

# 實驗兔、實驗鸞 痛苦、犧牲無人知

## ——以學名藥為例，檢視台灣不必要的實驗動物犧牲

熱原試驗應廢除活兔、鸞血的利用 改用人類全血 (MAT) 等替代

### Q & A

#### 一、何謂學名藥？

學名藥 (Generic drugs) 是指原廠藥專利過期後，其他藥廠就可根據其成分、劑量、劑型生產同種藥品，故已免除研發新藥過程冗長的動物實驗及人體臨床實驗，藥廠也可減少研發成本，台灣藥廠由於規模小，少有能研發全新藥物，因此多以生產學名藥為主。

依據衛生署「藥品查驗登記審查準則」，學名藥的定義為「與國內已核准之藥品具同成分、同劑型、同劑量、同療效之製劑。」

#### 二、何謂熱原？

熱原 (Pyrogen) 泛指所有會引起人類或動物體溫升高的物質，簡單來說就是會造成發燒的物質。熱原可分為內生性及外生性二種。

內生性熱原 (endogenous pyrogen) 是指由人體或動物體內免疫細胞分泌出的致熱物質。當人體接受到外來物質，或體內的組織細胞出現異常時，身體各處的單核球細胞 (monocyte) 就受到刺激而開始攻擊、吞噬敵人，同時分泌一些致熱的細胞激素 (cytokine)，會刺激下視丘內皮細胞釋放前列腺素 (PGE2)，使下視丘調高體溫造成發燒，並且使人感覺全身痠痛、無力、嗜睡、食慾不佳等症狀 (陳立材等，2009)。

外生性熱原 (exogenous pyrogen) 則為細菌、病毒、黴菌等微生物。其中最普遍、最廣為人知的是革蘭氏陰性菌細胞壁表面所產生的脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS)，又稱內毒素 (endotoxin)。內毒素會跟人體免疫細胞上的內毒素受體 (LPS receptor) 結合，活化人體的免疫機制，產生發炎、發燒等反應。它是細菌死後的產物，具熱穩定性，無法以加熱等滅菌消毒的方式去除，代表性的革蘭氏陰性菌為大腸桿菌。除了內毒素，外生性熱原也可能來自於革蘭氏陽性菌產生的外毒素 (exotoxin)、病毒、或黴菌，不過情況較不常見。外生性熱原若經由注射的方式進入人體，同樣會引發身體的一系列免疫系統反應，使單核球細胞、巨噬細胞分泌第一介白素等細胞激素，導致患者發燒，嚴重時甚至可能引發休克、死亡等。

#### 三、何謂 (兔子) 熱原試驗？

熱原試驗始於 1930 年代大型注射劑的發明。二次世界大戰時由於對大型注射劑的需求大增，更突顯了熱原試驗的重要性，於是逐漸建立了以兔子檢測熱原的標準試驗方法，其後各國也陸續將兔子熱原試驗收錄於藥典，成為當時法定唯一的熱原試驗法。

兔子熱原試驗(Rabbit Pyrogen Test, RPT)的目的，在偵測注射劑或醫療器材進入體內後，所造成的發熱程度。實驗的兔子需為 1.5kg 以上的成年健康家兔，公母不拘，一般皆選用紐西蘭白兔。如測試物為藥品，需將藥品自耳靜脈注射入兔子體內；如測試物為注射套組或醫療器材，則需先以液體沖洗其表面後，再將液體注射入動物體內。之後的 3 小時，每隔 30 分鐘測量一次肛溫，了解體溫上升的程度。

當時認為兔子的免疫機制與人體相似，對多數的熱原皆有反應，因此會使兔子體溫升高的產品，也會使人的體溫升高。經過兔子實驗證明不使體溫升高的產品，才能放心地被用在人體身上。

但因為兔子熱原試驗的靈敏度、準確度及人道問題備受爭議，目前已有人類全血試劑(MAT)可替代。

#### 四、何謂鱈血 LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 試驗法？

1964 年 Levin 及 Bang 發現鱈的血液在接觸到革蘭氏陰性菌細胞壁分泌的脂多醣(即內毒素)時，會產生凝結現象。進一步的研究發現，這是由於鱈血中的阿米巴細胞(amebocyte)存在一種酵素，會與內毒素產生酵素反應，導致血液凝結、甚至使鱈死亡(Young et al., 1993)。自此發展出了熱原試驗的替代方案—LAL 試驗法(Limulus amebocyte lysate test)，又稱細菌內毒素檢驗法(bacterial endotoxins test, BET)。

LAL 試驗法大致可分為凝膠法(Gel-clot method)、濁度定量法(Turbidimetric kinetic/end-point methods)、呈色法(Chromogenic kinetic/end-point methods)三種檢測方式。

LAL 試驗法比兔子熱原試驗更快速、更經濟，而且針對內毒素更加靈敏。它所需要的檢品量比兔子少很多，每次僅需 0.1ml；以凝膠法來說，實驗也僅需 1 小時，比兔子熱原試驗的 3.5 小時少了許多。更重要的是，針對最常出現的熱原物質—細菌性內毒素，LAL 試劑比兔子要靈敏得多。

#### 五、何謂人血熱原試驗？

當人體接收到外來的細菌、病毒等外生性熱原物質時，體內的免疫細胞，包括單核細胞(monocyte)、巨噬細胞(macrophage)等，會開始攻擊敵人，而產生讓身體發燒的內生性熱原—細胞激素(cytokine)，例如第一介白素(Interleukin-1  $\beta$ , IL-1  $\beta$ )、第六介白素(Interleukin-6, IL-6)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等。根據這個原理，約在八、九零年代開始，科學家開始研究以人類血液為模式的熱原試驗法—MAT (Monocyte Activation Test)，又稱 WBT (Whole Blood Test)。

經過多年來科學家不斷的研究、改良與測試，已發展出不同形式的人類血液進行實驗的方法，例如使用人類全血(human whole blood) (Hartung and Wendel, 1995)、人類周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PMBC) (Poole et al., 1988 and 2003)、人類單核細胞株(monocytic cell lines) (Eperon and Jungi, 1996; Peterbauer et al., 2000)…等方法。

歐洲替代方案確效中心(ECVAM)於 2006 年發表正式聲明，確認人血熱原試驗的有效性；隨

後美國替代方案確效跨部會協調委員會(ICCVAM) 也在 2008 年認可了這個試驗方法。

美國 FDA 在 2009 年公布允許 MAT 試驗法，今 (2012) 年 6 月更公告產業指南 (Guidance for Industry)，確認 MAT 可以替代兔子和 LAL，用於熱原試驗(FDA, 2012)。2010 年，歐洲藥典 (European Pharmacopoeia)正式收錄下列五種人血熱原試驗模式，包含 Human Whole Blood IL-1 (人類全血)、Human Whole Blood IL-6 (人類全血)、PBMC IL-6 (人類周邊血液單核細胞)、MM6 IL-6 (人類單核細胞株)、Human Cryopreserved Whole Blood IL-1 (人類冷凍全血)。

以全血為例，試驗方法是將健康、新鮮的人血施以抗凝血處理，再以無熱原、醫藥級的生理食鹽水稀釋後，使之接觸受檢產品。若檢品含有熱原，血液中的單核細胞會開始製造發炎性的細胞激素。檢品中的熱原越多，所製造出的細胞激素就越多。大約與檢品接觸的 2 到 3 小時後，即可測得細胞激素，8 小時後細胞激素的產量會達到高峰。之後再使用酵素連結免易吸附分析法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)，來檢測細胞激素的存在與多寡，即可得知熱原污染的程度如何 (Montag et al., 2007)。

科學家也發展了以冷凍全血來做為試劑的方法，發現解凍後的血液，其熱原試驗的效果跟冷凍前一樣好 (Schindler et al., 2004)。使用來源穩定安全、經過標準化處理的冷凍人血，大幅增加了 MAT 用在日常檢驗的可行性。

德國聯邦血清疫苗管理局(Paul-Ehrlich-Institute, PEI)則略為變通，將人血冷凍在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的環境中，能直接使用乾冰運送，保存期限亦長達 2 年以上，可大大增加冷凍全血在儲存、運送上的方便性。目前德國聯邦血清疫苗管理局已研發出二合一(IL-1 $\beta$  + IL-6)及三合一(L-1 $\beta$  + IL-6 + TNF- $\alpha$ )的細胞激素檢測法，使熱原的檢測更加精準(Montag et al., 2007)。

為了解人血與兔子、LAL 針對熱原反應的靈敏度，研究人員將兔子的血抽出，比照人血的實驗步驟，使二者分別接觸不同的熱原物質來試驗。結果發現，兔血與人血的免疫反應相似，不過在革蘭氏陽性菌熱原(LTA)的檢測上，人血較兔血靈敏得多。至於 LAL 試劑，則只對革蘭氏陰性菌所產生的內毒素(LPS)有反應，無法檢測出其他熱原。

## 五、兔子熱原試驗只是量測其體溫變化而已，而且可以反覆使用，有什麼問題？

(一) 兔子熱原試驗準確度受到質疑：早在 1950 年就有學者指出，由於實驗過程中兔子必須被強制固定無法動彈達數小時之久，期間更必須接受耳靜脈注射及反覆的體溫量測，可能因極度焦慮、緊迫而使體溫升高，造成實驗人員無法判定體溫升高究竟是因為動物太緊張，還是真的有熱原存在。另一方面，長時間的固定也可能導致血液循環變差，而使體溫不正常的下降，影響實驗判讀(Grant, 1950)。其後更陸續發現，不同的兔種、年齡、性別甚至飼養方式，對熱原的敏感度皆會有不同(van Dijck and van de Voorde, 1977; El-Khalik and Benoliel, 1982)，而這些變異因子，卻完全沒有在藥典中規範，使試驗結果多了許多不確定性。

(二) 兔子跟人體的免疫系統仍存在差異性：研究顯示某些會使兔子發燒的熱原，對人體可能不見得有影響，反之亦然(Nakagawa et al., 2002)；部分熱原雖能使兔子及人體都發燒，其引起發燒的劑量與發燒之程度也並不相似(Greisman and Hornick, 1969)。

(三) 實驗過程的人道問題：兔子熱原試驗雖未涉及疼痛程度較高的手術操作或安全性試

驗，僅包含靜脈注射、量體溫等簡易操作，但是為了使兔子乖乖接受耳靜脈注射及肛溫測量，並避免因活動而影響體溫變化，兔子試驗當日除飲水外，不得進食，且必需被緊鎖在如同斷頭台般的「固定器」中，完全無法移動頭部及身體長達數小時之久，這對無時無刻喜歡聞嗅、啃咬、奔跑、探索環境的他們來說，無異是相當大的精神折磨。兔子天性膽小、敏感、容易受到驚嚇，面對疼痛、不舒適的實驗過程，無法找地方躲藏，只能任由人類擺佈，無異造成兔子極大的緊迫與痛苦。若藥品遭受熱原污染，則兔子會發燒、休克甚至死亡。許多實驗兔子終其一生住在狹小的籠舍裡，在反覆施打多種藥物的實驗中度過。

## 六、蠶血 LAL 試驗法使用的試劑，只是抽取蠶血當原料，又不會殺死蠶，有什麼不好？

蠶的俗名為馬蹄蟹(horseshoe crab)，4 億年前即出現在地球上，是最古老的動物之一。全世界有 4 種蠶，其中美洲蠶(*Limulus polychemus*)分布於美洲大西洋沿岸，三棘蠶(*Tachypleus tridentatus*)、巨蠶(*Tachypleus gigas*)、圓尾蠶(*Carcinoscorpius rotundicauda*)則分布於印度太平洋海域。台灣本島西南部、金門、澎湖一帶沿海是三棘蠶的重要棲息地之一。蠶常棲息於砂質的淺海海底或潮間帶，繁殖期間，雄蠶會伏於雌蠶背上一同行動，故台灣民間稱其為夫妻魚或鴛鴦魚(游品清，2008；陳章波，2008)。

蠶在地球上生活了 4 億年，歷經了多次氣候及地質的巨大變化，現在卻因人類對自然環境的破壞，以及對蠶血的需求，面臨空前未有的生存危機。過去蠶曾廣泛分布於台灣西部沿海，如今只剩下金門、澎湖還能發現蠶的蹤跡。而金門、澎湖二地也成了蠶的保育重鎮。研究發現，蠶的壽命約在 20 至 25 年之間，成長相當緩慢，需花費 13、14 年的時間脫 16-17 次殼才能達到成熟(游品清，2008)。人工養殖蠶相當困難，行政院農委會水產試驗所於澎湖長期進行蠶的人工培育研究，至今能夠以 4 年時間培育出 12 齡蠶(每脫一次殼為一齡)，已超越日本記錄，為全球之冠(黃丁士，2011)。

由於人工繁殖困難，LAL 試劑的來源，幾乎百分之百來自野生的蠶。美國為最主要的 LAL 試劑生產國，目前共有 5 家生技公司經 FDA 核准可製造 LAL 試劑。一般抽血都選在春天成蠶上岸產卵時，據統計，1989 年美國有 13 萬隻蠶被捕捉抽血，其數量每年增加，至 1997 年已增加至 26 萬隻(HCTC, 1998)。通常在被捕捉後的 72 小時會被抽血，隨後便會被放回海洋，但死活不知。有時也會被賣給製造魚餌的工廠(ASMFC, 2001)。除美國外，中國大陸及日本也是 LAL 試劑的主要出口國(Hurton, 2003)。

抽血的方式是採用心包膜穿刺法，部分生技公司為了能快速採血，利用重力原理，以較粗的針穿刺心包膜讓血液向下流出，直到因凝結或流光自然停止。每隻蠶被採的血量並不一樣，以公蠶來說，範圍從 8.4ml 到 218.7ml 都有(Hurton, 2003; Walls, 2001)。然而，目前並不清楚安全的抽血範圍在哪裡，陸續也有研究指出，10-20%的蠶會因為抽血而死亡 (Rudloe and Hernkind, 1983; Thompson, 1998; Walls and Berkson, 2003)如果抽血伴隨外在壓力例如運輸、保定等流程，死亡率更提高到 29.4% (Hurton et al., 2009)。據調查，美國每年至少 3 萬隻蠶死於抽血(Bachinski et al., 2011)。

目前有生技公司已能利用基因工程，重組 LAL 試劑中凝集反應流程的因子 C，稱為重組因子 C(Recombinant Factor C, rFC)，其靈敏度穩定，且不須仰賴季節性的採血，可直接在實驗室製造，為一兼顧人道及保育問題的解決方案(Ding and Ho, 2001)。不過，雖然 LAL 試劑能夠敏銳、準確地偵測出內毒素，卻無法測出非內毒素的熱原，例如病毒、黴菌、革蘭氏陽性菌…的產物。因此，部分醫療產品，例如生物製劑、疫苗等藥物，可能仍無法完全採用 LAL 試劑，但可以人血熱原試驗法代替兔子做熱原試驗。