



細胞治療與細菌內毒素偵測

撰文：熊泰綸

細胞治療產品與一般的注射針劑或是置入性的醫療器材相同，活細胞經過加工或是體外培養後注射進入人體，因此其中的內毒素也必須進行嚴密的監控，避免過量的內毒素在加工過程中產生，導致患者產生致命的發熱或免疫反應。

細菌內毒素與熱原

細菌內毒素(Bacterial Endotoxin)為熱原(Pyrogen)的主要來源之一，而內毒素主要來自革蘭氏陰性菌(Gram-Negative)細胞壁外層中的一種複合物，在細菌分裂或是死亡的過程中會被釋放出來。而其主要的成分為脂多醣(LPS, Lipopolysaccharide)，在化學的結構上由O-antigen、Core Oligosaccharide、以及Lipid A組成(圖1)，而Lipid A的結構域為主要的毒性原因，若被釋放到體內會引起致熱反應或敗血性休克，嚴重更有可能引發瀰漫性血管內凝結(DIC, Disseminated Intravascular Coagulation)。另外，內毒素具有高度的熱穩定性，若要去其活性，在藥典法規中建議進行30~45分鐘250°C以上的乾熱處理進行去熱原(Depyrogenation)。

早期偵測熱原試驗法為使用兔子進行動物實驗，將待測的檢品直接的注射至兔子的體內，再藉由偵測肛溫的方式觀察其發熱反應。而該試驗方式在1976年的Annual Review of Medicine中被提出「向人或是動物重複投予LPS，會導致一些生物效能逐漸地減少，發熱就是其中的一項」。因此，使用鰲魚血液來源的LAL(Limulus Amebocyte Lysate)試劑操作細菌內毒素試驗漸漸取代過去的兔子熱原試驗，進一步成為目前的主流試驗法。

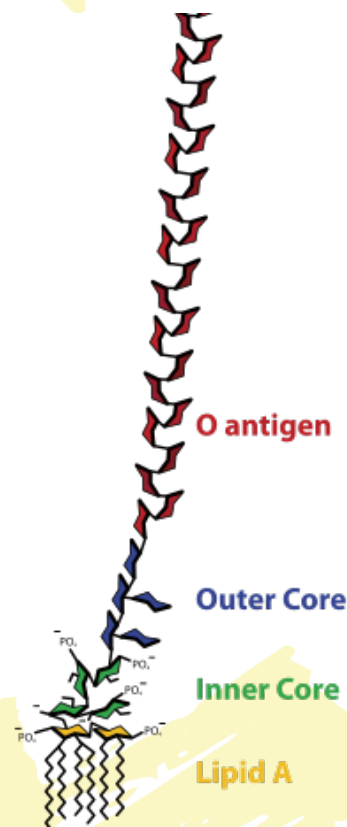
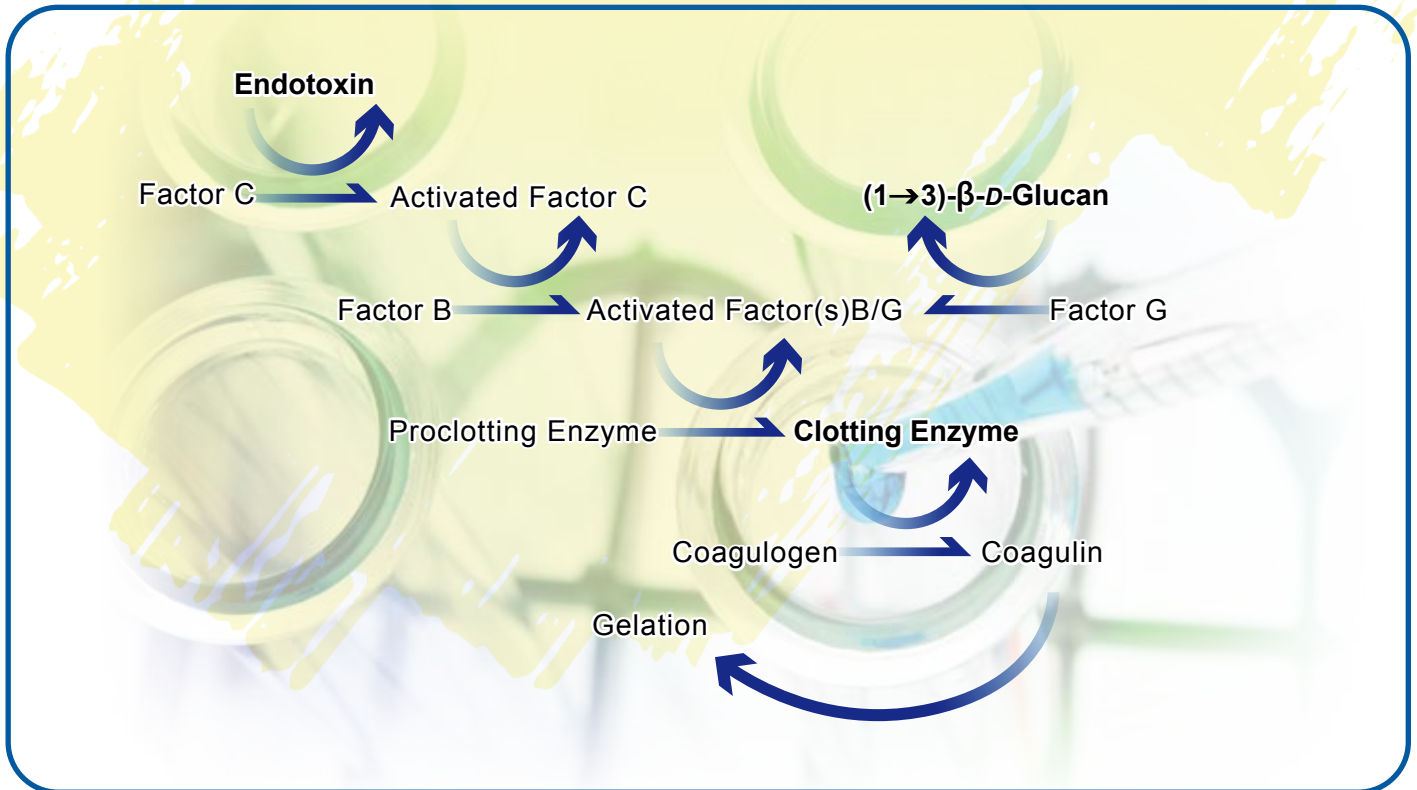


圖1、Lipopolysaccharide結構



Limulus Amebocyte Lysate 試劑

LAL(Limulus Amebocyte Lysate)試劑是使用鱈魚血液中的阿米巴變形細胞水性抽提液備製而成的生物檢測試劑，與內毒素會發生一連串的酵素反應後產生的凝集現象(圖2)，並將檢品與標準品進行比對後，定性或定量其內毒素濃度。在主流的各國藥典中(如USP、EP、JP、或是中華藥典)LAL試劑的內毒素偵測方法學可分為凝膠法、濁度法、及呈色法三種：



↑ 圖2、LAL 試劑對Endotoxin及β-D-Glucan有專一性，針對Endotoxin引發一連串的酵素反應產生的凝集現象，觀察凝集現象的強弱加以定性或定量內毒素。β-D-Glucan為另一條反應途徑形成的凝集現象，若檢品成分中有β-D-Glucan，可使用特定的緩衝液(β-D-Glucan inhibition buffer)抑制其反應途徑，避免false positive的發生。

1. 凝膠法(Gel-Clot Technique)：

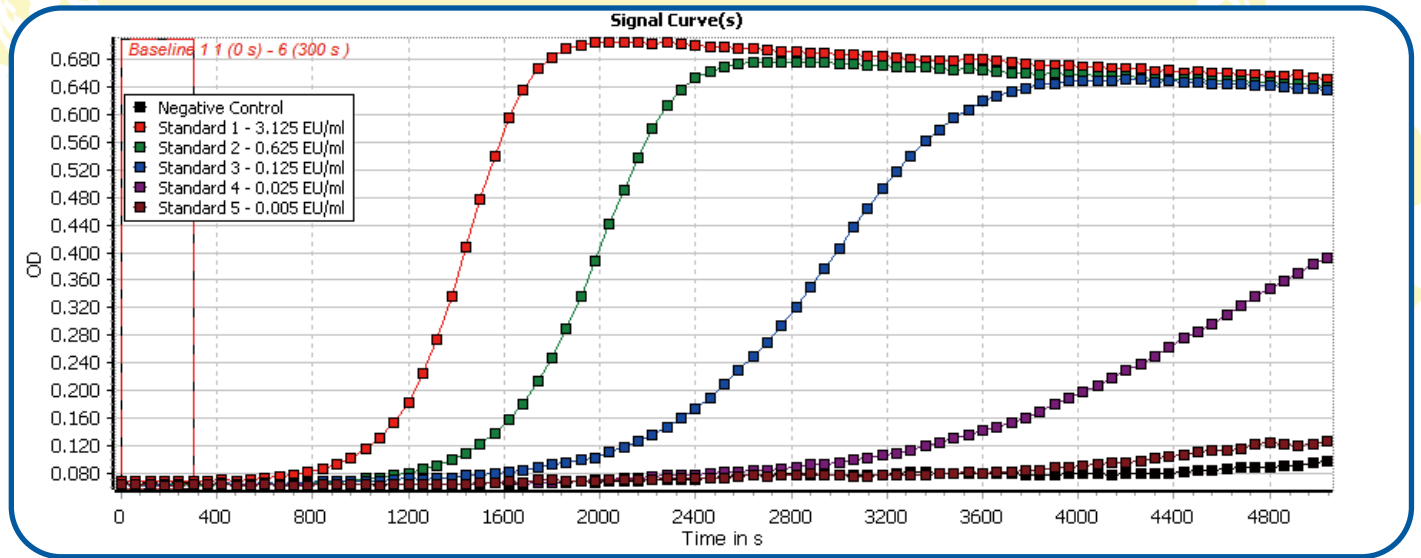
此法操作簡易快速，反應過程無須精密的分光判讀儀器進行監控內毒素試驗，將樣品與試劑混合於無熱原管中，置於37°C非循環式水浴槽中培養60分鐘即可進行判讀。當樣品內毒素大於試劑標示靈敏度時呈陽性(產生凝集反應)反應，若是小於時呈陰性(可滑動稠狀或液狀物)反應。



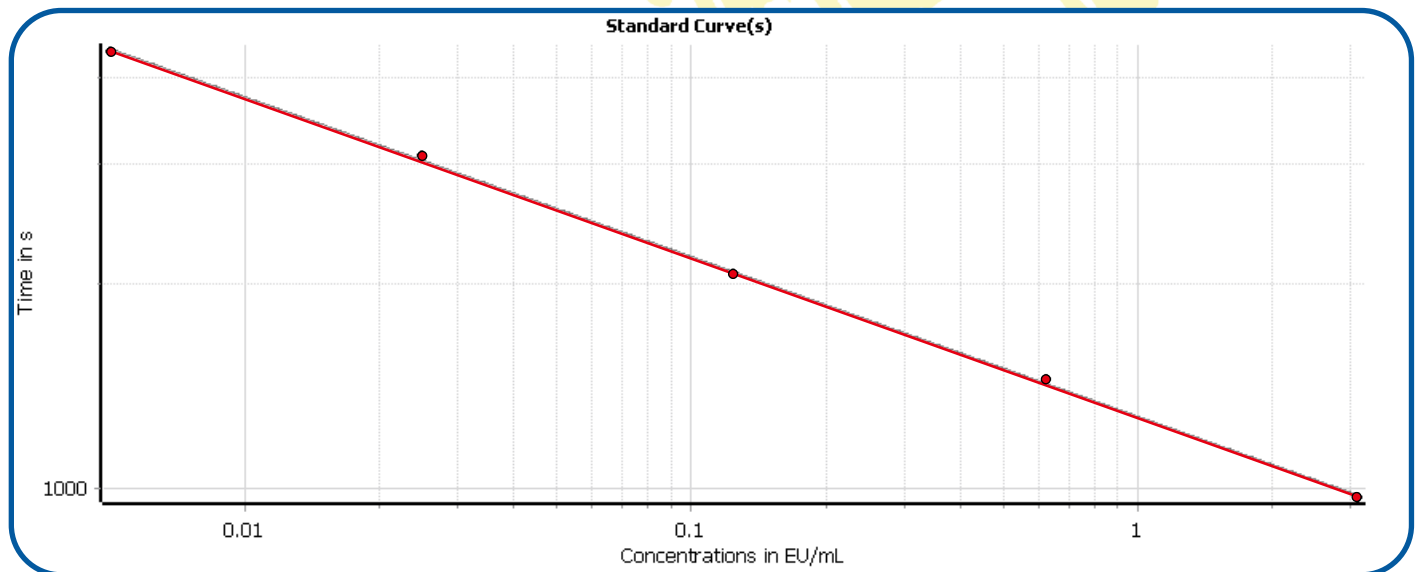


2. 比色法(Photometric Technique) :

比色法包含濁度法及呈色法，於2017年正式編入於中華藥典第八版，可精確定量內毒素濃度，且靈敏度可高達0.001 EU/ml。不同濃度的內毒素若要產生相同量的凝集物質，所需的時間也不相同。因此，利用動力法監控各標準品在反應中到達設定的OD值(Onset OD)所需的時間(圖3-1)，利用所需時間及對應的標準內毒素濃度規劃出標準曲線(圖3-2)，進而計算出各檢品之內毒素濃度。



↑ 圖3-1、動力法中各內毒素標準品對於Onset OD所需時間皆不相同，濃度越低標準品所花費時間越長。圖中平坦的黑色曲線為陰性對照組(Negative Control)，內毒素試驗中陰性對照組不可在標準曲線範圍內被偵測出內毒素濃度。



↑ 圖3-2、各內毒素標準品濃度及對應的Onset time可規劃出的內毒素標準曲線，其R值須 ≥ 0.98

干擾現象及稀釋條件

除了 β -D-Glucan之外，pH、離子、蛋白質...等成分皆有可能提高檢品的複雜度，造成LAL試劑偵測時出現干擾現象，導致試驗結果呈現偽陽性或偽陰性。大部分的干擾現象可藉由稀釋檢品的方式克服，但不可超過法規規範的最大稀釋倍數(MVD, Maximum Valid Dilution)。若是已達最大稀釋倍數仍無法克服其干擾現象，可嘗試針對不同的性質的檢品進行前處理去除有可能的干擾因子或是尋求更高的靈敏度來提高最大稀釋倍數的範圍。



LAL試劑為鱈魚血液萃取的生物來源偵測試劑，不同的鱈魚其生理條件也會有所不同，因此不論是凝膠法或是比色法在使用不同批次的LAL試劑前皆須進行試劑的核驗，以確保LAL試劑靈敏度及有效性；而進行內毒素測定時也須同時搭配標準曲線，嚴格確認試驗之有效及控管偵測結果的準確性。不論對於細胞治療或是注射針劑產品，有效率的監控內毒素有助於避免治療過程中因熱原引起的發熱與免疫反應，提高治療品質。

Associates of Cape Cod不但擁有40多年內毒素試驗經驗，並且為美國第一間獲准FDA合格製造的LAL試劑大廠。除全系列內毒素偵測試劑之外，更致力開發出兩大明星商品協助使用者輕鬆進行細菌內毒素試驗：

1. Pyros Kinetix® Flex - 完整的動力法LAL試劑產品線搭配各大藥廠首選內毒素偵測管式判讀儀Pyros Kinetix® Flex，提供目前全球最高靈敏度之內毒素偵測系統。

- 最高靈敏度0.001 EU/ml
- 單孔俱備獨立偵測頭進行判讀
- 節省耗材、試劑
- 分析電腦化自動處理，選單式報告
- 實驗數據電子化管理
(符合FDA 21 CFR part 11規範)



2. Pyrosate® - 凝膠法快篩試劑套組，簡單兩步驟，輕鬆完成內毒素偵測。

- 目前業界唯一可偵測原液之凝膠法產品
- 僅需分注及移液步驟即可完成實驗
- 培養時間短，最快30分鐘內即可進行判讀

特別推薦

分光判讀儀大廠BMG Labtech吸收光全光譜判讀儀SPECTROstar® Nano不但保留傳統濾鏡式判讀優點更提供以下多功能：

- 吸收光全光譜機款，符合實驗室多元實驗進行
- 同時具備微孔盤及傳統1 cm比色管判讀
- 控制及分析軟體皆符合FDA 21 CFR part 11規範
- 儀器判讀結束後自動計算直接提供樣品內毒素濃度
- 直觀式勾選所需data及匯入圖檔，客製化產出報告





參考資料：

1. <https://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/inspectiontechnicalguides/ucm072918.htm>
FDA Inspection Technical Guide, Bacterial Endotoxins/Pyrogens
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide> Wikipedia, Lipopolysaccharide
3. USP, 2011, Chapter <85>, Bacterial Endotoxin Test
4. http://www.acciusa.com/pdfs/newsletter/LAL%20Update%20Vol%202022_No3%20rev%20001.pdf
Associates of Cape Cod, LAL Update, October 2005, Volume 22, No.3

內毒素偵測相關產品：

產品貨號	產品名稱	產品規格
E0005	Pyrotell® & Pyrotell®-T專用標準內毒素	0.5 µg/vial
G5003	Pyrotell®凝膠法Multi-Test Vial 0.03 EU/ml	5 ml/vial (approx. 50 tests/vial)
G5006	Pyrotell®凝膠法Multi-Test Vial 0.06 EU/ml	5 ml/vial (approx. 50 tests/vial)
G5125	Pyrotell®凝膠法Multi-Test Vial 0.125 EU/ml	5 ml/vial (approx. 50 tests/vial)
G5250	Pyrotell®凝膠法Multi-Test Vial 0.25 EU/ml	5 ml/vial (approx. 50 tests/vial)
GS003	Pyrotell®凝膠法Single-Test Vial 0.03 EU/ml	0.2 ml/vial, 10 vials per pack
GS006	Pyrotell®凝膠法Single-Test Vial 0.06 EU/ml	0.2 ml/vial, 10 vials per pack
GS125	Pyrotell®凝膠法Single-Test Vial 0.125 EU/ml	0.2 ml/vial, 10 vials per pack
GS250	Pyrotell®凝膠法Single-Test Vial 0.25 EU/ml	0.2 ml/vial, 10 vials per pack
PSD030-10	Pyrosate®凝膠法快篩試劑套組 0.03 EU/ml	10-Test kit
PSD125-10	Pyrosate®凝膠法快篩試劑套組 0.125 EU/ml	10-Test kit
PSD250-10	Pyrosate®凝膠法快篩試劑套組 0.25 EU/ml	10-Test kit
T0051	Pyrotell®-T濁度法試劑	5 ml/vial (approx. 50 tests/vial)
EC010	Pyrochrome®專用標準內毒素	10 ng/vial
CG1500	Pyrochrome®呈色法試劑	3.2 ml/vial (approx. 60 tests/vial)
PKF64	Pyros Kinetix® Flex 64孔內毒素偵測管式判讀儀	64孔獨立偵測
PKF96	Pyros Kinetix® Flex 96孔內毒素偵測管式判讀儀	96孔獨立偵測
601-101	BMG SPECTROstar® Nano吸收光全光譜判讀儀	

詳情請洽當區岑祥服務人員