

毒藥物對實驗動物之病理診斷技術探討

廖俊旺 蔡三福 王順成

前 言

毒藥物對實驗動物病理及病變之診斷技術，為毒物病理學最重要的基礎。本所為目前國內毒藥物對動物測試研究唯一之專責機構，一般經由動物測試之實驗結果判讀，大部份需仰賴病理技術支援。目前本所已具備毒藥物對動物病理之診斷技術雛形，而此技術之開發研究，不僅支援往昔毒藥物對動物各種毒性測試結果之探討，更可藉由大體解剖及組織病理切片技術，快速診斷毒藥物對動物造成傷害之程度，其中包括急毒性測試系統所產生對動物組織器官之急性損傷，如口服急毒性、皮膚急毒性、眼刺激性、皮膚刺激性、皮膚過敏性及遲發性神經毒性等，及慢毒性試驗之器官組織慢性病變、腫瘤細胞之病理鑑定研究，及其他慢毒性研究，如致畸胎性、致生殖毒性之組織病理病變。本文就毒藥物對動物細胞所產生之病理傷害及診斷技術作一綜合探討，以為往後本系於此研究方向定位指標之參考。

實驗動物之細胞生理特性

毒藥物對哺乳動物急慢性傷害評估標準，最常使用的實驗動物是白鼠 (rat) 及鼯鼠 (mouse)。白鼠及鼯鼠均屬齧齒類哺乳動物，眼睛第三眼瞼退化，眼球上方有哈氏腺體 (Harderian gland)，為一淋巴腺體，與體內免疫防禦系統有關。骨骼系統與其他動物相似，但骨化時間為5歲齡。體內脂肪含有色素呈褐色稱褐色脂肪 (brown fat)，與體內碳水化合物利用及抗冷作用有關。

白鼠消化系統缺少扁桃腺及膽囊，舌頭味蕾缺乏水接受器，對水味覺無法分別。胃食道區佔大部份，胃腺體部 mast 細胞可分泌 histamine。小腸內 Brunner 腺體真正功能未明，但可分泌鹼性液體，以防胃酸侵蝕，此腺體在天竺鼠屬於粘液細胞分泌，與豬和鼯鼠為粘液及漿液組織不同，其腸內吸收率與其他種類亦有不同 (Kohn, 1965)。

肺泡內分三層即內襯細胞 (lining cell)、基底細胞 (basement cell) 及內皮細胞 (endothelial cell)。內皮細胞含 Surfactant，可防止肺泡細胞破裂 (圖 1.)。白鼠及鼯鼠肺泡較厚 (1.5mm)，肺臟內 acetylcholine 及 histamine 含量與其他動物不同，小支氣管不受 adrenergic nerve 控制。白鼠肝臟缺乏膽囊，膽汁藉由膽小管匯集至總膽

管，肝細胞內核仁大而明顯，常有2~3個核形成一個肝細胞。肝細胞再生能力強，切除2/3尚能存活，此均有別於其他動物。

腎臟絲球體未分葉，存有較多結締組織，Bowmens 細胞扁平且厚，濾過率較高，常見蛋白尿 (0.4~1.0mg/ml)。腎臟已知含有較多 L-amono acid oxidase 及 γ -glutamyltranspeptidase，可分解多種氨基酸，此現象於犬、貓、兔、天竺鼠、牛、羊等則均缺乏。

1920年至今已有許多教科書及實驗動物手冊詳細介紹此二種動物解剖學及生理學，但缺乏毒性測試項目所需的詳細資料，如血壓、脊髓液壓力、血量、荷爾蒙含量、腦學習中心位置，及其他生理資料。由於其各項生理值有別於其他大型動物，如犬、貓等，目前尚無人對其作詳細探討，因此本系研究方向之一，即以白鼠 (Wistar, SD strain) 及鼯鼠 (ICR strain) 二種品系，觀察其組織及細胞形態，比較其差異。若能建立基礎資料，將有助於毒藥物對細胞病理之分析，並得到客觀判讀資料。

毒藥物中毒之動物病理診斷技術

病理學為一研究實證之診斷科學，主要探討外來物質進入體內後，引起之細胞及標的器官或組織病變。外來物質造成生物體傷害的原因包括細菌、病毒之感染及其他物理或化學性物質之傷害，而多種毒藥物之不當或過量使用之化學傷害所引起體內細胞之病理病變，為本研究之重點。其他如化學農藥、醫療用藥物、化粧品及食物添加劑等物質，由於反應結果不同，包含可逆性或不可逆性反應方式，均為本系動物病理研究次一目標之研究對象。

以實驗動物為研究對象進行毒藥物對哺乳動物毒性之測試，其資料可供作人類或環境污染之傷害指標參考。毒藥物對哺乳動物毒性，一般分為全身性傷害 (general toxicity) 及系統性傷害 (systemic toxicity) 兩大類。

毒藥物所引起之全身性傷害主要位於正常細胞之接受器，例如有機磷劑之TOCP中毒時，TOCP與神經節之膽鹼酯酶結合，抑制其酯酶活性，引起神經脫髓鞘病變，進而造成遲發性神經毒性 (圖2.)。其他如有機氯劑之一 DDT殺蟲劑，可干擾神經傳導之 Na^+ channels，產生神經毒性干擾細胞膜傳導功能。其他物質亦證明與 adenosine triphosphatase (ATP) 結合或干擾碳水化合物之氧化作用，或與體細胞遺傳基因結合，或改變 DNA重組，影響正常細胞生長，或者透過基因突變，誘發體內腫瘤發生，或藉由影響遺傳基因導致胎兒畸型 (Lutz and Maier, 1988) 等全身性傷害。

系統性傷害如對肝臟、血液免疫系統、腎臟、呼吸系統、神經系統、心臟血管、皮膚、生殖及眼睛之毒性等。肝臟毒性為毒藥物最常見急性傷害臟器之一，急性傷害常導致肝細胞脂質堆積 (steatosis)、肝細胞壞死或肝膽管功能失調，慢性毒性則易造成肝纖維化及肝腫瘤。

目前毒藥物之病理診斷技術，依觀察細胞大小及變化程度，可分為三部分：(一) 肉眼病變檢查；(二) 一般光學顯微鏡檢查；(三) 電子顯微鏡檢查。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組織器官製成組織切片，置於光學顯微鏡下將細胞放大40~1,000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 Haematoxylin 及 Eosin 進行染色觀察。

Haematoxylin 可染出細胞核及核仁等鹼性物質使呈藍色，Eosin 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 (圖3.)。至於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1,000~1,000,000 倍，可更清楚觀察細胞內各種微小胞器之細微變化 (圖4.)。

利用不同染色法是病理學診斷發展之重要特色，如以抗酸性染色，可標示腎小管上皮細胞含鉛重金屬沉積 (圖5.)，結締組織纖維化則利用 Fast-blue 可染出藍色病灶區 (圖6.)，類澱粉蛋白 (amyloid) 可利用PAS及剛果紅 (congo red) 染色法使呈陽性反應，黑色素、血鐵素證明法可偵測生體內色素存在部位及量的變化。

近年來其他各種酵素組織化學染色法相繼發展，亦提供病理學快速及準確診斷之方向。利用細胞代謝過程所產生酵素含量異常增加，可偵測腫瘤疾病，如以酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ATPase) 染色法可染出細胞內容解體 (lysosome)， γ - 麩氨酸轉氨酶 (γ -glutamyltranspeptidase, GGTase) 染色法可應用於肝癌之偵測 (圖7.)。

有關免疫染色法於病理學診斷之應用範圍更廣，因一般以 H&E 染色及特殊組織化學染色單獨使用，雖可提供大部分之診斷資料，但均有其使用限制，如小細胞腫瘤、肉瘤及分化不良腫瘤等則無法加以精確細分。對原發性部位不明之轉移性腫瘤，需藉由特殊組織標記或腫瘤特殊抗原予以辨識。免疫染色於血液病理分析上，更可精確劃分細胞起源及分化程度，在分類上極具有價值，對日後治療及預後提供重要訊息。

免疫抗原及抗體法更可應用於細胞膜及細胞質之偵測。應用於細胞膜時，主要針對造血系統，如T及B淋巴球之鑑定及分化階段。應用於細胞質偵測，則包括其他抗體和酵素、中間型微絲 (intermediate filament) 蛋白及荷爾蒙等。細胞膜抗原容易受到固定過程之破壞，故必須以新鮮標本冷凍處理，而細胞質內成分則可以固定後之石臘標本染色。

染色之原理及過程係針對組織內抗原之相關性抗體，即利用初級抗體 (primary antibody) 覆蓋一段反應時間後，以次級抗體 (secondary antibody) 處理，再利用呈色物質 (chromogen) 標識出抗原位置，並經由顯微鏡予以觀察鑑定。這些過程隨著特異抗體之不同，變化甚多，如直接法、間接法、peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法及 avidin-biotin complex (ABC) 法等，其呈色物質又可利用螢光劑 (免疫螢光法) 及酵素類 (peroxidase, alkaline phosphatase) 等加以鑑定。由於病理診斷技術發展日新月異，如何有效應用病理診斷技術，以提升毒藥物病理學之研究水準，是本系病理研究室另一主題。

毒藥物對動物急毒性之病理研究

毒藥物急性中毒主要是針對使用者及生產者可能造成之急性傷害。由於急性中毒之病理症狀與其他病症不同，如巴拉刈 (paraquat) 殺草劑為目前最常見農藥中毒種類之一，其急性中毒可造成心肌、肝、腎及神經變性變化或造成肺細胞壞死形成肺纖維化。納乃得 (methomyl) 為另一類易引起中毒之劇毒性胺基甲酸鹽類農藥，其對白鼠口服急性毒之 LD_{50} 為 17~23mg/kg。已知案例中得知犬於此藥中毒時可造成全身性出血、散播性血管內凝血 (圖 8.)、肺水腫及呼吸肌麻痺致死等現象 (廖、蔡、王等, 1996)，以上均為毒藥物對動物急性中毒症狀之一。

肝臟為毒藥物進入動物後體內之主要代謝解毒器官，毒藥物對肝臟典型之急性毒性，視劑量、血流及細胞酵素產生多寡而異，一般分可逆或不可逆性等不同程度傷害。若大量劇毒性藥物經由中心靜脈，直接進入肝小葉中心區 (centrolobular area)，將導致肝細胞腫脹、核濃縮或溶解破裂，其細胞結構消失。

急性毒性重度傷害可造成肝細胞溶解、凝固樣壞死、空泡化或脂肪空泡樣變性變化 (圖 9.)。中度急性傷害可見肝小葉中間區 (midzonal area) 肝細胞腫脹，堆積脂質空泡，形成脂肪變性。輕度傷害則在肝小葉門脈三角區 (portal area) 空泡變性。

毒藥物除對肝細胞本身可能造成傷害外，對其他附屬細胞亦可造成影響，初期急性傷害可形成血竇內皮細胞腫脹，阻塞血流進而逐漸擴張，同時致活 kupffer 吞噬細胞作用，吞噬壞死細胞，並造成膽汁停止分泌、膽管上皮細胞微絨毛消失、微膽管擴張、膽汁淤積。末期急性傷害則導致膽管上皮細胞增生，病變區吸引許多單核球浸潤，以便清除壞死細胞，倘傷害持續進行，結締組織浸潤病變區，逐漸分泌膠原形成纖維化。

毒藥物進入體內急性傷害，對體內酵素造成之影響亦不同。肝臟有 4 種保護作用酵素參與急性毒藥物之排解，這些酵素較重要包括：（一）smooth endoplasmic reticulum (SER) 之氧化酵素；（二）peroxisomes 之過氧化酵素；（三）含硫基緩衝物或 glutathione 之氧化還原，及（四）細胞質內其他酵素 (Hutter, 1969)。急性中毒早期之細胞病變為細胞腫脹、SER 增生及細胞質內堆積濃染嗜伊紅性物質，若細胞死亡溶解，亦可見SER增生現象，此點可解釋在急性致死劑量下，細胞無法進行解毒功能之原因。

急性藥物中毒之機制，一般藥物可誘發肝細胞腫脹，肝細胞內SER增生及 Mixed function oxidase、cytochrom P-450、glutathione 等解毒酵素增加 (Bolender and Weibel, 1973)，且使 glutathione 還原合成 free sulfhydryl group 之物質以供作為 sulfhydryl buffer，俾使體內減輕毒藥物之毒性 (Reynold, 1980; Well, 1980; Chiew, 1982)。其他毒物急性傷害之機制如藉由SER轉變成其他有毒物質，傷害細胞膜，如 CCl_4 由肝細胞SER轉變成 free radical 即為一例。急性 Aflatoxin B_1 中毒，肝小葉中心區細胞壞死溶解，albumin、fibrinogen 及 globulin 降低，促使細胞內粒線體腫脹、ER 受損及SER 增生 (Miller, 1982)，均為毒藥物急性傷害機制之一。

另外值得一提，大多數人均忽視毒藥物急性中毒與其溶劑或添加劑之相關性，如 xylene、benzene、hexane、ethanol..... 等溶劑，皆可引起人畜急性中毒。本系試驗結果顯示，含有40% xylene 農藥經由眼刺激毒性測試，造成動物體 100%快速死亡。分析此現象，顯示脂溶性溶劑可穿透眼角膜或皮膚，由於視網膜含有許多 ganglion cell，藥劑經由神經元直接延伸至視神經，或經由皮膚血液循環吸收直接到達中樞神經，進而抑制呼吸系統，引起呼吸衰竭、心跳停止最後死亡，此時肝細胞內SER中 cytochrome-P450 含量則顯著增加。

毒藥物急性中毒診斷，是目前公害糾紛最不易解決的問題。若能針對毒藥物急性中毒所引起之細胞顯微病理，如 peroxidase-antiperoxidase

(PAP) 法及 avidin-biotin complex (ABC) 法染色標示，及解毒酵素變化如 cytochrom-P450 作用之不同，作一深入分析研究，找出有效證據，可加速診斷及治療正確性，縮短目前公害中毒糾紛處理流程。

毒藥物對動物慢性毒性之病理研究

毒藥物對動物慢性毒性之病理研究，主要是針對消費者及社會大眾。由於毒藥物之慢性毒性是毒藥物長期累積效應，因此往昔均以實驗動物之 2 年慢性或致癌性試驗為最常使用之實驗，主要評估該毒藥物是否具有潛在性之遺傳基因毒性及致腫瘤性，作為預測對人類健康危害之指標。

毒藥物對動物慢性毒性傷害病變與否，視其使用劑量與途徑有很大差異，諸如 benzene 之急毒性作用部位於 CNS 系統，而慢性毒性則為骨髓系統、免疫抑制作用及誘發腫瘤產生 (NTP report No. 289)。肝臟雖為 benzene 主要代謝器官，卻不是主要目標器官 (target organ)。結構類似之藥物，如 Bromobenzene 或 Chlorobenzene 則可誘發肝腫瘤，是其最大不同處。DDT 藥物對動物急毒性具神經毒性，慢性毒性可能誘發肝腫瘤 (Hayes, 1982; Sitting, 1981)。

一般慢毒性傷害之病變診斷，可依細胞型態表現加以判斷。以肝腫瘤病變產生之前癌細胞為例，肝前癌細胞初期稱 'ovall cell' 增生 (Farber, 1956; Inaoka, 1967)；進一步為 'altered (hyperplastic) foci' (Firminger, 1955; Reuber, 1965; Newberne, 1968)，最後為 'hyperplastic nodules' (Newberne, 1968; Farber, 1973)。ovall cell 增生於細胞形態學上主要細胞呈腫脹、細胞核及細胞質呈蒼白色，常集中於肝門脈三角區周圍 (Rabim, 1964)。altered (hyperplastic) foci 則經常出現在藥物處理之早期細胞變化，具有不同酵素染色特性 (Timme, 1978; Hirota, 1982)。hyperplastic nodules 呈現於藥物處理之末期細胞變化，細胞較 altered foci 大，細胞周圍緻密，細胞之顯微結構不同 (Farber, 1973)。

上述前癌細胞亦可利用 H&E 染色後所呈現嗜鹼性、嗜酸性、透明性或混合型存在型式 (圖 10.) 加以診斷。至於利用 glucose-6-phosphatase (Bannasch, 1968)、adenosine triphosphatase (Kitagawa, 1971)、 γ -glutamyl transpeptidase (Kalengagi, 1975) 等組織化學染色法進行組織染色，亦可協助慢毒性病理診斷。其他慢毒性病理診斷技術如特殊組織標記或腫瘤特殊抗原辨識法，或利用肌血球素 (myoglobin) 標定法以診斷

橫紋肌腫瘤 (rbdomyoma) ，或利用角蛋白 (keratin) 以確立上皮細胞腫瘤 (epithelioma) 等均為慢性病理診斷技術利用之重要例證。

毒藥物慢性毒性之診斷技術，需經由長期動物試驗，以區別毒害器官，進行研究評估，建立預警系統，其工作繁重費力、費時，因此加速建立快速之慢毒性傷害評估方法，為目前國內及世界對毒藥物慢性傷害診斷之重要課題。本系為縮短 2 年慢性或致癌性試驗所消耗之人力與物力，已建立快速誘導致肝癌法，藥物處理後 3 個月即可誘發出肝腫瘤 (圖 11.) (廖、王等, 1993) ，為慢毒性之病理研究提供新技術及速度，往後當加強此一技術開發及探討。

毒藥物對動物致畸胎及後代生殖毒性之病理研究

目前人類中每 5 對夫妻就有 1 對受不孕症困擾，其中超過 1/3 孕婦有胚胎早期死亡，10~15% 自發性流產，3% 新生兒畸型 (Zenick, 1994) ，其中影響因素雖多，然許多毒藥物濫用之潛在性危害，亦不容忽視。1985 年 Thalidomide 上市後，使用於孕婦害喜時之鎮吐劑，長期服用卻引發新生兒四肢畸型 (Fario, 1985; Warkany, 1971a) 。工廠中男性長期接觸有機溶劑，如 toluene、benzene、xylene、hexane... 等造成精蟲數目減少、無精症、無精症或精原細胞再生不良，甚至睪丸萎縮；女性卵巢生殖細胞 DNA 受損 (Barlow, 1982) 。

Sedatives 及 Tranguilizers 藥物作用於中樞神經系統，改變 Hypothalamus releasing hormone 及 Gonadotropins，影響體內荷爾蒙分泌。抗癌藥物 (Procarbazine) 會傷害倉鼠 (hamster) 精蟲頭部之 acrosomal plasma membrane (Singh, 1989) ，均說明藥物慢性毒害對生殖及致畸胎作用之影響。

本系近幾年來利用病理鑑定技術協助發展生殖及致畸胎毒性研究，最重要案例如對免賴得 (Benomyl) 藥物之探討。免賴得屬 Benzimid 類殺菌劑，具結合體內之 microtubulines，抑制細胞分裂作用。高劑量餵飼母鼠會導致幼鼠產生裂顎、尾不正常、小眼症等病理病變，其他病理病變為露腦畸形及水腦症，腦室內血管週圍細胞過度增生、壓迫腦組織，造成腦萎縮 (呂、王等, 1994; Ellis, 1987) ，雄鼠睪丸精原細胞壞死 (圖 12.) (廖、王, 1993) 、精蟲數目減少、活力降低、睪丸萎縮及不孕 (Hess, 1991; Nakai, 1992) 。

由於生殖及致畸胎毒性之結果將導致母體受孕率降低、不孕或胎兒畸型，造成社會成本嚴重負擔。毒藥物對動物生殖及致畸胎毒性之病理研究，所探討毒藥物危害作用機制及尋找特殊之酵素，協助快速診斷，其意義重大，因而此方向亦為本系在毒物病理研究之另一重要目標。

結 語

目前國內有關毒藥物對人體及動物安全評估之資訊，僅臺北榮民總醫院設有毒藥物諮詢中心，該中心偏重於毒藥物引起之臨床病理資料庫建立，雖對國內毒藥物中毒臨床諮詢提供相當重要資訊，但有關毒藥物對實驗動物病理及病變之診斷技術系統之開發及探討，則仍需更有系統的動物毒物病理學之實證科學配合。

本所為目前國內為研究發展毒藥物對動物測試具完整體系之專責機構，於毒藥物對動物一般病理之研究已有基礎，但對深入病理技術之引進及開發，尚待國內及國際合作。尤其有關測試各種酵素組織化學染色法，如免疫抗原及抗體之應用 Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法及 Avidin-biotin complex (ABC) 法等新染色技術，仍急待發展，因此希冀加強毒藥物之病理研究，進一步開展毒藥物病理專門技術領域，建立毒藥物對細胞傷害之基本資料，強化毒藥物安全評估判斷標準，以提供政府對毒藥物管理之參考，同時強化毒藥物病理新技術之開發及毒藥物病理快速診斷系統之建立，以提供臨床中毒治療之依據。

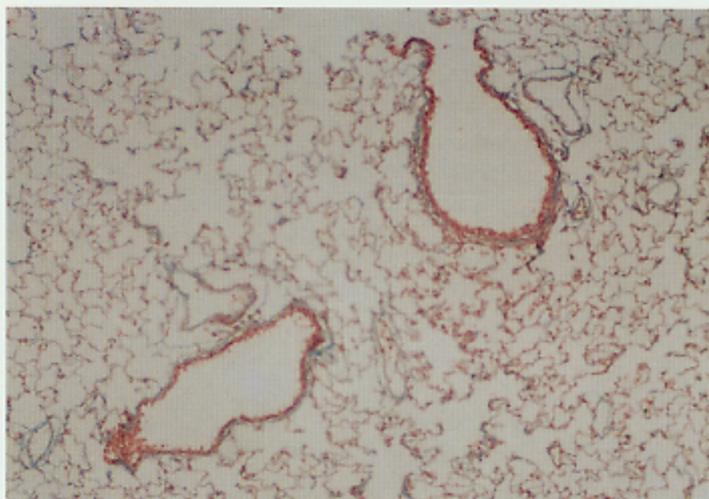


圖1. 正常白鼠肺臟組織切片
(Fast-Blue 染色, $\times 40$)

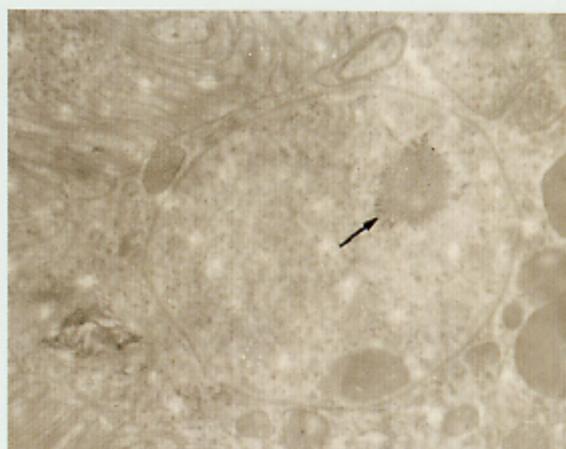


圖4. 鉛餵食白鼠引起腎小管上皮細胞
核內包涵體病變(↑, TEM, $\times 5,000$)

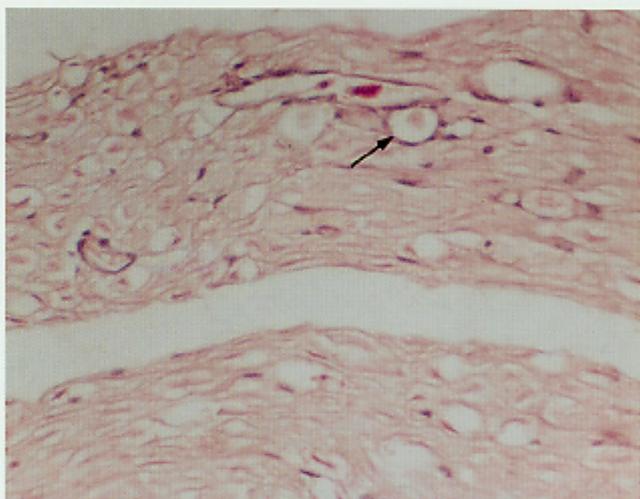


圖2. TOCP引起蛋鷄坐骨神經脫髓鞘病變
(↑, H&E 染色, $\times 400$)

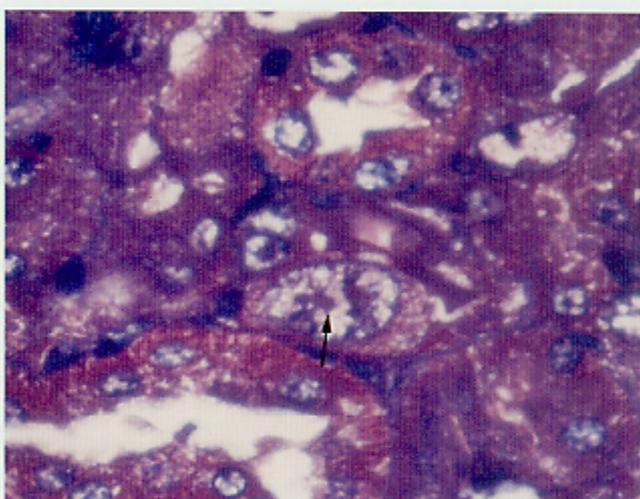


圖5. 鉛餵食白鼠引起腎小管上皮細胞核內包
涵體病變(↑, 抗酸性染色, $\times 1,000$)

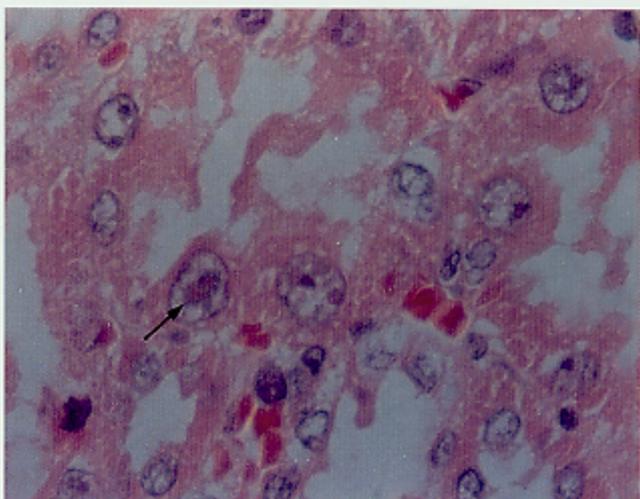


圖3. 鉛餵食白鼠引起腎小管上皮細胞核內
包涵體病變(↑, H&E 染色, $\times 400$)

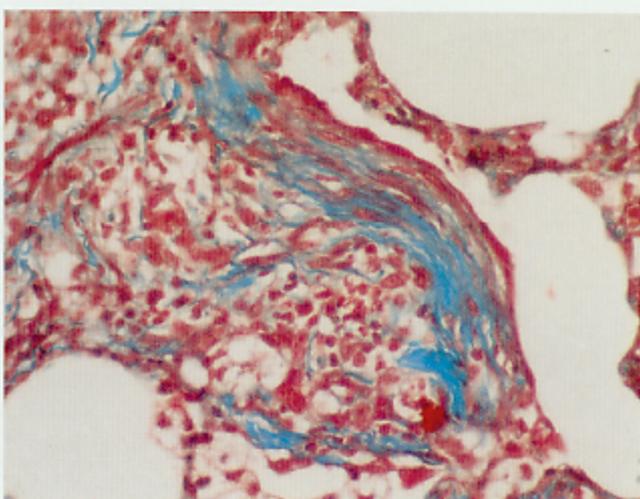


圖6. 鉛吸入造成白鼠肺纖維化病變
(Fast-Blue 染色, $\times 400$)

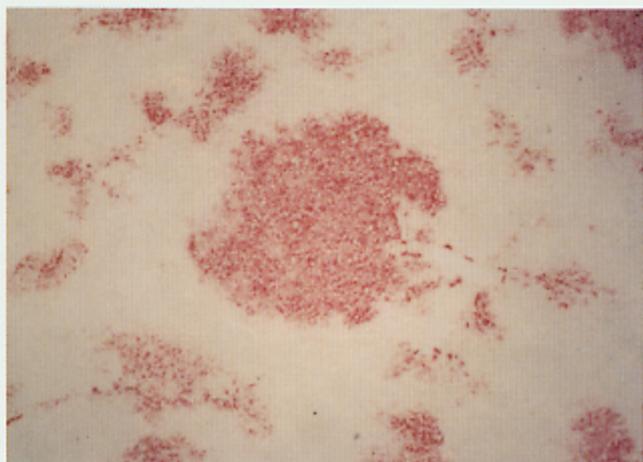


圖7. 免賴得飲水投予白鼠之肝臟 GGT 陽性病灶 (GGT 組織化學染色, $\times 40$)

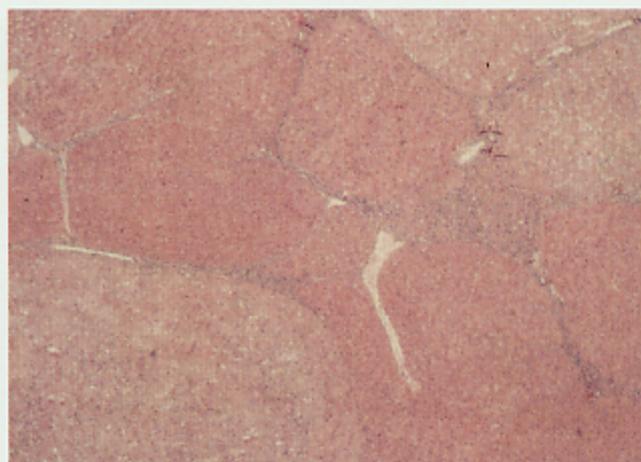


圖10. 2-AAF 誘發白鼠肝腫瘤病變 (H&E 染色, $\times 40$)

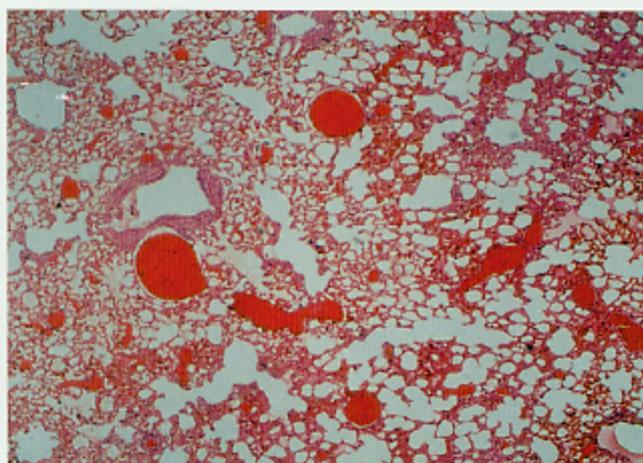


圖8. 納乃得引起犬急性中毒之肺臟血管內散播性凝血病變 (H&E 染色, $\times 40$)

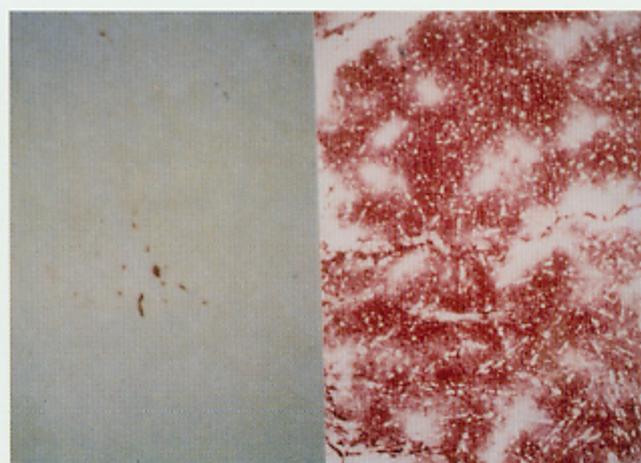


圖11. 2-AAF 誘發白鼠肝腫瘤病變 (左為對照組, 右為處理組, GGT 組織化學染色, $\times 200$)

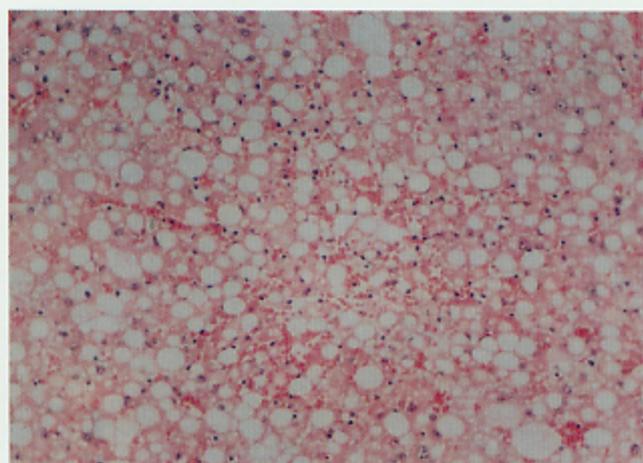


圖9. CCl_4 急性中毒白鼠之肝脂肪變性變化 (H&E 染色, $\times 200$)

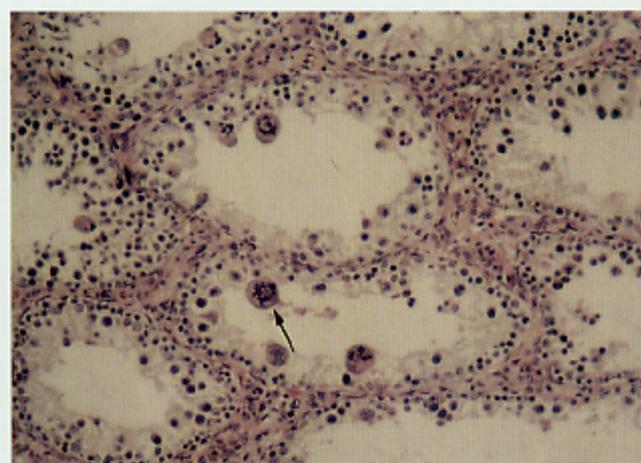


圖12. 免賴得飲水投予後引起雄鼠睪丸生精小管萎縮及多核巨噬細胞形成病變 (\uparrow , H&E 染色, $\times 400$)