (圖 6.12)。
- (2) 另以 STZ 誘導錢鼠(musk shrew)之動物模式，以單一劑量 75 mg/kg BW 腹腔注射 (ip) 錢鼠，經 10 天後，可百分之百誘發高血糖雄鼠，於非空腹 (non fasted) 之血糖值濃度 ≥ 300 mg/dl 及降低濃度胰島素 (0.25 ng/ml，較對照組少 30%)。該動物模式是由 Ohno 等人 (1998) 提出，此動物模式之優點為，此動物保留靈長類演化過程之特性，因此其特性與人類之差距較小，且誘發方式簡單，誘發率在雄性動物可高達 100%。此動物模式有助於 IDDM 及他其類型糖尿病之研究。



圖 6.12 STZ 誘導高血糖鼠

(四)、延緩老化之效能評估動物模式

目前衛生署已公告之保健功效項目中，延緩老化的保健效能的項目亦列名其中。一般認為國內保健食品工業具發展潛力之項目中，延緩老化是其中相當重要項目。雖然目前已建立許多老化基因小鼠模式，但 Takeda 等人 (1991) 所發展之老化促進小鼠 (senescence-accelerated mouse, SAM) 具有早期老化特徵，如脫毛、脊椎彎曲等，可作為延緩老化效能之動物評估模式。類澱粉蛋白 (β -amyloid) 沉積腦部被認為是引起 Alzheimer's disease 之主要原因 (Farra *et al.*, 2003)，SAMP8 小鼠被認為是最佳動物模式之一 (Morley *et al.*, 2004)，亦可表現在 SAM 小鼠腦部區，同時在 SAM 系列之小鼠中以 SAMP8 最具特色，其具嚴重的腦幹海綿體退化和海馬區含 PGS (PAS- positive granular structure)，其中最重要的老化指標即為腦幹海綿體退化 (spongiform degeneration)，在其出生 5-8 個月 SAMP8 小鼠，其海綿狀病變大小及數目均達到最高峰，而在 11 個月齡時，此時海綿空泡數目不但增加，且可擴充至腦部其他區域。因此對延緩老化有效之藥用與保健植物，可依其海綿狀空泡數目及類澱粉沉積 (β -amyloid) (圖 6.13) 多寡，作為效能評估之指標 (Ichiro *et al.*, 1994; Takeda and Hosokawa, 1991)。

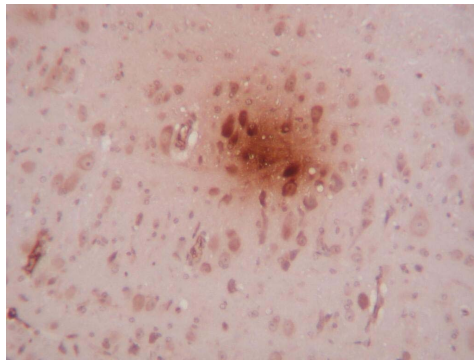


圖 6.13 類澱粉沉積斑 (β -amyloid plaque)

(五)、短期致癌性動物模式

利用動物之組織、器官及癌細胞株對致癌性之探討，由於細胞株與活體間之關連性，仍有爭議，其結果較難與動物研究結果取得良好相關性，因此動物實驗結果仍不可或缺。傳統測試藥物誘發癌症與否之動物實驗，需花費長達二年時間，費時且費力，因此，對藥用與保健植物之開發造成極大之障礙。發展抑制腫瘤及致癌性動物模式研究，可進一步補足此一缺點，無論在效能及安全評估上均相當重要。Ito 等人(1986)發展快速誘導致肝癌法 (medium-term bioassay for hepatocarcinogenesis)，可加速腫瘤細胞之生長，縮短癌細胞之形成時間 (Hadjiolov *et al.*, 1995)。依此模式利用肝部份切除術 (partial hepatectomy) 及投與致癌物 2-acetylaminofluorene (2-AAF) 可在短期內 (8-12 週) 快速誘導大鼠產生不同程度之肝腫瘤形成 (圖 6.14) (Liao, *et al.*, 1991, 1993)。結果發現經肝部份切除術之動物，其麩氨酸氨基轉氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、麩氨酸丙酸轉氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 及 γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) 在初期均顯著增加，第 10 及 12 週後並產生明顯小結節 (nodule) 及肝腫瘤 (hepatoma)，顯示此致癌動物模式誘導之成功性。由於本實驗動物模式，經生理性及化學性處理後所誘發大鼠肝腫病變之機率為 100%，是十分良好之動物模式。過程中除生理性處理外，其餘試驗動物生理均與自然狀態下相似，具良好之免疫系統，此也與人類正常狀況相似。因此，此模式進行藥用與保健植物之抑癌效能及安全評估，具相當實用價值。

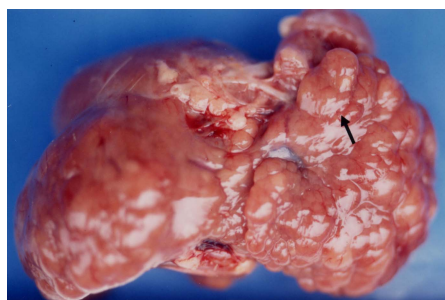


圖 6.14 大鼠致肝癌之肝腫瘤形成

四、研究方法

(一)、飲食研究

研究飲食之研究主要作為解答人與動物之許多問題，如：什麼食物或飲食對人最好；又何種飼料配方最適合實驗動物？利用動物模式進行飲食研究時，很重要且需注意的是，食物之營養份與消化液於生物體內會進行複雜交互作用，如攝入某些食物雖會增加特定營養物，但相對的亦會降低其他營養物的吸收，如汞中毒會降低食物中營養物-硒-的吸收。

(二)、生物檢定法

在化學分析方法未建立前，生物檢定法亦可得到相同結果。直接以生物體作為實驗對象的方法，稱之生物檢定法 (bioassays)。新藥劑的開發前，須以實驗動物進行其活體試驗。除了已知物質外，其他物質均需以二種以上實驗動物進行測試，以得知該成份物質在不同動物間可能表現出不同的反應。如人工合成的賀爾蒙可與天然荷爾蒙互相比較是否能對實驗動物均有相同作用。因此，在未有活體外試驗 (*in vitro*) 資料前，可使用生物檢定法進行測試。

(三)、埋植法之應用研究

將植入物 (device) 直接放入生物體內，稱之埋植 (implants)。有許多不同形式的埋植於人體及動物體內，部份埋植體為暫時性，部份則為永久性，如水晶體雖可隨時取出，但仍被認為是一種埋植體。許多埋植體為永久性，如心臟調節器、人工心瓣膜，骨釘、骨板及人工關節等均是。以上埋植體需先以實驗動物進行測試，現在已廣泛用於人體及寵物身上之埋植體。目前埋植體的需求量大且相當重要，但仍需不斷藉由動物試驗進行研究及改善。許多不同材質被製成不同型式埋植體植入動物體內，如電極器植入腦、心臟或其他組織，以監測體內電流量之用。許多不同型式的導管、開窗及打洞方式，均可方便作為連續取樣或注入試驗物質。小如膠囊的滲透壓幫浦亦可植入皮膚下，以調控藥劑或試驗物質的流量。這些埋植體均可提供研究者，持續不斷反覆的取樣或處理，可免除侵入性測試方式 (如：手術)。

(四)、插管與導管

插管為常用的埋植方法之一，該方法是以小管子直接插入體腔、膽管或血管內，如皮下留置針亦適用於靜脈插管。皮下留置針插管可外接體液進行持續治療或採血。具可伸縮的橡皮或塑膠管，稱之為導管，可直接用於插入體腔、膽管或血管內。導管可直接從身體外孔插入，如導尿管，能與體內膀胱連接，而靜脈插管則需以人為方式穿破血管插入靜脈，如靜脈留置針首先被使用，並依導管設計不同，可暫放於血管內或取出。如現在有許多不同商品化的血管導管產品，應用於實驗動物，小如小鼠用導管，大如馬用導管等。

(五)、危險性

不過埋植體或插管的使用，仍有許多潛在的遺傳性危險因子，如靜脈留置針因直接插入血液循環內，均可能帶入異物或未預期的細菌進入體內，進而威脅動物的生命。為避免感染，所有插入體內的埋植體均需經由滅菌過程保存，以維護動物健康。最理想情況下是埋植體均可被動物皮膚所包覆，突出體外的電極器或導管均會影響傷口的癒合。然而，埋植體緊貼皮膚是可預期最佳的狀態。技術操作人員必需向負責之實驗主持人報告此一困難度。最常見的危險指標是埋植體或植入區周圍出現過多滲出液、導管打結及動物企圖鬆開埋植體。在沒有特殊器材設備時，技術操作人員可不必企圖作進一步治療，僅需向他或她的實驗主持人報告發生情況。

(六)、行為動機研究

行為可反應出個體、群體或品種間對當時情境的反應，因此生物體對外來刺激的反應，稱之為行為。行為學科學家從事研究人與動物的行為時，擬尋找出其共通性及描述性，以作為詮釋及解說行為動機。心理學是心理情緒及行為表現，為人類所特有的。動物行為學(ethology)則是研究動物行為的一門科學。

(七)、心理學研究

心理學是一門非常廣泛性的研究科學。生理心理學著重在身體結構與行為上的反應功能，如神經組織。其他如：研究感覺功能、理解力及學習能力。人與動物的學習發展，亦為重要研究領域之一，經常以人與動物作為研究對象。

(八)、行為學研究

研究動物之行為學有助於解決人類之行為問題，正常與異常行為之作用，常出現在人與動物身上。因此可以動物作為探討心因性緊迫與感染後免疫學變化之研究對象。雖然在人有志願者可作為研究對象，但仍不易受控制。緊迫可降低許多種動物免疫上的反應，包括猴子。值得注意的是，一般均相信此種反應亦會發生在人身上。但若一般的飼養管理或操作不當下所發生緊迫，則不能當作是一種因子。然而在動物行為學之探討領域，至今仍缺乏顯著突出的研究。

(九)、動物行為研究

行為學研究者一般常以動物作為研究自然行為現象調查，電視媒體上特別節目中，常播出有關野生動物之自然行為調查。藉由實驗動物試驗可提供田野調查的資訊，在動物行為學研究領域相當重要。因可減少動物之使用，以釐清動物保護團體認為一般動物試驗，需使用大量動物或不當使用動物之疑慮。

五、安全性評估

多年來，實驗動物經常作為目前已上市之產品安全性評估，數千種的新藥、食品添加物、農藥、工業用化學物及其他產品。新藥產品對人體安全性評估是非常重要的，必需鑑定該產品對使用者、環境、下一代、植物及人體之影響。因而，新產品常使用實驗動物進行許多不同測試，以作為產品對生物體作用之評估。其中某些試驗是不具侵犯性傷害，但大部份測試則會造成動物疼痛，甚至死亡。安全性評估的目的 (Purpose of safety evaluations) 為如何使用少量的實驗動物測試即可得到許多產品有關的安全性，但重要的是，這些數據可提供作為中毒防治中心、生理學、生態學及其他科學家的資訊。新物質一般測試會以不同暴露方式至動物體，進而得知這些新物質是否具有毒性，毒性如何，以提供給使用者適當的警告標識、用途及運輸的標準操作，同時視其試驗材質、如何與人體、動物或環境接觸等情形，而有不同安全性評估。

(一)、活體外試驗模式

活體外試驗常自麻醉動物身上採取正常組織，或細胞株，如人類神經細胞株 (human neuroblastoma, SH-SY5Y cell line, ATCC No. CRL-2266) 及為人類之肝腫瘤細胞 (Hep G2 cell, ATCC HB-5065) (圖 6.15) 作為研究對象。某些特殊的化學物質對生物學上不同形式的細胞或器官，作用結果均可能不同。如可經由不同的記錄數據進行判讀，或取血清、細胞、組織或以同位素標定物質，進行持續且長時間觀察其作用之研究。執行的研究複雜性高，單靠一個人並無法完全瞭解試驗中所有測試項目，如當進行新的研究或不熟悉的動物模式時，則需依賴較熟悉動物操作的技術人員協助。

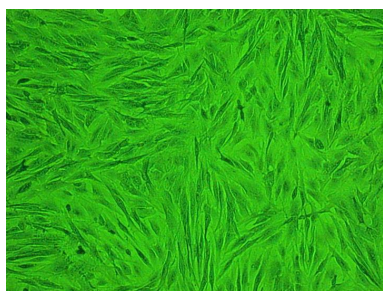


圖 6.15 A 人類神經細胞株 (human neuroblastoma, SH-SY5Y cell line)

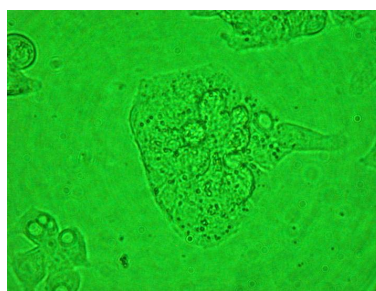


圖 6.15 B 人類之肝腫瘤細胞 (Hep G2 cell)

(二)、動物毒理安全性評估

為了評估新產品的安全性，實驗動物經常例行性作為安全性評估對象，如每批生產的疫苗或新藥物，均需測試其產品安全性及效用。毒理試驗參考規範包括衛生署健康食品安全性評估方法 (1998)、衛生署藥品非臨床試驗安全規範 (2000)、美國環保署 Harmonized Test Guidelines, USEPA, 1998) 及經濟合作暨開發組織 (Guideline for the Testing of Chemicals, OECD, 2001) 及 Internal Standard ISO 10993 (1993) 等國際試驗規範。動物毒理安全性測試規範及風險性評估，可提供毒性傷害之重要依據，為研究動

物毒理學之重要課題。一般而言，病理學主要評估生物體受到外來病原侵入、腫瘤、免疫及毒物傷害時，體內細胞、組織或器官所發生之各種反應及形態學變化，這些異常或疾病均會在細胞或組織內留下「足跡」。藉由病理學觀察藥物對體內組織細胞之影響，為一診斷疾病的科學，亦可作為治療疾病及發展新藥之重要參考指標。病理學同時可應用作為毒藥物是否引起動物體傷害之診斷技術基礎，而此一技術之開發與研究，不僅支援各種動物毒性測試結果之探討，更可藉由大體解剖及病理技術，快速且正確的評估毒藥物對動物造成傷害之程度，推估急毒性測試對實驗動物所產生組織器官之急性傷害劑量，如口服、皮膚及呼吸急毒性、眼及皮膚刺激性、皮膚過敏性及遲發性神經毒性，慢性試驗產生之組織器官慢性病變、腫瘤之病理鑑定；及其他慢毒性研究，如致畸胎性、致生殖毒性之病理變化等。

一般認為，食品遠比毒藥物之安全性為高，衛生署對健康食品所規範之功效評估試驗期，其安全性評估時間亦均較毒藥物之慢性試驗期短。綜觀目前通過健康食品認證之安全性評估，大部份均屬第一類產品，可免提毒性測試資料，產品之原料為一傳統食用且以通常加工食品形式供食，或產品具有完整之毒理學安全性學術文獻報告及曾供食用之記錄。僅少數為第二類產品之原料為傳統食用而非以通常加工食品形式供食者，需經基因毒性及 28 天餵食毒性等毒理試驗證實其食用安全性無虞（吳，2002；盧，1999）。第三類產品之原料非屬傳統食用者，需具備基因毒性、90 天餵食毒性及致畸胎性試驗。第四類產品更需具備與新藥之臨床前試驗相同等級之完整動物毒理試驗，其中包括慢性毒性及致腫瘤性試驗，所耗費人力與經費均相當龐大，目前未有第三類或第四類產品通過評估。

（三）、評估項目

動物毒理試驗中，透過臨床觀察試驗物質對動物之臨床症狀、飲食消耗量、行為改變及死亡（LD₅₀）等急性及慢性中毒出現之特異性症狀，可作為臨床中毒醫療之診察及評估重要依據。試驗物質短期或長期重覆暴露，經由體內代謝後可能代謝成無毒，或轉化具毒性之代謝產物對器官具有特殊毒害作用。動物毒理試驗藉由各種臨床病理學檢查，如血液學之白血球數（white blood cell count, WBC count）、紅血球數（red blood cell count, RBC count）、血球容積比（hematocrit, Hct）、平均紅血球體積（mean corpuscular volume, MCV）、平均血紅素（mean corpuscular hemoglobin, MCH）、平均血紅素濃度（mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC）、血紅素（hemoglobin, Hb）及血小板（platelet）等項目。白血球分類（differential leukocyte count）以血液抹片，經 Weigert's Iron Hematoxylin Stain Kit 染色後，於光學顯微鏡下，計算白血球之淋巴球（lymphocyte）、嗜中性球（neutrophil）、單核球（monocyte）、嗜酸性球（eosinophil）及嗜鹼性球（basophil）等各佔百分率（%）等對血液之作用。加上檢驗凝血功能是否正常，包括纖維蛋白原（Fibrinogen, Fbg）時間（s）及含量（mg/dl）、前凝血酵素時間（prothrombin time, PT）及活化部份前凝血酵素原時間（activated partial thromboplastin time, APTT）等干擾血液凝固因子。另外，血液生化值亦為安全性判讀之指標，如具肝毒性者，對肝臟及其他細胞功能受損程度，可藉由血清離子及指標酵素變化，如麩氨酸

氨基轉氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、麩氨酸丙酸轉氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、總膽紅素 (total bilirubin)、膽固醇 (cholesterol)、三酸甘油酯 (triglyceride)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌氨酸 (creatinine)、肌酸激酶 (creatine kinase)、乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、總蛋白 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、麩氨基轉氨酶 (γ -glutamyltranspeptidase, GGT)、葡萄糖 (glucose)、澱粉酶 (amylase) 及磷 (inorganic phosphorus)、鉀 (potassium)、氯 (chloride)、鈣 (calcium) 及鎂 (magnesium) 等離子濃度。尿液學檢查，包括尿液比重 (specific gravity)、膽紅素 (bilirubin)、尿膽紅素原 (urobilinogen)、酸鹼值 (pH)、蛋白質 (protein)、葡萄糖 (glucose)、酮體 (ketones)、硝基鹽 (nitrite)、潛血反應 (occult blood)；另尿液檢查則以 775 xg 離心 15 分鐘，取沉渣滴入血球計數盤於光學顯微鏡 400 倍下，計數尿中白血球 (leukocyte)、紅血球 (red blood cell)、上皮細胞 (epithelial cell)、圓柱體 (cast)、結晶體 (crystal) 及寄生蟲 (parasite) 等。對重要臟器重量比率 (%)，如腦、胸腺、心、肝、腎、脾、睪丸或卵巢等重量 (g) 及重量比率 (%) 之基準，較為客觀 (吳，2002；盧，2000)。值得注意的是，臨床血液生化值則視不同動物品系、年齡或性別，均有其不同之正常生理值範圍，此範圍高低差異，可能達到統計學上顯著性差異 ($p < 0.05$)，但實質上卻是正常且無毒害。因此，現今試驗物質之劑量安全閾值，改採用「無毒害作用劑量值 (no observed adverse effect level, NOAEL)」，取代以往之「無作用劑量值 (no observed effect level, NOEL)」 (Kroes and Koziarowski, 2002)，較符合動物正常生理範圍。

(四)、動物毒物病理檢測常見之人為操作錯誤

毒性病理的研判雖是一種比較常態的工作，但也是一種醫學藝術 (medical arts)。凡是藥廠或是化工廠在製造化合物式開發新藥時，都必須以數據結果定訂或找出製造過程中及新產品必須的安全評估 (safety assessment)。這些藥物或化合物的安全評估大部分是使用實驗動物做為測試目標，而依實驗動物經過試驗後的反應，建立人類於相同情況下可能的反應模式 (陳，1998)。

病理診斷技術依觀察細胞大小及變化程度，可分為肉眼病變檢查、光學顯微鏡檢查及電子顯微鏡檢查三部分。肉眼及組織病理變化之觀察與記錄，為動物毒性試驗最後判讀階段。各種動物試驗中，結果的判定正確與否，將影響產品使用時，重要的風險性評估數據，因此更顯重要。肉眼病變檢查及一般光學顯微鏡檢查法為病理診斷技術之基礎，肉眼病變檢查法即以肉眼判定組織器官病理變化；光學顯微鏡檢查法則進一步將器官製成組織切片，置於光學顯微鏡下將細胞放大 40~1000 倍，更清楚觀察細胞大分子之變化，同時配合使用不同染色劑如蘇木紫 (haematoxylin) 及伊紅 (eosin) 進行染色觀察。蘇木紫可染出細胞核及核仁等鹼性物質使呈藍色，伊紅則對酸性物質具親合性，可將細胞內蛋白質染成紅色或粉紅色，利用此二種染劑，可區分出細胞結構、形態、大小及組織排列，此即為最常使用之 H&E 染色法。電子顯微鏡可協助細胞之光學顯微辨識，

進一步將細胞放大 1,000~600,000 倍，可更清楚觀察細胞內各種微小胞器之細微變化（廖，1996）。

解剖者常因對實驗動物之解剖方式或臟器固定不當，引起「人為操作錯誤（artifact errors）」及死後變化（postmortem changes），將嚴重影響結果判讀偏差，不可忽視。常見之人為操作錯誤，如：組織不當過度的操作（excessive tissue manipulation）、不當的潤濕（improper moistening）及不當的固定液（poor fixation）（Feldman and Seely, 1988）。有經驗的病理學家可看出在不當解剖時所產生「人為操作錯誤」發生之時間，但仍有一些「人為操作錯誤」所造成之細胞變化與毒物引起之病變間無法區別，容易產生混淆。可惜的是，大部份解剖者並無法看到解剖時所造成「人為操作錯誤」之最終檢查結果，因而無法得知其所犯錯誤為何，並及時進行修正。另外，不當組織之選取操作亦為常見之「人為操作錯誤」，如以有齒鑷子擠壓、撕裂或刺穿臟器，將導致正常組織形態學之變形或遭破壞。正確方式應於解剖時提取臟器之結締組織部位，或以無齒平鑷取出臟器為佳。另常見解剖者因對實驗動物體內臟器正常之形狀、位置、色澤、硬度或大小（圖 6.16）缺乏正確認知，因而無法取得真正病變區以進行組織病理學檢查；或因無法正確辨識正常區與病變區，樣品取樣過小，無法真正代表毒藥物對整體器官之病理變化，甚而因此忽略對器官毒性之觀察，造成重大判讀結果錯誤。



圖 6.16 大鼠體內臟器（由左至右，脾、腎及心臟）

當動物死亡時，常因細胞自體溶解（autolysis）或自體消化（self-digestion）的結果，造成死後變化。究其原因主要因有細胞本身之酵素，或由體內正常菌叢發酵之結果，破壞正常細胞之結構（Feldman and Seely, 1988）。死後變化時，可見血紅素自破裂的紅血球跑出血球外，血紅素消失及細胞自體溶解現象，或肌纖維橫紋消失，均為細胞死後變化之現象。試驗期間發現有動物死亡時，若未能馬上解剖，應先放入冷藏，可延緩死後變化之速度。但切不可將檢體放至冷凍，以免發生細胞內冰晶產生，導致嚴重影響組織病理之判讀。不同器官發生死後變化時間亦有差異，如肝、腎、胰臟、眼睛及腸道發生死後變化之時間較快。一般而言，動物於犧牲後，應儘速將臟器浸泡固定液中，且愈快放入固定液之細胞形態學表現愈佳。雖然石蠟組織切片方式於一般光學顯微鏡下，不能明顯觀察出細胞早期或輕微之死後變化，但若以穿透式電子顯微觀察，則可清楚辨出細胞內胞器顯微結構之改變。亦或可進行臟器之固定液灌流（perfusion），可降低死後

變化時細胞內顯微結構改變。然而固定液灌流充足與否，將會影響組織之形態學染色。例如，正常肺臟內肺泡充滿氣體時，肺泡壁為一單層細胞形態。倘若因固定液灌流不足，將會使得肺泡壁塌陷而出現增厚現象，容易被誤認為間質性肺炎引起肺泡壁細胞增生病變。一般建議成年齧齒類動物肺臟固定液灌流容量，小鼠為 2 ml，大鼠為 4ml (Robens et al., 1994)。為減少肺臟死後變化的方式，亦可將氣管綁緊，防止肺泡內空氣及固定液跑出，以致固定不佳，再以 26G 注射針筒自氣管內緩緩注入固定液直接固定肺細胞，注入固定液量，小鼠為 0.1 ml，大鼠則為 0.8-1 ml。但需注意不可注入過量，以免造成肺泡破裂，形成人為之氣腫病變 (emphysema) (Feldman and Seely, 1988) 或肺臟血管週邊腫脹現象 (Mann et al., 2002)。然而，使用心臟穿刺採血，除容易造成心肌出血，亦會不慎穿刺肺臟，造成肺臟出血，或心臟穿刺採血動物死亡，以致放血不完全，均會影響病變判讀。

常用固定液為 10% 中性福馬林溶液，具有良好組織穿透能力，每小時約 1 mm，其與臟器體積比例應為 1:9，倘濃度過低或藥效過期，容易產生固定不完全現象。固定液浸泡 24-48 小時後，應更換新鮮福馬林溶液，以免殘留血液污染而降低固定液之效能，並於 7 天內完成組織粗修及石臘包埋為佳。常用例行性之細胞染色法為，蘇木紫及伊紅 (H&E) 染色，若需進行免疫組織化學染色，如細胞核增殖抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 或細胞凋亡 (apoptosis) 等，因考慮其抗原之再現性 (retrieval)，建議臟器於福馬林溶液固定 48 小時後，更換為 70% 酒精固定液，並應儘速完成粗修及石臘包埋，以免抗原性喪失 (Mann et al., 2002)。福馬林溶液亦非完美之固定液，浸泡過久，已知會造成腦白質部神經軸絲產生脫髓鞘及空泡化，易誤認為試驗物質引起腦之海棉樣變性 (spongiosis)；為避免福馬林溶液對大鼠眼球視網膜造成人為剝離，可選用 Zenkers 等其他固定液來取代。福馬林溶液之原液濃度為 37-40%，福馬林溶液為毒性強、具眼刺激性、過敏性、致變異性、吸入過多形成鼻腔上皮細胞腫瘤，為環保署列管之毒性化學物質，使用時需在通風及抽氣櫃內進行，並注意人員使用之安全 (Feldman and Seely, 1988)。

六、參考文獻

1. 吳家駒。2002。保健食品之安性評估。食品工業月刊。(35)：32-39。
2. 徐興鎔。2005。毒物病理學與病理師在新藥臨床前安全性試驗所扮演之角色。中華民國獸醫病理研討會。台北淡水。
3. 陳怡宏。2004。「世界保健食品會議」紀實。食品工業發展研究所專題報導。pp. 7。
4. 陳憲全。1998。美國與日本兩國的毒性病理學會簡介。中華民國實驗動物學會第十期會訊。中華民國實驗動物學會出版。pp. 5。
5. 衛生署。1999。28 天餵食毒性試驗。In：「健康食品安全及功效評估方法」。衛署食字第 8803780 號。台北。

6. 盧珍奴。1999。健康食品安全性評估-28 天餵食試驗之內容與意義。食品工業月刊專題報導。pp. 26-31。
7. 廖俊旺、蔡三福、王順成。1996。毒藥物對實驗動物之病理診斷技術探討。藥試所專題報導。(40) : 3-12。
8. 廖俊旺、蔡淑珍、王順成。2003。薑黃對大鼠 28 天餵飼之安全性。植物保護學會會刊。(45) : 237-255。
9. Aexpander Essers, A. A. J., Alink, G. M., Speijers, G. J. A. , Aexpander, J., Bouwmeister, P. J., Brandt, P. A. V. D., Ciere, S., Gry, J., Herrman, J., Kuiper, H. A., Mortby, E., Renwick, A. G., Shrimpton, D. H., Vainio, H., Vittozzi, L., and Koeman, J. H. 1998. Assessment: Food plant toxicants and safety. Risk assessment and regulation of inherent toxicants in plant foods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5: 155-172.
10. Chemoprevention Branch and Agent Development Committee (CBADC). 1996. Clinical development plan: Curcumin. *J. Cell. Biochem.* 265: 72-85.
11. Farra, S. A., W. A. Banksa, K. Uezua, A. Sanoc, F. S. Gaskina, and J. E. Morley. 2003. Antibody to β -amyloid protein increases acetylcholine in the hippocampus of 12 month SAMP8 male mice. *Life Sci.* 73: 555-562.
12. Feldman, D. E., and Seely, J. C. 1988. Chapter 1: The necropsy in general. In: *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. CRC Press, Inc., Florida, USA. pp. 1-20.
13. Hadjiolov, N. H., A. Bitsch, and H. G. Neumann. 1995. Early initiating and promoting effects in 2-AAF-induced rat liver carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Cancer Lett.* 98: 99-46.
14. Ichiro, A., M., Hideo, M. Veno, T. Talemura, N. Kitabayash, N. Seriu, T. Kawamata, S. Niagara, A. Shimed, and T. Takeda. 1994. Age related morphological changes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAMP8). *The SAM Model of Senescence*. pp. 67-72. Elsevier Science B.V.
15. Ishibashi, N., and Yamazaki, S. 2001. Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:465S-470S.
16. Ito, M., Y. Kondo, A. Nakatani, K. Hayashi, and A. Naruse. 2001. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9: 71-78
17. Ito, N., T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, and M. Kagawa. 1986. Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long-term carcinogenicity test. *Carcinogenesis.* 90: 601-61.
18. Kroes, R., and Kozianowski, G. 2002. Review article: Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment. *Toxicol. Lett.* 127: 43-46.

19. Lamartiniere, C. A., Zhang, J. X., and Cotroneo, M. S. 1998. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1400S-5S.
20. Lee, S. L., and I. S. Park. 2000. Effects of soybean die on the β cells in the streptozotocin treated rats for induction of diabetes. *Diabetes Res. Clin. Practice.* 47: 1-13.
21. Liao, J. W., and S. C. Wang. 1991. The rapid bioassay method for hepatocarcinogenesis on rat. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 17: 133-140.
22. Liao, J. W., S. C. Wang, and C. I. Liu. 1993. Effect of concentration on response in rapid bioassay for hepatocarcinogenesis in rat. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 19: 259-267.
23. Lo, H. C., S. T. Tu, K. C. Lin, and S. C. Lin. 2004. The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. *Life Sci.* 74: 2897-2908.
24. Mann, P. C., Hardisty, J. F., and Parker, M. D. 2002. Managing Pitfalls in Toxicologic Pathology. In: *Handbook of Toxicologic Pathology, Volume I, Part B: The Practice of Toxicologic Pathology, Basic Techniques.* Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., and Wallig, M.A. Ed, 2nd Edition, Elsevier Science & Technology Books. pp. 187-206.
25. Masiello, P., C. Broca, R. Gross, M. Roye, M. Manteghett, P. Hillaire-Bys, M. Novella, and G. Ribes. 1998. Experimental NIDDM. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes.* 47: 224-229.
26. Morley, J. E., W.A. Banks, V.B. Kumar, and S.A. Farr. 2004. The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *International Congress Series* 1260: 23-28.
27. National Toxicology Program. 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of turmeric oleoresin (CAS No. 8024-37-1) major component 79-85% curcumin, CAS No. 458-37-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies) . NTP Technical Report Series, No. 427.
28. Ohno T., J. Kitoh, K. Yamashita, Y. Ichikawa, F. Horio, M. Terada, A. S. Tanaka, and T. Namikawa. 1998. Toxin-induced IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) in the musk shrew. *Life Sci.* 63: 455-462.
29. Robens, J. F., Calabreses, E. J., and Piegorsch, W. W. 1994. Principles of testing for carcinogenicity, In: *Principles and Methods of Toxicology,* A. Wallace Hayes Ed., 3rd Edition, pp. 697-728. Raven Press, New York.
30. Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a

- risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.* 92: 111-119.
31. Sabater-Vilar, M., Maas, R. F., and Fink-Gremmels, J. 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutat. Res.* 444: 7-16.
 32. Takeda, T., and M. Hosokawa. 1991. Senescence-accelerated mouse (SAM) : a novel murine model of accelerated senescence. *JAGS.* 39: 911-919.
 33. Takeshita, S., I. Kawamura, T. Yasuno, C. Kimura, T. Yamamoto, J. Seki, A. Tamura, H. Sakurai, and T. Goto. 2001. Amelioration of insulin resistance in diabetic ob/ob mice by a new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: Bis (1-oxy-2- pyridinethiolato) oxovanadium (IV) with VO(S O)₂ 2 2 coordination mode. *Inorg Biochem.* 85: 179-186.