

黃麴毒素—B₁ 與A種肝病毒

對猴子肝細胞的長期效應

—我的肝癌研究—

醫科第四屆 林吉雄

本社 張傳添 譯

黃麴毒素 B₁ (Aflatoxin-B₁) 係 *Aspergillus flavus* 菌種當中某些菌株 (strains) 所產生的代謝物。因為在螢光下呈藍色，所以將第一個分析化合物稱為 Aflatoxin-B₁ ；如果在螢光下呈綠色則稱之為 Aflatoxin-G₁ , G₂ ；如由牛乳中分離出者，則稱之 Aflatoxin-M₁ , M₂ 。 *Aspergillus flavus* 是一種相當普遍的黴菌，經常可由花生米、麥、米、豆、麵包、牛奶、乳酪等食物中分離出。尤其是當食物儲藏於溫濕倉庫時，此菌甚易滋長。Aflatoxin-B₁ 是近年來世界各國癌研究機構的研究對象，其原因要追溯到一九六〇年代，英國農場發生雞瘟，成千的火雞在數天內死亡，病理研剖的結果顯示肝細胞壞死。因此，病理家推測這 Turkey-X 病 (病因未明之前的命名) 可能與食物有關。經過一番調查與化驗，發現由巴西進口的食物中某一部分含有菌毒 (toxin) ，後來證明這些 toxin 係 *Aspergillus flavus* 中某些 strains 的代謝物，由於其化學結構已經知道，目前已可由人工合成，供醫學研究之用。到目前為止 Aflatoxin 已被證明為鳥類、魚類的導癌物質，然對靈長類如人類、猴等的

長期效應並未被充分證明。

肝炎 (Hepatitis) 的病因早已被推測為病毒 (Virus)，臨床上可分 Infectious hepatitis 與 Serum hepatitis，不過現在 WHO 的命名法為 hepatitis A 與 hepatitis B，雖然有了名，這些 Virus 至今並未被分離出來。Hepatitis B 的研究如火如荼，由 Australia antigen 的發現到 Dane's particle 的觀察，至今泰半的人已經相信 Dane's particle 即是 Hepatitis B Virus 的本身。台灣到加拿大的黃醫師在肝病患者的肝細胞 cytoplasm 中也發現較小的 "Virus-like" particles，世人稱之「Huang's particle」，可能是 Hepatitis B Virus 之 coat (Dane's particle 在 nucleus 中)，Dane 和 Huang 兩位醫師也從此在醫學史上留芳千古。Hepatitis A 的研究比 Hepatitis B 步伐慢得多，可能是 Virus particle 比較小，數月前美國 NIH 一個 group 發表稱他們已由 Infectious hepatitis 的病人大便中的分離物看到 Virus particle，在電子顯微鏡下有很多結構很像 Virus，這個發現有待他人證實。筆者花了不少時日在 EM 下找 Hepatitis A 的 particle，如世界其他研究者，在肝細胞內始終找不到。有一次找到一些 particles，將 EM 的圖片送給 Dr. Svoboda 看，他說這些 particles 不是 Virus，他們已有了名目——"coated vesicles" 也。雖說 Hepatitis A particles 沒在 liver 找到，芝加哥大學的外科醫生 Dr. Barker 的血清仍舊能使猴子發生肝炎 (Dr. Barker 在一九六七年得 Infectious hepatitis，其 acute serum 被儲存供醫學研究，已在猴子的血液中滋長，並 pass 數代矣！)。

肝癌的研究為什麼扯上了 hepatitis virus 呢？因為有人指出，肝細胞損傷可能與肝癌有關，這便是有名的 "Two Stage Theory"，早期肝損傷的人在後期如接觸導癌物質很容易發生肝癌。台灣的肝炎很多，hepatoma 亦多並不無符合上述假說的說法。靈長類的肝癌研究在文獻上甚少，因此才有下述一聯串的研究。

已有一些文獻報告，提到關於「黃麴毒素」對非人類靈長動物肝之影響，然大多偏於急性與亞急性效果之研究，而此一毒素對肝機能與形態學上長時期慢性作用的研究報告，仍嫌不足。目前已發現在人類的食品中，有數量頗多的「黃麴毒素」之污染，而且也有詳盡而充分的證據，證實此類毒素與病毒性肝炎均對人類的肝硬化與肝癌發生，有著十分密切的關係。本研究乃為了明瞭「黃麴毒素 B₁」與肝硬化之病理發生所扮演的角色而設計。

材料與方法

本實驗—共動用了小猴 (Saguinus oedipomidas) 三十六隻，其重量從三七〇至四三〇 gm，雌雄俱有，分

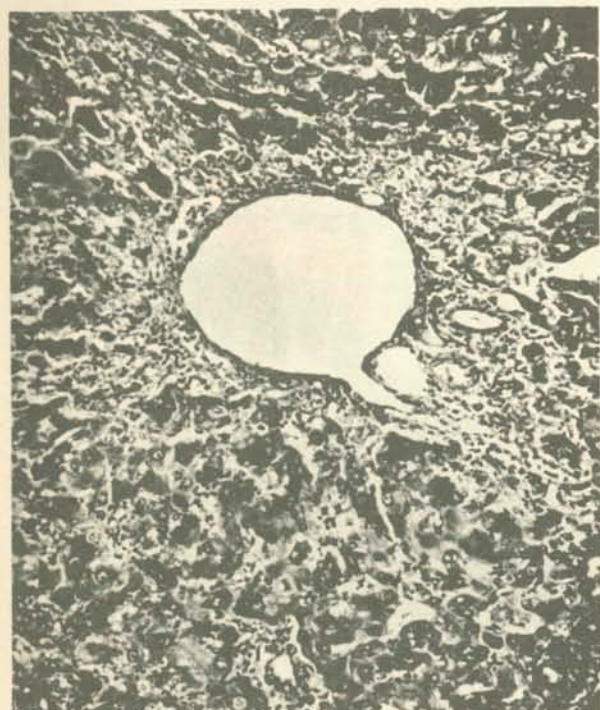


Fig. 1. Photomicrograph of a section of the liver from marmoset Gr. I showing stellate portal fibrosis. Gomori trichrome stain.

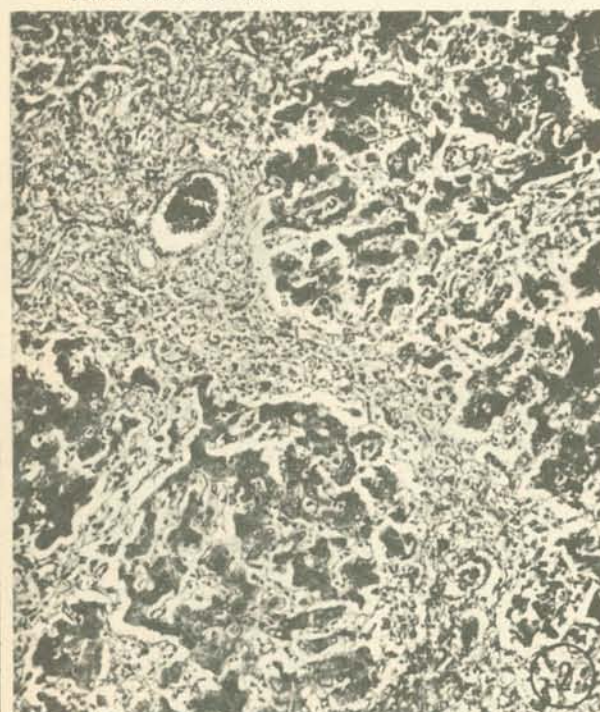


Fig. 2. Photomicrograph of a section of the liver from marmoset Gr. II showing cirrhosis with pseudolobular formation. P, Portal area. Reticulum stain.

別被處理如下：

第一組（含小猴十二隻），只用「黃麴毒素」處理：每週有五天，在其所食食物與水果中添加 2 ppm 的「黃麴毒素」（200 μg / kg 體重）。

第二組（小猴十二隻），併用「黃麴毒素」與病毒性肝炎雙重處理：在餵子添加「黃麴毒素」的食物（與第一組同）後六個禮拜，才開始注射，含有一〇〇倍或更多倍感染劑量的 G. Barker 種系肝炎病毒的 1/50 稀釋液 2.5ml。

第三組（小猴七隻），只給予肝炎病毒之處理：病毒之注射方法與第二組雷同。

第四組（小猴五隻），作為對照組，以資參考：供給正常的食物與水果。

在開始實驗前一天的早餐餵食前，我們抽取了所有小猴股靜脈血 3c.c.，拿來測定 SGPT (serum glutamic pyruvic transaminase)、SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase)、LDH (lactate dehydrogenase) 與 creatine phosphokinase 這些酵素的基準值。同時還進行了針插肝臟活組織檢查，針插操作前，我們曾施用 phencyclidine HCl (4 mg / kg 體重) 麻醉劑，每一隻的組織標本至少都用過光學顯微鏡檢查，另外每一組中有二個標本是置於電子顯微鏡作特別而深入的觀察。

實驗開始後第四十七天，我們又為所有實驗的小猴，全盤做了第二次的肝臟活組織檢查及血清酵素值之測定，這時第二組及第三組的小猴，且按計劃在其股靜脈注射如前所述之劑量的肝炎病毒溶液。

到了第八十二天，肝臟活組織檢查及血清酵素值測定，又全面做了第三次的重新估價。

此後，我們一直都很有規律地不時測定這些血清酵素數值，直到這些小猴不幸身亡為止。

結果

生存者

第一組的十二隻小猴中，有九隻在實驗開始後九至五週中先後不治而去，迄今為止，第二組及第三組也各僅有五隻與二隻幸運的生存者，而對照組中竟也有三隻之多死亡，但其中有一隻是在肝臟活組織檢查操作後，因出血過多而喪生的。統計本實驗共犧牲了小猴二十四隻。

形態學上的變化

在最初一〇週內死亡的八隻小猴，大都死於急性支氣管肺炎，針插肝臟活組織操作後併發內出血或慢性腹瀉所致的脫水，當然所有已死去的小猴中（二十四隻中的十九隻），大部分都是由於各種不同程度的肝臟傷害而死的。

Fig. 3. Photomicrograph of liver biopsy from marmoset Gr. III on day 82 showing periportal mixed cellular infiltration with several binucleate and giant cells, and balloon degeneration. Hematoxylin and eosin stain.

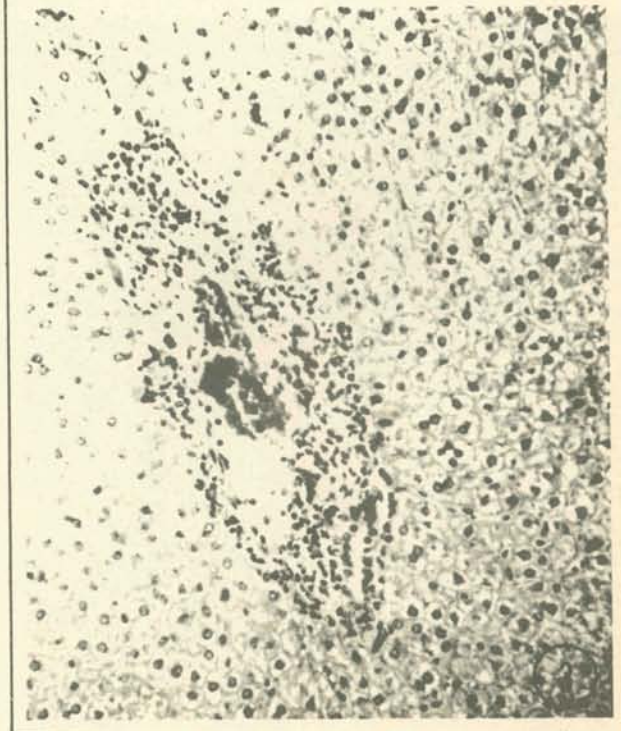




Fig. 4. Gross specimen of hepatic tumor from marmoset Gr. II marker, 1 cm.



Fig. 5. Photomicrograph of the hepatic tumor as shown in Fig. 4, showing cellular atypia and tumor giant cell (arrowheads). Gomori trichrome stain.

在第一組與第二組中，所予「黃麴毒素」的消耗量積達0.8 mg 以上時，即可看到顯著的肝細胞壞死現象，通常肝臟受傷害的程度是與「黃麴毒素」的消耗量成正比關係，但有二隻是例外，它們是第一組的第八號與第九號。肝細胞壞死除了常有多形核細胞的浸潤外，亦伴隨有卵圓細胞的增殖與巨細胞的變形現象。一般說來，肝門周圍區域的肝細胞壞死作用最為顯著，而巨細胞却從肝門區域呈放射狀漫向中心靜脈，這些多核巨細胞約在「黃麴毒素」施予後十三週才開始出現，不過在第四十七天，作第二次的肝臟活組織檢查時，即可找到二核巨細胞的痕跡了。第九週可發現到衛星樣散狀的肝門區域纖維化現象，至第十三週即愈趨顯著，至此尚可保存肝小葉組織之結構，到了第十五週，纖維化終於瀰漫成整個肝硬化，這時肝小葉結構的畸形與鏡下偽小葉的形成，俱可在第一組及第二組明顯地看到了。在前三組出現肝硬化程度最劇者，要算是併用毒素與肝炎病毒雙重處理的第二組了。肝炎病毒對肝臟的傷害作用，需要在將病毒接種後一個月後才逐漸顯著，不過這些變化也還都呈可逆性，像只用肝炎病毒處理過的第三組，迄未發現到肝硬化現象，就是一個很好的說明。

就已死去的小猴而言，第一組及第二組中分別有一隻及二隻長出眼觀可見的肝腫瘤，這些腫瘤都界限清楚，質脆，無纖維膜包被，其大小從直徑0.2到1.5 cm，鏡下觀時，它們與周圍正常組織之染色性質截然不同，組織上則由一群排列不規則的小樑構成，小樑的厚度由二到四個細胞不等，平均每一小樑約含有八到十六個細胞，而圓形細胞浸潤則僅限於腫瘤之周圍。腫瘤細胞及其核在外觀上是屬於多形性，尤其在最大的一個腫瘤（第一組的第七號）中，此類現象更是明顯。在某些區域，已有腫瘤細胞血管周圍浸潤出現，但轉移至其他器官的現象，則尚未見。肝細胞脂肪變性僅發生於早期，而其內膽汁滯留似乎在整個過程中約可看到，Kupffer細胞增殖主要呈現在肝門纖維化或硬化之前，而膽小管增生則屬更嚴重的後期，不過一旦到了此時期，纖維化及偽小葉之形成方是最主要的病野景象，而非那些膽小管的增生了。至於對照組的這些變化皆不呈顯著。

除肝外，其他器官並無啥特別變化。

電子顯微鏡的檢查方面，第一、二組的肝細胞，在第八十二天即可發現核仁內兩種纖維性及顆粒性成分已稍顯輕微分離現象，以及染色質間有明顯顆粒形成，某些肝細胞的核膜且呈不規則樣，甚至具有兩個核仁的細胞核內也都同時進行著上述的變化，至於一般所說的「核仁帽」，我們迄今尚未證實。細胞質中，內質網已呈擴大現象，附著其上的核糖體也與之分離，貯藏肝糖的顆粒大量減少，反而出現一種脂肪性空泡，在大多數的細胞，並可粒線體的基質內找到一種緻密物體，此外尚有很多溶酶

Fig. 7. Electron micrograph of a portion of a hepatocyte in Gr. II showing dilation and numerous vesicles of endoplasmic reticulum (ER), intra mitochondrial dense bodies (M, mitochondrion), and occasional coated vesicles (white arrow). g, Glycogen granules; mb, microbody. Lead stain.

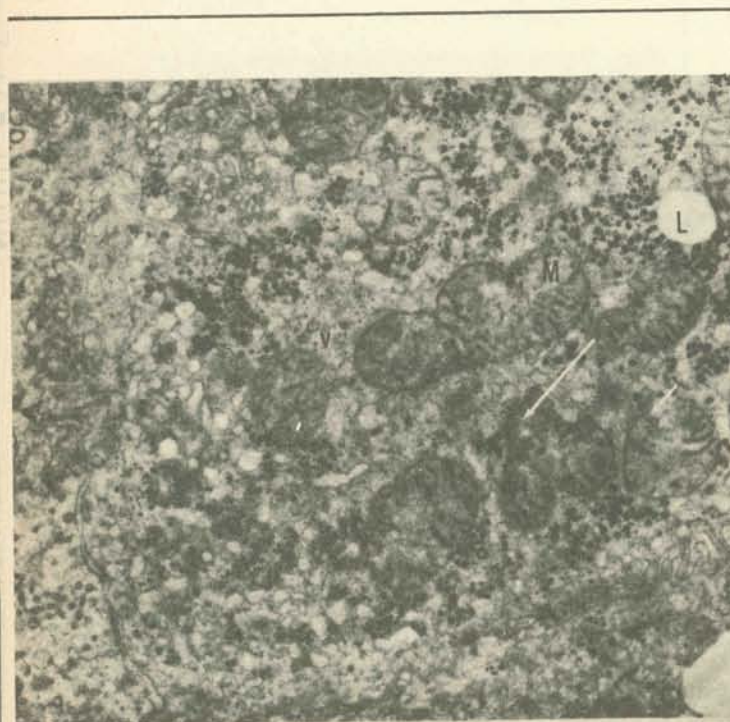
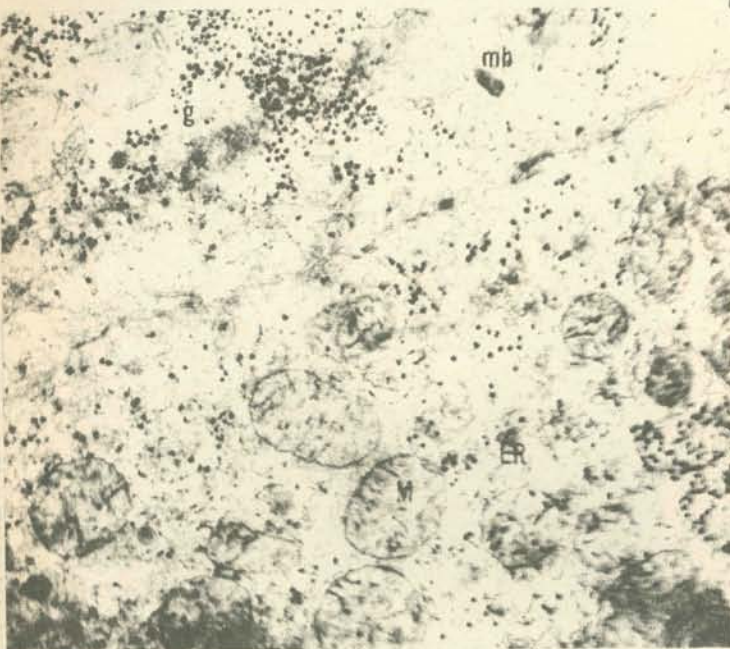


Fig. 8. Electron micrograph of a portion of a hepatocyte in Gr. II showing irregular mitochondrial profiles (long white arrow), mitochondrial membrane defects BC, Bile canaliculus; L, lipid vacuoles. Lead stain.

一個高峯，到了第二十五個月，又回復正常值，之後再重新添加「黃麴毒素」時，它們才又慢慢擡頭。

LDH

關於本實驗前三十個月內，所有小猴LDH值的變動情形皆列於第九圖，其中較引人注意的是在第八十二天的測定，結果是經雙重處理過的第二組，其LDH值的上升反不若第一、三組顯著，大致而言，LDH值之變動曲線與SGOT及SGPT者相差無幾。

LDH之基準值為 700 ± 28.9 單位/毫升，它是由五個同性酵素組成，各佔比例如下：LDH₁，36.5%；LDH₂，17.25%；LDH₃，20%；LDH₄，8.25%；LDH₅，18%——以上係依歐洲命名法而定。在第八十二天，第一、三組的LDH值上升了約三倍，而其中LDH₅之相對性上升竟佔21到62%之譜，至於LDH₄之變化，一般認為無意義，另外同時第二組的LDH值僅上升二倍。因為一旦發生溶血現象或在血清 creatine phosphokinase 濃度昇高時（正常值為5到60 單位/毫升），均能使所測之LDH值異常上升，故我們在操作時，需謹慎避免溶血發生，或損傷骨骼肌為原則，來作為測得LDH值之取舍標準。

討論

在某些地域，如非洲與東南亞一帶，原發性肝癌與肝硬化的致病率一向很高，而「黃麴毒素」已被視為其中一個很重要的致病因素。烏干達的某些區域曾調查過食品污染「黃麴毒素」竟高達1 mg/kg，而在史瓦濟蘭的一項研究也顯示「黃麴毒素」的污染與肝癌的發生，有著不可推卸的關係。目前一般意見認為「黃麴毒素」的消耗總劑量比起它被消耗的速率來得有意義，所以我們根據以前的經驗，這次作了2 ppm的「黃麴毒素」食物的實驗，以從事一項長期的觀察，同時我們也嘗試從這些罹病小猴之治療過程中，觀看其結果是否與肝癌發生的二期說理論符合一致。

形態學上的變化

很明顯的，「黃麴毒素-B₁」本身即能對靈長動物肝組織，造成極大的傷害，並促使血清之氨基交換酶（如SGOT、SGPT）與LDH值大大地上升。不過同樣拿應用「黃麴毒素」之長期實驗來說，在小猴身上的變化，即與老鼠者大不相同，老鼠終究會有肝腫瘤致生，然絕罕見侵及組織之結構，破壞使之變形，換句話說，肝內無纖維硬化之形成。而在靈長動物，如本實驗所用的小猴，若有肝癌致生時，亦必連帶有肝硬化。

由觀察中顯示，肝臟傷害的程度似乎與「黃麴毒素」之消耗量成正比，但有兩隻是例外，它們分別是第一組的

第八號與第九號，前者可能是因曾有一段長時期鬧腹瀉，進而干擾腸胃對「黃麴毒素」之吸收所致；而後者體內發現的條蟲也可能造成同一影響。

令人感到興趣的是，僅用肝炎病毒處理的第三組小猴，肝機能損傷通常可以完全復原，僅留輕微的肝門纖維化痕跡，但絕不演變成全盤肝硬化，換句話說，我們到目前為止，並沒有證據可以顯示病毒性肝炎的感染最後會導致肝硬化或肝腫瘤的地步，反而經「黃麴毒素」處理過後者方有此惡化趨勢。當然，同時併用「黃麴毒素」與肝炎病毒雙重處理過的小猴，比僅單獨用其中一種處理的，勢必產生更嚴重的組織學變化，尤其在已蒙「黃麴毒素」傷害的肝上又再加上肝炎病毒的感染，傷勢之必然加重，自不在話下。不過還是令人迷惑的是，在此急性期中，血清酵素值的變化却與上述現象的說明不一致。

在屍體解剖時所發現的肝腫瘤，多為無纖維膜包被，僅含些許網狀結構，鏡下觀染色性質異於正常肝組織，大小則從直徑0.2到1.5 cm。在第一組第七號的，是所有已發現的腫瘤中最大的一個，幾乎佔了半部右葉組織，其腫瘤細胞在外觀上並不一致，並已有至血管周鞘浸潤之現象，倘使它能再活長一點的話，那麼我相信這一已知最大的腫瘤，必定發展為分化較佳，由小樑架構的惡性癌，並展開有轉移現象。我們幾乎可以這樣說，所有較小的腫瘤皆停於癌前期罷了。現在我們已著手進行另一個實驗，在為數更多的小猴中，全部只拿來作「黃麴毒素 - B₁」的觀察，迄作者寫稿之時，有四隻小猴已發展出肝腫瘤了。普通良性腫瘤與惡性癌之間，絕難利用電子顯微鏡或血清酵素測定將之區分，而惟有靠臨床上看它是否有別器官轉移、血管侵襲、細胞不典型一致，極少網狀纖維結構與其直徑大小來作為鑑別診斷的依據了。在關於非人類的靈長動物實驗上，已有一個報告說：在餵予「黃麴毒素」食物二年半長出的原發性肝癌，已看到肺轉移的現象。另外也有一個例子，在連續口服「黃麴毒素 - B₁」達六年之久的恒河猴身上，也證實了上述現象。

二期說理論

正如第三組之結果顯示，就病毒性肝炎本身而論，並不足以對非人類之靈長動物，引發其肝硬化或肝腫瘤的罹患，然後第二組又給予我們一個觀念，先前的病毒性感染，再加上隨後接踵而至的化學毒素的刺激，才是真正關鍵所在。故我們已為此設計了另外的實驗，俾這一理論得以發揚光大。

附記

本稿完成後，又發現了兩隻小猴也有肝腫瘤的變化。

參考資料：略

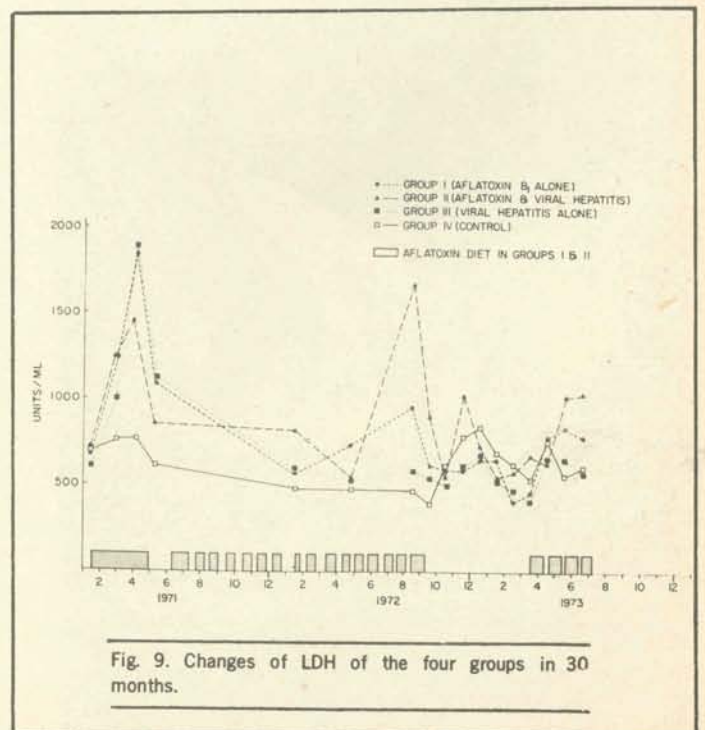


Fig. 9. Changes of LDH of the four groups in 30 months.