

# 健康食品之關節保健功效評估方法（草案）

## 壹、前言

退化性關節炎（osteoarthritis）是目前最常見的成人關節相關疾病，亦是引起關節疼痛及行動不便之主因。除了隨著年齡增加關節開始老化，外傷或是肥胖也會造成退化性關節炎。退化性關節炎的主要症狀為關節疼痛，另外也會出現關節僵直、變形、滑液囊發炎腫脹等症狀，從而影響病人的行動能力，甚至生活品質。

退化性關節炎的形成是一種新陳代謝活動及動態的過程，牽涉的範圍可能擴及整體關節組織（軟骨、硬骨、滑液膜/囊、韌帶和肌肉），會慢慢造成軟骨局部的磨損和骨刺的生長。所有的滑液囊關節隨著年齡的增長都會產生退化性關節炎，在受過傷的關節更易發生，尤其以膝關節最為常見。雖然疼痛跟關節彎曲角度受限是退化性關節炎常見的徵候，但臨床上也常見沒有疼痛的關節退化現象，有時在體檢時會看到 X-光檢查結果已有初期之退化性關節炎。關節軟骨的損傷與骨刺的生長，有可能造成關節周邊韌帶的鬆弛、關節周邊肌肉無力及滑液囊的發炎，若不及早保護，則會加速退化性關節炎的發生。這些變化，起因於關節損傷與修復間平衡的改變。退化性關節炎的病程進展通常是緩慢無感的，但最終會導致關節疼痛及無力，而影響行動能力。所以提早注意關節之保健是延緩退化性關節炎發生的不二法門。

研究健康食品對退化性關節炎之保護效果，應進行動物實驗或人體食用研究。人體食用之研究可採用西安大略及麥可馬司特大學關節炎量表（Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index, WOMAC）。該量表是一種可靠、經過驗證的評估方法，在臨床關節炎研究中廣泛使用，以量化關節炎患者的功能狀態。該評估有 3 個分類量表，共 24 個項目：分為疼痛 5 項，僵硬 2 項和身體活動困難程度 17 項，其分類或總量表分數愈低，代表較佳的功能狀態。

研究退化性關節炎的動物模式，常用的主要包含「藥物誘發關節炎」及「手術誘導關節不穩定」二種方式：

一、藥物誘發關節炎：於關節腔中直接注射分解軟骨基質的酵素，如木瓜蛋白酶

素、蛋白酵素、透明質酸酵素和膠原蛋白酵素，曾於小鼠、大鼠和兔中使用，其作用在消化軟骨基質，從而導致軟骨損傷。於關節腔注射抑制醣解作用之 monosodium iodoacetate 亦可誘發類似退化性關節炎的軟骨變化。在關節內注射細胞激素，如 interleukin-1，也被用來誘發退化性關節炎。然而，這些物質的注射僅適合作為早期退化性關節炎進程之測試研究。

二、手術誘導關節不穩定：此誘導的退化性關節炎模型被廣泛用於研究創傷誘導的退化性關節炎。前十字韌帶切除 (Anterior cruciate ligament transection, ACLT) 及 ACLT+內側半月板切除 (ACLT+medial menisectomy, ACLT+MMx) 是最常用的動物模型。ACLT 被廣泛應用於大型或小型動物中。經此手術後，在狗、兔及大鼠各於 4~32 週、2~12 週和 2~20 週會顯示出早期退化性關節炎的症狀，並造成組織學上的改變。在 ACLT+MMx 大鼠模型中，退化性關節炎的症狀則是於手術後 2~6 個星期內即可明顯觀察到。手術誘導之退化性關節炎的大鼠模式，建議使用 10 週齡或以上骨骼發育成熟的動物，盡可能模擬人類退化性關節炎的發展。

本評估方法之目的在於進行下列「人體食用研究」或「動物實驗」，以驗證受試產品之關節保健功效。

## 貳、評估實驗要件與檢測方法

本評估試驗得選擇「人體食用研究」或「動物實驗」之一進行。試驗原始數據紀錄必須保留供查核。

### 一、人體食用研究

#### (一)執行單位與執行人

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或具公信力之研究機構執行，以維持客觀與可靠性，並應遵循人體研究法。試驗計畫主持人必須具備足夠關節炎與疼痛評估相關之專業背景與研究經驗或著作。試驗必須有相關專長的醫師參與，且事先須通過執行單位或相關之人體研究倫理審查委員會 (Institutional review board, IRB) 或研究倫理委員會 (Research ethics

committee, REC) 之核准，才得開始進行試驗，並遵循衛生機關對健康食品人體食用研究之相關規定。試驗報告須檢附 IRB 或 REC 同意書。

## (二) 受試對象

### 1. 納入條件：

- (1) 年齡 45 歲~80 歲之男性或女性門診患者。
- (2) 有以 X-光判讀為 Kellgren-Lawrence Grading Scale 第 1 級或 2 級的初期退化性關節炎症狀，且醫師判定不需長期治療者。
- (3) WOMAC 疼痛量表分數>2.0 或 WOMAC 總量表分數>12。

### 2. 排除條件：

- (1) 有膝關節外傷，或膝關節手術（含內視鏡手術）病史者。
- (2) 一個月內曾服用過消炎類止痛藥物者。
- (3) 曾因退化性關節炎服用過類固醇藥物治療的病患。
- (4) 有嚴重心血管、嚴重腦血管、嚴重風濕病或嚴重精神疾病患者。

### 3. 退出標準：

試驗執行過程中，醫師可視患者對疼痛耐受程度開立止痛藥物（如乙醯胺酚），並視其劑量及頻率評估是否退出試驗，惟患者接受消炎類止痛藥物治療後須退出此試驗。

## (三) 試驗分組模式與人體食用研究規劃細部說明

1. 分組：將符合納入條件的受試者隨機雙盲分成兩組，完成人體食用研究的可評估受試者須至少 80 位。

- (1) 試驗組：食用受試產品
- (2) 對照組：食用安慰劑

### 2. 試驗規劃

試驗前先確認其納入及排除條件，並接受第一次主觀量表 WOMAC 之評估。該量表分析關節疼痛、僵硬感、活動困難程度，以作為該受試者的基礎值。後續每隔 4 週回診一次，接受 WOMAC 量表評估其改變程度。試驗期間為 12 週。

### 3. 安全性監測（必測）

- (1) 一般狀況：記錄受試者在試驗期間定期回診時之體溫、體重、血壓、脈搏、呼吸次數。
- (2) 尿液常規檢查（第 0 及 12 週）。
- (3) 心電圖檢查（第 0 及 12 週）。
- (4) 血液常規檢查：試驗前（第 0 週）、中期（第 4 及 8 週）及後期（第 12 週）抽血測量血中紅血球細胞數目、白血球細胞數目、血紅素、血容比、平均紅血球體積、血小板項目。
- (5) 血液生化分析：試驗前（第 0 週）、中期（4、8 週）及後期（12 週）抽血測量血脂質[Triglyceride (TG)、Total Cholesterol、Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)及 High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)]、血糖、肝功能[Aspartate aminotransferase (AST)、Aspartate aminotransferase (ALT)、 $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT)、albumin)]以及腎功能（尿素氮、肌酸酐及尿酸）。

其測定方法由上述血液檢測項目認證合格之教學醫院/醫事檢驗機構[如：Taiwan Accreditation Foundation (TAF)或 College of American Pathologists (CAP)認證]利用全自動血液學分析儀器分析。

#### (四) 受試人數

將受試者依照性別進行隨機分配，使每組人數為相同數量，且每組中男女人數儘量各半，完成人體食用研究的可評估受試者須至少 80 位，且試驗組及對照組的可評估受試者數量須平均。

#### (五) 評估測量方法說明

每次回診時，受試者接受 WOMAC 量表評估，分別取得其關節疼痛、僵硬感、活動困難度，與其基礎值相減，作為其各項指標之改變情況。

#### (六) 試驗劑量

試驗劑量應比照產品上市之建議劑量，且必須在安全合理範圍內。安全性第二類以上產品，於執行人體食用研究前，應先進行安全性評估試驗，以

足夠之安全倍數做為人體食用研究之測試劑量。

### **(七)數據之分析**

試驗組與對照組於基礎值分別評估關節疼痛、僵硬感、活動困難程度共三大類 24 項數據，分為關節疼痛 0~20 分，僵硬感 0~8 分，活動困難程度 0~68 分，總共 0~96 分。統計時就 WOMAC 三大類分數及總分，以第 12 週回診數據減去基礎值做為功效評估指標。並在 0、4、8 及 12 週，以 Analysis of Covariance (ANCOVA)分析其 WOMAC 關節疼痛、僵硬感、活動困難程度等三大類分數減去基礎值之改變趨勢。

### **(八)測定數據與結果之判定**

**主要試驗指標：**在 12 週試驗後，WOMAC 關節疼痛分數減去基礎值之兩組間差異。

### **(九)試驗結果統計分析與宣稱**

統計方法可使用 One-Way ANCOVA，以基礎值為共變量 (covariate) 進行統計分析。經人體食用研究 WOMAC 量表評估，以其 12 週後回診的 WOMAC 關節疼痛分數減去基礎值，兩組間數據改變的差異值需有統計上顯著差異 ( $p < 0.1$ )。且其中的三大項 (關節疼痛、僵硬感及活動困難程度) 之統計結果皆無呈現負面效應，則該產品可宣稱有助於改善關節不適、減少活動限制。

## **二、動物實驗**

### **(一)執行單位與執行人**

本評估試驗原則上應委託具有充分設備之國內外大學食品、營養、醫藥等相關研究所、教學醫院以上之醫療機構或其他受託研究機構執行，以維持客觀與可靠性。試驗計畫主持人必須具備足夠關節炎與疼痛評估相關之專業背景與研究經驗或著作。

### **(二)實驗動物**

動物必須來自公立研究機構、公私立大學或其他經中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。實驗應遵循行政院農業委員會發布之實驗動物管理與使

用之相關指引，必須事先經過執行單位之實驗動物照護及使用委員會或小組審查通過後執行，並需檢附核准證明文件。實驗使用 10 週齡以上之骨骼發育成熟雄性 Wistar 或 SD 大鼠（體重約 300 克±10%）。

### **(三) 動物之飼養**

實驗動物之飼養遵循實驗動物照護及使用委員會或小組核准之程序以及行政院農業委員會最新發行版本之《實驗動物管理與使用指南》。動物飼養環境需維持 12 小時日/夜週期，溫度維持在 23±2°C、濕度維持約 55%。

### **(四) 實驗設計與方法**

#### **1. 退化性關節炎之動物模式**

單側（右後肢）膝關節，可選用下列任一方法：

- (1) 前十字韌帶切除 (ACLT)。
- (2) 內側半月板切除 (MMx)。
- (3) 不穩定內側半月板 (Destabilization of the medial meniscus, DMM)。
- (4) 前述 3 種手術方法之組合。
- (5) 關節腔中直接注射分解軟骨基質的酵素，如木瓜蛋白酶。

手術流程需嚴格執行開創部位的剃毛和消毒，器械和材料的滅菌及人員無菌操作，並需於術前及術後三天注射廣效抗生素，例如 cefazolin 100 mg/kg/day，以避免手術部位感染。

#### **2. 實驗分組**

實驗動物區分為假手術或假注射組（作為誘發關節炎之對照組）、手術或注射誘發關節炎控制組（未餵食受試產品）及實驗組（於誘發關節炎組餵食 3 組不同劑量之受試產品）。3 組劑量介於相當於 0.5 倍到 3 倍成人建議劑量，其中包含 1 組相當於 1 倍成人建議劑量。每組至少 8 隻完成試驗。

#### **3. 受試產品餵食方式**

受試產品必須經由口服途徑進行試驗，視受試產品特性選擇下列合適方式餵食給予：

(1) 受試產品以經口胃管餵食模式：

根據每隻動物定期測量（至少每周一次）之體重換算出餵食之受試產品劑量，以口胃管餵食。

(2) 直接混加受試產品於動物飼料模式：

若受試產品是以混入飼料的方式給予，則須以每隻或每組為單位，試驗期間每 1-2 天測量飲食的消耗量，同時測量並扣除食物掉落量，換算成實際的受試產品消耗量，再根據每隻動物定期測量（至少每周一次）之體重校正為受試產品實際攝食劑量（mg/kg）。應在試驗開始前及在適當時機進行受試產品於飼料之安定性與純度的量與質之測量。

#### 4. 實驗操作流程

動物於第 0 週進行單側（右後肢）膝關節手術或注射酵素以誘發關節炎。僅切開關節腔但未切除對側膝關節之假手術或注射生理食鹽水則作為無關節炎對照組。其測量數據為自體右後肢（關節炎）及左後肢（正常）之差異比較。手術前先測量動物之體重、膝關節之寬度，並且記錄正常情況下之雙足平衡壓力值作為基礎值。手術後隔天開始以口服投予其受試產品，餵食頻率依不同產品特性給予。

手術後每週測量一次體重及膝關節寬度，每兩週進行雙足平衡測試（Incapacitance test），以評估餵食之受試產品對於關節發炎和疼痛之保護程度；一般而言，動物餵食受試產品至 12 週，可將動物犧牲取其膝關節組織後，進行後續的組織學分析，但亦可依據不同之動物試驗模式來縮短或延長餵食受試產品之週數。

#### 5. 實驗動物與人體間劑量之換算

(1) 受試產品以經口胃管餵食模式：

以管灌方式給予受試產品時，一般的認知，身體的新陳代謝速率與其體表面積的相關性，明顯超過與其體重之相關性。然而，要精確測量其體表乃非常不易，而即使在同一物種（species）內之體表，

其與體重間並沒有一簡單正確的公式可換算，且其關係又會隨著體重和體型的改變而與體表之關係係數呈現不規則的變異，因此在實驗期間之試驗劑量要維持與其代謝率之固定相關性；或人體與動物間之試驗劑量要精確的換算有其實際的困難。

本評估方法的人體與高等實驗動物間試驗劑量間之換算，原則上根據 2005 年美國食品藥物管理局所公告之實驗初期估算方法 (Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers)，而以 60 公斤之成人為基準。使用高等實驗動物進行試驗時，其劑量之換算原則上以人體每日每公斤體重之建議攝取量 (/kg bw/day) 的 6.2 倍作為大鼠之 1 倍劑量，其他動物或更詳細的換算可參閱該方法 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 另換算之。本換算方法適用於根據每天每隻動物之個別體重變異而換算出應給予直接管灌之受試產品劑量。此劑量換算方法提供業界參考，非強制性依據，但使用其他換算方法時，應檢附其明確之資料來源。

**(2) 直接混加受試產品添加於動物飼料模式：**

受試產品直接混加於飼料中飼養時，動物與人體之間的換算原則為以設定每人每日攝取 500 克乾重食物為基準，而健康成人之受試產品建議攝取量 (例如 10 克) 除以 500 克之百分比 (例如 2%)，則其為受試產品混加於動物飼料中 1 倍劑量的百分比(2%)；試驗時，得使用數種劑量進行試驗，以統計分析(建議使用 Duncan's Multiple Range Test) 比較出最適劑量百分比後，500 克乘以該百分比可得健康成人的建議每天攝取量。

**(五) 功效測定指標與測定方法**

**必測項目：**

- 1. 改善雙足負重功能之差異：雙足平衡測試**



雙足平衡測試用於測量後肢站立時的重量分配，用以評估動物關節疼痛不適的狀況。在正常情況下，大鼠後肢的重量分配會比較平均，雙足壓力差趨近於0；若大鼠單側膝關節損傷，未損傷側後肢需承受較多的重量，雙足的壓力差因疼痛而增加。大鼠後肢的重量分配以雙足平衡測試儀（Incapacitance tester）測量。大鼠將先經過訓練，在一個裝設65°傾斜板的壓克力箱中以後肢站立。正式測試時，此壓克力箱將置於雙足平衡測試儀上，讓大鼠自行以後肢站立，雙足平衡測試儀將分別測量兩隻後肢之壓力差，反覆進行5次後，取其平均值。

## 2. 軟骨保護之效果：進行膝關節之組織學分析

動物犧牲後，取出膝關節以10% formalin 固定48小時後，將膝關節浸泡於脫鈣液中28天進行脫鈣步驟。脫鈣完成後，以石蠟包埋組織後做石蠟切片（paraffin section），前後各切成5 μm 厚度之切片三片。隨後切片進行組織染色（包含HE染色與toluidine blue/fast green），利用顯微鏡觀察關節組織之平均形態變化，並以國際骨關節炎研究學會（Osteoarthritis Research Society International ,OARSI）所建議之大鼠關節組織學評分系統（The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat）摘錄之下列五點評估：

- (1) **軟骨基質流失寬度**（*Cartilage matrix loss width*），軟骨基質流失由表層軟骨破壞成纖維狀與基質流失開始，漸進惡化至更深層且更廣泛的基質流失，最終導致全層軟骨基質的損失。此項評估涵蓋軟骨厚度損失之幅度來計算，以軟骨基質流失嚴重度分為表層寬度（0%深度區，橫跨兩側完整軟骨區間內，任何基質流失之幅度），中間層寬度（50%深度區，軟骨基質流失已深達中間層），與潮線層寬度（100%深度區，基質已嚴重流失至潮線），將以上三項之寬度相加的總和為軟骨基質之流失幅度，以微米（μm）計算。
- (2) **軟骨退化評分**（*Cartilage degeneration score*）：主要以軟骨細胞損

傷死亡為主要評估標準。以膝關節脛骨內側承重平台劃出三等分區，各為外區（從關節內側邊緣起），中間區與內區（毗鄰十字韌帶膝關節之中央），以 0-5 分級評量損害程度多寡。每一區為 5 分，無損傷為 0 分，損害大於 75% 為最嚴重 5 分，三區總和滿分為 15 分。

(3) **總脛骨軟骨退化寬度** (*Total tibial cartilage degeneration width*): 評估脛骨軟骨表面受到任何退化表徵之寬度，以微米 ( $\mu\text{m}$ ) 計算。

(4) **脛骨軟骨顯著退化的寬度** (*Significant tibial cartilage degeneration width*): 評估脛骨軟骨表面受到顯著退化之表徵（以軟骨表面至浪潮標記(tidemark)的總厚度，有超過 50% 軟骨細胞損傷死亡之範圍），以微米 ( $\mu\text{m}$ ) 計算。

(5) **病灶的區域深度比** (*Zonal depth ratio of lesions*): 評估軟骨退化總深度比，如貳、二、(五)、2、(2)「軟骨退化評分」分成 3 區，以各區的病灶深度除以各區軟骨總厚度（軟骨表面至浪潮標記）磨損深度之比例計分，軟骨未有磨損為 0 分，全部磨損為 1 分，滿分為 3 分。

#### 選測項目：

**減少膝關節腫脹之效果：**測量膝關節寬度

在手術前及手術後，使用電子數位卡尺 (electronic digital caliper) 測定大鼠後肢膝關節之寬度，每週一次，直至實驗結束。

#### **(六) 安全性監測 (必測)**

為觀察攝取受試產品後是否會產生不良副作用，應於實驗結束前，動物應禁食 12 小時後犧牲，執行安全性監測。檢測指標如下：

##### **1. 全套血液檢查 (Complete blood count, CBC)**

以含有抗凝劑試管收集腹腔靜脈或尾靜脈的血液後，利用全自動血液學分析儀器分析包括白血球數、嗜中性球、淋巴球、單核球、嗜酸性球、嗜鹼性球、紅血球數、血紅素、血球容積、平均血球容積、紅血球血紅素平均值、紅血球血紅素平均濃度、紅血球分佈寬度及血小板。

## 2. 血脂質—TG、Total Cholesterol、LDL-C 及 HDL-C 濃度

收集腹腔大動脈或尾靜脈的血液離心後，利用酵素法及比色原理，或血液生化自動分析儀器分析 TG、Total Cholesterol、LDL-C 及 HDL-C。

## 3. 血糖

收集腹腔大動脈或尾靜脈的血液離心後，利用酵素法及比色原理，或血液生化自動分析儀器分析血糖。

## 4. 肝功能—血中 AST、ALT 活性

收集腹腔大動脈或尾靜脈的血液離心後，利用酵素法及比色原理，或血液生化自動分析儀器分析測量血中 AST 及 ALT 活性。

## 5. 腎功能—血中尿素氮、尿酸、肌酸酐濃度及尿液常規項目

利用酵素法及比色原理，或血液生化自動分析儀器分析測量血中尿素氮、尿酸及肌酸酐含量。收集實驗動物尿液後，再以尿液試紙做尿液常規檢驗。

### (七)實驗結果統計分析與結果判定

1. 改善雙足負重功能之差異：以 Repeated measure ANOVA 及 Tukey's multiple comparison test 做分析雙足差異，以  $p < 0.05$  達到顯著差異。
2. 軟骨保護之效果：以 One-way ANOVA 及 Tukey's multiple comparison test 分析 OARSI 五項指標，其中需有三項指標在統計上  $p < 0.05$ ，達到顯著差異。
3. 減少膝關節腫脹之效果：以 Repeated measure ANOVA 及 Tukey's multiple comparison test 分析大鼠後肢膝關節寬度， $p < 0.05$  達到顯著差異。

上述實驗結果中，受試產品於必測項目「改善雙足負重功能之差異」及「軟骨保護之效果」兩項目，與手術誘導或藥物誘發組別相較，須均無負向效應。若雙足平衡測試達到顯著差異，方可宣稱具有改善患肢的負重功能之效果。若膝關節之組織學分析達到顯著差異，則可另宣稱具有保護關節軟骨之效果。在雙足平衡測試和膝關節組織學分析同時達到顯著差異，

方可同時宣稱具有改善雙足負重功能和軟骨保護之效果。選測項目結果中，膝關節寬度達顯著差異時，方可宣稱具有減少膝關節腫脹之效果。

### 參、保健功效之宣稱

1. 受試產品以本評估方法推薦之人體食用研究，以 WOMAC 關節炎量表評估，有明確統計結果顯示改善時，可向中央衛生主管機關申請為「健康食品」，得宣稱：「有助於改善關節不適、減少活動限制」。
2. 受試產品以本評估方法推薦之動物實驗進行研究，其雙足平衡測試有明確統計結果顯示改善時，可向中央衛生主管機關申請為「健康食品」並得宣稱「經動物實驗結果證實，攝取本產品有助於改善患肢的負重功能」。另膝關節之組織學分析有明確統計結果顯示軟骨保護改善效果時，方得宣稱：「經動物實驗結果證實，攝取本產品有助於軟骨之保護」。若測量膝關節寬度有明確統計結果顯示改善時，得增加宣稱具有「減少膝關節腫脹之效果」。
3. 受試產品同時經人體食用研究有明確統計結果顯示改善，及動物實驗兩項必測項目有明確統計結果顯示改善者，得宣稱為：「有助於改善關節不適、減少活動限制及延緩退化」。