ISSN1021-7932 BCRC News 研發成果 1

財團法人
食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute

第 108 期

生物資源保存及研究簡訊 第29卷第4期

中華民國 105 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
◎「2016 微生物與食品安全管理國際研討會」圓滿落幕

委製服務 2
◎ 微生物液態發酵培養
◎ 回收純化製程
◎ 細胞產品及生物材料之安全性檢測試驗服務
◎ 標準生物性參考物質細胞株之生產與提供

科技新知 10
◎ 多能幹細胞庫之發展趨勢

「2016 微生物與食品安全管理國際研討會」圓滿落幕

圖、2016 微生物與食品安全管理國際研討會

（圖：生資中心 田桂娥助理技師提供）

微生物廣泛應用於傳統發酵食品，以微生物菌體或其代謝產物為素材結合現代生物科技，開發多樣化保健產品蔚為風潮，為食品與生技產業導入加值創新的能量。然而食品用微生物的安全性以及製程中潛藏的病原菌污染危害，皆具體影響產品的食用安全性及品質穩定性。為保障人民健康，各國在食品安全與風險的考量上，微生物相關之規範與管理愈趨嚴格。

面對國際化的趨勢，產品與服務放眼全球市場，但區域間微生物相關食品安全與風險管理法規標準的差異，可能造成產品跨境流通的障礙，因此對國內外微生物與食品安全相關法規全面的瞭解，方能掌握產品在全球市場流通的致勝關鍵。本所在經濟部技術處與衛生福利部食品藥物管理署的指導下，於本年度 10 月 18 日假食品工業發展研究所服務大樓 4 樓大講堂舉辦「2016 微生物與食品安全管理國際研討會」。會中邀請專家學者包括：衛福部食品藥物管理署鄭維智簡任技正、福建疾病預防控制中心馬群飛主任技師、清華大學林勤富助理教授以及本所黃錦城資深研究員和黃麗娜研究員，分別主講台灣與微生物相關之食品查驗登記管理規範、大陸微生物相關之食品安全標準和檢驗方法現狀、美國 GRAS 管理制度之法律發展與挑戰、台灣微生物相關之食品衛生管理制度與規範、微生物檢測及鑑定技術在食品法規符合性之應用等議題。

本次研討會有來自國內產學研各界近 50 個單位、共計超過 130 位與會者的共襄盛舉，會中

從國際食品安全管理趨勢導入，再針對美國、中國及台灣的微生物相關食品安全管理制度與規範詳細說明，同時配合法規、標準與檢驗方法的實務案例解析，協助與會者迅速掌握相關法規標準的精神與檢驗技術現況，期能落實於產品研發製造與流通，保障國人食的安全，更進一步結合國際管理法規發展全球佈局策略，強化產業競爭優勢。

食品所生資中心服務能量簡介

本所生資中心在微生物領域擁有多位專業研發及技術人員，建立各項關鍵技術及研發能量，並從醫藥、食品、環保、農業等領域之需求端，建立符合法規及檢驗標準之方法，提供多元服務，以滿足產業需求，技術能量包括產品中微生物的分離純化檢測、水質檢測、成分分析檢測及功能篩選檢測 (上述項目已於 107 期介紹)，本期介紹生產製程之委製服務及細胞相關技術服務)。

五、委製服務

微生物液態發酵培養

生資中心 / 研究員
吳柏宏

背景說明

無所不在的微生物

在生活環境中存在著成千上萬種以上微生物，雖無法以肉眼看見，但幾乎無所不在，與我們生活在一起，保持著亦敵亦友的互動，從各種不同的層面影響著我們的生活，與我們形成生命共同體的關係。微生物本身就像一個精細的微小生產工廠，我們藉由這些小小微生物的生產力生產出想要的產物。因此，只要能掌握微生物菌種及培養技術，依靠現代工業生產技術，指揮調控數十億個微小生物工廠，就能創造出無限的價值與商機。

微生物與經濟產業

透過神奇「發酵」魔力，小小微生物讓人大開眼界。「發酵」簡單說，仍借助微生物並透過培養環境來告訴微生物進行生命活動，以製備微生物菌體本身、或者生產代謝產物過程的手段。從餐桌上的美酒、飲食的調味醬料、傳統醃漬食物，到營養補充添加物、醫藥用之抗生素、藥用蛋白等，微生物發酵不僅豐富我們的飲食文化，更是人體健康、醫療保健不可或缺的得力幫手。隨著人類愈來愈了解微生物特性與掌握關鍵發酵培養技術，強化運用「微生物發酵技術」的產業應用範圍逐漸擴展，舉凡食品業，畜牧環境業、化學醫藥製造業，乃至綠色新能源開發。全球生物經濟活動中，微生物發酵產業對於國民經濟的提升佔有一席之地，期待「微生物發酵工藝」能更佳豐富我們的生活與創造經濟活動價值。

微生物發酵與產業化

微生物發酵的技術與應用，可稱為發酵工程，仍借助微生物進行產品開發解決人類所面臨的食品、健康、環境、資源與能源等重大問題，替人類社會帶來巨大經濟和社會效益。這項技術結合多學科領域整合，包含微生物學、化工、生命科學、基因及代謝工程、機械和統計等學科，發展極為多元。現代生物科技產業趨勢由主要的食品、醫藥遍及到農林漁牧、環保、能源及特用化學品等社會主要經濟活動，並依循產業界利基模式「研究開發」、「生產製造」、與「市場行銷」進行多元化價值產業擴展。整體而言，微生物發酵產業不受自然環境所影響，只要菌株、發酵生產技術成熟，便足以生產多樣化產品，應用於傳統發酵工程產業與現代基因工程生物技術領域等商品生產。

項目說明

服務能量

生資中心擁有微生物液態發酵先導工廠 (五公升，百公升至 2000 公升發酵設備)，可建立微生物及其生技產品之發酵製程，協助產學研界將實驗室研發成果，放大至商業化量產之前期試驗規模，包括各類食用菌液態種原生產技術，微生物活性產物生產技術，及重組蛋白生產技術之探索。

委託試驗

本中心液態發酵先導工廠備有各式發酵槽，接受外界委託進行菌種發酵培養服務。委託服務依發酵設備、菌種、培養條件、培養時間、培養基及發酵策略等模式進行。

專案委託研發

本中心微生物培養團隊，在「菌種篩選」、「菌種改良」、「培養基設計」、「微生物製程放大

技術」、「微生物製程最適化技術」、「菌種基因工程」、「基因工程菌株製程開發」等技術領域具有豐富經驗，可以協助產業界進行專案研發。

服務效益

協助產學研界開發生技產品，由實驗室研發階段導入至試量產規模，作為商業化生產之重要依據，並加速技術開發與商品化，促成業界參與投資，提升國內食品、生技產業及應用微生物各領域之商品研發能量。

回收純化製程

生資中心 / 副研究員
鄭芳宜

背景說明

回收純化程序不僅影響產品的品質，選擇簡便、快速且有效的製程，亦降低業界在發展新製程或商品時的生產成本。回收純化製程常使用的服務項目如表一，有鑑於回收純化技術的日新月異，相關設備與技術的精進，亦是目前發展的方向之一，如超音波設備、配方劑型設計等，藉由生資中心提供有效的回收純化程序，可以幫助業界確認生產製程的適合度，降低產品的開發風險，增進業者產品商業化的產業效益。

項目說明

回收純化製程需考慮程序簡便、成本低、產能高與品質佳四大關鍵因素，本所生資中心可以提供個別的單元操作試驗或選擇多種的單元操作進行搭配與組合，以達到商品化生產規格，以下將針對可提供的技術項目進行說明：

(1) 細胞破碎

許多具生理功效之蛋白質存在於微生物或動植物細胞內，需透過細胞破碎程序才能獲得，其穩定性不如胞外產物，且不同來源細胞的結構與大小各有差異，因此選擇有利的方法與操作條件，方能獲取最大釋出量並保有活性。已知細胞破碎的方法可分為機械式與非機械式兩種，非機械式破胞雖具有專一性，但規模化生產時其成本高、處理量皆阻礙其運用。故於量化生產時仍以珠磨細胞破碎為主，如圖一，每次處理量為 10 公升以上，其效果佳、易放大適用於酵母菌、微藻等結構較緊密的細胞。

(2) 固液分離

目的在將純化物質集中並達到濃縮的目的，以利於後續的單元操作，常見的方法有離心、過濾兩種，相關設備如圖二。離心是利用物質的沈降係數不同，在特定的離心力與溶液中達到分離的效果。過濾屬於一種傳統的固液分離技術，利用不同濾膜孔徑的選擇可分為板框過濾、微過濾 (MF) 與超過濾 (UF) 等，板框過濾可在常壓下進行較高固型物含量的操作，仍不易阻塞，微過濾或超過濾均需施加一定壓力，微過濾 (MF) 可處理 0.1-10μm 的粒子，多用在濾除菌體及水中微粒，超過濾 (UF) 則適用於 0.1μm 至 1nm 的物質，依分子量區分為 5-500K 的切割膜 (MWCO)，常見於酵素或蛋白質的分離純化。

(3) 精製純化

液相層析是藉由靜止相 (膠體) 與流動相的搭配，使產物與不純物之間作用力的差異而達到分離純化的目的，依照選擇的靜止相 (膠體) 作用原理不同如表二，可分為凝膠過濾、離子交換、疏水作用、逆向層析及親和性層析等。

表一、回收純化製程試驗項目

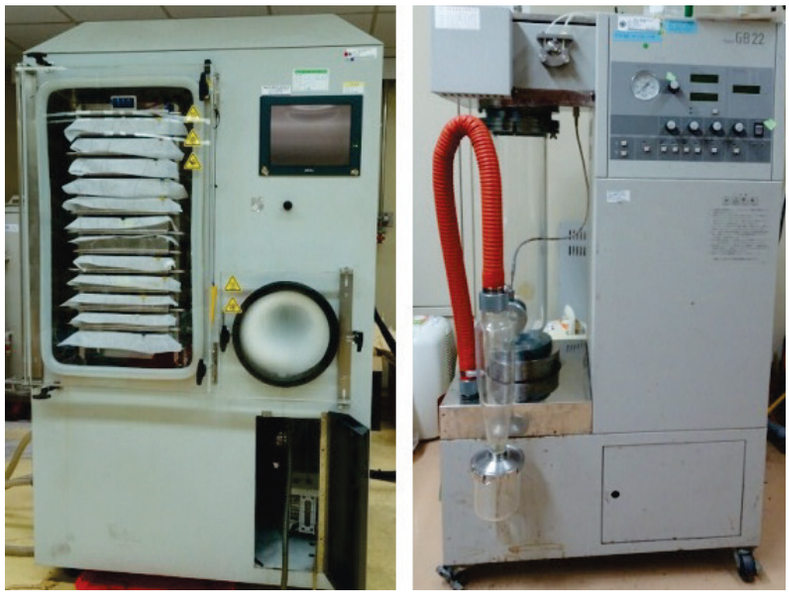
試　驗　項　目	
(1) 固液分離 - 板框壓濾	(8) 冷凍乾燥 (8 公斤)
(2) 固液分離 -MF/UF 過濾	(9) 噴霧乾燥機
(3) 固液分離 - 旋轉式真空過濾	(10) 錠劑試製
(4) 旋轉式真空乾燥	(11) 液相層析
(5) 珠磨細胞破碎	(12) 薄膜濃縮
(6) 水冷式冷凍乾燥 (30 公斤)	(13) 結晶
(7) 冷凍乾燥 (20 公斤)	

表二、層析純化原理

層 析 膠 體	作 用 原 理
凝膠過濾	分子大小
離子交換	分子電荷
疏水作用 / 逆向層析	分子表面的疏水作用
親和性層析	分子間交互作用

圖一、珠磨細胞破碎機

圖二、P12 離心機（左），MF/UF 膜過濾（右）



圖三、水冷式冷凍乾燥機（左），噴霧乾燥機（右）

圖四、錠片試製（左）與打錠機（右）

液相層析法對純化物質的活性影響小且不產熱，可快速分離各種生物分子，包括胜肽、核酸、蛋白質和天然產物等，溫度敏感且高價值的產物，依其操作規模可分為實驗室與試量產兩種，實驗室級可操作流量範圍為 0.01-100mL/min，試量產級可操作流量為 4-400mL/min，適合百公升級發酵後的純化製程 。

(4) 樣品乾燥

於終端產品應用時，為解決儲存時產品對溫度的敏感以及便於運送，會選擇以冷凍乾燥或噴霧乾燥 (圖三) 等方式除去水分。冷凍乾燥機原理為水在高度真空下，以固態與氣態存在，此時樣品中水分可直接昇華為氣體，達到乾燥的目的適用於熱敏感性物質，依操作體積分為 8 公斤、20 公斤及 30 公斤，且依據產品特性可調整製程的溫度梯度，降低活性的損失。噴霧乾燥是以高壓噴嘴或旋轉盤將液體霧化，增加其表面積使水分在熱空氣中迅速蒸發，可在短時間內迅速達到乾燥目的，常見於對高溫較不敏感，如奶粉、果汁粉、即溶咖啡等食品的生產。

(5) 產品成型

分離純化的樣品乾燥為粉末形式後，通常為方便消費者使用或產品的包裝，會經過加工成型的程序，簡易的產品成型設備如打錠機 (圖四)，搭配模具可製成直徑為 2 cm、1.6 cm、1.2 cm 與 0.8 cm 的規格，錠劑硬度、厚度和重量則藉由轉輪進行調整，最小可操作體積為 1 公斤。

細胞產品及生物材料之安全性檢測試驗服務

生資中心 / 副研究員
廖麗娟

背景說明

細胞治療產品應用於人體試驗時，與藥品臨床試驗相同，均有相關的嚴格法規來進行規範。細胞產品規格的建立與製造程序之控管需相當嚴謹，而細胞產品的品質 (如安全性等) 更是審查時最基本的要求。針對客戶於細胞產品品質安全性檢測的需求，財團法人食品工業發展研究所生資中心對外提供細胞產品安全性測試之委託試驗項目，已於 2012 年 9 月通過財團法人全國認證基金會 (Taiwan Accreditation Foundation, TAF) 認可評鑑，認證項目包括：(1) 細胞毒性試驗 -agar diffusion assay、(2) 內毒素測試 -LAL 呈色法、(3) 黴漿菌檢測 - 直接培養法、(4) 黴漿菌檢測 - 指示細胞法、(5) 無菌試驗法。此五項檢測項目可廣泛應用於細胞產品或醫材之品質或安全性檢測。提供客戶高品質且具符合國際標準或藥典規範要求之測試服務。

項目說明

通過 ISO/IEC 17025 認證之 5 項細胞產品安全性測試委託試驗簡介

(一) 生物相容性測試試驗服務

細胞毒性試驗為檢驗測試物質 (測試件) 是否具有體外之細胞毒性。本試驗方法為採用 agar diffusion 之試驗方法，以本中心通過 ISO Guide34:2009 之標準菌株 BCRC RM 60091 NCTC clone 929 (L cell, L-929, derivative of Strain L) 為測試細胞，實驗方法依據 ISO10993-5 建立，以體外細胞模式檢測待測試物是否具有細胞毒性，此檢測方法可取代體外動物試驗，減少實驗動物的使用。(圖一)

(二) 細胞產品品質安全性測試服務

細胞產品應用於治療人體時，與藥品臨床試驗的規範是相同的，對於細胞產品規格的建立與製造程序之控管需相當嚴謹，因此細胞產品品質如安全性是最根本的要求。針對客戶對於細胞產品品質安全性檢測的需求，本中心提供高品質的安全性測試包括：內毒素測定、黴漿菌及無菌試驗之檢測。

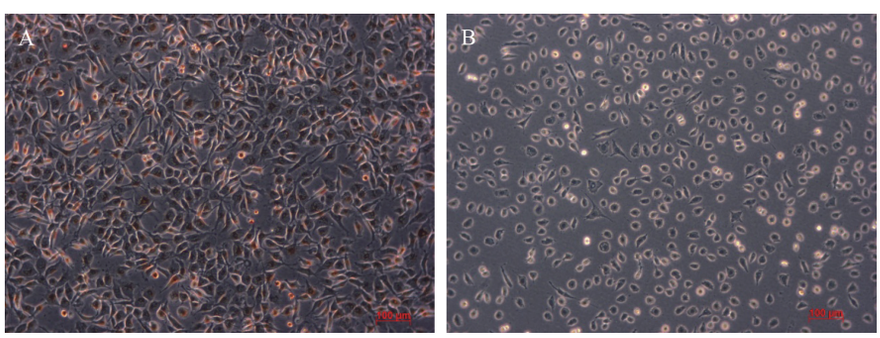
(1) 內毒素測定

內毒素 (endotoxin) 是革蘭氏陰性菌細胞壁上脂多醣類 (lipopolysaccharide, LPS) 之複合物。當細菌死亡破裂溶解後，內毒素會被釋放出來。內毒素為一種熱源 (pyrogen)，打入動物體內引起體溫上升、發冷、噁心、嘔吐、血壓下降，甚或引起休克或敗血症，造成死亡的情形發生。內毒素測定實驗方法依據美國藥典 (USP)，Bacterial Endotoxins Test<85>，執行其檢測方法為利用改良過的鱟之血液萃取物 LAL(Limulus Amebocyte Lysate)，及人工合成的色基胜肽，以比色測量 (終點呈色法) 來檢測水溶液樣品中的格蘭氏陰性細菌內毒素含量。

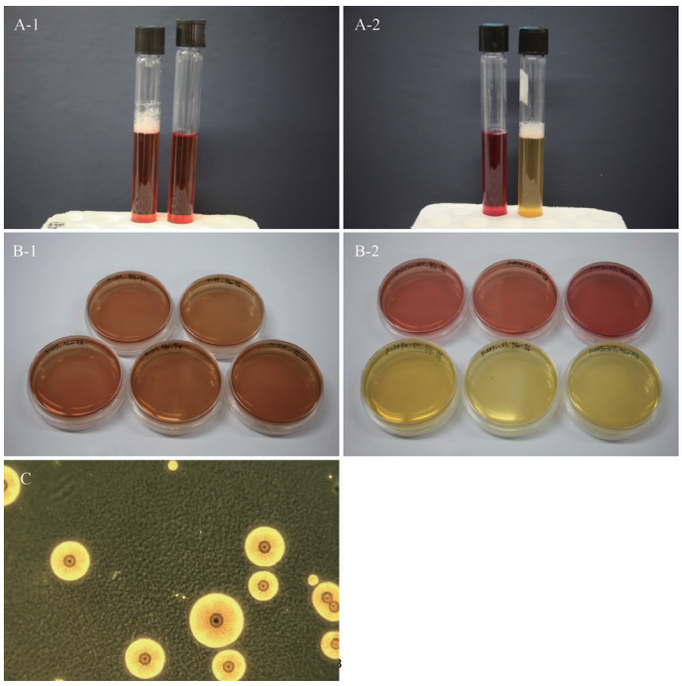
(2) 黴漿菌檢測

黴漿菌檢測試驗方法包含直接培養法及指示細胞法，此兩種檢測方法皆為 FDA 核可之標準方法，可檢測出高達 99% 黴漿菌汙染的準確度黴漿菌檢測試驗方法包含直接培養法及 DNA 螢光染色法，此兩種檢測方法皆為 FDA 核可之標準方法，可檢測出高達 99% 黴漿菌汙染的準確度。黴漿菌檢測實驗方法依據 EP <2.6.7> Mycoplasma，USP<63> Mycoplasma Test 建立。

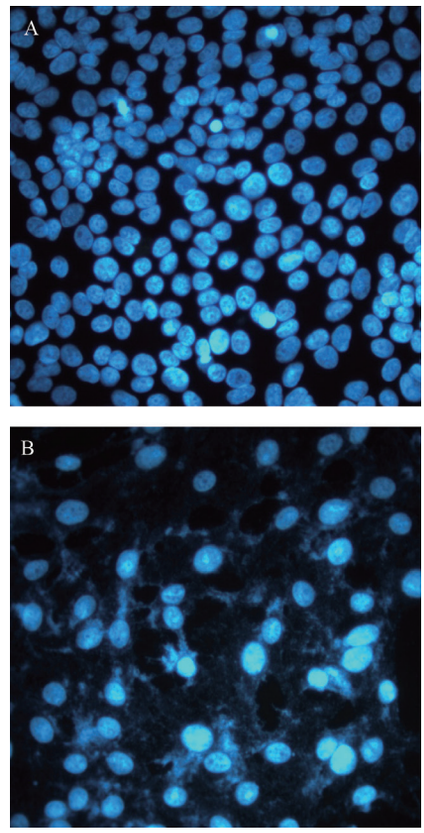
(a) 直接培養法：為利用合適培養基直接培養測試物質，觀察其黴漿菌菌落生長情形，藉此偵測待測試物是否有黴漿菌汙染。(圖二)



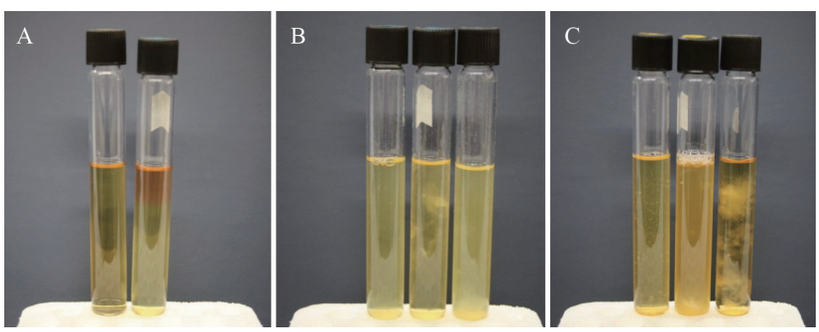
圖一、細胞毒性試驗 (agar diffusion assay) 利用 Neutral Red 染色 (可將活細胞核染成紅色)，於顯微鏡下觀察待測試物細胞毒性結果。(A) 陰性對照組 (D-PBS) (B) 陽性對照組 (1% phenol)



圖二、黴漿菌檢測直接培養法。黴漿菌合適之液體 (A) 培養基培養 14 天之結果，(A-1) 為陰性對照組，(B-2) 若有黴漿菌汙染其培養基顏色為黃色，有些黴漿菌汙染可能會造成培養基偏鹼，顏色可能為更紅、黴漿菌合適之固體 (B) 培養基培養 14 天之結果，(B-1) 為陰性對照組，(B-2) 若有黴漿菌汙染其培養基顏色為黃色，有些黴漿菌汙染可能會造成培養基偏鹼，顏色可能為更紅 (A-2) (C) 光學顯微鏡下黴漿菌之菌落型態 (*A. laidlawii*)



圖三、黴漿菌檢測指示細胞法。(A) 陰性對照組 (B) 陽性對照組 (*M. hyorhinis*)



圖四、無菌試驗檢測 (A)TSB(左) 及 FTM(右) 培養基培養結果皆為陰性、(B)FTM 培養基培養結果為陽性 (*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Clostridium sporogenes*)、(C)TSB 培養基培養結果為陽性 (*Bacillus subtilis*、*Candida albicans*、*Aspergillus brasiliensis*)

(b) 指示細胞法：將待測試物與指示細胞共同培養後，利用螢光染劑會與黴漿菌 DNA 結合的特性，若有黴漿菌存在，可在細胞核外觀察到許多大小均一之螢光小點，藉此偵測待測試物是否有黴漿菌汙染。(圖三)

(3) 無菌性試驗檢測

細菌、黴菌廣泛存在於環境中，因此無菌操作及試驗環境控管之嚴謹度將會影響產品的無菌性。實驗方法依據 EP <2.6.1> Sterility，USP<71> Sterility Tests 建立。將待測試物以直接接種於細菌及黴菌合適生長之培養基中培養，來確認待測物是否有細菌或黴菌汙染。(圖四)

國內目前已有數家生技廠商投入細胞治療及生醫材料市場，其所開發的細胞產品及醫材皆需要高品質 (安全性) 管控要求。生資中心為通過財團法人全國認證基金會認證之實驗室，五項細胞產品安全性測試試驗取得 ISO/IEC17025 認證，可對外提供高品質之細胞產品安全性測試試驗服務。

表一 細胞產品安全性測試試驗服務項目 (TAF 實驗室認證項目)

測試領域	樣品形式	測試方法	結果判定
14.01/15.99 生物科技 / 醫療器材	細胞產品 (水樣液)、醫療材料	L929 細胞毒性試驗 (agar diffusion assay)	陰性 / 陽性
14.01 生物科技	細胞產品 (水樣液)	內毒素測試 (Endotoxin test LAL 呈色法)	偵測極限 : 0.1EU/mL
14.01 生物科技	細胞產品、細胞培養上清液	黴漿菌汙染檢測 - 直接培養法	陰性 / 陽性
		黴漿菌汙染檢測 - 指示細胞法	陰性 / 陽性
14.01 生物科技	細胞產品、細胞培養上清液	無菌試驗	陰性 / 陽性

標準生物性參考物質細胞株之生產與提供

生資中心 / 副研究員
許璨文

背景說明

生物資源中心細胞庫長期以來，本著對於細胞株品管的重視，並加強對使用者服務的保障，自 2000 年導入 ISO9001 品質管理系統後，陸續獲得多項服務檢測試驗項目之國際認證。2012 年起亦依據 ISO Guide34 國際標準 (於 2016 年升級為 ISO 17034)，規劃生產製造出亞洲第一株生物性參考物質細胞株 (NCTC 929, BCRC RM60091) 並通過財團法人全國認證基金會 (Taiwan Accreditation Foundation, TAF) 之檢驗認可，為具有生產國際標準細胞株能力之生物性參考物質之機構 (Reference Material Producer, RMP)，可提供使用者高品質之參考物質細胞株。

項目說明

目前細胞庫已完成三株參考細胞株之生產並開放使用者申請提供，包括 BCRC RM60025 HepG2、BCRC RM60091 NCTC clone 929 BCRC RM60596 WJMSC。分述如后：

(1)BCRC RM60025 HepG2

BCRC RM60025 HepG2 為 human hepatoblastoma 細胞株，主要應用於體外抑制肝癌試驗之參考細胞株。純度經 DNA 指紋鑑定技術　短片段重複序列 - 聚合酶鏈鎖反應 (STR-PCR) 分析及進行資料庫比對，確定 100% 為 HepG2 細胞；並利用免疫螢光染色分析方式，確認該參考物質細胞株具有肝癌細胞株可表現甲型胎兒蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 和細胞色素 CYP3A (cytochrome P450 3A) 之能力 (圖一)。

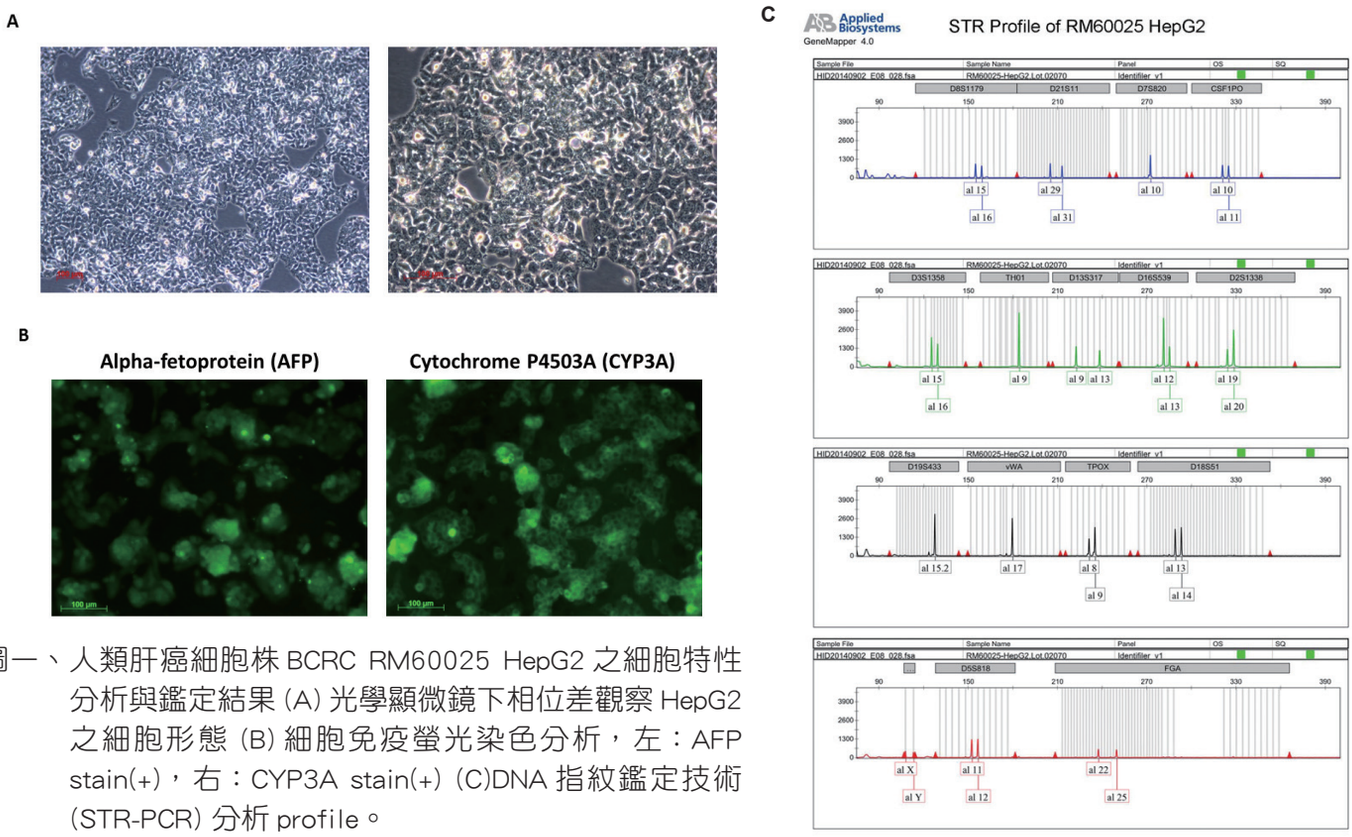
(2)BCRC RM60091 NCTC clone 929 (L cell, L-929, derivative of Strain L)

BCRC RM60091 NCTC clone 929 細胞來源為小鼠結締組織，為可應用於體外檢測測試醫療器材或其萃取物是否具有細胞毒性之測試細胞株之一 (依據 ISO10993-5 國際標準)。此體外細胞毒性試驗 (Tests for in vitro cytotoxicity) 檢測方式符合國際要求，亦可減少實驗動物之用量，符合 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) 之精神。此細胞株經國家實驗動物中心之小鼠微衛星基因型標記遺傳檢測服務，確認該小鼠細胞株之動物品系為 C3H/HeNcrNarl (圖二)。

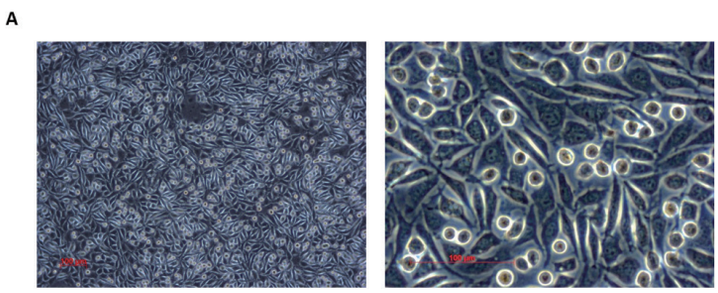
(3) BCRC RM60596 WJMSC

BCRC RM60596 WJMSC 為分離自人類臍帶之間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)，具有間質幹細胞之典型特徵。經表面抗原分析，具有 CD73(+)、CD90(+)、CD105(+)、CD14(-)、CD19(-)、CD34(-)、CD45(-) 及 HLA-DR(-) 蛋白之表現，並可於體外試驗環境下，成功的誘導分化為脂肪細胞 (adipocyte)、軟骨細胞 (chondrocyte) 和硬骨細胞 (osteocyte)(圖三)。可作為間質幹細胞表面標誌及分化特性之標準細胞株，亦可應用於相關細胞治療產品之製程確效試驗對照標準細胞株使用。

參考物質系列細胞株，代表此細胞株之製程與品質均經過嚴格之管控和檢測，所有品管測試均必須為合格認可實驗室之檢驗報告，且使用的試劑來源皆有 COA(Certificate of Analysis) 之品質保證，相關的實驗紀錄亦均需列管和追溯，大幅提昇產品的公信力，對使用者提供最佳保障。



圖一、人類肝癌細胞株 BCRC RM60025 HepG2 之細胞特性分析與鑑定結果 (A) 光學顯微鏡下相位差觀察 HepG2 之細胞形態 (B) 細胞免疫螢光染色分析，左：AFP stain(+)，右：CYP3A stain(+) (C)DNA 指紋鑑定技術 (STR-PCR) 分析 profile。



B

國家實驗研究院 實驗動物中心 NLAC NATIONAL LABORATORY ANIMAL CENTER

微衛星基因型標記遺傳檢測技術服務報告

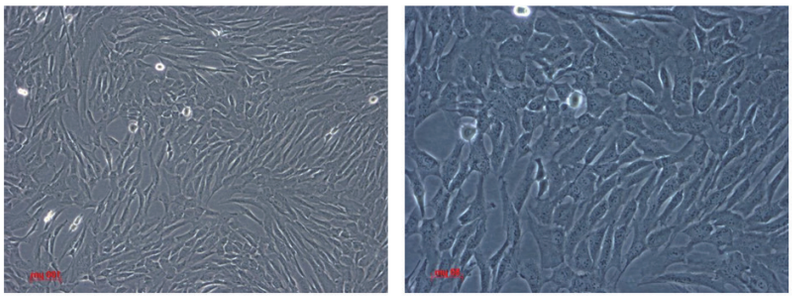
檢測結果

檢體來源	Genomic DNA							
項目	D8 Mit309	D11 Mit5	D13 Mit78	D14 Mit14	D15 Mit226	D18 Mit64	D19 Mit19	DX Mit210
送檢編號/ Chr	8	11	13	14	15	18	19	X
1								
2	120^{1}_{120}	186^{1}_{186}	226^{1}_{226}	248^{1}_{248}	186^{1}_{186}	172^{1}_{172}	116^{1}_{116}	124^{1}_{124}

MIT marker	D8 M309	D11 Mit5	D13 Mit78	D14 Mit14	D15 Mit226	D18 Mit64	D19 Mit19	DX Mit210
品系\ Chr	8	11	13	14	15	18	19	20
cM	43.0	37.0	75.0	10.0	11.6	2.0	26.0	29.5
BALB/cByJNarl	94	186	210	248	186	172	116	124
BALB/cJNarl	94	186	210	248	186	172	116	124
C3H/HeNCrNarl	120	186	226	248	186	172	116	124

圖二、小鼠結締組織細胞株 BCRC RM60091 NCTC clone 929 之 (A) 光學顯微鏡下相位差觀察之細胞型態與 (B) 微衛星基因型標記遺傳檢測種源鑑定分析結果。

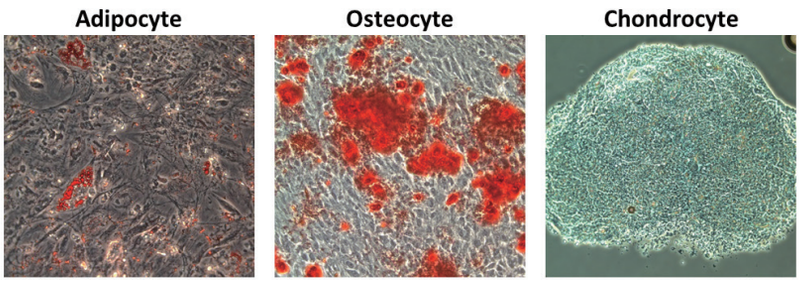
A



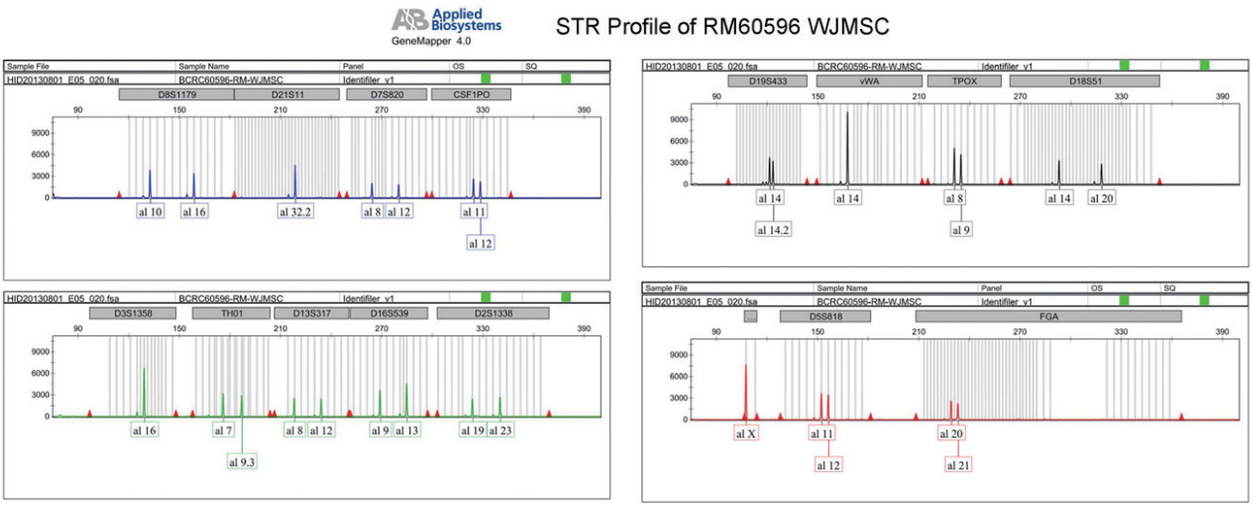
B

Surface Marker	Expression (%)	Surface Marker	Expression (%)
CD73	100	CD14	2.9
CD90	99.8	CD19	0.1
CD105	99.7	CD34	0.1
HLA-DR	0	CD45	0

C



D



圖三、人類臍帶間質幹細胞 BCRC RM60596 WJMSC 之細胞特性分析與鑑定結果 (A) 光學顯微鏡下相位差觀察 WJMSC 之細胞形態 (B) 細胞表面抗原分析 (C) 細胞分化能力鑑定分析與 (D)DNA 指紋鑑定技術 (STR-PCR) 分析 profile。

生物資源保存及研究簡訊
105年第29卷第4期

多能幹細胞庫之發展趨勢

生資中心 / 研究員
張育甄

多能幹細胞

多能幹細胞 (Pluripotent Stem Cells) 為具有分化為體內所有不同細胞之能力的幹細胞，因此已成為未來細胞治療時最有潛力之目標細胞。多能幹細胞可由胚胎發育為囊胚 (blastocysts) 時，將其中的內細胞團 (inner cell mass) 取出培養而獲得。目前已可藉由體細胞核轉移 (somatic cell nuclear transfer，SCNT) 之技術或進行誘導式多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells， iPS) 的製程獲得 (圖一)。

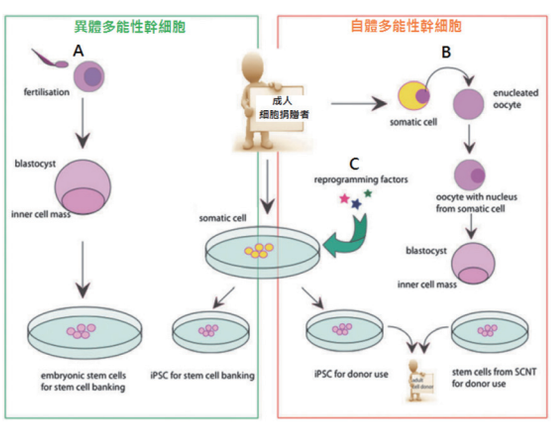
由個人化至細胞庫的建立

iPS 的問世開啟了建立個人化多能幹細胞的可行性。雖然在科學家的努力之下，現今 iPS 的製作技術相較於過去已進步許多，然而建立一株合格之 iPS 細胞株，除前期的基因轉染、篩選培養過程之外，後期的細胞增殖、產品品管等步驟皆十分耗時繁瑣，此外完成整個流程所需之高額花費，亦成為落實醫療應用之高牆。因此個人化之 iPS 雖具優勢，面對未來需求仍有緩不濟急之疑慮。為了解決這樣的問題，預先製備符合臨床等級使用之多能性細胞庫 (包括胚胎幹細胞、SCNT 多能幹細胞及 iPS 細胞)，以確保使用時有充足且安全的細胞來源，為目前世界各國研究人員對於多能幹細胞未來應用較為一致的看法。然而使用預先建立之多能幹細胞庫，在異體移植上首當其衝所需面對地即為免疫排斥之問題。

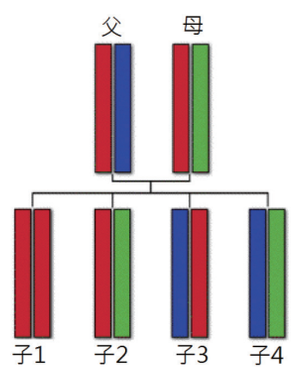
Homozygous haplotype 多能幹細胞庫

人體的體細胞的染色體均為同源組合，分別來自父母雙方。人體的後天性免疫藉由 HLA Class I 及 Class II 來辨識自體及外來抗原 (如：病毒、細菌等)，因而調控免疫反應的發生，移植時，HLA 配對的程度愈高受贈者對外來細胞之接受度愈高，移植成功率愈高。而在遺傳過程中，HLA 單倍型 (haplotype) 可作為一個完整的遺傳單位由親代傳給子代，因此子女的 HLA 單倍型也是一個來自父方，一個來自母方。而若一個體獲得自父方與母方之 HLA-haplotype 完全相同的狀況則稱為純合子 (homozygotes，如圖二中子 1)。在族群中存在著一定比例之純合子個體，相對於高變異族群，在人種組成變異度低之族群可獲得適合該族群的 HLA-homozygotes 之機率則提高許多。

T 細胞是免疫系統中用於辨識外來侵入物之重要細胞，因此在移植時，若移植物 (細胞、組織或器官) 無高度配對，經由抗原呈現作用 (antigen presenting activity) 使 T 細胞將其偵測為外來物，即可觸發一連串的免疫反應引發排斥作用。而 HLA-homozygotes 之組合相對單純，僅需配對原有之一半分型，即可使捐贈者與受贈者雙方達到高度配



圖一、多能幹細胞的取得方式：可由 (A) 胚胎發育為囊胚 (blastocysts) 時取得內細胞團 (inner cell mass) 並培養，或由 (B) 成人取得自體之體細胞，經體細胞核轉移 (SCNT) 之技術獲得囊胚後取得多能幹細胞，亦或 (C) 取得成人之自體細胞經再程式化因子之轉殖，獲得誘導式多能幹細胞 iPS。



圖二、HLA 單倍型之產生。子代之分別由父方與母方遺傳一單倍型 HLA， 若父方與母方各具一相同分型之 HLA，子代則有 25% 之機率獲得 HLA-homozygotes (子 1)。

對，使受贈者之 T 細胞無法辨識為異體細胞 (圖三)，因此可大幅提高移植時之 HLA 分型配對率 .

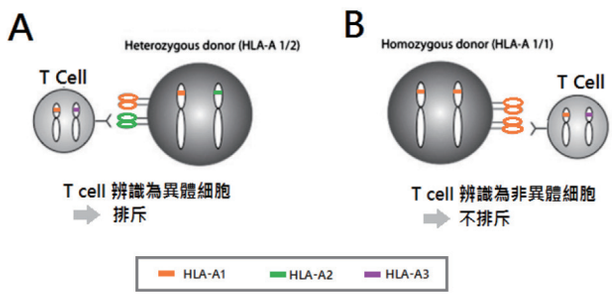
將此概念用於細胞庫之建置的相關研究中，以胚胎幹細胞為例，根據 2005 年日本京都大學 Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS) 學者 Norio Nakatsuji 等人於 Nature Biotechnology 的發表中指出，針對 Japanese population 而言，以隨機的卵子提供者作為來源， 若可建立 200 個胚胎幹細胞即可達成至少於 HLA-A，HLA-B，HLA-DR 中至少 2-locus 80% 之配對。而若使用隨機提供卵子再配合孤雌生殖所製得之胚胎幹細胞，則將降至 100 株即可達成 3-locus 90% 之配對。主要原因在於以此方式建立之胚胎幹細胞株其染色體皆為 homozygotes，可大幅提高配對的機率。

發展多能性幹細胞庫的藍圖

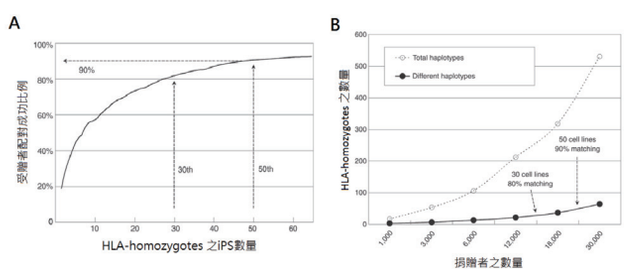
以 HLA-haplotype 多能幹細胞庫為目標，便需篩選具有 HLA-haplotype 的細胞捐贈者，取得 homozygous HLA 之細胞來源。而問題在於 : 需篩選多少的 HLA-haplotype 的捐贈者才能符合所需，又如何才能找到這些 homozygote donor 呢 ?

在 Norio Nakatsuji 的研究中指出， 利用 broad serology-level 解析度分析來自日本血液移植資料庫與臍帶血細胞庫中 2578 個捐贈者之資料，Japanese population 中其 HLA-A 有 8 種分型，HLA-B 有 20 種分型，HLA-DR 則有 10 種分型。依據此資料僅須建立 30 株 HLA-homozygotes iPS 即可滿足 82.2% 的 Japanese population 之 HLA 配對需求，若提升至 50 株 HLA-homozygotes iPS 則可獲得 90.7% 接受者之配對成功率。而受限於 HLA 之多型性，再增加 iPS 數量對配對成功率無顯著之提升 (如圖四 A)。在篩選捐贈者數量方面，根據 Norio Nakatsuji 之分析，約可於 15,000 之捐贈者中取得上述 30 株 HLA-homozygotes 之 iPS， 若擴大至 24,000 位捐贈者，可篩選出滿足近九成配對吻合度之 50 株 iPS 細胞 (圖四 B)。

若以英國族群而言，劍橋大學 Dr. Taylor 於 2005 年 Lancet 期刊中曾經提到，經由過去器官與臍帶血移植之資料篩選出於 HLA-A, -B, -DR 中最重要之配對而計算出，可由 10,000 捐贈者中篩選出 10 位 homozygous HLA 捐贈者以滿足 38% 英國族群之需求。而他進一步於 2012 年以 WHO HLA nomenclature 報告為運算基礎，進而計算出需建立 405 種 homozygous combination 才能達成 100% 符合英國族群之受贈者，但若建立其中 10 種較易出現之組合即可達到 58.3% 之族群需求，若將數量擴增至 150 種即可滿足 93.16% 英國族群於 HLA-A, -B, -DR 中 zero-mismatch 之可能。而許多學者也紛紛發表相關之分析結果，2012 年 Gourraud 等人研究中顯示，以同樣建立出於該族群中最常見之 20 株 HLA haplotype iPS 細胞庫而言，在 European American 中需篩選 26,000 位捐贈者，並滿足 50% 的受贈者配對，而若為 African American 族群，則需於 110,000 位捐贈者中篩選，以滿足 22% 之族群配對需求。雖然因種族之



圖三、以 HLA-A 分型為例，分析移植中接受者之 T 細胞 (HLA-A1/A3) 對於 heterozygous 與 homozygous 捐贈者對於半配對成功之反應。(A) 對於一表現 HLA-A1/2 之 heterozygous 捐贈者，接受者之 T 細胞辨識出其不相容之 HLA-A2 而誘發免疫反應，產生排斥作用。(B) 對於一表現 HLA-A1/1 之 homozygous 捐贈者，接受者之 T 細胞無法辨識出不相容之結構，不誘發免疫反應。



圖四 以日本族群為例， HLA-homozygotes iPS 細胞株建立之需求。(A) 受贈者至少與一 HLA-homozygotes iPS 細胞配對成功相對於 HLA-homozygotes iPS 細胞數量之累積比例關係 . (B) HLA-homozygotes 之細胞數量與捐贈者數量之相對累積關係。

HLA 組成與基因型頻率，與使用資料庫與運算方式使結果有些微差異。但這些研究顯示，藉由高度篩選受贈者可有效建立小型但具有臨床效益之多能幹細胞庫。

多能幹細胞庫之細胞來源與國際化

對於這些 homozygous HLA 細胞捐贈者來源，目前研究學者一致的共識在使用於各國已建立之臍帶血庫為基礎。為供移植之用，這些臍帶血庫已完成捐贈取得流程將細胞收集、保存，無倫理爭議且具追溯性。而臍帶血為胎兒早期之細胞，因此較成人所提供之細胞而言，具有的染色體變異較少，可提供較高的 iPS 轉染成功率。各地臍帶血庫所保存之細胞已是移植即戰力，皆經由嚴格品質控管之臨床級細胞，而且大部分皆已完成 HLA 分型分析，並多為當地族群所保存，有助於有效地建立區域性的多能幹細胞庫。目前日本已著手由血液建立 iPS 細胞庫，歐洲與美國仍在評估中。

雖然串聯國際間進行多能幹細胞庫可進一步實現細胞治療願景，但在執行上仍須考慮：(1) 直接以血庫或臍帶血庫時，須檢視捐贈者或其父母所簽署之捐贈同意書，是否能擴及將其做為多能幹細胞庫來源並做為學術、臨床甚至於商業化之使用。(2) 當多能幹細胞庫建置後，極可能將某單一細胞株進行長期使用，並用於多位接受者，因此將提升捐贈者異常時所造成之風險 (例如：捐贈者具有晚發性的基因異常)。(3) 欲進行機構間的多能幹細胞庫交流，需站在相同製程監控與品管標準的基礎上。(4) 以配對成功後之細胞移植雖可以解決主要的排斥問題，然而 HLA 構造複雜且多樣性高，仍可能因其非主要抗原分子造成接受者對於移植物的排斥。

結語

未來將是多能幹細胞在再生醫學上大放異彩的時代，然而耗時與昂貴的障礙使客製化多能幹細胞的應用性受到限縮。目前經由臍帶血庫中尋找族群中主要 homozygous HLA 分型之捐贈者，並建立其多能幹細胞庫為科學家們的共識。多能幹細胞庫的建立有助於降低移植後受贈者免疫排斥之風險，為了研究目的，許多國家目前皆已建構了非臨床等級之多能幹細胞庫，可知相關的軟硬體設施已然具備。現階段我們將期待國際間對於建立全球各族群之多能幹細胞庫的合作共識，也應致力於開發臨床等級之多能幹細胞株的標準方法，提供未來醫療上更豐富的資源。

參考文獻

1. Gourraud PA1, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines. Stem Cells. 2012; 30(2):180-6.
2. Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. Nat Biotechnol. 2008; 26(7):739-40.
3. Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. Cell Stem Cell. 2012 Aug 3; 11(2):147-52.
4. Turner M, Leslie S,Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, Trounson A, Turner D, Yamanaka S, Wilmut I. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. Cell Stem Cell. 2013; 13(4):382-4.
5. Zimmermann A, Preynat-Seauve O, Tiercy JM, Krause KH, Villard J. Haplotype-based banking of human pluripotent stem cells for transplantation: potential and limitations. Stem Cells Dev. 2012; 21(13):2364-73.

生物資源保存及研究簡訊 第108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、許璨文、黃學聰
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
本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所
ISSN 1021-7932
9 771021 793004