

行政院農業委員會 函

地址：100臺北市南海路 37 號

承辦人：蘇怡欣

電話：(02)2312-4640

傳真：(02)2381-1319

41265臺中市大里區東榮路483號

受文者：仁愛醫療財團法人大里仁愛醫院

發文日期：中華民國102年10月01日

發文字號：農牧字第1020043407號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：普通

附件：如文

主旨：轉知衛生福利部食品藥物管理署及行政院環境保護署提供動物實驗替代相關資料，請查照參用。

說明：

- 一、衛生福利部食品藥物管理署102年6月14日以署授食字第1021404511號公告(自102年7月1日起生效)修正「中華藥典第七版之通則」，除原有熱原鯨血試劑(LAL)外，新增歐洲藥典之熱原替代方案(單核球活化試驗法-MAT)等相關資料(如附件1)。
- 二、另行政院環境保護署101年10月12日以環署水字第1010090770號令修正發布之「放流水標準」(如附件2)，其中生物急毒性管制項目修正為戴奧辛。

正本：本會家畜衛生試驗所、國立屏東科技大學、奇美醫療財團法人奇美醫院、國立臺灣海洋大學、國立臺灣大學、財團法人台灣動物科技研究所、國立政治大學、本會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所、荷商台醫股份有限公司台灣分公司、國立臺北護理健康大學、中山醫學大學、財團法人國家實驗研究院實驗動物中心、財團法人彰化基督教醫院、高雄醫學大學、國立中國醫藥研究所、財團法人食品工業發展研究所、台灣東洋藥品工業股份有限公司(製劑研發中心)、國立海洋生物博物館、財團法人佛教慈濟綜合醫院、行政院國軍退除役官兵輔導委員會高雄榮民總醫院、本會畜產試驗所臺東種畜繁殖場、本會畜產試驗所、本會畜產試驗所宜蘭分所、本會畜產試驗所新竹分所、本會畜產試驗所彰化種畜繁殖場、本會畜產試驗所高雄種畜繁殖場、本會畜產試驗所恆春分所、本會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場、國立中正大學、嘉南藥理科技大學、國立成功大學、仁德醫護管理專科學校、慈濟學校財團法人慈濟大學、行政院環境

保護署環境檢驗所、行政院國軍退除役官兵輔導委員會臺北榮民總醫院、馬偕紀念醫院、國立高雄師範大學、國立臺灣師範大學、台灣生物製劑股份有限公司、秀傳醫療社團法人秀傳紀念醫院、新光醫療財團法人新光吳火獅紀念醫院、國泰醫療財團法人國泰綜合醫院、行政院原子能委員會核能研究所、本會農業試驗所、國立陽明大學、臺北醫學大學、臺北市立體育學院、財團法人生物技術開發中心、長庚醫療財團法人林口長庚紀念醫院、國立東華大學、慈濟學校財團法人慈濟技術學院、東海大學、中國化學製藥股份有限公司新豐工廠、國軍高雄總醫院、施懷哲維克生物科技股份有限公司、高雄市農會(生物製藥廠)、臺北市立教育大學、國立高雄海洋科技大學、國立澎湖科技大學、財團法人國家衛生研究院、弘光科技大學、國立中興大學、醫療財團法人徐元智先生醫藥基金會亞東紀念醫院、國立彰化師範大學、本會農業藥物毒物試驗所、國防醫學院預防醫學研究所、太景生物科技股份有限公司、國立宜蘭大學、國立清華大學、宏昌製藥股份有限公司、華達化學製藥股份有限公司、亞洲大學、國立新竹教育大學、應元化學製藥股份有限公司、國立臺中教育大學、中國文化大學、永豐化學工業股份有限公司、辰和科技藥業股份有限公司、李茂盛婦產科診所、行政院國軍退除役官兵輔導委員會臺中榮民總醫院、國立中山大學、永信藥品工業股份有限公司、中興藥品工業股份有限公司、寶島製藥股份有限公司、中央研究院、建台藥品股份有限公司、公源藥品股份有限公司、汎球藥理研究所股份有限公司、瑞士藥廠股份有限公司、國防醫學院、元培科技大學、新功藥品工業有限公司、天穗製藥有限公司、振興醫療財團法人振興醫院、中臺科技大學、濟生化學製藥股份有限公司、靜宜大學、國立中央大學、國立交通大學、本會特有生物研究保育中心、國光生物科技股份有限公司、澄清醫院中港分院、長庚大學、大仁科技大學、聯華製藥股份有限公司、臺北市立聯合醫院、國立臺南大學、瑞立化學製藥股份有限公司、全信製藥有限公司、大豐製藥股份有限公司、中原大學、進階生物科技股份有限公司、南光化學製藥股份有限公司、樂斯科生物科技股份有限公司、本會水產試驗所(水產加工組及養殖組)、本會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心、本會水產試驗所東部海洋生物研究中心、本會水產試驗所海水繁養殖研究中心、本會水產試驗所淡水繁養殖研究中心、本會水產試驗所東港生技研究中心、國立嘉義大學、中國醫藥大學、美和學校財團法人美和科技大學、台灣尖端先進生技醫藥股份有限公司、輔仁大學、中央警察大學、國立高雄第一科技大學、瑞雄製藥有限公司、臺北市立動物園、大豐疫苗科技股份有限公司、大豐化學製藥股份有限公司、大同大學、仁愛醫療財團法人大里仁愛醫院、東吳大學、全亞洲製藥股份有限公司、衛生利部食品藥物管理署、亞諾法生技股份有限公司、長庚醫療財團法人基隆長庚紀念醫院、臺北市立萬芳醫院、財團法人工業技術研究院、嘉信藥品股份有限公司、實踐大學、台灣微脂體股份有限公司、經國管理暨健康學院、長庚醫療財團法人高雄長庚紀念醫院、長庚學校財團法人長庚科技大學、國立臺灣大學醫學院、財團法人佛教慈濟綜合醫院大林分院、輔英科技大學、馬偕醫護管理專科學校、義守大學、長庚醫療財團法人嘉義長庚紀念醫院、景岳生物科技股份有限公司、國立暨南國際大學、長榮大學、普生股份有限公司、德英生物科技股份有限公司、義大醫療財團法人義大醫院、中華醫事科技大學、麥德凱生科股份有限公司、南臺科技大學、顧德生物科技股份有限公司、財團法人佛教慈濟綜合醫院台北分院、大葉大學、財團法人天主教耕莘醫院、樹人醫護管理專科學校、大華技術學院、中州學校財團法人中州科技大學、聯亞生技開發股份有限公司、歐美生技股份有限公司、遠東新世紀股份有限公司、台灣東洋藥品工業股份有限公司(癌症轉譯研究中心)、東宇生物科技股份有限公司、童綜合醫療社團法人童綜合醫院、台美檢驗科技有限公司、秀傳醫療財團法人彰濱秀傳紀念醫院、億康生物科技股份有限公司

司、科宜生物科技股份有限公司、國軍高雄總醫院左營分院、慕德生物科技股份有限公司、亞東創新發展股份有限公司、明道大學、財團法人國家實驗研究院實驗動物中心南部設施、豐華生物科技股份有限公司、台灣大塚製藥股份有限公司中壢工廠、馬偕醫學院、國立虎尾科技大學、濁水溪生物科技股份有限公司、醫療財團法人辜公亮基金會和信治癌中心醫院、惠合再生醫學生技股份有限公司、瑞寶基因股份有限公司、銘傳大學、國立體育大學、昌達生化科技股份有限公司、上準環境科技股份有限公司、泉盛生物科技股份有限公司、國立臺北教育大學、南台灣環境科技股份有限公司、佛光大學、瑞德生物科技股份有限公司、佳美環境科技有限公司、九連環境開發股份有限公司、琨鼎環境科技股份有限公司、抗體王生物科技股份有限公司、台灣檢驗科技股份有限公司、台灣醣聯生技醫藥股份有限公司、中環科技股份有限公司、福壽實業股份有限公司、雙鶴生物科技股份有限公司、朝陽科技大學、精準環境股份有限公司、亮宇生物科技股份有限公司、馬汀動物科技有限公司、環球學校財團法人環球科技大學、中欣工程行、三和生技有限公司、信東動物藥品股份有限公司、臺北市動物保護處、新北市政府動物保護防疫處、臺中市動物保護防疫處、臺南市動物防疫保護處、高雄市動物保護處、基隆市政府建設局、新竹市政府建設局、嘉義市政府建設處、桃園縣政府動物防疫所、新竹縣家畜疾病防治所、苗栗縣動物防疫所、彰化縣動物防疫所、南投縣家畜疾病防治所、雲林縣動植物防疫所、嘉義縣家畜疾病防治所、屏東縣家畜疾病防治所、宜蘭縣動植物防疫所、花蓮縣動植物防疫所、臺東縣動物防疫所、澎湖縣家畜疾病防治所、金門縣動植物防疫所、福建省連江縣政府

副本：行政院國家科學委員會、行政院國家科學委員會中部科學工業園區管理局、行政院國家科學委員會南部科學工業園區管理局、衛生福利部、衛生福利部疾病管制署、行政院環境保護署、國防部、教育部、中華實驗動物學會

主任委員 陳保基

本案依照分層負責授權單位主管執行

衛生福利部食品藥物管理署 公告

發文日期：中華民國102年6月14日
發文字號：署授食字第1021404511號
附件：「單核球活化試驗法」乙份

主旨：修正「中華藥典第七版之通則」增訂「單核球活化試驗法(Monocyte Activation Test, 簡稱MAT)」，並自中華民國一百零二年七月一日生效。

副本：

單核球活化試驗法

一、前言：

單核球活化試驗法 (Monocyte Activation Test, 簡稱 MAT) 係用於檢測或定量可活化人單核球 (monocytes) 或單核細胞 (monocytic cells), 促使其釋放內源性介質 (endogenous mediators) 之成份的試驗法。前述內源性介質包含：腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF α)、介白素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、介白素-6 (interleukin-6, IL-6) 等在發燒致病機轉中扮演重要角色之促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)。本法可偵測產品中是否存在熱原 (pyrogens), 並在經過產品專一性確效後, 用以取代家兔熱原試驗 (rabbit pyrogen test)。

產品中若含有非內毒素致發熱或促發炎污染物 (non-endotoxin pyrogenic or pro-inflammatory contaminants), 其劑量反應曲線 (dose-response curves) 常較內毒素之劑量反應曲線更為陡峭, 且其最大劑量反應常由未稀釋或較低稀釋倍數之檢品中檢出。因此, 在檢測含有或可能含有非內毒素污染物之檢品時, 稀釋範圍應涵蓋最小稀釋倍數。下述 3 種方法均應以避免受熱原污染之方式進行。

方法 A：定量試驗

方法 B：半定量試驗

方法 C：對照批次比對試驗 (reference lot comparison test)

二、定義：

最大有效稀釋度 (maximum valid dilution, MVD) 是在可偵測出污染物限量 (contaminant limit concentration, CLC) 下所允許之最大檢品稀釋倍數。MVD 之計算公式如下：

$$MVD = \frac{CLC \times C}{LOD}$$

CLC：污染物限量

C：檢品溶液 (以下簡稱檢液) 濃度

LOD：偵測極限 (limit of detection)

CLC 係以每 mg、每 mL 或每生物活性單位 (unit of biological activity) 之檢品中所含相當內毒素含量 (endotoxin equivalents) 表示, 並據此判定是否合格。CLC 之計算公式如下：

$$CLC = \frac{K}{M}$$

K：可產生發熱反應之內毒素閾值 (threshold) 劑量, 以每公斤體重單位劑量 (IU/Kg) 表示。

M：產品每公斤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 小時內之最大總投給劑量。

除非另有規定, 產品正文 (monograph) 若已規定內毒素限量 (endotoxin limit concentration, ELC), 則 CLC 等同該 ELC。在此情況下, 若內毒素限量指明以重量計 (IU/mg), 則檢液濃度應以 mg/mL 表示之; 若內毒素限量指明以生物活性單位計 (IU/Unit), 則檢液濃度應以 Units/mL 表示之; 若內毒素限量指明以體積計 (IU/mL), 則檢液濃度應以 mL/mL 表示之。

相當內毒素含量可由內毒素標準品之劑量反應曲線計算而得 (方法 A), 或與內毒素標準品溶液之讀值比對而得 (方法 B)。內毒素標準品儲備溶液 (stock solution) 係以國際標準品 (International standard) 校正過之對照標準品製備而得。

臨界值 (cut-off value) 之計算公式如下：

$$\bar{x} + 3s$$

$\bar{x}$ ：空白對照 (R_0) 四重複之平均值

s：空白對照 (R_0) 四重複之標準差 (standard deviation)

臨界值應以適當之單位表示。LOD 是與臨界值相對應之內毒素濃度, 可由內毒素標準曲線計算而得。本試驗之 LOD 宜以每毫升含有之相當內毒素含量 (endotoxin equivalents/mL) 表示。

三、試驗法概述

(一) 細胞培養

取檢品與人單核球或單核細胞共同培養於 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 之適當環境 (如含 5% CO_2 的加濕空氣中)，培養時間需足以累積相當之測試標的，以供明確之判讀。上述之單核球或單核細胞可來自：

1. 人肝素化周邊血 (human heparinised peripheral blood)，取出後最好不超過 4 小時，通常以培養基或生理食鹽水稀釋至 2~50% v/v (最終濃度)。
2. 含單核球之成分血 (blood fractions)，如以密度梯度離心 (density-gradient centrifugation) 分離之人周邊血單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。
3. 人單核細胞株 (monocytic cell line)。

若為上述 2 或 3 之人周邊血單核細胞或單核細胞株，通常以培養基、供血者自體血漿或 AB 血清 (AB serum)，調配成每孔 (或管或其他容器) 含 $0.1\sim 1.0 \times 10^6$ 個細胞。培養單核細胞株時，得以熱去活化胎牛血清 (heat-inactivated fetal bovine serum) 取代 AB 血清。

(二) 測試標的之選擇及測定

細胞培養後，以適當方法 (如 ELISA 法) 測定選定之測試標的 (促發炎反應或致發熱反應之細胞激素，如 $\text{IL-1}\beta$)，並取檢品與內毒素標準品、或與對照批次之試驗結果做比對及判定。上述測定法應以適當標準品進行校正及驗證。

四、檢驗器材：

使用經確效之程序，以烘箱去除所有玻璃器皿及其他耐熱器材之熱原，常用去熱原方法為 250°C 以上放置至少 30 分鐘。若使用塑膠器材 (如微量反應盤或吸管尖)，需使用無熱原且不會干擾試驗結果之器材。

五、細胞來源及驗證 (Qualification)

(一) 細胞來源

全血 (whole blood) 係來自個別供血者或混合而得之血液，如人肝素化周邊血；周邊血單核細胞係由前述全血中所分離出之細胞。以上皆應符合本文第五、(二)暨五、(三)之規定。

(二) 供血者之驗證

1. 供血者於捐血前一週未受任何細菌或病毒感染，且無任何感染相關症狀。
2. 除一般捐血規定外，供血者於捐血前 48 小時內不得服用非固醇類消炎止痛劑；於捐血前七日不得服用固醇類消炎止痛劑。
3. 服用免疫抑制劑或其他會影響本試驗結果判讀之藥物者，不得為供血者。
4. 供血者之血液不得含有造成已知疾病之因子，且不得呈現「人類免疫缺乏病毒第一型及第二型 (human immunodeficiency virus type 1 and type 2) 抗體」、「B 型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen)」及「C 型肝炎病毒 (hepatitis C Virus) 抗體」陽性反應。並應以核酸擴增技術 (nucleic acid amplification technology, NAT) 檢測混和血液中 HIV、HBV 及 HCV 等病毒，其結果均應為陰性。

(三) 混合細胞 (Cells pooled from a number of donors) 之驗證

混合細胞 (來自全血或成分血，如：周邊血單核細胞) 須取自至少 4 名、最好 8 名以上之供血者，儘可能以等體積之血液，或由等體積血液取得之細胞混合製備而得。

合格之混合細胞應於血液採集後 4 小時內，使用至少 4 個連續稀釋濃度之內毒素標準品 (如：在 $0.01\sim 4 \text{ IU/mL}$ 範圍內) 做出劑量反應曲線，且該曲線須符合本文第六、(一)中對標準曲線之規定。

(四) 凍存細胞 (Cryo-preserved cells) 之驗證

供本法使用之細胞來源，如人全血、成分血或單核細胞株皆可冷凍保存。混合之凍存細胞可在冷凍前混合，或於個別供血者之凍存細胞解凍後立即混合而得。混合凍存細胞須取自至少 4 名、最好 8 名以上之供血者，儘可能以等體積之血液，或由等體積血液取得之細胞混合製備而得。

凍存血液或細胞需在解凍後立即確認品質，其劑量反應曲線須符合本文第六、(一)中對標準曲線之規定。

(五) 單核連續細胞株 (Monocytic continuous cell lines)

連續培養人單核細胞株 (或進一步選殖得到最適於本法使用之細胞株)，以確保能充足提供本法使用。細胞應維持於無菌條件下，除定期檢測是否遭黴菌污染外，亦應定期檢測其特性 (如細胞倍增時間 (doubling time)、型態及功能等) 與安定性。藉由例行檢測來追蹤人單核細胞株各繼代間之表現，以評估其功能穩定度。

功能穩定度評估標準可包括生長條件 (growth criteria)、試驗最大訊號、背景值及受體表現等。受體表現可以專一性之配體 (ligands) 檢測，如：以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 檢測類鐸受體-4 (toll-like receptor 4, TLR4)、以脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 檢測類鐸受體-2 (TLR2)、以合成細菌性脂蛋白 (synthetic bacterial lipoprotein) 檢測 TLR2-TLR1 或 TLR2-TLR6 等。

六、預試驗 (Preparatory testing)

為確保試驗之精密度 (precision) 及有效性，進行下述各項預試驗以確認標準曲線符合規定、檢液不會干擾試驗、可檢測出內毒素與非內毒素污染物、及檢液不會干擾偵測系統 (detection system) 等。

(一) 標準曲線之規定

製備至少 4 個濃度之內毒素標準品溶液，各濃度至少進行 4 重複檢測，作出標準曲線。未加入內毒素標準品之空白對照溶液應做適當調整，使其讀值愈低愈好。標準曲線應符合下述規定：

- 反應與劑量對數值之回歸分析應有顯著相關 ($p < 0.01$)；
- 反應與劑量對數值之回歸分析不可顯著的偏離線性 ($p > 0.05$)。若以 4 變項邏輯曲線 (4-parameter logistic curve) 分析，其結果不可顯著的偏離依常用統計方法建立之理論曲線 (theoretical curve)。

(二) 干擾因子試驗 (Test for interfering factors)

為確保試驗之有效性，應確認檢液不會干擾試驗。當試驗條件發生可能影響實驗結果之改變時，需進行試驗方法確效。於同次實驗中，同時測試「連續稀釋檢液」及「含內毒素標準品之連續稀釋檢液」，製備方法如下：

1. 連續稀釋檢液：以適當之稀釋液將檢品進行幾何連續稀釋 (geometric steps)，所有的稀釋階均不可超過 MVD。
2. 含內毒素標準品之連續稀釋檢液：同上述之稀釋倍數另製備一組稀釋檢液，方法如下：
 - 方法 A：於各稀釋階檢液中加入相等或接近標準曲線中間濃度之內毒素標準品；或以相等或接近標準曲線中間濃度之內毒素標準品溶液作為稀釋液，進行檢品稀釋。
 - 方法 B：於各稀釋階檢液中加入 2 倍 LOD 濃度之內毒素標準品；或以 2 倍 LOD 濃度之內毒素標準品溶液作為稀釋液，進行檢品稀釋。

以標準曲線計算各試液中之相當內毒素含量。由「含內毒素標準品之連續稀釋檢液」之平均相當內毒素含量，減「連續稀釋檢液」之平均相當內毒素含量 (若有時)，計算內毒素標準品平均回收率。若回收率在 50~200% 間，則判定檢液於此試驗條件下無干擾因子。無法達到上述規定時則建議使用方法 C。

方法 C 係取 3 個稀釋倍數之檢液，包括可促使釋出最多選定測試標的之檢液濃度 (即最高濃度，亦即最小稀釋倍數)、及其 2 倍與 0.5 倍濃度之檢液 (即上下 2 倍稀釋之檢液) 進

行試驗與確效評估。

由於前述檢液之最大讀值會隨供血者及批次而異，產品專一性確效須做至少三次獨立試驗，且每次試驗須使用來自不同供血者之細胞。若未稀釋之檢液有最大讀值，則在未加入細胞進行培養前，以未稀釋及 2 倍和 4 倍稀釋之檢液進行確效評估。

上述三個稀釋倍數均不得超過 MVD，並將此三個試液的稀釋倍數 (dilution factor) 訂為 f_1 、 f_2 及 f_3 。需定期以取自於 4 名不同供血者之細胞、單一混合細胞或人單核細胞株之一次繼代 (1 passage) 細胞進行產品專一性確效分析。

(三) 非內毒素單核球活化污染物 (non-endotoxin monocyte-activating contaminants) 之確效分析

除細菌內毒素外，前述預試驗亦可用於偵測非內毒素致發熱或促發炎污染物，可取過去因非內毒素污染物造成家兔熱原試驗呈陽性反應之檢體批次，或使用於人身上有藥物不良反應之檢體批次做驗證。

如上述批次不易取得，則應於預試驗時使用類鐸受體之特定配體，如肽聚糖 (peptidoglycans)、脂磷壁酸或合成細菌脂蛋白等進行驗證。

(四) 偵測系統之干擾

當檢品之最佳稀釋倍數 (檢液濃度) 確立後，應測試此檢液濃度是否干擾標準品溶液於偵測系統 (如：ELISA) 中之讀值。由添加檢品於各標準品連續稀釋溶液之讀值，與不含檢品之各標準品連續稀釋溶液之讀值比較，其差異應在 20% 內。

七、試驗方法

(一) 方法 A：定量試驗

本法為檢品與內毒素標準品劑量反應曲線之比較。若檢品內之污染物濃度小於 CLC 即判定合格。

1. 試驗步驟

使用經確效之試驗方法製備試液如表一，並分別與取自於 4 名不同供血者之細胞、單一混合細胞、或人單核細胞株之一次繼代細胞進行培養，以 4 重複試驗測定之。

表一

試液編號	試液名稱	添加內毒素濃度 (IU/mL)	重複試驗數(次)
A	檢液/ f	無	4
B	檢液/ $2 \times f$	無	4
C	檢液/ $4 \times f$	無	4
D	檢液/ f	內毒素標準曲線之中間濃度 (R_3)	4
R_0	無熱原生理食鹽水或稀釋液	無	4
$R_1 \sim R_4$	無熱原生理食鹽水或稀釋液	4 種濃度之內毒素標準品	4/每濃度

試液 A：稀釋後之檢品溶液， f 表示稀釋倍數，即干擾因子試驗中內毒素回收率在 50~200% 之最低稀釋倍數（最高濃度）。

試液 B：2 倍稀釋之試液 A，不超過最大有效稀釋度。

試液 C：2 倍稀釋之試液 B，不超過最大有效稀釋度。

試液 D：取試液 A 加入標準曲線中間濃度 (R_3) 之內毒素標準品。

試液 R_0 ：空白對照溶液（陰性對照）。

試液 $R_1 \sim R_4$ ：干擾因子試驗中所用之內毒素標準品溶液濃度。

2. 結果計算

所有用於數據分析之檢測結果，其來源細胞之劑量反應曲線均須符合本文第六、(一) 對標準曲線之規定。將試液 D 之相當內毒素含量減試液 A 之相當內毒素含量所得之相當內毒素含量回收率，應在 50~200% 範圍內。

對於每個不同的細胞來源（如個別供血者、單一混合細胞或人單核細胞株），由 $R_1 \sim R_4$ 做成內毒素標準曲線，分別計算試液 A、B 或 C 之相當內毒素含量。

經稀釋倍數和濃度校正後，若由試液 A、B 或 C 重複試驗結果計算之平均相當內毒素含量小於檢品之 CLC，則符合此特定細胞之檢測規定。

3. 結果判定

若使用來自個別供血者之細胞，則檢品須符合 4 名不同供血者的細胞檢測，始可判定合格；若檢品只通過其中 3 名之細胞檢測，則須進一步以另外 4 名不同供血者細胞進行檢測，當檢品符合 8 名不同供血者細胞之其中 7 個檢測，則判定合格（即 8 名供血者細胞檢測試驗中，最多允許出現 1 個陽性反應）。

當單核球的來源是由許多個別供血者細胞所組成之單一混合細胞，則檢品需符合 1 個混合細胞的檢測。使用人單核細胞株檢測時，檢品需符合該細胞株之一次繼代細胞的檢測。

(二) 方法 B：半定量試驗

本法為檢品與內毒素標準品之比較，原則上選擇試液 A 作為判定之依據。若檢品內之污染物濃度小於 CLC 即判定合格。

1. 試驗步驟

使用經確效之試驗方法製備試液如表二，並分別與取自於 4 名不同供血者之細胞、單一混合細胞、或人單核細胞株之一次繼代細胞進行培養，以 4 重複試驗測定之。

2. 結果計算

所有用於數據分析之檢測結果，其來源細胞對試液 $R_0 \sim R_4$ 之平均反應值 (mean

responses) 隨劑量增加而有遞增情形。試液 R_0 之平均反應值可能與試液 R_1 之平均反應值相等。對於每個不同的細胞來源，試液 R_2 之平均反應值應較陽性臨界值為大。臨界值以下

表二

試液編號	試液名稱	添加內毒素濃度 (IU/mL)	重複試驗數(次)
A	檢液/f	無	4
B	檢液/ f_1	無	4
C	檢液/ f_2	無	4
D	檢液/f	$2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
E	檢液/ f_1	$2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
F	檢液/ f_2	$2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
R_0	無熱原生理食鹽水或稀釋液	無	4
R_1	無熱原生理食鹽水或稀釋液	$0.5 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
R_2	無熱原生理食鹽水或稀釋液	$1 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
R_3	無熱原生理食鹽水或稀釋液	$2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4
R_4	無熱原生理食鹽水或稀釋液	$4 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品	4

試液 A：稀釋後之檢品溶液，f 表示稀釋倍數，即干擾因子試驗中內毒素回收率在 50~200% 之最低稀釋倍數（最高濃度）。

試液 B：稀釋後之檢品溶液， f_1 為一個未超過最大有效稀釋度，且依產品專一性確效分析後擇定之稀釋倍數，如： $0.5 \times \text{MVD}$ 。

試液 C：稀釋後之檢品溶液， f_2 為一個未超過最大有效稀釋度且依產品專一性確效分析後擇定之稀釋倍數，如： MVD 。

試液 D：為試液 A 中添加 $2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品（LOD 濃度由預試驗得之）。

試液 E：為試液 B 中添加 $2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

試液 F：為試液 C 中添加 $2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

試液 R_0 ：空白對照溶液（陰性對照）。

試液 R_1 ：含 $0.5 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

試液 R_2 ：含 $1 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

試液 R_3 ：含 $2 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

試液 R_4 ：含 $4 \times \text{LOD}$ 內毒素標準品。

之數據可視為陰性反應。

若試液 R_1 或 R_2 之平均反應值超過臨界值，則用於進行檢測之溶液也須呈現陰性反應。以每一個陰性試液（試液 A、B 或 C）及其相對應之陽性試液（試液 D、E 或 F）與試液 R_3 之平均反應值比較，分別計算 3 組回收率，應在 50~200% 範圍之間。

若試液 A、B 及 C 均呈現陰性結果，則符合此特定細胞之檢測規定，即檢品之污染物濃度小於 CLC。

3. 結果判定

依方法 A（詳見第七、（一）、3）進行結果判定。

（三）方法 C：對照批次比對試驗

本法為檢品與適當之有效對照批次（validated reference lot）作比較。本法適用於當檢品中含有（或極可能含有）非內毒素污染物，因而明顯干擾試驗，且在最大有效稀釋度範圍內，無法以稀釋方式排除之情況。由於在檢品稀釋過程中，非內毒素污染物引發之劑量反應曲線可能較內毒素更為陡峭（線性範圍較窄），因此須以預試驗取得包含最低稀釋度之適

當檢品稀釋範圍。

1. 試驗步驟

使用經確效之試驗方法製備試液如表三，並分別與取自於 4 名不同供血者之細胞、單一混合細胞、或人單核細胞株之一次繼代細胞進行培養，以 4 重複試驗測定之。

2. 結果計算

所有用於數據分析之檢測結果，其來源細胞對試液 G 之反應值及試液 A、B 或 C 中至少一個之反應值，皆須大於試液 R_0 之基礎反應值 (basal release)。對於每個不同的細胞來源 (如個別供血者、單一混合血液或人單核細胞株)，使用所選定測試標的之標準曲線 (需包含空白對照溶液和至少 4 個連續稀釋之內毒素標準品，以 2 重複試驗測定之) 計算試液，並計算試液 A~F 之平均反應值。

將試液 D、E 和 F 之平均反應值總和，除以試液 A、B 和 C 之平均反應值總和。若商數不超過 2.5，則符合此特定細胞之檢測規定。

表三

試液編號	試液/稀釋倍數	重複試驗數(次)
A	對照批次溶液/ f_1	4
B	對照批次溶液/ f_2	4
C	對照批次溶液/ f_3	4
D	檢液/ f_1	4
E	檢液/ f_2	4
F	檢液/ f_3	4
G	陽性對照組 (內毒素標準品)	4
R_0	稀釋液	4

試液 A、B 和 C：取對照批次，依干擾因子試驗所得之稀釋倍數 f_1 、 f_2 和 f_3 ，稀釋而得之試液。

試液 D、E 和 F：取檢品依對照批次於干擾因子試驗所得之稀釋倍數 f_1 、 f_2 和 f_3 ，稀釋而得之試液。

試液 G：為細胞存活能力之陽性對照組，具明顯陽性反應之內毒素標準品濃度。

試液 R_0 ：檢品稀釋液，作為空白對照溶液 (陰性對照)。

3. 結果判定

依方法 A (詳見第七、(一)、3) 進行結果判定。

在方法 A、B 和 C 中，可用多種不超過最大有效稀釋度之稀釋倍數，取得較接近之污染物定量結果。

單核球活化試驗法指引

一、前言

單核球活化試驗法 (Monocyte Activation Test, 簡稱 MAT) 主要係作為家兔熱原試驗法之替代方法。MAT 可偵測致發熱或促發炎污染物，包括來自革蘭氏陰性菌之內毒素及包括病原相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 在內之非內毒素污染物，此類污染物可來自於革蘭氏陽性或陰性菌、病毒、真菌、及產品或製程相關之生物或化學物質 (biological or chemical entities)。

由於非內毒素污染物是一群物化性質相異之分子，且通常未知有何類污染物存於檢品中，故藉由與內毒素標準品或與相同檢品之對照批次 (reference lot) 比較，評估污染物之含量，並以相當內毒素含量 (endotoxin-equivalent) 表示之。

本法中，以內毒素標準品刺激單核球時，其劑量反應曲線通常會涵蓋約 1 log (10 倍) 以上之濃度範圍；而以含有非內毒素污染物 (僅含非內毒素污染物或兼有內毒素存在) 之檢品刺激單核球時，常表現出非常陡峭之劑量反應曲線 (濃度範圍通常僅在 1 或 2 個稀釋階內)。簡言之，檢測可能含有此類非內毒素污染物之產品時，其最大劑量反應 (讀值) 通常出現於未稀釋或較低稀釋倍數之檢品中，因此檢品稀釋範圍應涵蓋最小稀釋倍數。

二、試驗方法

(一) 試驗方法選擇指引

除非進行適當修正及方法確效，本法原則上不適用於會刺激細胞釋放測試標的之檢品，或檢品本身即含有測試標的等二種情況。產品專一性確效分析應建立如篩選供血者、增加每次試驗供血者之數量及調整試驗結果判定之嚴格度等適當步驟，使其儘可能鑑別出在特定產品/污染物組合 (product/contaminant(s) combination) 中不反應者 (non-responders) 出現之頻率，以提高檢出受污染批次之可能性。

若「連續稀釋檢液」及「含內毒素標準品之連續稀釋檢液」之劑量反應在大範圍 (broadly) 內呈現平行關係，則該檢品同時適用方法 A 及方法 B；若「連續稀釋檢液」及「含內毒素標準品之連續稀釋檢液」之劑量反應呈現非平行關係，則該檢品適用半定量試驗之方法 B。

方法 C 為對照批次比對試驗 (reference lot comparison test)，係針對不同供血者之細胞對特定產品/污染物組合之反應具極大變異性所設計。雖然大多數供血者的單核球對細菌內毒素之劑量反應大致相似，然而來自不同供血者之單核球對於非內毒素污染物的反應卻可能有顯著的差異，因此方法 C 或許也可鑑別存於特定產品/污染物組合中之不反應物質。

(二) 污染物限量 (contaminant limit concentration, CLC) 計算

CLC 係以每 mg、每 mL 或每生物活性單位 (units of biological activity) 之檢品中所含相當內毒素含量表示，並據此判定是否合格。除非另有規定，產品正文 (monograph) 若已規定內毒素限量 (endotoxin limit concentration, ELC)，則 CLC 等同該 ELC。

CLC 以相當內毒素含量表示，並依下列公式計算：

$$CLC = \frac{K}{M}$$

K：可產生發熱反應之內毒素閾值 (threshold) 劑量，以每公斤體重單位劑量 (IU/Kg) 表示。

M：產品每公斤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 小時內之最大總投給劑量。

內毒素限量依產品類別及給藥途徑而定，並明訂於產品正文中。表四列出不同給藥途徑下之建議 K 值。對於其他的給藥途徑，細菌內毒素之合格標準係依該產品在開發過程中所得結果而定。

表四

給藥途徑	K (每公斤體重單位劑量, IU/Kg)
靜脈內	5.0
靜脈內 (放射性藥品)	2.5
骨髓內	0.2

(三) 抗凍劑 (Cryo-protectants)

抗凍劑 (如：二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)) 及其於細胞解凍後之殘留可能對細胞造成影響。即使細胞已被徹底洗滌，DMSO 對培養中之細胞仍具毒性，且冷凍保存過程可能改變細胞膜通透性等細胞特性。

(四) 干擾因子試驗 (Test for interfering factors)

原則上使用至少 3 個不同批次產品進行干擾因子試驗。若檢品於干擾因子試驗呈現顯著之批次間差異，則此產品應逐批進行干擾因子試驗，此即併行性分析方法確效 (concomitant validation)。

執行干擾因子試驗時，應使用無內毒素及其他致發熱物質和促發炎污染物之產品批次。若該產品僅有 1 個批次可用，則須以 3 次獨立試驗執行確效，並滿足再現性精密度之要求 (如： $\pm 50\%$)。

三、以 MAT 取代家兔熱原試驗法

本法主要目的係作為家兔熱原試驗法之替代方法。可能含有致發熱性污染物之無菌製劑等藥品，其產品正文應納入細菌內毒素檢驗法或 MAT。原則如下：

- 本試驗若為產品正文中之必要檢驗項目，可採細菌內毒素檢驗法或 MAT 其中之一。但在將 MAT 納入正文前，須確認 MAT 之 3 種方法中有 1 種適用於該產品；
- 由供應商提供必要資訊。供應商對 MAT 適用於特定之原料藥或製劑若有任何疑慮及考量，可提供確效數據以為參考。上述數據包括檢品製備細節、任何排除干擾因子之必要程序，及有助於確認以 MAT 取代家兔熱原試驗法之平行性試驗分析資料。

四、替代試驗法之分析方法確效

以 MAT 取代家兔熱原試驗法、或以其他試驗法取代偵測促發炎及致發熱性污染物，均視為以替代性試驗法取代藥典收錄之方法，故若以本法應用於產品放行檢驗及製程相關檢驗時，應另經核准。

若採用非本法收載之其他 MAT 方法，建議以下列程序進行方法確效：

- 方法中之試驗程序及檢驗相關試劑等應經適當之確效與驗證；
- 應取至少 3 個生產批次產品進行干擾因子試驗 (若有需要，亦應測試排除干擾因子之程序)。

放流水標準

101 年 10 月 12 日行政院環境保護署環署水字第 1010090770 號令修正發布第二條、第五條、第六條條文

第 一 條 本標準依水污染防治法（以下簡稱本法）第七條第二項規定訂定之。

第 二 條 事業、污水下水道系統及建築物污水處理設施之放流水標準，其水質項目及限值如下表。但特定業別、區域另定有排放標準者，依其規定。

第 三 條 事業及其所屬公會或環境保護相關團體得隨時提出具體科學性數據、資料，供檢討修正之參考。

第 四 條 本標準所定之化學需氧量限值，係以重鉻酸鉀氧化方式檢測之；真色色度，係以真色色度法檢測之。

第 五 條 本標準所定之戴奧辛係以檢測 2,3,7,8-四氯戴奧辛(2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-TeCDD)，2,3,7,8-四氯喃(2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzofuran, 2,3,7,8-TeCDF) 及 2,3,7,8-氯化之五氯 (Penta-)，六氯 (Hexa-)，七氯 (Hepta-) 與八氯 (Octa-) 戴奧辛及喃等共十七項化合物所得濃度，乘以國際毒性當量因子 (International Toxicity Equivalency Factor, I-TEF) 之總和計算之，以總毒性當量 (Toxicity Equivalency Quantity of 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin, TEQ) 表示。

第 六 條 本標準各項目限值，除氫離子濃度指數為一範圍外，均為最大限值，其單位如下：

一、氫離子濃度指數：無單位。

二、真色色度：無單位。

三、大腸桿菌群：每一百毫升水樣在濾膜上所產生之菌落數(CFU/100 mL)。

四、戴奧辛：皮克-國際-總毒性當量/公升 (pg I-TEQ/L)。

五、其餘各項目：毫克／公升。

第 七 條 本標準各項目限值，除水溫及氫離子濃度指數外，事業或污水下水道系統自水體取水作為冷卻或循環用途之未接觸冷卻水，如排放於原取水區位之地面水體，不適用本標準。

第 八 條 事業、污水下水道系統及建築物污水處理設施，同時依本標準適用範圍，

有二種以上不同業別或同一業別有不同製程，其廢水混合處理及排放者，應符合各該業別之放流水標準。相同之管制項目有不同管制限值者，應符合較嚴之限值標準。各業別中之一種業別廢水水量達總廢水量百分之七十五以上，並裝設有獨立專用累計型水量計測設施者，得向主管機關申請對共同管制項目以該業別放流水標準管制。
前項廢水量所佔比例，以申請日前半年之紀錄計算之。

第 九 條 本標準除另定施行日期者外，自發布日施行。

由下列連結可下載 Word 檔或 PDF 檔

- 1.放流水標準
- 2.放流水標準(pdf 檔)