

熱原動物替代試驗方法-單核球活化試驗法之建立

林伯霖 黃俊翔 彭怡瑄 鄧子華 許家銓 黃守潔 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

熱原(Pyrogen)來自於細菌、病毒、真菌及其相關代謝物等，進入人體後可能驅動先天免疫系統活化，導致發燒、發炎、休克甚至多重器官衰竭。因此，針對無菌製劑及注射液等，中華藥典均訂有熱原試驗規定，以避免熱原污染之產品流入市面。傳統實驗兔熱原試驗(Rabbit Pyrogen Test)為常用之熱原檢測方法，為配合衛生福利部於「藥品查驗登記審查準則」增列「熱原試驗應以非活體動物替代方式優先」，推動替代(Replacement)、減少(Reduction)、精緻化(Refinement)之3R政策，部分產品得以細菌內毒素檢驗法(Bacterial Endotoxin Test, BET)替代，惟BET仍具侷限性，僅能檢測革蘭氏陰性菌之脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)。為此，本研究擬評估單核球活化試驗法(Monocyte Activation Test, MAT)用於檢測檢品中潛在熱原之可行性，依據中華藥典「單核球活化試驗法(通則3011)」進行方法A之預實驗，使用市售MAT套組對細菌內毒素標準品進行測試、分析該方法於檢品(分別使用2種抗蛇毒血清)之干擾因子試驗、偵測非內毒素熱原(Non-Endotoxin Pyrogen, NEP)對此系統之適用性及偵測系統之干擾試驗。結果顯示，MAT適用於抗蛇毒血清之熱原檢測，後續以此方法進行常規檢驗，測試結果熱原含量分別為小於16 IU/mL及小於2 IU/mL。未來將持續評估不同蛇種的抗蛇毒血清與人體血清蛋白等的適用性，以提供國內醫藥品製造廠建立非活體熱原替代試驗法之參考。

關鍵詞：熱原、單核球活化試驗、抗蛇毒血清

前 言

「熱原」為進入動物體內導致其發熱的物質，典型之熱原如：革蘭氏陰性菌細胞壁的LPS^(1,2)，又稱為細菌內毒素(Endotoxin)。當病人注射到受細菌內毒素污染之產品時，會刺激先天免疫系統，如巨噬細胞、單核球、樹突細胞及嗜中性球等釋放出內源性細胞激素，造成病人有發炎、休克及多重器官衰竭等嚴重症狀，甚至導致病人死亡^(1,2)。因此，無菌製劑、注射液及侵入式醫材等皆於中華藥典定有熱原

試驗之相關規範，傳統熱原試驗為兔熱原試驗⁽³⁻⁵⁾。

兔熱原試驗的原理是以兔子為實驗動物，將待測檢品注入實驗兔，以儀器測量被施打之實驗兔體溫是否上升，以判定檢品是否含有熱原。此試驗之優點是可檢測出細菌內毒素與非細菌內毒素之熱原，但僅能作為定性試驗，無法判斷檢品中所含熱原之多寡⁽⁶⁾。除此之外，實驗兔個體、飼養環境及人為施打等不同干擾，皆會影響試驗結果。此試驗也不適用於部分藥物，如放射性藥品、化療藥品、細胞

激素、止痛劑、免疫抑制劑及細胞治療產品等⁽⁶⁾，加上近幾年來，動物保護與實驗用兔品質不一等議題，皆可能影響此試驗之進行⁽⁶⁾。

BET為另一種熱原檢測法。1956年Bang等人發現將蠶(*Limulus polyphemus*)的變形血球(Amebocyte)以無菌水脹破後所萃取之溶質，會與多種革蘭氏陰性菌結合後產生果膠樣的半透明膠狀物質⁽⁷⁾。因此當受檢之醫療用品或注射液被革蘭氏陰性菌污染時，蠶血液萃取溶質可與內毒素於37°C經半小時至1小時內產生凝集反應。依此原理，人們利用蠶血開發蠶試劑，進行細菌內毒素試驗，運用此試劑與檢品進行反應，可做為檢品中內毒素定性及定量之用⁽⁷⁾。BET之優點為偵測靈敏度高，但亦有其侷限性，例如只能針對革蘭氏陰性菌細胞壁上的脂多醣體進行檢測，無法檢測出其他NEP，如革蘭氏陽性菌脂蛋白(Lipoproteins)、肽聚醣(Peptidoglycan)、脂磷壁酸(Lipoteichoic acids, LTA)、病毒及細菌的去氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)⁽⁷⁾。此外，部分脂質體、奈米顆粒、細胞治療產品及會干擾此凝集系統之藥品，亦無法適用於此試驗。

MAT為近年來新興之體外熱原試驗法⁽⁸⁻¹¹⁾，其原理係利用並偵測可促使人單核球(Monocytes)或單核細胞(Monocytic cells)在內毒素刺激下，所釋放之內源性介質(Endogenous mediators)成分，包含：腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、介白素-1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)、介白素-6 (Interleukin-6, IL-6)等，皆為促發炎細胞激素(Pro-inflammatory cytokines)，於發熱致病機轉中扮演重要角色^(10,11)。

表一為上述3種熱原試驗之比較表，MAT不僅可以替代活體動物試驗，亦可檢測內毒素及NEP。自2009年，歐洲藥典第七版即收錄MAT作為免熱原試驗之替代試驗⁽⁵⁾。2012年美國FDA公告熱原與內毒素測試指南(Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxin Testing)中提

到，經確效之MAT得用於替代內毒素試驗，而欲以MAT替代免熱原試驗則視個案處理⁽¹²⁾。而我國於102年6月14日，前行政院衛生署食品藥物管理局公告修正中華藥典第七版之通則，增訂「單核球活化試驗法」，並自102年7月1日起生效，後續於105年收錄於中華藥典⁽¹³⁾。另於102年6月25日前行行政院衛生署公告修正「藥物優良製造準則」第21條，以及102年7月30日衛生福利部公告修正「藥品查驗登記審查準則」第10條，皆增列「熱原試驗應以非活體動物替代方式優先」。

為因應歐洲藥典及中華藥典先後收載MAT，且2021年歐洲藥典委員會第170次會議中決議在5年內，完全刪除歐洲藥典中的免熱原測試，以達成減少活體熱原試驗之目的，本研究依據中華藥典「單核球活化試驗法(通則3011)」所載之方法A進行相關評估，選用市售MAT套組(PyroMAT)作為方法材料，並以2種市售抗蛇毒血清(抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清與抗百步蛇毒血清)為待測檢品進行預試驗，以確保試驗之精密度及有效性，依序進行計算檢品最大有效稀釋度(Maximum Valid Dilution,

表一、三種熱原試驗比較

	實驗兔熱原試驗	細菌內毒素檢驗法	單核球活化試驗
原理	實驗兔免疫反應	內毒素與蠶試劑反應	人類先天免疫反應
使用動物	是	是(蠶試劑)	無
檢測污染物	內毒素與非內毒素	內毒素	內毒素與非內毒素
靈敏度	差(5 IU/mL)	佳(0.03 IU/mL)	中(0.19 $\pm$ 0.10 IU/mL)
限制	定性試驗	定量或定性試驗	定量或定性試驗
技術與發展	成熟	成熟	開發與驗證中
動物保護議題	有	可能有	無

MVD)，確認標準曲線符合規範、檢品干擾因子試驗判定、可檢測出內毒素及非內毒素污染物(如，金黃色葡萄球菌細胞壁成分LTA)及檢品對於偵測系統之干擾等各項預試驗分析⁽¹³⁾。接著以MAT對市售抗蛇毒血清進行常規檢驗，確認常規檢驗之可行性。期在未來，作為國內醫藥品製造廠建立非活體熱原替代試驗法之參考。

材料與方法

一、材料與設備

(一)材料

1. 人類單核球細胞(Cryopreserved human monocytic mono-mac-6 cells, MM6, PyroMatcells, Merck, Germany)
2. PyroMAT system monocyte activation test (MAT)試劑套組(Merck, Germany)，套組詳細內容物請參考表二
3. 內毒素標準品(Reference standard endotoxin, RSE, 10,000 IU/vial, Merck, Germany)
4. 熱致死金黃色葡萄球菌(Heat-killed

Staphylococcus aureus, HKSA, Merck, Germany)

5. 鞭毛蛋白(Flagellin, FLA, Merck, Germany)
6. 市售抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清(National health research institutes, Taiwan)
7. 市售抗百步蛇毒血清(National health research institutes, Taiwan)

(二)設備

1. 生物安全操作櫃(Class-II-A2, Bioquell, UK)
2. 離心機(KUBOTA 1720, Japan)
3. Vortex Genie II 振盪器(伯昂興業股份有限公司，臺灣)
4. 細胞培養箱(PHCBI, Japan)
5. 八爪微量分注器(Eppendorf, Germany)
6. 微量吸量管(Gilson, USA)
7. 酵素免疫分析儀(ELISA reader, BioTek, USA)
8. 數據分析軟體Gen5 Secure Software (Agilent, USA)

表二、PyroMAT system monocyte activation test (MAT)套組內容物

品項	說明	含量
96-well plate	96-wells plate for cell incubation	1 plate
assay diluent	buffered protein base with preservatives	11 mL
color reagent A	stabilized hydrogen peroxide	12 mL
color reagent B	stabilized chromogen tetramethylbenzidine	12 mL
IL-6 conjugate	polyclonal antibody specific for human IL-6 conjugated to horseradish peroxidase with preservatives	21 mL
IL-6 microplate	12 strips of 8 wells each, coated with a monoclonal antibody specific for human IL-6	1 plate
plate sealers	adhesive strips	4 strips
RPMI	cell culture medium, with L-glutamine and HEPES	50 mL
stop solution	2N sulfuric acid	6 mL
wash buffer	25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives	21 mL
water	endotoxin-free water	125 mL

二、方法

(一)內毒素標準溶液製備

取內毒素標準品(10,000 IU/vial) 1瓶，加入無熱原水5 mL，劇烈振盪30分鐘混勻，使標準品濃度為2,000 IU/mL，並以每管體積50 μ L分裝於各個微量離心管中，儲藏於-80°C冰箱，作為儲備液(Stock solution)。實驗前，取分裝後的儲備液，加入950 μ L無熱原水回溶，使其濃度為100 IU/mL，並劇烈振盪3分鐘混勻，配製成各個稀釋度，以進行後續標準曲線的繪製。

(二)NEP標準溶液製備

取NEP標準品一瓶(包括HKSA與FLA)，依原廠說明書所示，HKSA加入無熱原水1 mL，FLA加入無熱原水500 μ L，劇烈振盪1分鐘混勻製備為原倍測試液，並以每管體積50 μ L分裝於各個微量離心管中，儲藏於-20°C冰箱，作為儲備液。

實驗前，取分裝後的儲備液，加入450 μ L無熱原水回溶，使其濃度為1/10倍測試液，並劇烈振盪3分鐘混勻。後續以無熱原水稀釋至1/500倍，添加至檢品，另稀釋至1/1,000倍作為 PyroMAT套組的陽性對照組。

(三)細胞培養

取配製好各濃度的內毒素標準溶液、NEP標準溶液及待測檢品，加到96孔無熱原微量細胞培養盤中，添加量為每格50 μ L。接著取MM6細胞於37°C水浴進行解凍1分鐘，再以1:10 (v/v)的比例，將MM6細胞與以37°C預熱的RPMI培養基，於50 mL無菌離心管溫和混合，離心去除DMSO，接著以20 mL的RPMI培養基回溶，取上述細胞液每格添加200 μ L於96孔盤中。後續將96孔盤置於細胞培養箱(37°C，不含CO₂)培養22 $\pm$ 2小時。

(四)IL-6測定

以八爪微量分注器取稀釋液(Assay diluent) 100 μ L，加入96孔盤各個位置中，再以微量吸量管取細胞培養完成之盤內之上清液100 μ L，加到IL-6 ELISA microplate之96孔盤相對應的位置，貼上封膜於室溫培養2小時。之後將上清液倒出，以清洗緩衝液400 μ L清洗盤內，共清洗4次，並將盤中剩餘水漬拍乾，之後於每格加入IL-6接合試劑(IL-6 conjugate) 200 μ L，貼上封膜於室溫培養2小時。接著將上清液倒出再以清洗緩衝液400 μ L清洗盤內，共清洗4次並將盤中剩餘水漬拍乾。呈色前將先將顯色劑A (Color reagent A)與顯色劑B (Color reagent B)以1:1 (v/v)的比例進行混合，並於每格加入呈色混合液200 μ L進行呈色，於室溫避光20分鐘，最後加入終止液50 μ L終止反應，以酵素免疫分析儀進行OD₄₅₀與OD₆₃₀的吸光值測定。

(五)方法驗證

根據中華藥典(下稱藥典)第九版通則3011⁽¹³⁾，在建立MAT時，為確保試驗之精密度與有效性，需先計算檢品MVD，並進行內毒素標準曲線之製作、檢品干擾因子試驗、非內毒素單核球活化污染物之確效分析及偵測系統之干擾等試驗，本研究分別以二、方法所建立流程進行以下試驗。

1. 計算MVD

MVD是指可偵測污染物限量濃度內所允許之檢品最大稀釋倍數。MVD係根據內毒素參考標準品計算而得，其計算公式如下：

$$MVD = "CLC \times C" / "LOD"$$

CLC：污染物限量濃度(Contaminant Limit Concentration)。

C：檢品溶液濃度。

LOD：偵測極限(Limit of Detection)。

CLC是以每mg、每mL或每生物活性單位(Unit of Biological Activity)之待測檢品中所含內毒素含量(Endotoxin Equivalents)表示，並據此判定是否符合內毒素規範。

2. 標準曲線之建立

取分裝後的內毒素標準品，加入950 μ L無熱原水稀釋，使其濃度為100 IU/mL，並劇烈振盪3分鐘混勻後，進行連續稀釋配製0.8 IU/mL、0.4 IU/mL、0.2 IU/mL、0.1 IU/mL、0.05 IU/mL、0.025 IU/mL以及0.0125 IU/mL，並以上述濃度繪製標準曲線，其規範須符合下列兩項：

- a. 反應與劑量對數值的迴歸分析應符合統計之顯著性($p < 0.01$)。
- b. 反應與劑量對數值之線性關係沒有統計之顯著偏離($p > 0.05$)。

3. 待測檢品之配製及干擾因子試驗

本研究中之檢品有兩項，分別為市售抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清及市售抗百步蛇毒血清，取此兩種檢品分別以無熱原水進行稀釋，其稀釋度不可超過MVD。待檢品稀釋至各個適當的濃度後，添加內毒素標準品，並使檢品中所含之內毒素標準品的最終濃度為0.2 IU/mL，最後計算回收率，回收率規範為50~200%。

4. 非內毒素單核球活化污染物分析

除了細菌內毒素外，此試驗亦可用於偵測NEP，因此必須確認此方法對檢品的適用性。取適當稀釋濃度之檢品，添加NEP標準品，包括HKSA與FLA，並依照MAT試劑套組使用手冊步驟，使檢品中所含之NEP標準品最終濃度為1/1,000倍。為證明此方法可用於偵測NEP，合格規範訂為NEP標準品的OD值須大於LOD的OD值，且添加非內毒素熱源標

準品的檢品，其回收率需在50~200%。

5. 偵測系統之干擾

當待測檢品的最佳稀釋倍數確定後，需測試檢品濃度是否干擾標準品於偵測系統之讀值。將最佳稀釋倍數的待測檢品，添加於標準品之各稀釋濃度，並與不含待測檢品之標準品讀值比較，其差異應在 $\pm 20\%$ 以內。

(六)數據分析

將上述各試驗之IL-6測定結果，皆以OD₄₅₀扣除OD₆₃₀的吸光值進行計算，並使用數據分析軟體(Gen5 Secure Software)建立標準曲線、計算檢品回收率及定量檢品所含污染物等。

結果與討論

一、分析MVD

根據藥典所定義之CLC，其計算公式： $CLC = K/M$ ，K為產生發熱反應之閾值(Threshold)劑量，以每Kg體重單位劑量(IU/Kg)表示；M為產品每Kg體重之最大建議使用劑量，當產品須在固定時間內多次注射或連續輸注時，M為1小時內之最大總投予劑量。依據抗蛇毒血清仿單所載，檢體以10 mL回溶，設定成年人平均體重為70公斤，而抗蛇毒血清以靜脈注射，所以K值以5.0 IU/Kg代入。經計算後CLC為35 IU/mL。本研究中所使用之試驗套組，熱原的偵測極限為0.05 IU/mL，根據藥典公式 $MVD = CLC \times C/LOD$ 計算後，MVD的數值為700倍，後續檢品以原倍至稀釋320倍進行實驗。

二、內毒素標準曲線

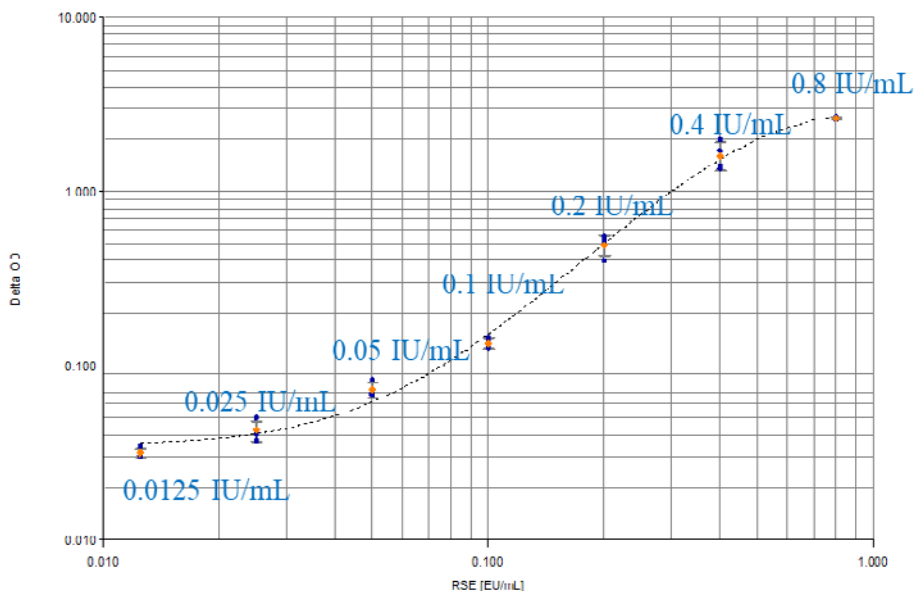
依據藥典對於內毒素標準曲線之規範，標準曲線至少需含4個內毒素標準品濃度。因此本研究將內毒素標準品以無熱原水進行稀釋至各濃度，分別為0.8 IU/mL、0.4 IU/mL、

0.2 IU/mL、0.1 IU/mL、0.05 IU/mL、0.025 IU/mL、0.0125 IU/mL，各濃度4重複，將其測定所得吸光值以Gen5 Secure Software分析軟體進行五變相邏輯分析統計(5 Parameter logistics curve)，製作標準曲線如圖一，曲線呈現S型，經軟體計算，迴歸分析的p值為0.000，小於0.01；而線性關係的p值為0.993，大於0.05，此標準曲線符合藥典之規範，可作為待測檢品計算內毒素含量之用。

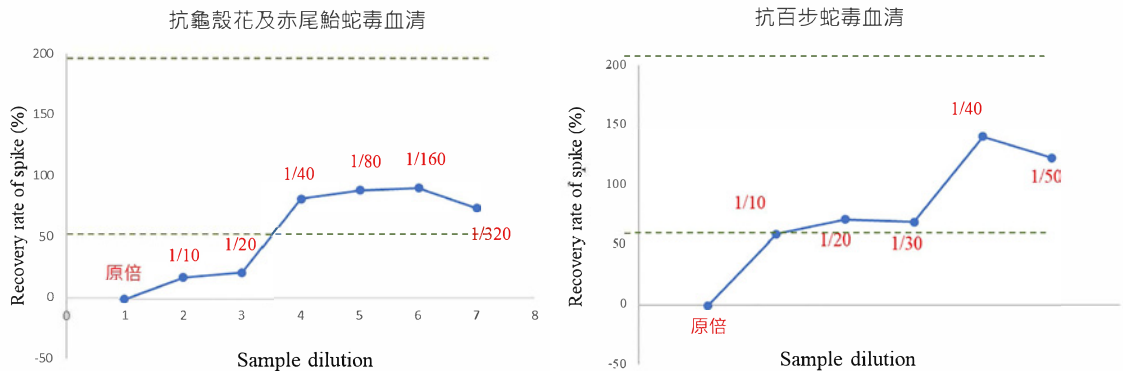
三、檢品干擾因子試驗

本研究以抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清與抗百步蛇毒血清兩種市售抗蛇毒血清為檢品分別進行稀釋，並各區分為控制組與添加組，在不超過MVD下，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清控制組的稀釋倍數為原倍至320倍，抗百步蛇毒血清控制組的稀釋倍數為原倍至50倍。添加組為將內毒素標準品添加至經稀釋後之各檢品中，最終濃度為0.2 IU/mL，使添加組濃度

為該稀釋倍率之檢品與0.2 IU/mL之內毒素標準品。續與人類單核球細胞進行培養後，再取上清液進行IL-6測定，最後以軟體分析計算各檢品稀釋度之回收率，若回收率介於藥典規定區間(50-200%)時，則判定檢品該稀釋度不會干擾本試驗，若回收率超出範圍，則判定檢品該稀釋度會干擾此試驗，若檢品經連續稀釋至MVD或採用其他排除干擾的方式仍無法達到回收率規範要求時，則判定不適用本法。圖二為兩種市售抗蛇毒血清之回收率，結果顯示，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清在原倍至20倍稀釋時內毒素添加之回收率皆小於50%，不符合規範(50-200%)，表示受到檢品的干擾。而在稀釋40倍至320倍，回收率達到70%以上，符合規範。抗百步蛇毒血清的內毒素添加之回收率結果，除原倍外在10倍稀釋後，回收率皆在50%以上，故在10倍稀釋後皆符合規範。後續之預試驗，包括內毒素型單核球活化污染物之確效分析及偵測系統之干擾，檢品需根據回



圖一、內毒素之標準曲線



圖二、不同稀釋倍數抗蛇毒血清添加內毒素標準品之回收率

收率規範，選擇適當的稀釋倍數來進行後續實驗，除了落在藥典規範的50-200%內，回收率越接近100%會越佳。因此，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清以80倍稀釋(回收率80.72%)；抗百步蛇毒血清以20倍稀釋(回收率70.57%)，選擇這兩個濃度作為最佳稀釋倍數，並進行後續實驗。

四、NEP分析

為確認此方法對檢品的適用性，應於預試驗時使用至少2種非內毒素之類鐸受體(Toll-Like Receptor, TLR)的配體，例如:肽聚醣、LTA、鞭毛蛋白及細菌全細胞萃取物等，因此本研究選擇使用HKSA及FLA來進行NEP分析。HKSA為NEP，可刺激單核細胞中的類鐸受體第二型(Toll-Like Receptor 2, TLR2)，並作為 PyroMAT系統的陽性對照組；FLA亦為NEP，可刺激單核細胞中的類鐸受體第五型(Toll-Like Receptor 5, TLR5)，可作為PyroMAT套組的陽性對照組。根據干擾因子實驗中所得到的結果，選用稀釋80倍的抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清、稀釋20倍的抗百步蛇毒血清，添加HKSA及FLA後，再與人類單核球細胞進行培養，取上清液進行IL-6測定，最後以軟體分析數據。表三為兩種市售抗蛇毒血清添加HKSA之吸光值結果，控制組HKSA之吸光值

表三、非內毒素熱原標準品HKSA之確效分析

	OD _{delta} (n = 4)	判定
STD (0.05 IU/mL, LOD)	0.0732 ± 0.0030	-
HKSA (control)	1.5513 ± 0.1941	檢出
抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清	0.0188 ± 0.0015	未檢出
抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清+ HKSA	1.3888 ± 0.0627	檢出，且回收率88.31%
抗百步蛇毒血清	0.0295 ± 0.0017	未檢出
抗百步蛇毒血清+ HKSA	1.5055 ± 0.2162	檢出，且回收率95%

備註：檢出表示可代入RSE標準曲線後並得到結果；未檢出表示結果< LOD。回收率需在50~200%。

(1.5513)大於LOD的吸光值(0.0732)，表示此實驗可以檢測到HKSA。添加與不添加HKSA標準品的檢品之差值分別為1.3700與1.4760，皆大於LOD的吸光值，表示皆可以在檢品中偵測到HKSA。表四為兩種市售抗蛇毒血清添加FLA之吸光值結果，控制組FLA之吸光值(1.3940)大於LOD的吸光值(0.0732)，表示此實驗可以檢測到FLA。添加與不添加FLA標準品的檢品之差值分別為1.4195與1.4067，皆大於LOD的吸光值，表示皆可以在檢品中偵測到FLA。綜合HKSA及FLA的實驗結果，此套組可偵測NEP，表示NEP可刺激人類單核球細胞。

表四、非內毒素熱原標準品Flagellin之確效分析

	OD _{delta} (n = 4)	判定
STD (0.05 IU/mL, LOD)	0.0732 ± 0.0030	-
Flagellin (control)	1.3940 ± 0.1119	檢出
抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清	0.0693 ± 0.0048	未檢出
抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清+ Flagellin	1.4888 ± 0.1029	檢出，且回收率101.83%
抗百步蛇毒血清	0.0908 ± 0.0650	未檢出
抗百步蛇毒血清+ Flagellin	1.4975 ± 0.0897	檢出，且回收率100.91%

備註：檢出表示可代入RSE標準曲線後並得到結果；未檢出表示結果< LOD。回收率需在50~200%。

胞，釋放促發炎細胞激素IL-6。因此單核球活化試驗不僅可以檢測內毒素熱原，NEP亦適用於此法。

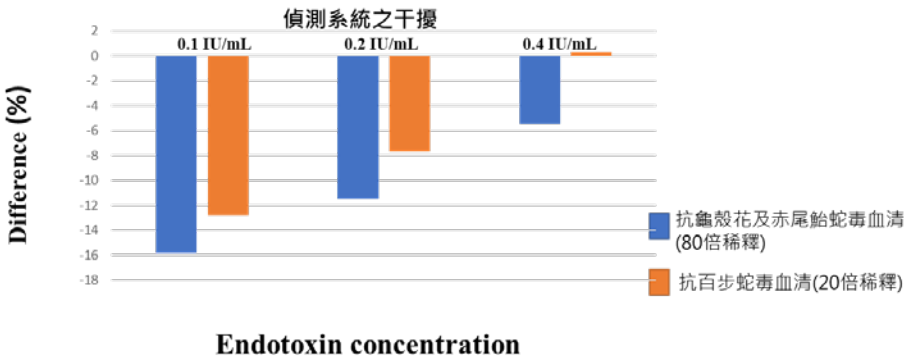
五、偵測系統之干擾

以檢品干擾因子試驗中所得最佳稀釋倍數，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清為稀釋80倍，抗百步蛇毒血清為稀釋20倍為檢品來進行後續實驗。添加不同濃度的內毒素標準品，使檢品的最終濃度分別為稀釋80倍及20倍，且其所含之3個內毒素最終濃度為0.1 IU/mL、0.2 IU/mL、0.4 IU/mL，再與人類單核球細胞進行培養後，取上清液進行IL-6測定，最後以軟體分析計算偵測系統之干擾。圖三是兩種抗蛇毒血清的偵測系統之干擾結果，2者皆符合藥典規範的± 20%內，因此單核球活化試驗亦適用於

此2種抗蛇毒血清。

六、常規檢驗分析

完成預實驗並確認皆符合規範後即進入常規檢驗，根據藥典方法A常規檢驗之規範為在標準曲線中須至少4濃度4重複、空白試驗組之OD值須小於0.1、反應與劑量對數值的迴歸分析應符合統計之顯著性(p<0.01)以及反應與劑量對數值之線性關係沒有統計之顯著偏離(p>0.05)，在試驗檢品中須執行3稀釋濃度且其回收率皆應落在50~200%範圍內。對於檢品合格與否的判定為經稀釋倍數與濃度校正後，若由3稀釋濃度之試液重複試驗結果計算之平均相當內毒素含量均小於待測檢品之CLC，則判定為合格。本研究對每種檢品進行3次獨立試驗，以驗證方法之穩定性。



圖三、抗蛇毒血清添加不同濃度內毒素標準品之偵測系統干擾結果

表五、方法A常規檢驗結果-抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清

	Assay 1	Assay 2	Assay 3
內毒素標準曲線 是否符合規範	Valid	Valid	Valid
非內毒素熱原之 檢測	Valid	Valid	Valid
檢品 1/80稀釋	74.1	89.9	87.9
回收率 1/160稀釋	68.5	98.9	75.9
(%) 1/320稀釋	55.3	77.1	57.1
結果	<16 IU/mL	<16 IU/mL	<16 IU/mL
是否合格 (< 35 IU/mL)	是	是	是

表五為抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清以方法A執行常規檢驗結果，3次獨立試驗之標準曲線經軟體計算，迴歸分析的p值為小於0.01，線性關係的p值為大於0.05，皆符合藥典之規範；檢品的3稀釋濃度回收率皆落在50~200%範圍內亦皆符合規範，接著進行檢品判定，由於檢品皆小於LOD(0.05 IU/mL)的OD值(數據未顯示)，表示檢品中所含的內毒素含量小於0.05 IU/mL，因此抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清內毒素3次獨立試驗之含量皆小於16 IU/mL ($0.05 \text{ IU/mL} \times 320$ 倍稀釋)，符合結果與討論一計算所得抗蛇毒血清之CLC(35 IU/mL)。

表六為抗百步蛇毒血清以方法A執行常規檢驗結果，同前操作，3次獨立試驗之標準曲線迴歸分析的p值為小於0.01，線性關係的p值為大於0.05；而檢品回收率皆落在50~200%範圍內，符合藥典之規範。在檢品判定上，由於檢品皆小於LOD(0.05 IU/mL)的OD值(數據未顯示)，表示檢品中所含的內毒素含量小於0.05 IU/mL，因此抗百步蛇毒血清內毒素3次獨立試驗之含量皆小於2 IU/mL($0.05 \text{ IU/mL} \times 40$ 倍稀釋)，亦符合抗蛇毒血清之CLC。

綜合上述結果，MAT可應用於前述2項抗蛇毒血清並能偵測非內毒素單核球活化污染物

表六、方法A常規檢驗結果-抗百步蛇毒血清

	Assay 1	Assay 2	Assay 3
內毒素標準曲線 是否符合規範	Valid	Valid	Valid
非內毒素熱原 之檢測	Valid	Valid	Valid
檢品 1/20稀釋	96.0	88.2	70.6
回收率 1/30稀釋	84.3	80.3	68.3
(%) 1/40稀釋	100.0	99.3	139.2
結果	<2 IU/mL	<2 IU/mL	<2 IU/mL
是否合格 (< 35 IU/mL)	是	是	是

(如，LTA與FLA)，做為另一新興體外熱原試驗。未來本研究將持續進行不同之市售套組及不同生物藥品之相關分析，期提供國內醫藥品製造廠建立非活體熱原替代試驗法之參考，協助其與國際法規發展接軌。

參考文獻

1. Mohanan P.V., Banerjee S., and Geetha. 2011. Detection of pyrogenicity on medical grade polymer materials using rabbit pyrogen, LAL and ELISA method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 : 1170-4.
2. Groote D.D., Zangerle P.F., Gevaert Y., *et al.* 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation, *Cytokine* 4: 239-48.
3. Morath S., Geyer A., and Hartung T. 2001. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Experimental Medicine* 193: 393-7.
4. Banerjee S., and Mohanan P.V. 2001. Inflammatory response to pyrogens determined by

- a novel ELISA method using human whole blood. *Journal of Immunological Methods* 369:146-53.
5. European Pharmacopoeia 10th ed. 2019. European Department for the Quality of Medicines. France.
 6. Schindler S., Bristow A., Cartmell T., *et al.* 2003. Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli. *Altex* 20: 59-63.
 7. Levin J., and Bang F.B. 1964. A description of cellular coagulation in the limulus. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 115: 337-45.
 8. Dijck P., and Voorde H. 1977. Factors affecting pyrogen testing in rabbits. *Developments in Biological Standardization* 34: 57-63.
 9. Hartung T., and Wendel A. 1996. Detection of pyrogens using human whole blood. *Altex* 9: 353-9.
 10. Katsuura G., Arimura A., Koves K., *et al.* 1990. Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 β -induced ACTH release. *American Journal of Physiology* 258:163-71.
 11. Mohanan P.V., Siddharth B., and Geetha C.S. 2010. An indigenously developed human whole blood assay for pyrogenicity: a comparative assessment. *Toxicology Letters* 196:37-51.
 12. Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. 2012. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. USA.
 13. 中華藥典第九版編修諮議會。2021。中華藥典第九版。衛生福利部食品藥物管理署，臺北。
 14. Allen D., Clippinger A., Morefield S., *et al.* 2019. Using the Monocyte Activation Test for Medical Devices. NICEATM poster: SOT 2019 Annual Meeting.

Establishment of Monocyte Activation Test (MAT) as Alternative In-Vitro Pyrogens Test Method

PO-LIN LIN, CHUN-HSIANG HUANG, YI-HSUAN PENG, TZU-HUA TENG,
JIA-CHUAN HSU, SHOU-CHIEH HUANG, SU-HSIANG TSENG
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Bacteria, viruses, fungi and their related metabolites are potential origins of pyrogens. Pyrogens may stimulate the innate immune system, leading to fever, inflammation, shock, and even multiple organ failure. Therefore, for sterile preparations and injectable solutions, the Taiwan Pharmacopeia (TWP) has established pyrogen test regulations to prevent products contaminated with pyrogens from entering the market. The rabbit pyrogen test (RPT) is commonly used for pyrogen detection. However, in response to the 3R policy promoted by the Ministry of Health and Welfare to prioritize *in vitro* pyrogen-test methods as alternatives for animal test, RPT has been replaced by the bacterial endotoxin test (BET) in certain products. However, BET still has limitations, such as it can only detect lipopolysaccharides (LPS) in Gram-negative bacteria. To address this issue, this study evaluated the feasibility of the MAT for detecting potential pyrogens in pharmaceutical products, and conducted a preparatory testing of Method A based on the “Monocyte activation test (General Chapter 3011)” in the TWP. A commercial MAT kit was used to test the bacterial endotoxin standard, analyze the interference factors, and evaluate the applicability of this method for detecting non-endotoxin contaminants and interference in the detection system. This study has accomplished both preparatory testing and routine testing evaluations of two venom antisera using the commercial MAT kit. The results showed that the MAT is applicable for venom antisera, and the pyrogen contents of two test samples was less than 16 IU/mL and less than 2 IU/mL, respectively. In the future, the applicability of different types of venom antiserum will be evaluated to provide reference for domestic pharmaceutical manufacturers to establish non-animal alternatives for pyrogen testing.

Key words: pyrogen, monocyte activation test, venom antiserum