



財團法人 食品工業發展研究所

生物資源保存及研究簡訊 第27卷第4期

中華民國 103 年 12 月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎ 亞洲菌種聯盟第 11 次年會觀察

研發成果 2

- ◎ 造血幹細胞無血清體外增殖培養之研究
- ◎ 低強度超音波應用於生物醫學之概況與發展
- ◎ 標準生物參考物質生產與提供

產研新訊 12

- ◎ 『台灣細胞醫療促進協會』於 2014 年 12 月 5 日成立並舉行國際研討會

亞洲菌種聯盟第 11 次年會



ACM11 與會者合照 (ACM11 大會提供)

本所生資中心袁國芳主任及陳玉芬管理師應邀參加 10 月 29-31 日於韓國首爾舉辦之亞洲菌種年盟 (Asian Consortium for the Conservation and Sustainable use of Microbial Resources) 第 11 屆年會 (ACM11)，於大會報告本中心之發展近況，並與亞洲各菌種中心代表進行交流。

生物多樣性公約架構下的名古屋議定書 (The Nagoya Protocol on Access and Benefit-sharing) 自今年 10 月 12 日起生效，微生物等遺傳資源之跨國移轉，有賴各國菌種中心或生物資源中心 (以下通稱菌種中心) 之合作，以利議定書之落實以及移轉效率之提高。為此目的，一方面，ACM 提出了聯盟成員間的微生物國際交換網絡 (Network of International Exchange of Microbes under ACM, NIEMA) 系統之構想，與歐盟今年 4 月 16 日通過的 ABS 立法 (Regulation (EU) No 511/2014) 其中的 Registered Collection 系統，共同支援國際菌種聯盟提出的菌種移轉 TRUST (Transparent User-Friendly System of Transfer) 系統。另一方面，ACM 架構下的亞洲菌種整合目錄 ABRCN，也與國際菌種聯盟之全球菌種目錄 Global Catalogue of Microorganisms (GCM) 予以整合。以各洲菌種中心之區域整合為基礎之全球菌種中心合作模式逐漸成形，作為落實名古屋議定書之配套機制。

亞洲的新興菌種中心普遍對微生物的產業利用維持相當高的興趣，與歷史悠久並具有崇高學術地位的歐洲的菌種中心有所不同，關心微生物產業應用的議題成為 ACM 的特色。乳酸菌更是各菌種中心常見的收集與開發重點。例如，利用乳酸菌開發美容

用酵素、分析乳酸菌的抗突變活性、乳酸菌鑑定、從傳統食品分離乳酸菌。會議中本中心也報告了乳酸菌菌種鑑定及菌株鑑別的研究努力。會議期間本中心與會人員與 ACM 成員交換了各種合作的可能性，包括菌種鑑定及菌株鑑別的合作。

(文：生資中心陳玉芬管理師)

二、造血幹細胞與造血系統

造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 是指在血液或骨髓中，具有無限制增殖能力與具有分化為所有血液細胞與免疫細胞能力的原始細胞，此外造血幹細胞還具有能夠從骨髓移動到全身的循環系統，也具有回歸骨髓 (homing) 能力。造血幹細胞的數量相當稀少，約佔所有血液細胞的十萬分之一。而原本視為孕婦產後廢棄物的臍帶血，在發現其中含有豐富的造血幹細胞後，開啟了臍帶血臨床應用的發展，也為造血幹細胞移植提供了更多樣化的選擇。

人體內的血液中存在著多種不同血球細胞，主要分為淋巴細胞與血液細胞，都是由原始的造血幹細胞分化而來 (如圖一所示)。淋巴細胞包括 B 淋巴細胞 (B lymphocyte)、T 淋巴細胞 (T lymphocyte) 和自然殺手細胞 (nature killer cell)，負責全身性的免疫系統，循環於血液中，抵禦外來或非己的抗原物質，並產生免疫反應將其排除消滅，以維護人體的健康。血液細胞包括白血球 (leucocyte)、紅血球 (erythrocyte) 與血小板 (platelet)。白血球為有核細胞，壽命多半在 36 小時至數天，可再細分為顆粒性白血球 (granular leucocyte) 與無顆粒性白血球 (angranular leucocyte)。顆粒性白血球包括嗜中性白血球 (neutrophil)、嗜酸性白血球 (eosinophil) 與嗜鹼性白血球 (basophil)；無顆粒性白血球則包括了單核球 (monocyte) 與巨噬細胞 (macrophage)。白血球具有吞噬異物、消除病變衰老所造成的不正常細胞、調節免疫反應與防止體內血塊形成等功能。

造血幹細胞無血清體外增殖培養之研究

生資中心 / 研究員

姚少凌 (現職元智大學化學工程與材料科學學系副教授)

一、前言

至 1998 年起，成功地發現、分離並建立培養人類胚胎幹細胞 (embryonic stem cells, ES cells) 以來，幹細胞研究一直是極為受到矚目的研究主題。直到 2012 年，由日本學者 Shinya Yamanaka 教授以人工誘導式多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells) 的研究獲得諾貝爾生理 / 醫學獎時達到顛峰。在過去十多年

期間，財團法人食品工業發展研究所生資中心除了建立台灣幹細胞庫，以提供台灣產、學、研界品質優良的幹細胞外，細胞單元也持續的在幹細胞研究的領域下努力，筆者將藉由此篇簡訊，針對造血幹細胞進行深入淺出的介紹，並將細胞單元近年來在造血幹細胞以及無血清增殖培養相關的研究成果上，做一個整理 (如表 1 所示)。

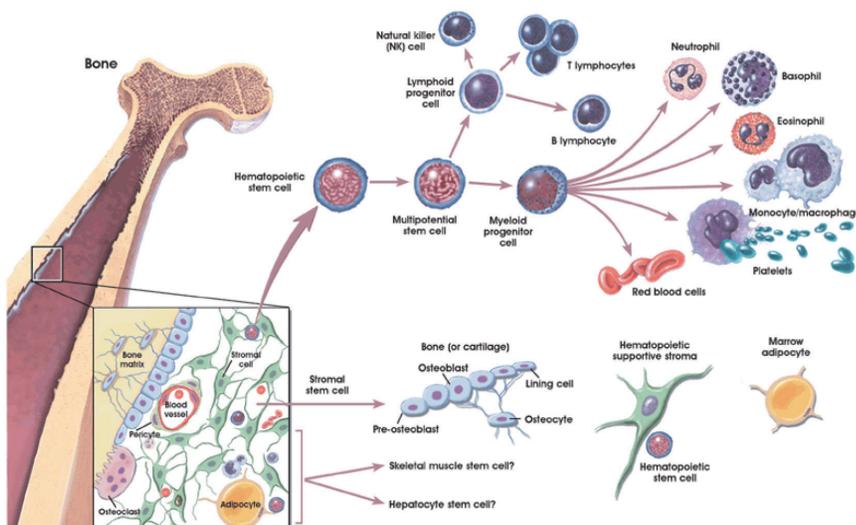


圖 1、造血幹細胞分化的途徑

(<http://www.nih.gov/news/stemcell/primer.htm>)

表 1、細胞單元關於造血幹細胞以及無血清培養歷年所發表之期刊論文與專利

期 刊	年份;卷期:頁數	題 目
Cytotherapy	2013;15:1126-35	A stromal-free, serum-free system to expand ex vivo hematopoietic stem cells from mobilized peripheral blood of patients with hematological malignancies and healthy donors
PLoS One	2013;8:e56715	Protein arginine methyltransferase 1 interacts with and activates p38 α to facilitate erythroid differentiation
Stem Cells	2011;29:1763-73	Lysophosphatidic acid induces erythropoiesis through activating lysophosphatidic acid receptor 3
J. Biol. Chem.	2010;285:20595-606	Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells
Exp Hematol.	2009;37:1330-9	Characterization and transplantation of induced megakaryocytes from hematopoietic stem cells for rapid platelet recovery by a two-step serum-free procedure
Biochem. Biophys. Res. Commun.	2009;378:112-7	Large generation of megakaryocytes from serum-free expanded human CD34 ⁺ Cells
J. Biomed. Sci.	2008;15:357-63	Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1 β expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages
Methods Mol. Biol.	2007;407:165-75	Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from human cord blood in serum-free conditions
Stem Cells Dev.	2007;16:1043-52	Generation of natural killer cells from serum-free expanded human umbilical cord blood CD34 ⁺ cells
Stem Cells Dev.	2006;15:70-80	Characterization of serum-free ex vivo-expanded hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood CD133 ⁺ cells
Exp Hematol.	2005;33:1273-4	Systematic strategy approach in medium design
Exp Hematol.	2004;32:720-7	A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells
Enzyme Microb Technol.	2003;33:343-52	Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells
專利編號	專利日期	名 稱
US 8762074 B2	2012/5/10-2032/5/10	Optimizing culture medium for CD34 ⁺ hematopoietic cell expansion
US 7723106 B2	2010/5/25-2027/1/28	Stroma-free, serum-free, and chemically defined medium and method for ex vivo mononuclear cell expansion using the same

紅血球為不帶有細胞核的細胞，壽命約為 120 天，內含有大量的血紅素，每個血紅素分子帶有四個鐵原子，使的紅血球具有攜帶大量氧氣與二氧化碳的功能，能夠從肺部攜帶氧氣提供全身組織與細胞生命活動所需，並能帶走代謝所產生的二氧化碳。血小板亦不帶有細胞核，也不具有完整的細胞結構，是由巨核細胞 (megakaryocyte) 胞質碎裂而來，壽命約為 5-9 天，功能為造成凝血反應，以避免體液與血液的大量流失。

在人體中，造血幹細胞必須以極驚人的速度來製造血液與

免疫細胞，以紅血球為例，平均每秒需產生約二百萬個紅血球，才能維持人體內紅血球數量的平衡與穩定。造血幹細胞同時也需要製造其他種類的血球與免疫細胞，是以數量稀少的造血幹細胞必須不斷的快速進行分裂與分化，方能使人體內血液與免疫細胞的數目維持在平衡且固定的數量，以保持生理狀態的均衡與正常。

三、造血幹細胞的鑑定

造血幹細胞的研究，首要步驟就是將造血幹細胞從骨髓或是血液中分離出來，而由於造血

幹細胞的外觀、大小與形態和一般的淋巴細胞相當類似，加上造血幹細胞所佔的比例實在太低，造成早期造血幹細胞研究上的困擾。直到 1988 年，Irving Weissman 教授發現了血球細胞的特殊表面標誌蛋白 (cell surface marker)，並發展出利用帶有螢光染劑的單株抗體進行與特定標誌蛋白的接合技術，再利用流式細胞儀 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 分選技術來達到分離出造血幹細胞的結果。現今，最常使用的鑑定方法就是根據造血幹細胞表面特定的標誌蛋白，來區分或分離純化造血幹細胞，而常見的造血幹細胞表面標誌蛋白有 CD34 抗原與 CD133 抗原，分別敘述如下：

(1) CD34 抗原：

CD34 抗原分子是一種單鏈跨膜的醣蛋白 (single-chain transmembrane glycoprotein)，分子量約為 90-120 kDa，表現在造血幹細胞、造血前驅細胞、血管內皮前驅細胞、胚胎纖維母細胞以及少數的神經組織，而在分化成熟的血球細胞表面則不會表現。CD34⁺ 細胞約佔骨髓單核細胞 (mononuclear cells, MNCs) 的 0.5-3%；臍帶血單核細胞的 0.15-1.5%；在周邊血液中最少，約為 0.05-0.2%。在小鼠、非人靈長類以及人類的自體移植實驗都證實，經過大劑量化療以及放射線自療後，輸入純化過後的自體骨髓 CD34⁺ 細胞，可快速恢復患者的造血功能，顯示 CD34⁺ 細胞中包含了造血幹細胞。

一般認為，並非所有的 CD34⁺ 細胞都是造血幹細胞，CD34⁺ 細胞是多種細胞的集合，是屬於異質性的細胞群，但是造血幹細胞則全部表現 CD34 抗原，

因此藉由 CD34 抗原的篩選，可以使造血幹細胞得到相當程度的純化。若是將 CD34+ 細胞再依照其他表面抗原分為若干亞群，可以得到一群更接近真正造血幹細胞的細胞。例如 CD34+CD38- 細胞較 CD34+CD38+ 細胞為原始。

(2) CD133 抗原：

CD133 抗原分子，舊名又稱為 AC133 抗原分子，是一種單鏈跨膜的醣蛋白，分子量約為 117 kDa，是在 1997 年被新發現的造血幹細胞表面抗原，表現在造血幹細胞、造血前驅細胞、胚胎肝臟與極少部分的 CD34+ 細胞上。在造血幹細胞中，CD133 抗原主要是會共同表現在 CD34bright 細胞上，近來有文獻顯示，CD34+CD133+ 細胞在 NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immune-Deficiency) 老鼠移植模式中是最具有骨髓重建 (bone marrow repopulating/reconstituting) 功能的細胞。

四、造血幹細胞的臨床應用與未來發展

造血幹細胞是目前臨床上，應用最為成熟的幹細胞，其相關的研究與常規的臨床經驗，迄今已經有近六十年的歷史。最早相關的研究可以追溯到 1945 年，當年美軍的兩顆原子彈轟炸日本的廣島與長崎，結束了二次大戰，同時也開啟了造血幹細胞的研究。當時許多的臨床案例發現人體經過放射線的污染與照射後，會造成染色體的變異與造血系統的破壞等導致死亡。1956 至 1957 年間，Ford、Nowell、Gengozian 等多位科學家在老鼠的動物試驗上，確認放射線的照射會造成骨髓造血功能的破壞。之後在 1961

年，Till 以及 McCulloch 這兩位科學家同樣利用老鼠的動物實驗，確認了老鼠骨髓內含有豐富的造血幹細胞，可以利用健康老鼠的骨髓，透過骨髓的移植來挽救經過放射線照射瀕死的老鼠，奠定了現今臨床骨髓移植的基礎。很快的在 1968 年，成功的進行了第一例人類的骨髓移植；1985 年確認了週邊血液中也含有造血幹細胞，並成功的進行了第一例人類的週邊血移植；1986 年科學家 Broxmyer 發現孕婦產後的臍帶血中亦含有豐富的造血幹細胞，在 1988 年，成功的進行第一例人類的臍帶血移植。現今將骨髓移植、週邊血移植以及臍帶血移植合併稱為「造血幹細胞移植」。

造血幹細胞在臨床上的應用主要是治療惡性血液方面的疾病，針對患者進行大劑量的化療 (chemotherapy) 以及放射線治療 (radiotherapy)，以破壞全身的造血系統，再進行造血幹細胞的移植，以達到造血功能重建的目的。下列將介紹目前造血幹細胞已經成熟的臨床應用以及未來可能的發展：

(1) 血液腫瘤治療：

血液腫瘤方面的疾病，是由於人體內白血球不正常的增生所造成，主要的療法是針對病人進行大劑量的化療與放射線治療，最大限度的破壞其不正常的造血細胞 (同時也破壞了正常細胞)，再將經過人類白血球表面抗原 (human leukocyte antigens, HLAs) 比對相符的造血幹細胞進行移植，藉此重建患者正確的造血與免疫系統，以提高治療效果與患者的生存期，尤其是具有高轉移性與全身性的血液腫瘤疾病。這類血液腫瘤的疾病包括：acute lymphoblastic leukemia、acute

myeloblastic leukemia、chronic myelogenous leukemia (CML)、Hodgkin's disease、multiple myeloma 與 non-Hodgkin's lymphoma。

(2) 遺傳性血液功能缺陷治療：

另一方面異體的造血幹細胞移植則是應用在治療遺傳性的血液功能缺陷，如先天性的貧血 (缺乏某些血液細胞) 以及先天性的新陳代謝錯誤 (基因上的缺陷導致缺乏某些酵素)，這類的貧血疾病有：aplastic anemia、beta-thalassemia、Blackfan-Diamond syndrome、globoid cell leuko-dystrophy、sickle-cell anemia、severe combined immuno deficiency、X-linked lymphoproliferative syndrome、Wiskott-Aldrich syndrome 和 Fanconi's anemia；而新陳代謝錯誤的疾病則有：Hurler's syndrome、Lesch Nyhan syndrome 和 osteopetrosis。

(3) 固體腫瘤治療：

2001 年，在美國國衛院發表了一項令人振奮的研究報告，在為 38 位患有腎腫瘤的病患抑制免疫系統功能後 (並非完全破壞)，移植 HLA 比對符合的造血幹細胞，三個月後，發現約有一半患者的腎腫瘤會萎縮。此外也有報告顯示，在造血幹細胞具有抗癌的活性 (antitumor activity)，會抑制血癌與乳癌細胞的生長。目前，許多的實驗正積極研究如何利用造血幹細胞抑制其他固態腫瘤的生長，如肝臟、前列腺、卵巢、結腸、食道、肺臟與胰臟等腫瘤。

(4) 基因治療：

自人類首例基因治療臨床試驗實施以來，人們對基因治療一直有著憧憬，希望藉由基因的校正來達到治療基因缺陷的疑難雜

症，目前研究主要是針對糖尿病、惡性腫瘤、愛滋病與囊性纖維化等疾病。基因治療的技術到目前為止尚未成熟，仍有許多瓶頸待突破。而以造血幹細胞為基因治療的靶細胞 (target cell) 則有下列優點：

1. 造血幹細胞具有自我更新與無限分裂的能力，目標基因導入後能長期表現，一次治療終身受用，對於先天性遺傳缺陷的病患相當重要。

2. 被導入目標基因的造血幹細胞可分化為各種血液細胞，藉由循環系統到達全身各組織與器官，可使目標基因發揮最大延伸的功能。

3. 造血幹細胞的分離純化、體外培養、冷凍保存以及移植技術日趨成熟，提供造血幹細胞在基因治療中強而有力的後盾。目前已經嘗試於治療腺苷脫氨酶 (ADA) 缺乏症、HIV 感染、Gaucher disease 與癌症的基因治療。

五、造血幹細胞在臨床應用上的瓶頸

除了抗原比對困難外，造血幹細胞在臨床應用上所遭遇到最大的瓶頸就是能夠取得的數量稀少，需要經過繁雜的手續方能從捐贈者身上取得足夠移植的造血幹細胞。臨床上證實，移植高劑量造血幹細胞的病患存活率較移植劑量低的病患為高，而醫學上認定的最適移植劑量為 2.5×10^6 CD34+ 細胞 / 公斤。從臍帶血中所能獲得的造血幹細胞數量甚為稀少，而且不像骨髓與周邊血液可以重複抽取，可持續累積直到移植所需要的劑量。目前為止利用臍帶血造血幹細胞移植的紀錄為體重 40 公斤的少年。而且因為造血幹細胞的數量較低，會導致

造血功能重建 (主要為血液中嗜中性白血球以及血小板濃度的回覆) 所花費的時間比骨髓或周邊血移植來的長，增加移植失敗的風險。找尋體內 (in vivo) 或體外 (ex vivo) 培養的方式來增加臍帶血造血幹細胞的數量，並保持其幹細胞原始的特性，便成為目前造血幹細胞在移植醫學研究上最重要的課題。

六、造血幹細胞的培養與增殖

歸納出目前文獻中，造血幹細胞體外增殖培養系統常見的培養基條件有三：1. 與間質細胞 (stroma cell) 共同培養；2. 血清的添加與 3. 細胞激素的添加。

造血幹細胞與間質細胞共同培養，雖然可以模擬人類骨髓的微環境，但是當移植到患者體內時卻會造成嚴重的免疫排斥反應；血清的添加，可以提供許多荷爾蒙 (hormone)、生長因子 (growth factor)、蛋白質 (protein) 與營養源等的成分，但是也增加了細菌 (bacteria)、黴漿菌 (mycoplasma) 與病毒 (virus) 感染的機會，同時也可能因為血清批次的不同而增加了許多的不確定性，加上血清的價格相當昂貴且變動劇烈，因此現今對於各種臨床用細胞的培養，尤其是細胞本身或其代謝產物將用於人體的細胞產品，都被美國食品與藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 要求培養的過程中不可使用間質細胞與血清，而且所有的添加物必須有明確的化學組成與濃度，以減少人體使用上的副作用。歸納常見的血清取代物如下：

1. 非荷爾蒙類蛋白質：

血清球蛋白 (serum albumin) 有多項生理功能，如可以緩衝 pH 與滲透壓的變化、中和培養基中

毒性物質、協助動物細胞抵抗機械剪應力、與脂肪酸結合後，可攜帶、提供脂肪酸、並作為膽固醇的攜帶者；Albumax I 是一種高脂性 (lipid rich) 的球蛋白；運鐵蛋白質 (transferrin) 則是一種運輸鐵離子的蛋白質，對大部分的細胞增殖都有促進的效果。

2. 荷爾蒙類的蛋白質與其他分子：

最常被添加的是胰島素 (insulin)，可作為細胞生長和維持因子，其功能為增加葡萄糖與 uridine 的吸收，加速核糖核酸 (RNA)、蛋白質、肝醣、脂肪酸及脂質的合成；腎上腺皮質素 (hydrocortisone) 與人工合成皮質素 (dexamethasone) 都有文獻報導用於無血清培養基。

3. 氨基酸：

氨基酸多半在基礎培養基中已經被添加，基礎培養基約含有 13-21 種氨基酸，Eagle 曾提出 arginine、glutamine、histidine、leucine、isoleucine、lysine、methionine、phenylalanine、threonine、tryptophan、tyrosine、valine 與 serine 等 14 種氨基酸是動物細胞生長所必須的。其中麩胺酸醯胺 (glutamine) 可作為能量來源與碳源，所以在無血清培養基中通常會將麩胺酸醯胺的添加量增加數倍。

4. 抗氧化劑：

在細胞培養的過程中，氧氣與某些細胞會產生氧自由基 (oxygen radical)，具有很高的氧化能力，會攻擊細胞導致細胞的不正常生長與凋亡，因此需要添加抗氧化劑來中和培養基中的氧自由基，常用的抗氧化劑有：2-mercaptoethanol、monothioglycerol、pyruvate、catalase、superoxide dismutase 與 glutathione peroxidase 等。

5. 其它：

目前有些細胞在完全化學限定 (chemical defined) 的培養基中並無法存活。所以由動物組織或其他來源的萃取物也常用於取代血清，其中常見的有：peptone、tryptose phosphate broth、yeast extract、casein enzymatic hydrolysate、lactalbumin hydrolysate 及 primatone 等，其缺點是組成不明確。

另外，在造血幹細胞的體外培養系統中，細胞激素的存在亦是相當重要的，其來源可以是由共同培養的間質細胞所提供，或是額外添加。細胞激素對造血幹細胞的作用是相當複雜的，至今尚未能有明確的定論，同一種細胞激素對於細胞可能產生不同作用，包括促進 (promotive)、抑制 (inhibitive)、拮抗 (antagonistic) 或協同 (synergistic interaction) 作用，取決於：細胞激素是單獨作用或與其他細胞激素共同作用、濃度的高低以及對於不同分化程度的細胞而有不同的作用等。文獻中對於細胞激素在造血幹細胞體外增殖培養系統中所扮演的角色一直很難以有定論，導致細胞激素對造血幹細胞增殖的影響時常有不同的結論，甚至是相反的結果。歸納常見有助於造血幹細胞增殖的細胞激素如下：

1. Stem cell factor (SCF, 又名 c-kit ligand (KL) 或 mast-cell growth factor (MGF))，是一種作用在早期造血程序的生長因子，在人體骨髓的環境中能夠刺激髓系與淋巴系的前驅細胞增殖，分子量為 18.4 kDa、含有 164 個 amino acid residues 的蛋白質。

2. Flt-3 ligand/Flt-2 ligand (FL) 有刺激骨髓中具有形成群落能力的前驅細胞的增殖能

力以及避免早期前驅細胞凋亡 (apoptosis) 的能力。分子量為 17.6 kDa、含有 155 個 amino acid residues 的蛋白質。

3. Interleukin-3 (IL-3) 能刺激骨髓中某些細胞形成特定的細胞群落，包括能夠形成 megakaryocyte、neutrophil 與 macrophage 等群落的細胞。分子量為 15.0 kDa、含有 133 個 amino acid residues 的蛋白質。

4. IL-6 是一種非特定與針對早期血液細胞的細胞激素，能與 SCF、FL 或 IL-6 sR(溶解態的 IL-6 接受器) 等激素共同作用誘導造血幹細胞進入增殖的細胞週期，在人體多半是由 T cell 或是 B cell 所分泌。分子量為 20.3 kDa、含有 184 個 amino acid residues 的蛋白質。

5. IL-6 sR (IL-6 soluble Receptor) 能與 IL-6 形成高親和力的結合來提高 IL-6 的活性，並在溶液中形成複合物 (complex)，再與細胞膜上的糖蛋白 gp 130 做結合來傳遞訊號。分子量為 80 kDa、含有 339 個 amino acid residues 的蛋白質。

6. IL-11 是一種高能力的生長因子，能夠促進淋巴系細胞 (T 細胞與 B 細胞) 的生長。分子量為 19.1 kDa、含有 178 個 amino acid residues 的蛋白質。

7. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 是一種由 T cell、macrophage、fibroblast 或是 endothelial cell 所分泌的多功能細胞激素，能夠刺激 neutrophil、eosinophil 與 macrophage 的生成。在臨床上用來加速血液細胞的恢復速率。分子量為 14.6 kDa、含有 128 個 amino acid residues 的蛋白質。

8. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 能刺激骨髓中特定的細胞形成 neutrophil，此外 G-CSF 還能夠增加 neutrophil 在免疫系統中的活性。分子量為 18.7 kDa、含有 174 個 amino acid residues 的蛋白質。

9. Thrombopoietin (TPO，又名 Mpl-ligand 或是 MGDF)，能夠刺激 megakaryocyte 的增生與成熟，也能提高血小板在體內循環系統的濃度。分子量為 18.5 kDa、含有 174 個 amino acid residues 的蛋白質。

10. Erythropoietin (EPO)，在人體內是由腎細胞所分泌，主要是刺激紅血球前驅細胞的增生與分化。分子量為 21 kDa、含有 153 個 amino acid residues 的蛋白質。

11. Stem cell growth factor- α (SCGF)，是一種新發現的造血生長因子，主要是作用在造血早期的階段，能夠促進原始造血細胞的生長。與 EPO 或是 GM-CSF 共同合用，能夠促進紅血球系或是骨髓系的細胞增生。分子量為 33.9 kDa 的非糖基化蛋白質。

七、結語

經過多年來的研究與臨床試驗，造血幹細胞是临床上應用最為廣泛與成熟的幹細胞，也帶動了許多新興產業的出現。儘管如此，目前依然有著許多應用上的瓶頸與限制。食品所生資中心在經濟部科專計畫與創新前瞻計畫的支持下，得以進行幹細胞相關的研究，細胞單元的同仁也期許能在幹細胞的領域下繼續努力，協助帶動台灣幹細胞研究、醫療與產業的發展，也為人類的健康帶來更好的保障。

低強度超音波應用於生物醫學之概況與發展

生資中心 / 副研究員
溫政浩

超音波是指任何聲波或振動，其頻率超過人類耳朵可以聽到的最高閾值 2000Hz，所以一般人耳不可聽見其聲波。一般超音波檢測所使用頻率範圍由 1MHz 至 25MHz，基本設備需有電子訊號產生器，藉著轉換能量的器具，或稱探頭 (Transducer Probe) 發射出超音波，再經由接觸媒質傳導至物件中。當傳至物體面時，超音波可能反射或透射，藉由分析反射或透射訊號，可了解物質內部之組成與構造。

超音波傳導在碰到物體的時候，會產生反射與折射的特性，在二次世界大戰時即廣泛用於偵測與聲納裝置上，而後超音波技術在醫學上的應用才被推廣。最初在醫學的應用上，研究者用探頭將超音波發射於物體或人體內，並接受傳輸其反射或折射的音波，產生相對應的影像，超音波就是利用這種原理將聲波轉換為可供檢測的影像。

目前應用在醫學上的超音波

大致上都屬於低強度超音波 (Low Intensity Pulsed Ultrasound, 簡稱 LIPUS)。目前最常應用在醫學上的 LIPUS 是指頻率範圍在 1~3MHz 內，強度大致在 30mW~1W/cm² 之間的超音波，過高的強度會導致組織過熱而傷害生物體。目前低強度超音波的在醫學上的使用，不只有觀察內部臟器影像的功能，其他如修復骨骼損傷或是軟骨修復的成效都已被證實，以下將介紹低強度超音波在現今生物醫學的各種應用。

(一) 骨折癒合

目前低強度超音波在醫學上的應用，效果最顯著的是骨折癒合方面。目前這項技術在 1994 年時已經通過美國食品與藥物管理局 (The Food and Drug Administration, FDA) 的認可，可應用在骨折的癒合復健上。其實早在 1952 年，研究學者們就發現在骨折的兔子身上，如果施以連續的超音波治療，斷裂部位骨骼

的癒合情況會較好。因此在 1953 年時進行臨床試驗，在 8 位患者身上也發現斷骨處產生較多量的癒合組織。30 年後，Dyson 與 Brookes 等人也在骨折的兔子腓骨上，以 500mW/cm² 的強度持續刺激受傷處，證實骨骼癒合的速度會增快。

上述研究顯示低強度超音波會影響骨質癒合與鈣化程度，因此討論相關機制的研究也跟著興起。如表 1 所示，在體外細胞培養的實驗中，骨質形成相關機制會因低強度超音波的治療而有所改變，且大致上都往促進骨質生成的方向。有些細胞也會因為超音波的關係而分泌更多有關骨質合成的細胞激素，如 PDGF, TGF- β ... 等。目前研究上認為低強度超音波治療骨折的機轉仍不明確，一般認為超音波可能向骨折處產生微小的力量，刺激骨骼適應及改變其結構；同時組織吸收超音波的能量，使代謝速度正常，也可使局部體液的流動加速，增加養分供給及廢物排除，而促進骨骼生成。

低強度超音波療法的使用首先由 Xavier 和 Duarte 於 1983 年提出，他們針對骨折癒合不良的病患使用該療法，治癒率可達 85% 以上。至於骨折治療方面，

表 1、超音波與骨生成作用相關之文獻。(J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A(2):259- 70.)

Study	Cell Model	Signal Intensity	Observed Effects
Chapman et al., 1980 ⁴⁵	Thymocytes	0.5-3 W/cm ² 2 W/cm ²	Decreased intracellular K ⁺ ions, decreased K ⁺ ion uptake, increased K ⁺ ion efflux
Ryaby et al., 1989 ⁴⁶	Differentiating cartilage and bone-cell cultures	200 mW/cm ²	Increased Ca ⁺ incorporation
Ryaby et al., 1991 ⁴⁷ , 1992 ⁴⁸	MC3T3/TE85 osteoblastic cell-lines	20, 30, 45 mW/cm ²	Increased adenylate cyclase activity, increased expression of TGF- β
Wu et al., 1996 ⁵²	Chondrocytes	50, 120 mW/cm ²	Increased aggrecan mRNA expression
Parvizi et al., 1997 ⁴⁹ , 1999 ⁵³	Chondrocytes	50-500 mW/cm ²	Increased release of intercellular Ca ⁺ , increased aggrecan mRNA expression, increased proteoglycan synthesis
Kokubu et al., 1999 ⁵⁰	MC3T3 osteoblastic cell-line	30 mW/cm ²	Increased expression of PGE ₂ /COX-2
Ito et al., 2000 ⁵¹	SaOS-2 osteoblastic cell-line HUVEC endothelial cells	30 mW/cm ²	Increased PDGF-AB secretion

研究報告顯示低強度超音波的確可加速骨痂 (Bone Callus) 的生長，縮短骨折癒合的時間。

(二) 組織重建與細胞增殖技術的研究

組織重建 (Tissue Engineering) 是利用細胞、材料與工程的原理，外加一些維持生理活性的物質，使製造出來的產品具有可以取代原本失去功能的組織，包括了具有完整功能的細胞、細胞生長貼附所需的細胞骨架與維持正常生理機能的生長因子與環境。目前組織重建所面臨最大的挑戰之一，是需要足夠數量且功能性完整的細胞。

有關利用低強度超音波增加細胞產量的研究，在間質幹細胞 (Mesenchymal stem cell) 的研究上得到證實。在 2009 年，Chen 等人發現只要加入適當的誘導激素與超音波的刺激，形成軟骨細胞 (Chondrocyte) 的數量可以大量增殖。有些研究也顯示，導入超音波的對於細胞數量的增加並無太大助益，反而是影響其細胞外基質的產出量，進而影響細胞的生長狀態。目前大部分關於間葉幹細胞與超音波的研究都指出，加入低強度超音波培養的細胞增殖數量會較高，且成骨作用 (Osteogenesis) 會明顯增強。

在 2008 年時，Inubushi 等人也發現人類牙周韌帶上取得的幹細胞，在培養過程中加入低強度超音波後，不只細胞數量增多，更可以成功分化成牙骨質母細胞 (Cementblast)。低強度超音波對於牙齒的組織重建工程非常重要，也許未來使用超音波與個人取得的幹細胞，就可以進行牙齒的重建工程，取代以往植牙的方式。其他細胞，如纖維

母細胞 (Fibroblast)、成骨母細胞 (Osteoblasts) 與單核球也可經由導入超音波達到增殖細胞數量的目的。Tarek H. El-Bialy 等人的實驗室對骨髓裡的幹細胞做了超音波的相關研究，也發現低強度超音波處理的幹細胞數量會有增加的趨勢，也跟超音波的強度成正比，如圖 1 所示。

體外細胞數量的提升對於細胞治療或是組織重建都是非常重要的指標，包括了造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell, HSC)。

造血幹細胞自從在 50 年代被發現後，一直都被視為解決血液疾病的救星，也是目前最被廣泛應用於臨床治療的細胞。加拿大亞伯塔大學的陳頡教授在 2012 年發表了一份文獻，指出搭配低強度超音波與造血幹細胞增殖培養基，相對於對照組，可以增加造血幹細胞的增殖倍數達一倍以上，且不影響其表面抗原或分化能力，對於大量增殖造血幹細胞具有莫大的潛力，也提供了未來造血幹細胞移植治療無限的希望。

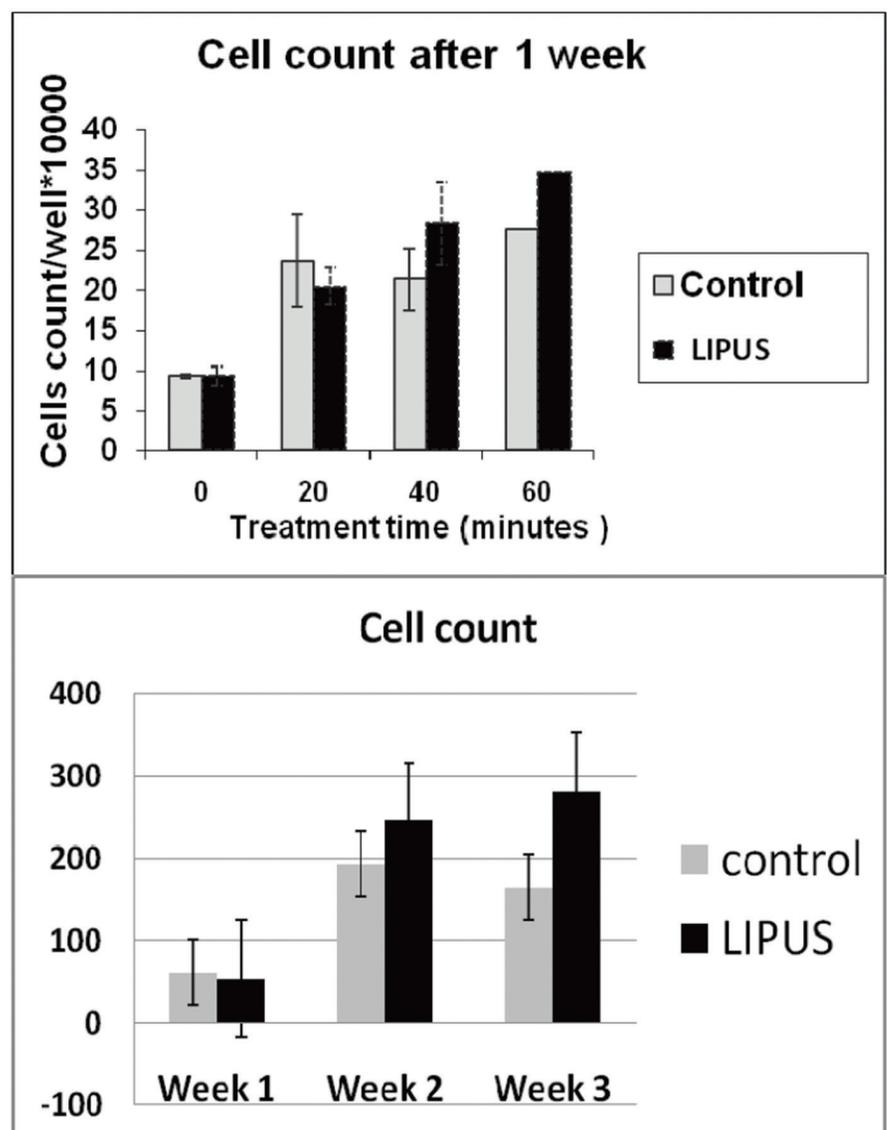


圖 1、低強度超音波對於骨髓內幹細胞生長之影響。

(Tarek H. El-Bialy (2010). Low Intensity Pulsed Ultrasound: A Laboratory and Clinical Promoter in Tissue Engineering)

(三) 空穴效應 (Cavitation) 與藥物投遞系統的開發

超音波廣泛的應用在工業與民生用途中，就是利用其超音波高速震盪、疏密有秩的特性，推動介質作用，使液體分子間產生壓力的交替變化，形成真空的微氣泡 (Microbubble)；但是當聲壓累積到一定程度時，氣泡會持續擴張，並在正壓的區域受到擠壓與閉合，這種現象成為空穴效應 (cavitation)。當洗淨液中無數的細小的微氣泡，在震盪過程中受壓破裂時，產生強大的衝擊力可將物品的表面與死角的髒汙剝離，達到徹底洗淨的效果。目前像鐘錶、珠寶首飾、鏡片、光學儀器等產業，就需要利用超音波洗淨技術來進行精細的清潔工作。

因為超聲波可以產生無數細小的微氣泡，因此適合當作攜帶投遞藥物的載體；而另一方面，藉由超音波的震盪控制微氣泡的破裂，破裂瞬間可以改變附近組織的通透度，進而將微小的藥物分子送入目的地，達到治療的效果，如圖 2 所示。所搭載的藥物形式不限於小分子，甚至連基因都可以直接搭載於其上，包括了疏水性

分子藥物或是脂質體 (liposome)。目前國內由長庚醫院腦瘤研究團隊，利用低強度超音波結合石墨烯奈米粒子，成功開發了腦瘤治療法。研究團體利用石墨烯奈米粒子攜帶大量化學治療藥物，配合超音波治療腦部腫瘤，目前動物實驗上發現可以完全抑制腦瘤的生長，且沒有復發的跡象。此研究可改變以往藥物投遞系統無法精準投遞藥物的缺點，且低強度的超音波對於人體沒有傷害，又容易控制其強度與頻率範圍，已成為未來研究的導向。

(四) 微生物發酵與其他研究

上述的研究說明了超音波的應用不僅在工業與日常生活，且在生物醫學上也得到相當廣泛的應用。而最近幾年的研究中也發現，低強度超音波對於一些微生物發酵產物也有所助益。加拿大亞伯塔大學的陳頡教授指出，經由低強度超音波處理過的微生物發酵反應中，會比對照組高出約 31% 的生物性酒精產量。而在製作抗體方面，陳頡教授也發現融合瘤 (Hybridoma) 經由超音波刺激後，抗體的產量增加了約 60%。而 Bernardi 等人的研究也

宣稱可以利用超音波取得更多的血小板溶解產物 (Platelet lysate)，且可以供給細胞營養且不影響細胞的特性，被視為可以取代目前培養系統的胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)。雖然上述研究都還未被正式運用在工業化生產上，且機制也還未被清楚探討，顯示未來低強度超音波或許可以廣泛應用在此工業化製程方面，減少原物料成本與製程時間。

結論

超音波早在被人類發現前就已經存在大自然中，舉凡鯨豚類互相溝通的訊號，蝙蝠獵食的回音定位，都是屬於超音波的一種。最早的超音波應用為應用在軍事情用途上，例如雷達與聲納裝置的使用，而後來也漸漸推廣至工業與醫療上。超音波的優點為不需有侵入性的診察或治療，也沒有放射線或輻射等的威脅，因此成為最重要的醫學檢測方式之一。

除了可提供物體成像外，低強度超音波在醫學上的使用也有一段時間，且技術也非常成熟。目前美國食品藥物管理委員會也通過低強度超音波可作為治療骨折的醫療方法，且生物學實驗上也證實超音波的確對於骨骼癒合與軟骨生成具有一定的功效。不止在骨骼癒合方面的成就，低強度超音波對於特定細胞的增殖也具有一定的助益，對於日後組織重建醫學的發展提供極大的潛力。

開發精準的藥物投遞系統一直都是醫療上的目標，超音波導入這方面的研究也讓我們看到了一些新契機。結合超音波容易控制與無其他副作用的優點，目前在動物實驗上可看到不錯的成果，未來勢必會有更多的臨床試驗。

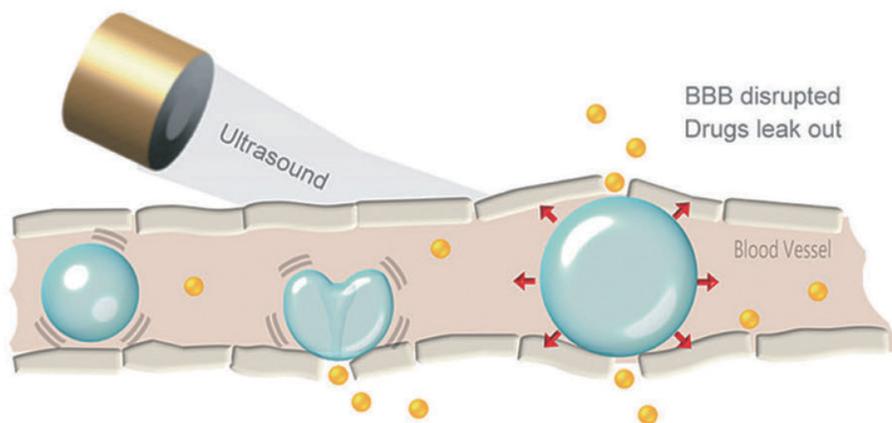


圖 2、超音波應用於藥物投遞系統之假想圖。
(Chang Gung Med J. 2012;35(2):125- 39.)

另一方面，工業化製程的理想狀態是可以利用有限的原物料成本達到最大的收益成果，目前研究也發現超音波可以增加這些產物量，對於工業化生產提供相當大的效益。總結以上，低強度超音波不止在現今工業與醫學上有貢獻，也提供無限的潛力與希望。

參考文獻：

- Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chiericato K, Lievore C, Madeo D, Rodeghiero F, and Astori G. 2013. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 15(8):920-9.
- Kang S.T. and Yeh C.K. 2012. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. *Chang Gung Med J*. 35(2):125-39.
- Khan Y. and Laurencin C.T. 2008. Fracture repair with ultrasound: clinical and cell-based evaluation. *Suppl 1*:138-44.
- Xing J.Z., Yang X., Xu P., Ang W.T. and Chen J. 2012. Ultrasound-enhanced monoclonal antibody production. *Ultrasound Med Biol*. 38(11): 1949-57
- Xu P, Gul-Uludag H, Ang WT, Yang X, Huang M, Marquez-Curtis L, McGann L, Janowska-Wieczorek A, Xing J, Swanson E and Chen J. 2012. Low-intensity pulsed ultrasound-mediated stimulation of hematopoietic stem/progenitor cell viability, proliferation and differentiation in vitro. *Biotechnol Lett*. Oct;34(10):1965-73.
- Mohamed Shaheen, Michael Choi, Woon Ang, Yupeng Zhao, James Xing, Ray Yang, Jida Xing, Jian Zhang and Jie Chen. 2012. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production *Cell Transplant*. 57:462-468.
- <http://www.math.thu.edu.tw/activities/program/finbiosci2003-2005/compsci/bioengineer/ch6.htm>

標準生物參考物質生產與提供

生資中心 / 副研究員
廖麗娟

生資中心於 2012 年生產第一株參考物質 (Reference Material, RM)-L929(NCTC 929, BCRC RM60091) 細胞，其生產製備皆依照 ISO Guide 34，並通過財團法人全國認證基金會鑑定合格之參考物質生產機構。L929 細胞來源為小鼠結締組織，主要可應用作為測試醫療器材或其萃取物 (依據 ISO10993-5) 引起之細胞毒性測試之測試菌株之一。

2013 年建立一株參考物質 -WJMSC(瓦頓氏凝膠 (Wharton's jelly, WJ) 間質，幹細胞 (mesenchymal stromal cells (MSCs), BCRC RM H-WJ001)，WJMSC 經由表面抗原分析其具有 CD45(-)、CD 34(-)、HLA class II (-)、CD73(+)、CD90(+)、CD105(+) 及 HLA ABC(+) 之表現的間質幹細胞的特性，並可在體外試驗成功的誘導分化成脂肪細胞、軟骨細胞及硬骨細胞，因此可作為間質幹細胞表面標誌及分化特性之標準菌株。

生資中心即將於 2014 年底完成新增一株參考物質 -HepG2(人類肝癌細胞株，

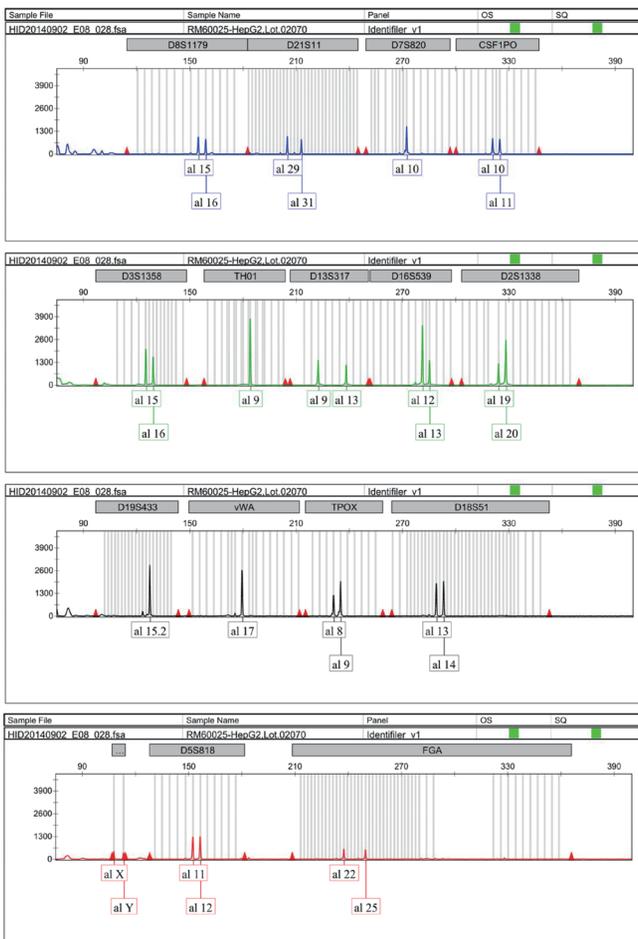
BCRC RM60025)，主要應用於體外抑制肝癌試驗之參考菌株，並完成參考物質之純度、無菌性、穩定度及均勻性之分析，純度分析經由農科院動科所生物安全測試實驗用利用細胞種源鑑定技術 (Isoenzyme) 測試 HepG2 結果為 100% 為人類細胞以及本所人類細胞株指紋鑑定技術比對資料庫確定 100% 為 HepG2 細胞，以及利用螢光免疫染色分析確認具有肝癌細胞株可表現甲種胎兒蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 及 CYP3A(cytochrome P450 3a) 之能力，歡迎學研界先進們多加利用。

參考物質細胞 BCRC RM60091 (即為 NCTC clone 929)、BCRC RM60596 (即為 WJMSC 細胞) 已經公開可分讓給各界使用，另外 BCRC RM60025 即將公開。欲了解這三株細胞株的特性，請直接到訪 BCRC 官網，點選生物資源線上目錄 (https://catalog.bcrc.firdi.org.tw/BSAS_cart/)，在 BCRC number 鍵入 RM，並勾擇 cell，enter 或 submit search，查詢結果頁列表出已經公開的細胞株編號及相關資料。

(A)

測試物質名稱	校正後位移(Corrected Migration Distances, CMD)						
	NP	G6PD	MD	MPI	PepB	AST	LD
Standard (L929)	24.7	18.1	12.0	14.5	7.2	10.2	8.0, 12.0, 15.0
Control (HeLa)	12.8	15.8	9.0	12.5	12.2	15.0	-5.0, 3.0, 10.0, 17.5
Human	12.8	12.1	8.3	12.9	12.4	15.0	-5.0, (3.0, 10.6, 18.7)
測試物質 1030728-05	12.8±2	10.7±2	9.0±2	13.0±2	11.7±2	15.6±2	-4.5±2
Mouse	25.2	14.5	12.0	16.8	8.0	10.0	5.5, 9.7, (12.8)
測試物質 1030728-06	23.8±2	15.8±2	12.9±2	15.5±2	7.2±2	12.0±2	6.0±2, 11.0±2

(B)



(C-1)

(C-2)

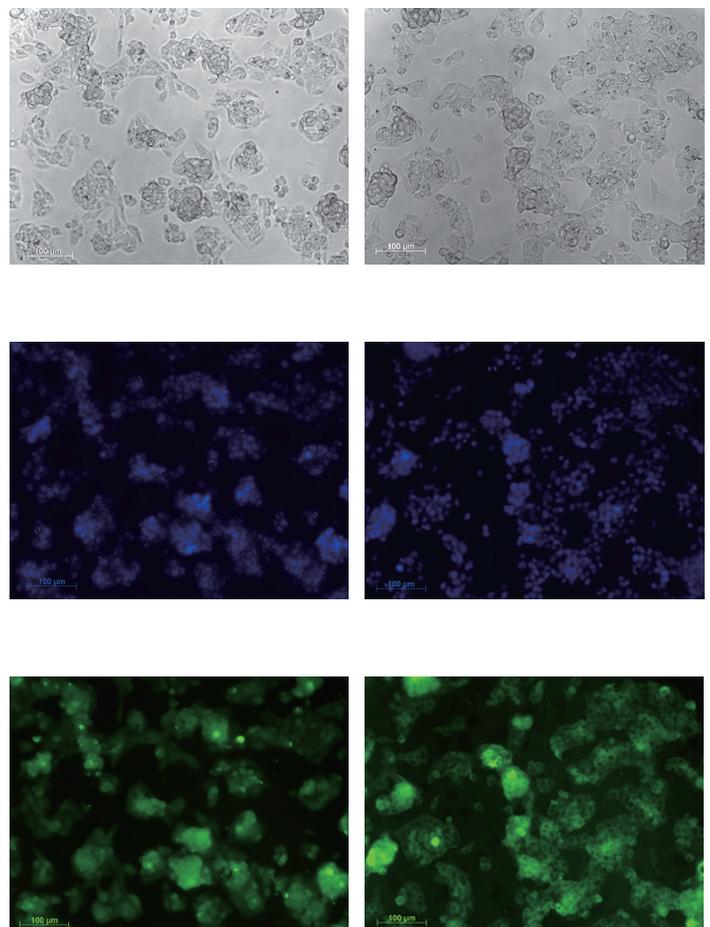


圖 1、人類肝癌細胞株 BCRC RM60025 HepG2 細胞鑑定結果。

(A) 細胞種源鑑定技術 (Isoenzyme) 測試 HepG2(測試物質 1030728-05) 結果為 100% 為人類細胞。

(B) 人類細胞株指紋鑑定 (STR-PCR) 之 profile

(C-1) 由上至下為光學顯微鏡下 HepG2 之細胞形態, DAPI 染色及 螢光免疫染色分析結果, AFP stain(+) 及 (C-2) 由上至下為光學顯微鏡下 HepG2 之細胞形態, DAPI 染色 CYP3A stain(+)

『台灣細胞醫療促進協會』於 2014 年 12 月 5 日成立並舉行國際研討會

生資中心 / 研究員
許璦文

自 1998 年 James Thompson 與 John Gearhart，分別成功的在體外建立培養出人類多能性 (pluripotent) 的胚幹細胞 (embryonic stem cell) 之後，幹細胞的相關研究已蔚為全球的一股研究熱潮。由於幹細胞具有自我更新的能力，並且在適當的條件之下，可以分化成各式各樣不同種類的細胞，因此學/研界對於將幹細胞實際應用在臨床治療上，均寄予莫大的期望。而 2012 年諾貝爾醫學獎得主 Shinya Yamanaka 發現，在將特定的四個外源基因導入體細胞之後，可以將已分化的細胞重新回復到原始多能性的幹細胞狀態，即所謂的『誘導型多能幹細胞』(induced pluripotent stem cells, iPSC)，更使得幹細胞的專屬客製化個人醫療，不再是個遙遠夢想。

根據財團法人醫藥品查驗中心 2013 年度的研究報告指出，全球已有超過 500 家的生技公司參與在細胞治療的相關研究，而其

中約有將近三分之一主要是針對在幹細胞的治療方面。目前國際上，細胞治療在醫療領域與生技產業，已漸趨成熟，然而台灣在細胞治療方面，仍是處於早期開發的階段，尚未有細胞治療產品核准上市。衛生福利部於今年的九月份正式發布『人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準』的最新公告，希望可以在確保人類細胞治療產品臨床試驗合乎科學性、安全性及社會倫理性，並保障受試者權益的前提下，來實行人類細胞治療相關產品的臨床試驗。

因此，台灣細胞醫療促進協會 (Taiwan Association of Cell Therapy, TACT) 秉持著促進細胞醫療產、官、學合作，推動細胞醫療技術、教育與產業之發展為宗旨，以提升台灣細胞醫療科技發展、建構台灣細胞醫療科技產官學合作平台、加強台灣細胞醫療教育及研發之交流、推動台灣細胞醫療相關產業發展和促進台

灣細胞醫療法令之訂修為主要任務進行設立。目前協會正積極招募會員中，並於 2014 年 12 月 5 日，假國泰金融中心會議廳舉行協會成立大會暨細胞治療國際研討會。會中也特別邀請美國國家科學院院士、歐洲藥物管理局、日本組織工程株式會社 J-TEC 和日本國立癌症研究中心及國內的專家學者進行演講，並和與會來賓進行經驗的交流與分享。

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，在『行政院國家科學技術發展基金』經費支持下，建置有『台灣幹細胞庫』設施，目前已收集並公開有 6 株由國人自行建立的人類胚胎幹細胞，提供研究人員申請使用。今年度也參與生技醫藥國家型科技計畫 (NRPB) 之『人類疾病多潛能幹細胞服務聯盟』計畫，可提供國內研究人員建立人類 iPSC 之技術諮詢、教育訓練，並作為人類疾病 iPSC 之保存資源庫，將可成為國內從事細胞治療、藥物篩選研究等方面，強而有力的後盾。

參考資料：

1. 幹細胞治療產品的產業發展與法規研究。當代醫藥法規月刊，第 037 期。財團法人醫藥品查驗中心。
2. <http://taiwancelltherapy.wordpress.com/>

生物資源保存及研究簡訊 第100期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所
發行人：廖啟成所長
主編：陳倩琪
編輯：王俐婷、吳柏宏、許璦文、黃學聰

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路 331 號
電話：(03)5223191-6
傳真：(03)5224171-2
承印：國大打字行
電話：(03)5264220
ISSN：1021-7932
GPN：2009001214
中華郵政新竹誌字第 0030 號
交寄登記證登記為雜誌交寄

