

尿液黃麴毒素代謝產物和肝細胞癌之 重疊病例對照研究

連如蘋¹ 于明暉^{1,2}

廖運範³ 陳建仁¹

為探討臺灣地區黃麴毒素暴露和肝細胞癌發生的關係，本研究係以民國77-81年收案自公保健診中心和長庚醫院肝病中心的4841名男性B型肝炎病毒帶原者和2501名男性非帶原者為研究世代，利用追蹤期間發生肝細胞癌且有庫存尿液檢體的43名個案為病例組，每名病例選取一名B型肝炎表面抗原(HBsAg)陽性及一名HBsAg陰性未罹患肝細胞癌個案為對照組。研究結果顯示，尿液黃麴毒素代謝產物間的相關性在肝細胞癌病例組，HBsAg陽性對照組及HBsAg陰性對照組不同，且各種尿液代謝產物佔黃麴毒素總量的百分比在三組中亦有差異，AFM₁%在HBsAg陰性對照組最高，AFP₁%在HBsAg陰性對照組最低，AFB₁%在病例組最高。黃麴毒素總量及大多數代謝產物濃度愈高，罹患肝細胞癌的相對危險性愈高，在控制了其它重要危險因子作用後，尿液黃麴毒素總量及黃麴毒素M₁(AFM₁)和罹患肝細胞癌的危險性有相關。AFM₁和肝細胞癌的相對危險性在不抽菸、不喝酒、或年齡50歲以下者較高。(中華衛誌 1997; 16(5): 417-427)。

關鍵詞：黃麴毒素、肝細胞癌、重疊病例對照研究

前 言

肝癌；絕大部份屬於肝細胞癌，是一種預後差且致死率高的癌症，每年全球至少有25萬人死於肝癌[1]。肝細胞癌的發展是多步驟的病理變化過程，牽涉多種危險因子的作用。在臺灣地區，雖然80%以上的肝細胞癌可歸因於B型肝炎病毒的慢性感染，但是B型

肝炎帶原者中，只有一部份會發生肝細胞癌。因此，許多流行病學研究已發現，除了B型肝炎病毒以外，可能還有其它重要的內生性或外生性因子和肝細胞癌有關，例如：C型和D型肝炎病毒，抽煙、喝酒習慣、新鮮蔬菜攝取頻率、血清維生素A、男性荷爾蒙及口服避孕藥，均有研究發現和肝癌的發生有關[2-7]。

肝癌的死亡率有相當顯著的世界地理分佈差異[8]，高發生率地區集中在非洲撒哈拉大沙漠以南和東南亞[1]，除了B型肝炎病毒以外，似乎和較高的黃麴毒素暴露有關。黃麴毒素B₁(AFB₁)是食物中含量最多的黃麴毒素種類[9]，IARC在1987年將AFB₁列為致癌物質[10]。AFB₁進入活體後，會在肝細胞內，經酵素代謝作用，代謝成各種黃麴毒素代謝

¹國立臺灣大學流行病學研究所

²國立臺灣大學公共衛生學系

³長庚紀念醫院肝病中心

聯絡人：陳建仁

聯絡地址：台北市仁愛路一段1號1547室

聯絡電話：(02)3970800-8359

傳 真：(02) 3511955

投稿日期：85年4月9日

接受日期：86年9月8日

產物。經過羥化作用(hydroxylation)，可形成黃麴毒素M₁(AFM₁)及黃麴毒素Q₁(AFQ₁)，經由去甲基作用(demethylation)，會形成黃麴毒素P₁(AFP₁)，經由環氧化作用(epoxidation)，會形成黃麴毒素B₁環氧化物(AFB₁-8-9-epoxide)，它是一個黃麴毒素代謝過程中不穩定的中間產物，容易和體內的親核性大分子，如：DNA、RNA和蛋白質等結合。

黃麴毒素在體外試驗發現有很強的致突變性。在黃麴毒素高暴露地區，試管內實驗發現，黃麴毒素會使p53基因249譯碼子產生G→T突變[11,12]，而且黃麴毒素在許多動物實驗中已被證實會導致肝癌的發生[13]，但目前並沒有充分的證據肯定黃麴毒素和人類肝癌的關係。早期黃麴毒素與肝細胞癌的流行病學研究，大多屬於生態相關研究[14-16]，大部份的研究均發現黃麴毒素和肝癌的發生是有相關，但是生態相關研究，以族群為研究單位，可能會發生生態謬誤，推估個人危險性有困難。病例對照研究之研究結果對於黃麴毒素和肝細胞癌的相關並不一致[3,17,18]。以往的病例對照研究，大多利用問卷回溯過去黃麴毒素暴露來蒐集資料，可能會有嚴重的回憶偏差。目前生化及免疫學的方法已可被用以測定人體組織及血液尿液檢體中的黃麴毒素，利用黃麴毒素生物標記於黃麴毒素和肝細胞癌的分析流行病學研究，可以改善以往對個人層次之黃麴毒素暴露的定量問題，並釐清黃麴毒素和肝細胞癌間的關係。唯一的一個追蹤研究是在中國大陸上海進行，其重疊病例對照研究結果顯示，黃麴毒素代謝產物和肝細胞癌發生有相關，且黃麴毒素和B型肝炎慢性感染有交互作用[19]。

臺灣地區地處亞熱帶，氣候溫暖潮濕，適於黴菌生長，農作物在栽培、收穫及貯存加工過程中，黃麴毒素的污染機會增加，國內學者對食品污染的研究，已發現花生及其製品有高頻率的黃麴毒素的污染[20]。因此，本研究的目的是利用重疊病例對照研究法，以尿液黃麴毒素代謝產物為生物標記，探討不同尿液黃麴毒素代謝產物對肝細胞癌發生的獨立作用，及其和年齡、教育程度及抽菸

喝酒習慣的交互作用。

材料與方法

本研究係以重疊病例對照法探討尿液黃麴毒素代謝產物和肝細胞癌發生的關係。研究對象，世代之追蹤方式，重疊病例對照研究之病例組和對照組選取，及實驗和統計方法分述於下：

研究對象

本研究的世代包括兩個來源，民國77年8月至81年6月，自長庚醫院肝病中心及公保聯合門診選取4841名30-65歲男性無症狀B型肝炎病毒帶原者，及2501名性別、年齡配對的非B型肝炎病毒帶原者個案。每名研究對象在進入研究時，即接受訪視。研究個案的社會人口學特性、抽菸及飲酒習慣、飲食攝取頻率及個人與家屬的重要慢性病既往史資料，是以預試修定過的結構式問卷，由受過嚴格訓練的訪視員進行訪視獲得。抽菸習慣的定義是每週至少四天抽菸，喝酒習慣的定義是每週至少一次喝酒。在收案及定期追蹤檢查時，均採取研究個案的血液及尿液檢體，檢體在採集當日經前處理及分裝後，血液檢體(包括血清，血漿，白血球)凍存於-70℃的冰箱中，紅血球和尿液檢體凍存於-30℃冰箱，以進行各項分析。

研究世代之追蹤及重疊病例對照研究之病例組及對照組之選取

研究個案的追蹤方式，包括定期健康檢查，公保死亡給付檔案之死亡診斷書檢索，及全國癌症登記檔案及死亡診斷書檢索三種途徑。B型肝炎病毒帶原者，每半年至一年必須接受定期健康檢查，血清胎兒甲蛋白檢查結果不正常($>20\text{ng/ml}$)或超音波檢查發現腫塊的研究個案，均轉介到臺大醫院或長庚醫院做進一步確診。對於非B型肝炎病毒帶原者，每年進行血清胎兒甲蛋白之檢查。約有80%的個案定期接受健康檢查。而定期追蹤檢查可能會遺漏一些發生肝細胞癌的個案，所以使用公保死亡給付檔案之死亡診斷書檢索、

全國癌症登記檔案及死亡診斷書檢索，以確保追蹤的完整性。

自民國77年8月追蹤至84年1月31日為止，共有50名個案在追蹤期間罹患肝細胞癌，而肝細胞癌的診斷標準是採下列兩個條件之一：(1)病理學或細胞學證實；(2)血清胎兒甲蛋白大於400ng/ml，而且至少一項影像檢查為陽性，包括：腹部超音波及血管顯影、電腦斷層掃描。本研究以追蹤期間發生肝細胞癌且有庫存尿液檢體的研究個案為病例組，黃麴毒素代謝產物是以研究個案進入研究時所採集的尿液檢體進行分析。對照組的選取是利用隨機抽樣的方式，由追蹤期間未發生肝細胞癌的世代個案中選取與肝細胞癌病例在年齡(±3歲)及採集檢體時間(相同季節)配對的個案做為對照，對於每名肝細胞癌病例，選取一名B型肝炎帶原者及一名B型肝炎非帶原者為對照個案，可觀察B型肝炎病毒是否會影響黃麴毒素的代謝。50名罹患肝細胞癌者，其中有43名個案有庫存尿液檢體。因此，有43對病例對照進入分析。

實驗方法

本研究之B型肝炎病毒表面抗原是以放射免疫分析法(radioimmunoassay)測定(Abott Laboratories, North Chicago, IL)，血清C型肝炎病毒抗體是利用第二代酵素免疫分析法(enzyme immunoassay)測定(Abott Laboratories, North Chicago, IL)，初次檢定為陽性者，經重複檢定亦為陽性，始判定為陽性。

尿液黃麴毒素G₁(AFG₁)和黃麴毒素B₁及其各種代謝產物，包括：黃麴毒素M₁(AFM₁)、黃麴毒素P₁(AFP₁)及黃麴毒素-鳥糞嘌呤鍵結物(AFB₁-N⁷-guanine adduct)，是參照Orti等人研發的方法[21]，以逆相高效率液相色層分析儀(reversed-phase HPLC)測定。標準品AFM₁、AFP₁、AFG₁、AFB₁(Sigma, St. Louis, MO)是以苯：氰甲烷(98：2，V/V)的溶劑進行稀釋；黃麴毒素-鳥糞嘌呤鍵結物(AFB₁-N⁷-guanine adducts)標準品，參照Martin和Garner之標準方法製備[22]，是以甲醇進行稀釋。

統計方法

本研究採用SAS 6.04版及PECAN軟體進行各項統計分析。尿液黃麴毒素代謝產物間的相關係數以皮爾森相關係數(Pearson's correlation coefficient)為指標，並以t檢定分析相關係數的統計顯著意義。病例組和對照組黃麴毒素代謝產物濃度之差異是以中位數檢定(median test)進行。對於分組資料，AFM₁及AFP₁是以對照組尿液黃麴毒素分佈之三分位數為分組標準，AFM₁分為≤1.6、1.7-2.8、>2.8三組，AFP₁分為≤1.6、1.7-3.3、>3.3三組。AFB₁-N⁷-guanine adducts是以對照組尿液黃麴毒素分佈之最高四分位數為分組標準，分為無、>0且≤0.38、>0.38三組。病例組和對照組分佈之差異是以卡方檢定進行，單變項及多變項調整化配對對比值，是以條件對數複迴歸分析計算。

結果

病例組的平均年齡±標準差為50.95±9.97歲，對照組的平均年齡±標準差為51.33±9.87歲。所有的研究對象AFM₁均為陽性，AFP₁在病例組及對照組均有81.4%為陽性；AFB₁-N⁷-guanine adducts在病例組有48.8%陽性，對照組有39.5%陽性；AFB₁在病例組有41.9%陽性，對照組有20.9%陽性；AFG₁在病例組有9.3%陽性，對照組有14.0%陽性。黃麴毒素總量為AFM₁+AFP₁+AFB₁-N⁷-guanine adducts+AFB₁+AFG₁。HBsAg陽性對照組和HBsAg陰性對照組的黃麴毒素總量，AFM₁和AFP₁之中位數並無統計上顯著差異。但病例組黃麴毒素總量的中位數(6.85ng/ml)和對照組黃麴毒素總量的中位數(4.97ng/ml)之差異達顯著意義(P=0.01)。

病例組和對照組尿液黃麴毒素代謝產物之比較

表一為肝細胞癌病例和所有配對對照之各種尿液黃麴毒素代謝產物的比較，黃麴毒素總量的濃度愈高，罹患肝細胞癌的相對危險性愈高(趨勢檢定；P=0.055)。

量濃度大於6.9ng/ml者和小於3.0者比較，配對對比值為2.72(95%信賴區間：0.99-7.51； $P=0.053$)。AFM₁的濃度愈高，罹患肝細胞癌的相對危險性也愈大(趨勢檢定； $P=0.029$)，AFM₁濃度大於2.8ng/ml者和小於1.6者比較，配對對比值為2.90(95%信賴區間為1.06-7.92； $P=0.038$)。雖然罹患肝細胞癌的相對危險性也有隨AFP₁和AFB₁-N⁷-guanine adducts濃度的增加而增加的趨勢，但沒有統計上顯著的意義。尿中代謝產物可預測得AFB₁者，罹患肝細胞癌的配對對比值為2.52(95%信賴區間：1.16-5.49； $P=0.02$)。尿液可測得AFG₁者之罹患肝細胞的相對危險性較低，但並未達到統計顯著意義。如果只有HBsAg陽性肝細胞癌病例和其HBsAg陽性配對對照組比較，各種尿液黃麴毒素代謝產物和肝細胞癌相關之相對危險性趨勢分析結果亦相似。

表二是肝細胞癌病例、HBsAg陽性對照及HBsAg陰性對照之尿液黃麴毒素代謝產物間之相關性比較。在HBsAg陰性對照組，

AFM₁和AFB₁-N⁷-guanine adducts，AFM₁和黃麴毒素總量、AFB₁-N⁷-guanine adducts和黃麴毒素總量及AFB₁和AFG₁均有顯著正相關，AFM₁及AFB₁-N⁷-guanine adducts和黃麴毒素總量的相關係數各為0.99和0.71，但AFP₁和黃麴毒素總量沒有顯著相關。在HBsAg陽性對照組，AFM₁及AFP₁和黃麴毒素總量有顯著正相關；相關係數各為0.87和0.42，但AFB₁-N⁷-guanine adducts和黃麴毒素總量無顯著相關。在病例組，AFM₁和AFB₁、AFP₁和黃麴毒素總量及AFB₁和黃麴毒素總量之間有顯著正相關。AFP₁和黃麴毒素總量間之相關係數為0.94，但AFM₁及AFB₁-N⁷-guanine adducts和黃麴毒素總量無顯著相關。

表三為肝細胞癌病例、HBsAg陽性對照組及HBsAg陰性對照之特殊黃麴毒素代謝產物佔總黃麴毒素百分比的比較。HBsAg陰性對照組之AFM₁佔總黃麴毒素的百分比高於HBsAg陽性對照組及肝細胞癌病例組，但以對照組AFM₁佔總黃麴毒素百分比分佈的中位

表一 43名肝細胞癌病例及86名配對對照黃麴毒素代謝產物(ng/ml)分佈之比較

尿液黃麴毒素 代謝產物	分組	病例組 人數 (%)	對照組 人數 (%)	配對 對比值	(95%信賴區間)	P值
總黃麴毒素	≤3.0 ^{a+}	8(18.60)	28(32.56)	1.00		
	3.1-6.9	14(32.56)	29(33.72)	1.76	(0.62-5.01)	0.291
	>6.9	21(48.84)	29(33.72)	2.72	(0.99-7.51)	0.053
AFM ₁	≤1.6 ^{a*}	9(20.93)	28(32.56)	1.00		
	1.7-2.8	10(23.26)	29(33.72)	1.07	(0.38-3.02)	0.893
	>2.8	24(55.81)	29(33.72)	2.90	(1.06-7.92)	0.038
AFP ₁	≤1.6 ^a	15(34.88)	39(45.35)	1.00		
	1.7-3.3	10(23.26)	23(26.74)	1.28	(0.48-3.41)	0.619
	>3.3	18(41.86)	24(27.91)	2.22	(0.85-5.78)	0.102
AFB ₁ -N ⁷ -guanine	無	22(51.16)	52(60.47)	1.00		
	>0且≤0.38 ^b	15(34.88)	26(30.23)	1.37	(0.61-3.08)	0.445
	>0.38	6(13.95)	8(9.30)	1.83	(0.55-6.13)	0.328
AFB ₁	無	25(58.14)	68(79.07)	1.00		
	有	18(41.86)	18(20.93)	2.52	(1.16-5.49)	0.020
AFG ₁	無	39(90.70)	74(86.05)	1.00		
	有	4(9.30)	12(13.95)	0.63	(0.19-2.09)	0.453

^a 以對照組尿液黃麴毒素分佈之三分位數為分組標準

^b 以對照組尿液黃麴毒素分佈之最高四分位數為分組標準

⁺ 趨勢檢定； $P=0.055$

^{*} 趨勢檢定； $p=0.029$



數(61.2%)分組，較高AFM₁佔總黃麴毒素百分比並沒有隨肝細胞癌HBsAg陽性對照及HBsAg陰性對照三種狀態顯著減少的趨勢。AFP₁佔總黃麴毒素的百分比在HBsAg陰性對照

組，較低於HBsAg陽性對照組及病例組，而HBsAg陽性對照組和病例組相似，以對照組AFP₁佔總黃麴毒素百分比之中位數(46.5%)分組，較高AFP₁佔總黃麴毒素百分比顯著隨著

表二 肝細胞癌病例、HBsAg陰性對照及HBsAg陽性對照之尿液黃麴毒素代謝產物間之相關性比較

		AFP ₁	AFB ₁ -N ⁷ -guanine	AFB ₁	AFG ₁ 黃麴毒素總量 ^a	
AFM ₁	HBsAg陰性對照組	-0.03	0.68*	-0.08	-0.10	0.99*
	HBsAg陽性對照組	-0.08	-0.12	-0.04	-0.06	0.87*
	病例組	-0.10	-0.05	0.31*	-0.04	0.24
AFP ₁	HBsAg陰性對照組		0.08	0.23	-0.15	0.13
	HBsAg陽性對照組		0.28	0.08	-0.08	0.42*
	病例組		0.07	0.24	-0.02	0.94*
AFB ₁ -N ⁷ -guanine	HBsAg陰性對照組			-0.05	-0.08	0.71*
	HBsAg陽性對照組			0.30	-0.12	0.14
	病例組			-0.06	-0.11	0.15
AFB ₁	HBsAg陰性對照組				0.32*	-0.03
	HBsAg陽性對照組				-0.07	0.02
	病例組				0.27	0.34*
AFG ₁	HBsAg陰性對照組					-0.12
	HBsAg陽性對照組					-0.08
	病例組					-0.03

^a黃麴毒素總量為：AFM₁+AFP₁+AFB₁-N⁷-guanine+AFB₁+AFG₁

*P<0.05

表三 肝細胞癌病例及其配對對照特殊黃麴毒素代謝產物佔總黃麴毒素百分比之比較

特殊黃麴毒素代謝產物佔總黃麴毒素百分比	分組	病例組 人數(%)	HBsAg陽性對照組 人數(%)	HBsAg陰性對照組 人數(%)	趨勢檢定之P值 ^a
AFM ₁ %	≤37.6% ^b	14(32.56)	15(34.88)	13(30.23)	0.38
	37.6-77.6%	17(39.53)	18(41.86)	11(25.58)	
	>77.6%	12(27.91)	10(23.26)	19(44.19)	
AFP ₁ %	≤24.9% ^b	14(32.56)	15(34.88)	24(55.81)	0.05
	24.9-57.6%	16(37.21)	15(34.88)	8(18.60)	
	>57.6%	13(30.23)	13(30.23)	11(25.58)	
AFB ₁ -N ⁷ -guanine%	無	22(51.16)	24(55.81)	28(65.12)	0.19
	0-7.5% ^c	19(44.19)	15(34.88)	11(25.58)	
	>7.5%	2(4.65)	4(9.30)	4(9.30)	
AFB ₁ %	無	25(58.14) [*]	34(79.07)	34(79.07)	0.03
	有	18(41.86)	7(20.93)	9(20.93)	
AFG ₁ %	無	39(90.70)	38(88.37)	36(83.72)	0.33
	有	4(9.30)	5(11.63)	7(16.28)	

^a檢定特殊黃麴毒素代謝產物佔總黃麴毒素之百分比是否隨肝細胞癌，HBsAg陽性及HBsAg陰性的變化有顯著趨勢

^b以黃麴毒素代謝產物的三分位數分組

^c以對照組中特殊黃麴毒素代謝產物佔總黃麴毒素百分比分佈之中位數分組

^{*}病例組和HBsAg陽性對照組間有統計顯著差異；P<0.05

肝細胞癌病例、HBsAg陽性對照、HBsAg陰性對照三種狀態減少($P=0.05$)。肝細胞癌病例組及HBsAg陽性對照組之尿液可偵測得AFB₁-N⁷-guanine adducts的百分比比較高於HBsAg陰性對照組，但此百分比並未隨肝細胞癌病例、HBsAg陽性對照及HBsAg陰性對照有顯著變化的趨勢。病例組之尿液可偵測得AFB₁的百分比顯著高於對照組，而HBsAg陽性對照組和HBsAg陰性對照組相似。尿液可偵測得AFG₁的百分比隨肝細胞癌病例、HBsAg陽性對照及HBsAg陰性對照三種狀態顯著上升，但趨勢檢定未達統計顯著差異。

黃麴毒素和肝細胞癌關係的分層分析

43名病例中，採尿至發生肝細胞癌時間在兩年以下有22名(51.2%)，大於兩年有21名

(48.8%)。採尿至發生肝細胞癌時間大於兩年者之尿液黃麴毒素總量、AFM₁、AFP₁及AFB₁-N⁷-guanine adducts濃度，和時間間隔兩年以下者比較，並沒有顯著差異。表四為AFM₁在其他危險因子不同暴露狀況下的相對危險性。對於無抽菸習慣者，無喝酒習慣者，年齡50歲以下者，隨AFM₁濃度增加，罹患肝細胞癌的相對危險性上升，除了年齡50歲以下者，AFM₁和罹患肝細胞癌的危險性有邊緣性統計相關外，其餘相對危險性的趨勢檢定均有顯著統計意義。但對於有抽菸習慣者、有喝酒習慣者、年齡大於50歲者，AFM₁和罹患肝細胞癌的危險性無顯著相關。

多變項分析

多變項條件對數複迴歸分析結果如表五

表四 AFM₁在其他肝細胞癌危險因子不同暴露情況下和發生肝細胞癌的關係

變項	分組		AFM ₁		
			≤1.6 人數(%)	1.7-2.8 人數(%)	>2.8 ^a 人數(%)
抽菸	無	對照組	20(33)	19(32)	21(35)
		病例組	4(17)	6(25)	14(58)
		危險對比值	1.0	1.6	3.3*
	有	對照組	8(31)	10(38)	8(31)
		病例組	5(26)	4(21)	10(53)
		危險對比值	1.0	0.6	0.5
喝酒	無	對照組	22(34)	21(33)	21(33)
		病例組	5(17)	7(23)	18(60)
		危險對比值	1.0	1.5	3.8*
	有	對照組	6(28)	8(36)	8(36)
		病例組	4(31)	3(23)	6(46)
		危險對比值	1.0	0.6	1.1
年齡	≤ 50	對照組	16(37)	12(28)	15(35)
		病例組	4(18)	6(27)	12(55)
		危險對比值	1.0	2.0	3.2*
	> 50	對照組	12(28)	17(40)	14(32)
		病例組	5(24)	4(19)	12(57)
		危險對比值	1.0	0.6	2.1

* $P<0.05$; +: $0.05<P<0.1$

^a以對照組黃麴毒素分佈的三分位數分組

所示。在控制抽菸喝酒習慣、C型肝炎病毒抗體陽性狀態及教育程度以後，尿液黃麴毒素總量和肝細胞癌的危險性呈邊緣性統計相關，濃度最高組和最低組比較，配對對比值介於2.5-3.0倍間。尿液AFM₁濃度愈高，罹患肝細胞癌的相對危險性愈高，濃度最高組和最低組比較，配對對比值介於3.0-4.0倍間，有統計上顯著意義。如果以42名HBsAg陽性肝細胞癌病例及其HBsAg陽性配對對照進行多變項條件對數複迴歸分析，在控制多重危險因子以後，黃麴毒素總量及AFM₁濃度愈高，和肝細胞癌的相對危險性亦增加，結果和表五相近。

討 論

在臺灣地區，以往對黃麴毒素和肝細胞癌的研究，侷限於病例對照研究和生態相關研究[3,23]。這些研究皆有測量個人黃麴毒素暴露量的困難，且無法釐清黃麴毒素和肝細胞癌間的因果時序關係。本研究採重疊病例對照研究，以測量尿液黃麴毒素代謝產物來估計個人黃麴毒素暴露情形，採尿時間在發生肝細胞癌以前，雖然採尿季節不同、尿液保存時間長短、保存狀況好壞及解凍次數的多寡，可能會影響尿液黃麴毒素代謝產物的濃度，但因本研究在對照組的選取上，採與病例採尿時間配對方式，病例組和對照組的尿液檢體採集和貯存條件一致，故僅可能導致尿液黃麴毒素和肝細胞癌的相對危險性低估。

各種尿液黃麴毒素代謝產物佔黃麴毒素總量的百分比，以AFM₁最高，此觀察結果和以往的流行病學研究[24,25]及動物實驗[26]一致。黃麴毒素總量和AFM₁的相關係數，在HBsAg陰性對照組最高，HBsAg陽性對照組次之，而在肝細胞癌病例組沒有顯著相關，反之；黃麴毒素總量和AFP₁的相關係數在肝細胞癌病例組最高，HBsAg陽性對照組次之，而在HBsAg陰性對照組無顯著相關。AFM₁佔黃麴毒素總量的百分比在HBsAg陰性對照組最高，而在肝細胞癌病例組最低，AFP₁所佔黃麴毒素總量的百分比，在肝細胞癌病例組最高，而在HBsAg陰性對照組最低。在人類肝組織研究中，肝腫瘤組織比週邊非腫瘤組織代謝AFB₁產生AFP₁的比例亦較高[27]。是否HBV慢性感染及/或肝細胞癌早期病理變化會影響黃麴毒素代謝途徑，值得進一步探討。

臺灣地區過去對肝腫瘤組織的研究，黃麴毒素B₁-DNA陽性率為70%左右[28]。在本研究中，各種尿液黃麴毒素代謝產物測量值的範圍，和Qian等在中國大陸上海的研究相似，但本研究尿液可偵測得任一黃麴毒素代謝產物的陽性率為100%，而上海的研究只有40.8%。本研究和上海的研究均是以高效率液相層析法測量尿液黃麴毒素，可能偵測的極限並無很大的差異存在，顯示臺灣地區黃麴毒素的暴露至少和上海地區的暴露量近似，一般臺灣地區的民眾日常生活中黃麴毒素的暴露來源，值得深入研究。

表五 肝細胞癌危險因子之多變項條件對數複迴歸模式分析(所有研究個案均進入分析)

變項	分組	模式1(43配對) 危險對比值(95%CI)	模式2(43配對) 危險對比值(95%CI)	模式3(37配對) 危險對比值(95%CI)	模式4(37配對) 危險對比值(95%CI)	模式5(37配對) 危險對比值(95%CI)	模式6(37配對) 危險對比值(95%CI)
抽菸	1-5932包·年	0.94(0.28-3.14)	1.11(0.32- 3.81)	1.74(0.43-7.01)	2.04(0.49- 8.44)	1.49(0.37- 6.10)	1.74(0.43- 7.01)
	>5932包·年	2.32(0.84-6.37)	3.38(1.13-10.14)*	2.16(0.67-6.90)	3.23(0.92-11.37)*	1.96(0.57- 6.67)	2.71(0.71-10.29)
喝酒	有習慣性喝酒	0.97(0.40-2.36)	0.78(0.31- 1.97)	1.28(0.46-3.53)	1.02(0.35- 2.96)	1.16(0.41- 3.30)	0.97(0.33- 2.86)
Anti-HCV	陽性			1.14(0.24-5.39)	1.02(0.22- 4.78)	1.20(0.25- 5.77)	1.10(0.23- 5.36)
教育程度	高中(職)以上					0.39(0.12- 1.21)	0.35(0.10- 1.19)
黃麴毒素總量	3.1-6.9	1.77(0.59-5.26)		2.16(0.63- 7.41)		2.22(0.64- 7.70)	
	>6.9	2.72(0.95-7.79)*		3.34(0.98-11.45)*		2.97(0.86-10.27)*	
AFM ₁	1.7-2.8		0.89(0.30-2.62)		1.11(0.32- 3.78)		1.31(0.36- 4.76)
	>2.8		3.12(1.11-8.80)*		4.05(1.21-13.53)*		4.25(1.24-14.71)*

*P<0.05

*0.05<P<0.1

Qian等在上海的重疊病例對照研究，指出尿液可偵測得黃麴毒素代謝產物和發生肝細胞癌有顯著相關，相對危險性為4.0倍，尿液黃麴毒素代謝產物中，以AFB₁-N⁷-guanine adducts和肝細胞癌的相對危險性7.6倍最高[19]。本研究單變項分析結果顯示，罹患肝細胞癌的危險性隨尿液黃麴毒素總量及大多數黃麴毒素代謝產物的增加而上升。黃麴毒素總量及AFM₁和肝細胞癌危險性有顯著劑量效應關係，調整了抽菸、喝酒習慣、C型肝炎病毒抗體陽性狀態及教育程度後，尿液黃麴毒素總量及AFM₁和肝細胞癌仍具有顯著統計相關，和黃麴毒素總量低於3.0ng/ml者比較，尿液黃麴毒素總量6.9ng/ml以上者罹患肝細胞癌的相對危險性介於2.5-3.0倍間，AFM₁最高濃度(>2.8ng/ml)罹患肝細胞癌的相對危險性介於3-4倍間。另外；Qian等在上海的研究，發現可偵測得尿液任一黃麴毒素代謝產物的肝細胞癌相對危險性只有3.4倍，而HBsAg帶原狀態的相對危險性只有7.3倍，但若同時B型肝炎帶原且尿液可偵測得黃麴毒素代謝產物，相對危險性高達59.4倍[19]。由於本研究中只有一名病例是HBsAg陰性，因此B型肝炎病毒慢性感染和黃麴毒素間的交互作用有待進一步研究。

尿液黃麴毒素代謝產物只能反映2-3天的黃麴毒素暴露情形，本研究僅以研究個案進入研究時的尿液檢體進行黃麴毒素分析，若研究個案的飲食習慣在追蹤期間有所改變，則可能導致相對危險性的估計發生偏差，由於本研究個案進入研究時並未罹患肝細胞癌，因此本研究以進入研究時的尿液檢體進行黃麴毒素分析所產生的黃麴毒素暴露的錯誤分組，屬於和疾病狀態無關的錯誤分組(non-differential misclassification)，只會低估尿液黃麴毒素和肝細胞癌二者間的相關，在這情形下，如果尿液黃麴毒素代謝產物和肝細胞癌仍有顯著相關，可見其可能真有相關存在。

本研究之肝細胞癌病例採尿至發病期間介於兩個月至五年間，尿液黃麴毒素較高者是真正攝食黃麴毒素量較大，或是由於臨床前期病理變化改變攝食習慣或黃麴毒素的吸

收、分佈和排泄？本研究結果發現採尿至發生肝細胞癌時間兩年內及兩年以上的病例之黃麴毒素代謝產物濃度並無顯著差異，甚且是兩年以上的病例尿液黃麴毒素代謝產物濃度較高於兩年以下的病例，顯示早期肝細胞癌的病理變化並不會使本研究的相對危險性高估。

AFM₁和肝細胞癌的相對危險性在不抽菸、不喝酒，或年齡50歲以下者較高。對於此現象，目前沒有確切的解釋，但很有趣的發現，肝細胞癌病例有抽菸者的黃麴毒素暴露量較不抽菸者為低，是否臺灣地區沒有抽菸喝酒習慣者發生肝細胞癌的危險因子，除了B型肝炎病毒以外，主要是黃麴毒素，有待進一步研究。另外，和較年老者比較，較年輕者的各種尿液黃麴毒素代謝產物的作用皆較為顯著，是否黃麴毒素的暴露有加速肝細胞癌病理發展的作用，也值得未來探討。

本研究發現尿液黃麴毒素代謝產物和發生肝細胞癌有顯著相關。未來利用尿液黃麴毒素代謝產物作為生物標記，應用在高危險群(如：澎湖群島的當地居民)的監測(monitoring)期能減少黃麴毒素的暴露，以降低黃麴毒素的危害。

誌謝

感謝Drs. Regina M. Santella及謝玲玲教授AFB₁-N⁷-guanine標準品之製備，國科會研究補助NSC 84-2331-B-002-183，NSC 85-2331-B-002-264經費補助，特予誌謝。

參考文獻

1. Colomb M. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1992; **15**:225-36.
2. Yu MW, You SL, Chang AS, Lu SN, Liaw YF, Chen CJ. Association between hepatitis C virus antibodies and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1991; **51**: 5621-5.
3. Chen CJ, Liang KY, Chang AS et al. Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking,

- cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991; **13**:398-406.
4. Chen CJ, Yu MW, Wang CJ, Huang HY, Lin WC. Multiple risk factors of hepatocellular carcinoma: a cohort study of 13737 male adults in Taiwan. *J Gastroen Hepatol* 1993; **8(suppl.)**:s83-7.
 5. Yu MW, Hsieh HH, Pan WH, Yang CS, Chen CJ. Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995; **55**:1301-5.
 6. Yu MW, Chen CJ. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993; **53**:790-4.
 7. Palmer JR, Rosenberg L, Kaufman DW, Ellen Warshauer M, Stolley P, Shapiro S. Oral contraceptive use and liver cancer. *Am J Epidemiol* 1989; **130**:878-82.
 8. Beasley RP. Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma: epidemiologic considerations. *Hepatology* 1982; **2(suppl.)**:21s-6.
 9. Cullen JM, Ruebner BH, Hsieh LS, Hyde DM, Hsieh DP. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male fisher rat compared to aflatoxin B₁. *Cancer Res* 1987; **47**:1913-7.
 10. IARC Monographs (1987). Suppl. 7. "Evaluation of carcinogenic risk to humans." pg. 83-7, IARC Press, Lyon.
 11. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; **350**:427-8.
 12. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; **350**:429-31.
 13. Dragan YP, Pitot HC. Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In: Eaton DL, Groopman JD, eds. *The toxicology of aflatoxins*. New York: Academic Press, 1994, pp179-98.
 14. Van Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, Van DerWatt JJ, Vincent TJ, Purchase IF. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br J Cancer* 1985; **51**:713-26.
 15. Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Cancer Res* 1989; **49**:2506-9.
 16. Campbell TC, Chen J, Liu C, Li J, Parpia B. Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the People's Republic of China. *Cancer Res* 1990; **50**:6882-93.
 17. Bulatao-Jayme J, Almero EM, Castro MCA, Jardeleza MTR, Salamat LA. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *Int J Epidemiol* 1982; **11**:112-9.
 18. Srivatanakul P, Parkin DM, Khlat M et al. Liver cancer in Thailand. II. A case-control study of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1991; **48**:329-32.
 19. Qian GS, Ross RK, Yu MC et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; **3**:3-10.
 20. 湯淑英：食物中的黃麴毒素與肝癌。食品工業 1978; **10**:18-29.
 21. Orti DL, Grainger J, Ashley DL, Hill RH. Chromatographic and spectroscopic properties of hemiacetals of aflatoxin and sterigmatocystin metabolites. *J Chromatogr* 1989; **462**:269-279.
 22. Martin CN, Garner RC. Aflatoxin B₁-ox-



- ide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acid. *Nature* 1977; **267**: 863-5.
23. Hatch MC, Chen CJ, Levin B et al. Urinary aflatoxin levels, hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Int J Cancer* 1993; **54**:931-4.
24. Groopman JD, Donahue PR, Zhu J, Chen J, Wogan GN. Aflatoxin metabolism in humans : detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:6492-6.
25. Zhu JQ, Zhang LS, Hu X et al. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. *Cancer Res* 1987; **47**:1848-52.
26. Groopman JD, Hasler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN. Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N⁷-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/ high performance liquid chromatography. *Cancer Res* 1992; **52**:267-74.
27. Kirby G, Wolf CR, Neal G, Srivantanakul P, Wild C. Metabolism of aflatoxin B₁ by human liver tissue from Thailand. *Am Asso Cancer Res* 1993; **34**:162.
28. Chen CJ, Zhang YJ, Lu SN, Santella RM. Aflatoxin B₁ DNA adducts in smeared tumor tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; **16**:1150-5.

URINARY AFLATOXIN METABOLITES AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA—A NESTED CASE-CONTROL STUDY

JU-PING LIEN¹, MING-WHEI YU^{1,2}
YUN-FAN LIAW³, CHIEN-JEN CHEN¹

In order to elucidate the association between aflatoxin exposure and hepatocellular carcinoma (HCC), a cohort of 4841 male asymptomatic chronic hepatitis B virus (HBV) carriers and 2501 male non-carriers aged 30 years or above was recruited from Government Employees Central Clinics and the Liver Unit of Chung-Gung Memorial Hospital between August, 1988 and June, 1992. There were 43 newly-developed HCC cases identified during follow-up periods. For each case, one HBV carrier and one HBV non-carrier were randomly selected as controls from cohort members without HCC. Cases and controls were matched with respect to age (within 3 years) and the

season of urine collection. Correlation among various urinary aflatoxin metabolites were quite different for HCC cases, chronic HBV carriers, and HBV non-carriers. The relative risk of developing HCC was increased with urinary levels of total aflatoxins, aflatoxin P₁, aflatoxin M₁, aflatoxin-N⁷-guanine, and aflatoxin B₁. After adjusting for other risk factors, urinary level of total aflatoxins and aflatoxin M₁ were associated with the development of HCC. The relative risks of HCC associated with urinary aflatoxin M₁ were more marked among individuals aged less than 50 years and those who smoked or drunk. (*Chin J Public Health. (Taipei): 1997; 16(5): 417-427*)

Key words: *Aflatoxin, Hepatocellular carcinoma, Nested case-control study*

¹Institute of Epidemiology, College of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

²Department of Public Health, College of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

³Liver Unit, Chang-Gung Memorial Hospital and Chang-Gung Medical College, Taipei, Taiwan.

