



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

生物資源保存及研究簡訊

中華民國 108 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

◎ 食品所農產品保鮮計畫成果獲科技部頒發 2019 未來科技突破獎

◎ 2019 台灣醫療科技展

研發成果

3

◎ 生資中心新設置 GTP 細胞處理中心正式營運

◎ 生資中心於細胞治療產業之服務能量

◎ GLP 體外皮膚敏感性評估取代動物性試驗

◎ BCRC 不再提供細胞株說明

◎ 2019 CiRA 國際研討會 - 日本 iPSC 幹研究發展趨勢

◎ 生資中心生物材料銷售與服務價格調整公告

食品所農產品保鮮計畫成果獲科技部頒發

2019 未來科技突破獎



科技部陳良基部長親自頒發「2019 未來科技突破獎」給食品所研發團隊

食品所執行科技部智慧農業專案計畫 - 農產品保鮮技術創新研發與系統整合，開發水果採收後保鮮的天然素材，取代傳統化學保鮮劑，可有效增加整體保存時間及保鮮能力，有助擴展外銷商機。研發成果之「啟動農產品保鮮的大未來」技術榮獲科技部「2019 未來科技突破獎」，未來科技突破獎以科學突破與產業應用為兩大指標進行評選，從近 600 件報名作品中脫穎而出，再從 88 件獲獎技術中由生科司推薦、科技部部長最終評選，獲選為亮點技術，受邀於「2019 未來科技展 (FUTEX)」展出。「2019

未來科技展 (FUTEX)」於 12/5-12/8 在世貿一館展出，為期四天的展出期間，湧入了超過 10 萬名不同領域、背景的參觀人潮，透過展出研發團隊可與來自產官學等單位交流，將研究成果銜接產業需求，也可與民眾和學生交流，增加民眾對科技發展的瞭解及產業對新穎性技術應用的機會。

食品所「啟動農產品保鮮的大未來」技術，與財團法人台灣香蕉研究所和行政院農業委員會高雄區農業改良場共同合作，食品所研究團隊透過篩選抑制病原菌潛力之黑酵母菌

株，透過複合黑酵母發酵液的製備，進行香蕉及芒果炭疽病原菌之抑菌試驗；結合現有標準檢疫蒸熱流程為基礎，以柵欄技術概念導入微生物資材，降低炭疽病罹病度，取代傳統化學保鮮劑，可有效增加整體保存時間及保鮮能力。以芒果外銷至日本儲

運條件為模擬標的，罹病度下降52%；導入外銷香蕉在集貨場之處理流程，加入微生物資材可降低果表罹病度90%和降低果軸罹病度39%。

技術負責人生資中心賴進此副主任表示，黑酵母保鮮資材具有天然與環保的特性，容易導

入現今農產品集貨場處理流程使用。將果實浸泡於資材中，風乾後即可裝箱運輸，應用於實際產業極為簡便，不但有效延長整體保存時間，藉此提升香蕉與芒果在國際外銷或國內運銷的保鮮能力，以高品質擴大台灣水果於國內外的市場布局。

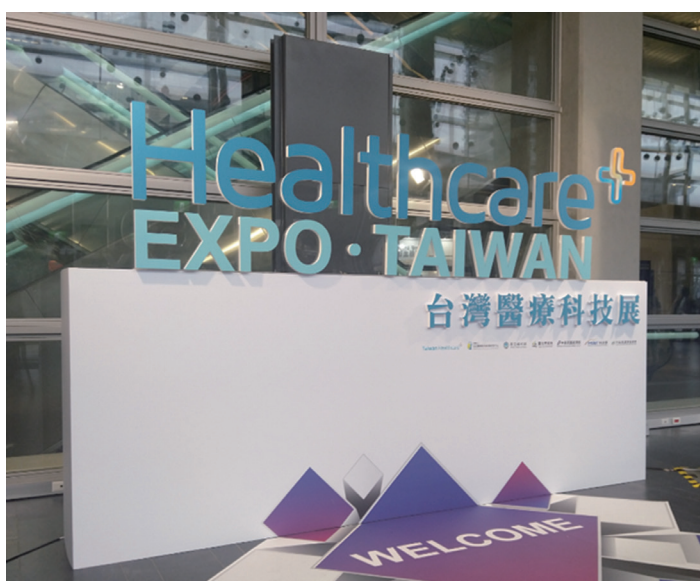
開發與創新價值—保健配料與產品應用」、「發酵食品微生物之生物活性代謝產物之探索研發」、「微生物組產業化技術平台」以及「微生物鑑定與全球行銷」等內容，並藉由此次的參展機會，廣泛與產官學研各界人士進行交流，期望未來可以有更多的研究開發、委託服務與技術移轉等合作機會。

2019 台灣醫療科技展

生資中心 / 研究員
許璦文

第三屆「2019 台灣醫療科技展」，於2019年12月5日至12月8日期間在南港展覽館盛大舉行。今年展出主題十分多元豐富，囊括「特色醫療」、「預防醫學」、「基因醫學」、「細胞治療」、「農業科學」、「智慧醫院/醫材」、「生技製藥」以及「創新技術」等主題，有來自12個國家，超過500家生技、醫院、科技廠商，總計1900個展

覽攤位共同展出。本次展覽中，食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，亦就我們所具有的服務能量—可提供「高價創能力之生物資源產業服務平台」，進行宣傳展出。包括：「臨床試驗細胞一站式服務」、「產品



食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心
參展「2019 台灣醫療科技展」

(圖：生資中心張育甄研究員)

生資中心新設置 GTP 細胞處理中心正式營運

生資中心 / 研究員
張育甄

近年來細胞治療已成為全球生技製藥的關鍵發展項目，國內亦有多家細胞治療公司成立並投入產品的開發與臨床試驗，形成極受矚目的新興產業。2018 年 9 月在兼顧安全性與發展性的前提下，衛生福利部公告「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」(簡稱特管辦法)之修訂，開放了六項低風險且具預期療效之自體細胞治療項目，加速細胞臨床使用。此舉不但使台灣細胞治療接軌國際發展，同時開啟了台灣生技醫療的新藍海時代。

細胞治療產品生產首要要件為符合人體細胞組織優良操作規範 (Good Tissue Practice, GTP)，其中規範了製程環境要求，建置並維持設施運作的合規，成為進入細胞臨床治療的門檻之一。生資中心原有 GTP 細胞操作室已滿載，今年度於食品所經費支持下，建置 GTP 細胞處理中心 (GTP Cell Processing Center)，提供學研產業界進駐使用，進行細胞產品生產與研發。

GTP 細胞處理中心之環境與管理

臨床細胞之生產環境潔淨度為製程品質關鍵要務，新建之 GTP 細胞處理中心以高效潔淨濾網過濾之層流空氣，維持製備管制空間之潔淨度至 Class 10,000 等級，並透過階層式正壓控制氣流方向，避免交叉污染之風險。全室配置獨立自動調節空調系統，確保室內溫溼度穩定。整體

環境 24 hr 不間斷持續運作，連結中央監控系統即時控制並記錄環境狀況，若遇異常可即時通報並解決。

GTP 細胞處理中心規劃四獨立操作室，每室內配置符合 NSF49 規格之生物安全操作櫃，維護產品與操作人員的安全，同時提供 CO₂ 培養箱、藥品級冷藏設備與離心機及倒立式顯微鏡，交由進駐單位製備細胞產品使用。於品管實驗室與冷凍設備室設置流式細胞儀、即時聚合酶連鎖反應儀、程式降溫儀與超低溫冷凍設備，涵蓋產品品管、功能分析與保存處理之專業需求。

生資中心以專業的管理人員進行 GTP 細胞處理中心之維運，建立完整文件系統並維持高規格的环境管理。負責定期進行環境

與儀器設備校驗作業，使整體設施全時段保持於合規高效之狀態。內部管制之設計採單向行進方式與傳遞箱系統，區隔進出與人物流動線。所有人員採二次更衣，進入操作區時須穿著拋棄式無塵衣鞋，減少污染源並將交叉污染之風險降至最低。同時配合門禁監控與即時攝影系統，嚴格管制人員進出權限，確保作業場所的安全性與保密性。

GTP 細胞處理中心之服務經驗

於國內開啟細胞治療臨床試驗以來，生資中心已有多家廠商之進駐服務經驗，並協助廠商通過衛生福利部之 GTP 查核。本次 GTP 細胞處理中心落成，合併原有之三間操作室擴大服務規模至七間操作室，每間操作室皆為獨立單位，適用於各類型細胞之製備與操作，將提供產業界更大的服務量能，協助進駐之細胞治療公司快速跨越產業門檻，創造更高的產業價值。**進駐相關服務請洽：**cyj@frdi.org.tw 張育甄 研究員



圖一 GTP 細胞處理中心入口 (A)，獨立細胞操作室 (B)，管制區潔淨走道 (C)。

生資中心於細胞治療產業之服務能量

生資中心 / 研究員 / 管理師
張育甄 / 李士瑛

細胞產品於全球臨床治療與試驗好消息頻傳，無論是突破性的 CAR-T 療法或幹細胞產品都有快速的發展。過去生技產業的發展推進較為緩慢，然而各國法規的開放與產業的合作，使細胞治療領域突飛猛進，已成為生技醫藥領域的明日之星。國內無論是耕耘已久或新興投入的細胞治療公司，據統計目前已超過 50 家，所建構之產業鏈已然成形。對應細胞治療產品對品質與安全性的嚴格要求，食品所生資中心整合多年經驗與技術，提供發展細胞治療公司由研發、生產、品管到保存之高品質一站式服務。茲就各項服務內容重點說明如下：

一、研發服務

於國家衛生研究院、經濟部與科技部之計畫之持下，生資中心陸續執行與協助動物細胞庫、幹細胞庫與誘導式多能幹細胞庫 (iPS cells) 的建置，於各類細胞皆有豐富的培養與應用分析經驗。面對多樣化的細胞治療產品，以細胞庫資源加入試驗技術能量，提供客製化的研究方案，於過去協助多家細胞治療廠商進行製程

開發與合作研究。服務類型涵蓋免疫細胞與幹細胞，支援新創公司研發缺口。生資中心為具公信力的第三方公正機構，支援廠商進行確效試驗之設計與分析，確立細胞產品分析結果的有效性。同時以堅實的培養經驗規劃教育訓練課程，藉由講授與實作同步的方式，幫助產業界建立受訓人員的細胞培養品質觀念與操作技術，使其能迅速而穩健地進入實務工作。

二、生產服務

由研發跨入臨床，細胞治療產品之生產是進入產業的關鍵進程。生資中心於 2013 年起即啟用 GTP 細胞實驗室之服務，以符合 GTP 規範之環境與機儀設備，支援細胞治療公司跨越操作設施需求門檻，快速投入細胞產品之生產。於 2019 年底更完成新設之 GTP 細胞處理中心建置，以專業的設施提供與管理系統，擴大服務量能，使進駐之細胞治療公司能專注於產品之製程及品管分析，減輕人物力負擔，落實研發成果的產業化與商品化。累積多年 GTP 細胞製備環境的服務，進

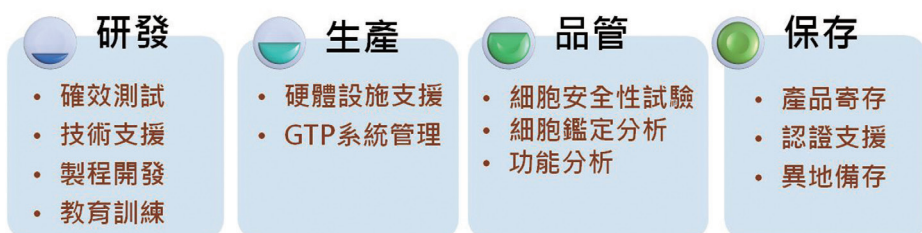
一步協助進駐廠商通過衛生福利部之查核，提供臨床等級細胞生產最有力、直接的設施支援。

三、品管服務

細胞治療首重產品之品質與安全，生資中心建立符合藥典之細胞產品安全性品管分析方法，於 2007 年取得 ISO 17025 之認證，包括無菌試驗 (Sterility)、黴漿菌試驗 - 指示細胞法 (Mycoplasma-Indicator Cell Method)、黴漿菌試驗直接培養法 (Mycoplasma-Direct Culture)、內毒素試驗 (Endotoxin Tests)。近年來安全性品管服務之國內外產學研機構超過 30 家，提供之分析報告協助廠商通過衛生福利部、美國食品藥物檢驗局等法規單位之審核。同時以短片段序列重複分析 (STR-PCR) 技術提供細胞鑑別服務，協助細胞治療廠商於維持細胞庫之種批系統時，確認其來源的正確性。並藉由提供功能性分析確立臨床細胞之特性，做為臨床應用的基礎。

四、保存服務

生資中心於 1982 年運行以來致力於建構及維持國際水平之生物資源銀行，為我國生技產業最重要基磐建設。我們在保存的優勢來自於由微生物到細胞保存累積超過 300 案，客戶保存材料超過 30 萬保存管之服務經驗，提供包含研發生物材料之秘密保存、生技服務業保存庫、藥廠研發之異地備援保存及專利生物材料之寄存…等全方位的服務。於細胞治療產品越來越多元化的趨勢下，無論是細胞庫或基因載體之保存服務，生資中心皆以兼具安全與保密性之高品質管理，透過制度化的作業流程、專業保存



圖一 生資中心整合臨床細胞一站式服務內容

系統與完善的緊急應變措施，協助寄存客戶通過衛生福利部之認證審查。

生資中心以研發為基礎應用為導向，針對再生醫療發展之趨勢，整合細胞治療所需之資源與技術，除了可導入研發、生產、品管與保存任一服務於製程需求

中，更可相互串聯提供最靈活便捷之一站式服務平台。我們將與產業界攜手並進共創競爭優勢，成為最好的支援夥伴。

研發、生產服務請洽：

cyj@firdi.org.tw 張育甄 研究員

品管、保存服務請洽：

syl@firdi.org.tw 李士瑛 管理師

GLP 體外皮膚敏感性評估取代動物性試驗

生資中心 / 副研究員
沈曼晴

前言

皮膚過敏性是因物質藉由免疫機制引發的皮膚反應，症狀有發癢、紅斑、紅腫等現象。目前證實過敏相關機制為分子引發事件 (molecular initiating event, MIE)，當外來化合物與特定生物大分子作用下，並與不同生物組織結構 (如：細胞、器官等) 結合後出現不良結果 (Adverse outcome; AO) 相互連結的關係，稱不良結果途徑 (Adverse Outcome Pathway; AOP)，產生對生物體不利影響，即為過敏接觸性發炎 (OECD, 2012)。

過敏性相關機制途徑如下 (圖一)：

第一個關鍵事件 - 分子引發事件 (molecular initiating event, MIE) 帶電物質與皮膚蛋白質的親核中心共價結合。

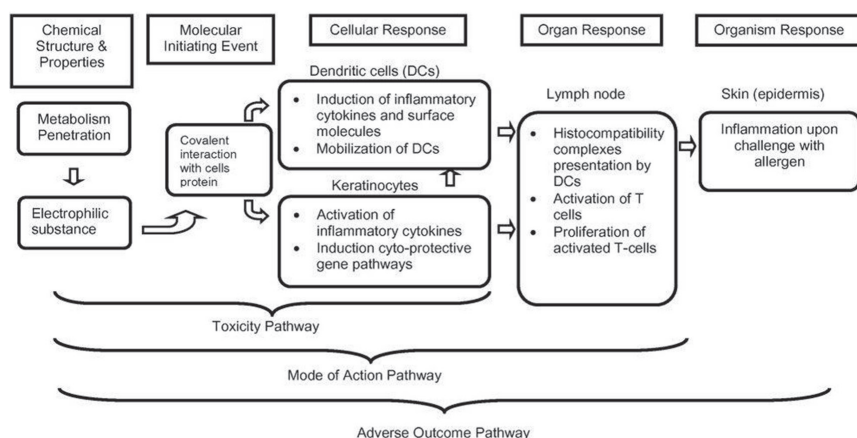
第二個關鍵事件 - 發生於角質細胞形成中，包括發炎反應以及特定細胞信號傳遞途徑 (例如抗氧化劑 / 親電子反應依賴性途徑) 相關的基因表達變化。

第三個關鍵事件 - 樹突細胞 (dendritic cells; DC) 的激活，通過特定細胞表面標示物、化學激活素 (chemokines)、細胞激素 (cytokines) 的表現量變化。

第四個關鍵事件 - T 細胞活化和增殖，通過老鼠局部淋巴結試驗 (Local Lymph Node Assay; LLNA) 評估其變化。與皮膚接觸後引起過敏反應的物質以《聯合國全球化學品統一分類和標籤制度》United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 來進行分類。而根據聯合國 GHS 區分皮膚致敏性試劑和非致敏性試劑的測試方法，有三種體外測試方法，人類細胞系激活測試 (human cell line activation test; h-CLAT)、U937 細胞激活測試 (U937 cell line activation Test; U-SENS™)、IL-8 基因分析 (Interleukin-8 Reporter Gene Assay; IL-8 Luc Assay)。證實以機械學及化學為基礎的體外測試方法解決了兩個關鍵事件，第一個關鍵事件以直接蛋白反應性測定 OECD TG 442C (OECD, 2015)，和第二個關鍵事件以 ARE-Nrf2 螢光酵素測試方法 OECD TG 442D (OECD, 2015)，可評估在 AOP 機制下試驗物質對皮膚致敏性的潛在危險。另外，人類細胞系激活測試 (h-CLAT) OECD TG 442E 該方法可評估在激活的樹突細胞及 Interleukin-8 引起皮膚致敏性的 AOP 機制下表面抗原 (CD54、CD86) 表現量，以判定試驗物質的致敏性。

皮膚敏感性評估常使用試驗方法：

- (1) 小鼠耳朵紅腫試驗 (Mouse ear swelling test; MEST)：連續多次耳朵皮內注射試驗物質，測試對耳朵腫脹程度的影響。
- (2) 小鼠局部淋巴結試驗 (Local lymph node assay; LLNA)：利用試驗物質誘導淋巴細胞



圖一 皮膚過敏性相關途徑

表一 OECD TG 442E 在 h-CLAT 方法中建議之標準品

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	CV75 Reference Range in $\mu\text{g/mL}$ ²	h-CLAT results for CD86 (EC150 Reference Range in $\mu\text{g/mL}$) ²	h-CLAT results for CD54 (EC200 Reference Range in $\mu\text{g/mL}$) ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	2-12	Positive (0.5-10)	Positive (0.5-15)
4-Phenylenediamine	106-50-3	Solid	Sensitiser (strong)	5-95	Positive (<40)	Negative (>1.5) ³
Nickel sulfate	10101-97-0	Solid	Sensitiser (moderate)	30-500	Positive (<100)	Positive (10-100)
2-Mercaptbenzothiazole	149-30-4	Solid	Sensitiser (moderate)	30-400	Negative (>10) ³	Positive (10-140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	Liquid	Sensitiser (weak)	>20	Negative (>5) ³	Positive (<250)
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Solid	Sensitiser (weak)	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Glycerol	56-81-5	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Lactic acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	1500-5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	Solid	Non-sensitiser	>1000	Negative (>1000)	Negative (>1000)

增生而使淋巴結腫脹來判定試驗物質的致敏性，其缺點為只能測試中度或強度致敏性物質。

- (3) 天竺鼠皮膚過敏性試驗 (Guinea pig maximisation test; GPMT)：直接將試驗物質塗抹或皮內注射於動物，來確定試驗物質是否有致敏性，試驗結果可以區分微致敏性及無致敏性。
- (4) 天竺鼠無過敏性試驗 (Buehler test)：重複將試驗物質塗抹於皮膚測試對皮膚的過敏程度，確認試驗物質致敏性濃度。

以往皮膚敏感性的評估通常使用天竺鼠作為實驗動物的方法進行，Russell and Burch 於 1959 年出版「人道實驗技術之原則」；The Principles of Humane Experimental Technique」，並發表 3R 原則 - 替代 (Replacement)、減少 (Reduction) 及精緻化 (Refinement)。

- (1) 替代：實驗中直接替代或避免使用動物的技術或方法。

- (2) 減少：每個實驗或研究中使用的動物數量減少，還是要根據實驗設計以確保可靠和可重複性的結果。

- (3) 精緻化：實驗動物可能會受到痛苦及折磨，試驗中要盡可能降低對動物的傷害。

皮膚敏感性試驗使用 h-CLAT 方法原理為量化暴露於致敏物質後人單核細胞白血病細胞 THP-1 中與單核細胞和樹突細胞 (DC) 激活過程相關的細胞表面抗原 (CD86 和 CD54) 表現的變化。利用測得 CD86 和 CD54 細胞表面抗原表現量來區分物質對皮膚是否有過敏性反應。根據目前研究證實，h-CLAT 方法適用於測試多種不同質地的物質，可適用於可溶解於溶劑中穩定的膠體及懸浮溶液，當試驗物質不易溶解 DPBS 或 DMSO 中有沉澱現象，可查詢文獻是否有溶劑可溶解試驗物質並穩定試驗物質為溶液不再沉澱，即可使用此溶劑進行試驗。h-CLAT 方法證實可以區分致敏性及非致敏性物質，有效評估敏感性。

取代動物性實驗方式 h-CLAT 人類細胞株測試

利用體外培養人類單核白血病細胞 (THP-1) 與試驗物質培養 24 小時，透過流式細胞儀檢測細胞表面抗原 CD86 和 CD54 表現的相對螢光強度量 (Relative fluorescence intensity; RFI)，以評估試驗物質對皮膚敏感性及有效濃度。OECD TG 442E 所列出之十個建議標準品如下 (表一)。

細胞培養

將 BCRC 60430 來源 THP-1 細胞解凍後，培養於 90% RPMI 1640 培養基 (含 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、4.5 g/L glucose、10 mM HEPES、1.0 mM sodium pyruvate)、10% Fetal bovine serum 及 0.05 mM 2-mercaptoethanol。須培養兩個星期待細胞生長速率正常，才可進行試驗，並且細胞使用期限為兩個月及不可培養超過 30 代。THP-1 細胞以 $1-2 \times 10^5$ cell/ml 濃度每 2-3 天繼代一次，

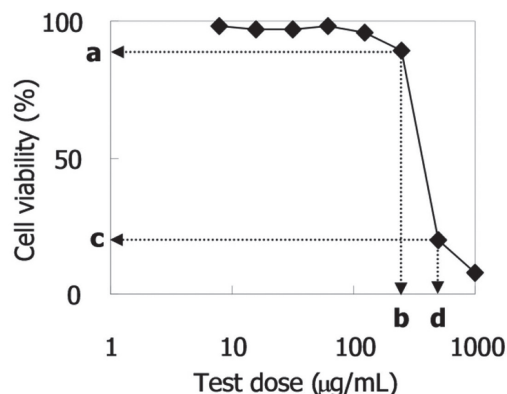
保持細胞濃度為 $0.1-1 \times 10^6$ cell/ml，並觀察細胞型態確定細胞無成團現象為單顆細胞生長，而進行後續試驗。

細胞品質反應確認 (Reactivity check)

對照物質依照 OECD TG 442E 標準步驟進行配製。兩個陽性對照物質 (1) 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 配製 stock solution 2 mg/ml 再稀釋為 $8 \mu\text{g/ml}$ 。(2) Nickel sulfate (NiSO_4) 配製 stock solution 10 mg/ml 再稀釋為 $200 \mu\text{g/ml}$ 。以及一個陰性對照物質 Lactic acid (LA) 配製 stock solution 100 mg/ml 再稀釋為 $2000 \mu\text{g/ml}$ 。對照物質與 THP-1 細胞 1×10^6 cells/well 培養 24 小時後，細胞計數計算細胞存活率及利用流式細胞儀檢測細胞表面抗原 CD86 和 CD54 表現。細胞存活率來說，對照物質中的溶劑組別 (medium 及 DMSO) 與細胞反應 24 小時後，其細胞存活率需大於 90%；CD86 和 CD54 表現量，陽性對照物質 CD86 $\text{RFI} \geq 150$ (EC150) 及 CD54 $\text{RFI} \geq 200$ (EC200)，陰性對照物質不得有陽性反應，即可判定細胞品質為穩定。細胞品質反應須確認兩次皆通過，方可進行後續的試驗物質劑量分析。

試驗物質劑量分析 (Dose finding assay)

測試試驗物質對 THP-1 細胞存活率影響，將以細胞存活率 75% (CV75；75% cell viability) 為基準，來計算試驗物質的適合試驗之濃度。將試驗物質以 PBS、DMSO 或可以提供科學證明可溶解試驗物質之溶劑，依照 OECD TG 442E 標準步驟進行稀釋與



圖二 試驗物質濃度對於細胞存活率的變化 (a：細胞存活率大於 75% 的最小細胞存活率。c：細胞存活率小於 75% 的最大細胞存活率。b 跟 d：分別為 a 與 c 對應之試驗物質濃度。)

1×10^6 cells/well 的 THP-1 細胞培養 24 小時後，觀察細胞型態的變化及細胞存活率，繪製試驗物質濃度對細胞存活率的變化 (圖二)，並計算出試驗物質 CV75 的濃度。

試驗物質對細胞 CD86 / CD54 抗原表現分析

利用試驗物質劑量分析測得劑量濃度，將試驗物質依照溶劑的不同來計算試驗中試驗物質需使用的濃度。溶劑為 D-PBS (或 medium) 起始濃度為 $100 \times 1.2 \times \text{CV75}$ (mg/ml)；溶劑為 DMSO 起始濃度為 $500 \times 1.2 \times \text{CV75}$ (mg/ml)，當無法取得 CV75 起始濃度就以試驗物質劑量分析中的最高濃度。

對照物質 (陽性物質 DNCB $4 \mu\text{g/ml}$) 與試驗物質依照 OECD TG 442E 標準步驟稀釋並與 1×10^6 cells/well 細胞培養 24 小時，計算細胞存活率及 CD86 / CD54 抗原表現分析，以相對螢光強度 RFI 是利用平均螢光強度 (geometric mean fluorescence intensity; MFI) 來計算，方式如下：

$$\text{RFI} = \frac{\text{MFI of chemical_treated cells} - \text{MFI of chemical_treated isotype control}}{\text{MFI of solvent_treated ctrl cells} - \text{MFI of solvent_treated isotype ctrl}} \times 100$$

試驗物質結果分析

計算試驗物質對有皮膚過敏性的有效濃度，需計算 EC150 (CD86 抗原表現) 及 EC200 (CD54 抗原表現) 有效試驗物質濃度，有兩種計算方式。

當 A_{dose} 的 RFI 值大於 150 / 200， B_{dose} 的 RFI 值小於 150 / 200 如圖三 (A)，以下列公式計算 (兩濃度間之 RFI 值必須大於 10%)：

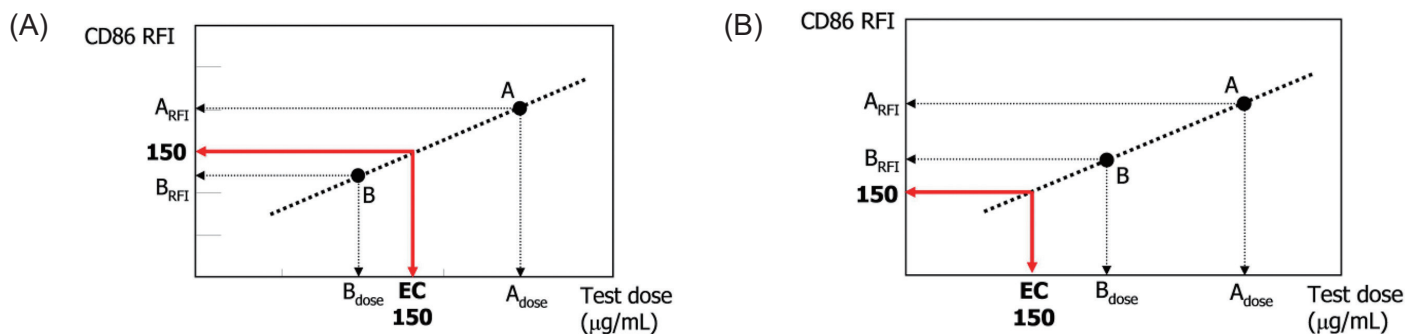
$$\text{EC150 (for CD86)} = B_{\text{dose}} + [(150 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times (A_{\text{dose}} - B_{\text{dose}})]$$

$$\text{EC200 (for CD54)} = B_{\text{dose}} + [(200 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times (A_{\text{dose}} - B_{\text{dose}})]$$

當所有濃度的 RFI 值皆大於 EC150 或 EC200 時如圖三 (B)，就以最低濃度及第二低的濃度進行下列公式之計算 (兩濃度間之 RFI 值必須大於 10%)。

$$\text{EC150 (for CD86)} = 2^{\{\text{Log}_2(B_{\text{dose}}) + (150 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times [\text{Log}_2(A_{\text{dose}}) - \text{Log}_2(B_{\text{dose}})]\}}$$

$$\text{EC200 (for CD54)} = 2^{\{\text{Log}_2(B_{\text{dose}}) + (200 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times [\text{Log}_2(A_{\text{dose}}) - \text{Log}_2(B_{\text{dose}})]\}}$$



圖三 試驗物質結果分析判定

試驗物質過敏性濃度分析

皮膚敏感性結果為陽性時，可計算出 EC150 / EC200 有效濃度，重複進行二至三次試驗後結果皆為陽性，得到三次之有效濃度 (EC) 數值，取其中位數；若三次實驗中只有兩次試驗得陽性結果，則取其較高濃度為最終有效濃度。

試驗物質致敏性結果判定

在試驗三重複測試中可能結果三次試驗結果會有所不同，OECD TG 442E 也說明並非所有試驗物質皆可同時使 CD86 及 CD54 有陽性反應，因此要如何判定試驗物質是否有致敏性極為重要，OECD TG 442E 列表說明各種試驗結果判定的方式。當前兩次試驗中 CD86 及 CD54 皆為陽性反應，可預測試驗物質有致敏性不須再進行第三次試驗。同樣，當兩次試驗中 CD86 及 CD54 皆為陰性反應，可預測試驗物質無致敏性不須再進行第三次試驗。前兩次試驗結果無再現性時 (至少 CD86 及 CD54 其中一個為陽性反應)，需進行第三次試驗，結果為陰性反應，將判定試驗物質無致敏性；結果為 CD86 及 CD54 其中一個為陽性反應或皆陽性反應，判定試驗物質為有致敏性。

結論

皮膚過敏性試驗是為了判斷及確認試驗物質是否具致敏性及致敏性濃度，以往各國皆利用動物性試驗測試，於 1959 年 Russell and Burch 發表 3R 原則 - 替代 (Replacement)、減少 (Reduction) 及精緻化 (Refinement)，促使各國更精進實驗方法以減少動物使用量及替代動物試驗方法為目標。基於對動物的人道對待原則下，我國於 2016 年通過《化粧品衛生管理條例》修正案，對化粧品業者進行化粧品或化粧品成分之安全性評估，不得以動物作為檢測對象。BCRC 也將此作為目標，使用 h-CLAT (OECD TG 442E) 方法體外試驗取代動物試驗建立試驗方法並依照優良實驗室操作規範 (Good Laboratory Practice, GLP) 進行運作，未來將協助企業評估產品或物質的致敏性。

參考文獻

1. OECD (2018), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In vitro skin sensitization assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitization. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and

Development.

2. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168.
3. Russell, WMS., Burch, RL. The Principles of Humane Experimental Technique. London, Methuen, 1959.
4. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
5. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
6. OECD, Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). EURL ECVAM DB-ALM Protocol no.158.
7. 英國國家動物 3R 研究中心網站 <https://www.nc3rs.org.uk/>

BCRC 不再提供細胞株說明

生資中心 / 研究員
許璦文

動物細胞在生命科學研究領域的應用，已有超過一百年的發展歷史。由於細胞株具有體外增殖複製的能力，且相較於動物實驗，細胞培養所需要使用到的設備較為簡單，再加以細胞的同質特性 (homogeneity)，和細胞培養和試驗的環境較為單純且容易受到控制，因此細胞培養已被廣泛應用在醫學和疾病的研究探討上，作為研究模型使用。然而需要注意的是，近年來有多篇報告指出，目前被研究人員廣為使用的動物細胞株，存在有交叉污染 (cross-contamination) 或是被誤認 (misidentified) 的情形。尤其是自國外引進或是來自私人實驗室分讓的細胞株，若沒有經過特定的檢查程序確認細胞株是否正確，有極高的機率存在著交叉污染或是細胞株誤用的問題。

根據德國微生物及細胞培養收集中心 (DSMZ - German

Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) 1999 年發表在 International Journal of Cancer 的報告，DSMZ 有 18% 的人類細胞株，受到其他人類細胞的交叉污染。美國典型培養物保藏中心 (American Type Cell Culture, ATCC) 在經過測試後也發現，有 31 株動物細胞株存在有不正確或是細胞株交叉污染的問題 (<https://www.atcc.org/Products/Cells and Microorganisms/Cell Lines/ Misidentified Cell Lines.aspx>)。國際細胞株鑑定委員會 (International Cell Line Authentication Committee, ICLAC) 致力於收集並公布錯誤細胞株之相關資訊，經分析後確認，目前有 451 株錯誤細胞株已無法公開取得，但仍有 31 株錯誤細胞可由公開細胞庫或實驗室來源取得 (http://iclac.org/wp-content/uploads/Cross-Contaminations-v8_0.pdf)。

表一、BCRC 下架細胞株一覽表

BCRC No.	Cell name	Description
60017	KB	HeLa contaminated from original depositor
60022	intestine 407 (Hela markers)	HeLa contaminated from original depositor
60024	chang liver	HeLa contaminated from original depositor
60043	HL-CZ	Misidentified as K562, 100% match; from original depositor
60145	TSHG8301	Misidentified as ME-180, 100%match; from original depositor
60152	Me Kam	Misidentified as CCD-966SK, 100% match. ; from original depositor
60165	CE48T/VGH	原始寄存者提供細胞背景資料為 male，但經 STR-PCR 鑑定後，僅測得 X 染色體
60324	T3 671 Subline No2	Misidentified as RD, 100%Match ; from original depositor
60338	WRL-68	HeLa contaminated from original depositor
60379	TMC-1	Misidentified as SW-480, 100% Match. ; from original depositor
60403	CG1001	BCRB 60402 CG1000, 100%Match
60449	CC-M2	Misidentified as SW-480, 100% Match. ; from original depositor
60450	CC-M3	Misidentified as SW-480, 100% Match. ; from original depositor
60527	HT (human trophoblast)	HeLa contaminated from original depositor
60528	TL (trophoblast-like)	Misidentified as SiHa, 100% Match. ; from original depositor
60529	TL ^{ouaR} (ouabain-resistant TL cells)	HeLa contaminated from original depositor

報告指出，這些錯誤的細胞株，通常是在一開始建立時，即錯誤標示了細胞的組織來源。另外也有相當高比例的細胞株是在建立培養的過程中，受到 HeLa 細胞的交叉污染。也有很多被誤認為是人類組織來源的錯誤細胞，在細胞株建立的階段，就已經被實驗室既有的小鼠細胞所取代。經過統計，目前已有超過 33,000 篇的科學論文，使用錯誤的細胞株進行研究發表。而這些使用錯誤細胞所衍生的無效研究數據，不僅造成研究經費與資源的浪費，對於研究人員長期投注的心力，更造成莫大的損失。因此，為避免研究人員使用錯誤的細胞株，除了透過公開資訊搜尋，確認使用的細胞株是否有交叉污染或是誤用的情形之外，建議研究人員應透過大型公開之細胞庫來源取得研究用細胞株。同時，定期複核使用細胞株的正確性，和檢測是否有其他細胞株或是微生物的污染，是確保研究成果與品質的重要關鍵。

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 / 國家衛生研究院細胞庫，目前可對外公開分

讓有 647 株細胞株。所有提供之細胞株，皆經過嚴格品管檢測，包括：無菌試驗（細菌與黴菌污染檢測）、黴漿菌污染檢測（直接培養法與 DNA 螢光染色法），以及人類細胞複核（STR profile）等分析。確認細胞株沒有微生物污染，與人類細胞株之正確性後，方對外進行分讓提供。食品所生資中心對外亦提供相關之細胞產品品管檢測服務，且所有檢測服務項目，皆符合 ISO 9001:2015 或 TAF/ISO 17025:2017 之標準。目前細胞庫有 17 株人類細胞株已下架不再提供，詳如表一所列。

未來我們仍會持續收集由國人所自行開發建立的細胞株，並嚴格執行相關的品管檢測，確保細胞品質，提供研究人員豐富且高品質的研究細胞資源。

細胞株公開寄存申請請洽：

lwh@firdi.org.tw 許璿文 研究員

細胞株品質檢測服務請洽：

syl@firdi.org.tw 李士瑛 管理師

參考文獻

1. Horbach SPJM, Halfman W. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. PLoS

One. 2017; 12(10): e0186281.

2. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? Biotechniques. 2007; 43(5):575-86.
3. MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. Int J Cancer. 1999; 83(4):555-63.

以改善脂肪酸代謝的藥，發現可提升癌症治療效果。最後本庶佑亦指出腸道微生物體學與免疫系統的調節習習相關，將是未來提升癌症治療研究之重點。

山中伸彌 Recent progress in iPS cell research and application

山中伸彌教授以 Recent progress in iPS cell research and application 報告日本目前在 iPS 的應用與最新發展。過去十年 iPS 已經成功完成第一期臨床試驗，證實 iPS 的使用的安全性。然而個人化 iPS 的建立除了高昂的建立時間與金錢成本外，細胞品質的管控亦是最大的挑戰。因此 CiRA 提出同合子 HLA (Homozygous HLA typing) iPS 儲存庫的建置計畫。認為只要篩選找到 HLA 同合子之捐贈者細胞，經由重新編程，可建立成同合子 HLA iPS 細胞株，則可降低免疫排斥風險，提供給大多數 HLA 相匹配之病人使用，此一策略具有降低建立成本與確保細胞品質之優點。由於日本人民

2019 CiRA 國際研討會 - 日本 iPS 幹研究發展趨勢

生資中心 / 研究員
盧懷恩

京都大學 iPS 研究所 (Center for iPS cell Research and Application, CiRA) 是日本 iPS 最高研究單位，現任所長為 iPS 發明人暨 2012 諾貝爾生理醫學獎得主山中伸彌 (Shinya Yamanaka) 教授。CiRA 每兩年舉辦國際研討會，邀請日本與國際學者齊聚一堂，一同分享 iPS 之相關研究。今年 CiRA 2019 國際研討會 - 主題為改變科學和醫學未來的 iPS 於 2019 年 11 月 27 日至 29 日於京都大學舉行。研討會的內容包含多能性和基因組編輯的基礎研究到幹細胞的臨床應用。今年 CiRA 國際研討會特別邀請 2018 年諾貝爾生理醫學獎得主本庶佑 (Tasuku Honjo) 博士主題演講，接下來將就本庶佑博士與山中伸彌的演說內容進行分享。

本庶佑 Serendipities of acquired immunity

本庶佑教授以 Serendipities of acquired immunity 為題分享 PD-1 於免疫治療的研究歷程。T 細胞上的 PD-1 於後天免疫系統中扮演著如剎車系統，的角色在癌症治療上往往因 PD-1 而導致毒殺腫瘤的效果不佳。因此阻斷 PD-1 的方法成為癌症治療的發展重點。在 2014 年，美國 FDA 與日本 PMDA 核准阻斷 PD-1 策略應用於癌症治療上。會議中本庶佑團隊發表最新的研究進展指出，臨床試驗統計 PD-1 的治療效果因人而異。其研究團隊率先發現脂肪酸的代謝發現可能是 PD-1 治療上成效上重要的評估指標。研究團隊就在 PD-1 治療沒效的肺癌患者身上，同時給予可

族基因型較為單純，根據統計，只要建立 145 株 HLA 同合子 iPSC 細胞，即可涵蓋 90% 日本人族群。目前已從數十名具有 HLA 同合子的捐贈者中，建立了 4 株 iPSC 細胞株，這 4 株細胞已可涵蓋全日本約 40% 的人口。然而要完全找到 145 個 HLA 同合子捐贈者，HLA-A，-B 和 -DR 純合子的捐贈者，估計將需要測試約 160,000 人。山中教授於會中表示，利用 CRISPR-CAS9 基因編輯剔除 HLA 基因，可大大提高配對機會，擴大適用的人口，同時大程度降低免疫反應的風險。因此報告 CiRA Akitsu Hotta 和 Shin Kaneko 團隊發表於 Cell Stem Cell 的研究指出透過 CRISPR-CAS9 基因編輯策略可以將 iPSC 細胞療法帶給更廣泛的患者。然而，若將所有的 HLA 基因剔除後，會引起免疫系統自然殺手細胞 (NK) 細胞攻擊。因此團隊刪除了 HLA-A，HLA-B 和 單 HLA-C 等位基因，以保留一個 HLA-C 等位基因，建立出 HLA-C 保留的 iPSC (HLA-C retained iPSC)。實驗指出 HLA-C retained iPSC 不會誘發 CD8，CD4 T 細胞與 NK 細胞攻擊。經過估計，團隊建立之 12 種 HLA-C 的 iPSC 細胞株已可涵蓋高達 90% 世界人口。因此未來幾年 CRISPR-CAS9 基因編輯 iPSC 的建立將是 CiRA 發展的重點之一。

台灣人類疾病誘導型多能幹細胞細胞庫公開分讓使用

日本京都大學山中伸彌教授成功建立誘導型多潛能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 不止突破了人類胚胎幹細胞使用上的道德爭議與臨床使用上免疫排斥的限制，更開創了嶄新的幹細胞研究領域。透過 iPSC

Taiwan Human Disease iPSC Cells Service Consortium

10 Normal & 58 Disease iPSC lines available online



- | | |
|---|---|
| 3 Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency (AADC)
芳香族L-胺基酸類脫羧基酶缺乏症 | 5 Parkinson's Disease
帕金森氏症 |
| 3 Fabry disease
法布瑞氏症 | 4 Premature ovarian failure (POF)
卵巢早期功能不全 |
| 3 Familial amyloid neuropathy
家族性蕁粉樣多發性神經病變 | 2 Prader-Willi Syndrome (PWS)
威利症候群 |
| 5 Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD)
顏面肩胛肱骨型肌肉失養症 | 1 Spinocerebellar Ataxia type 3
第3型脊髓小腦萎縮症 |
| 3 Frontotemporal dementia (FTD)
額顳葉癡呆症 | 2 Spinocerebellar ataxia type 22
第22型脊髓小腦萎縮症 |
| 3 Juvenile macular degeneration
青年性黃斑部病變 | 2 Spinocerebellar Ataxia type 36
第36型脊髓小腦萎縮症 |
| 3 Leber's hereditary optic neuropathy
賴博氏遺傳性視覺神經症 | 1 Sialidosis disease
涎酸酵素缺乏症 |
| 4 Mitochondrial DNA mutation
粒線體DNA疾病 | 6 Schizophrenia
精神分裂症 |
| 1 Monogenic diabetes
單基因糖尿病 | 2 Short QT syndrome
短QT綜合症 |
| 3 Polycystic Kidney Disease (PKD)
多囊性腎臟病 | 2 Type 1 diabetes
第1型糖尿病 |

圖一 人類疾病誘導型多潛能幹細胞 (iPSC) 服務聯盟計畫已上架可公開分讓 68 株人類 iPS 細胞株

技術可誘導建立出符合自體基因型的幹細胞，在臨床醫療上有極高的治療潛力。除此之外，在基礎疾病研究中，常受限於無法取得適當的疾病細胞，而透過 iPSC 技術可將病患疾病細胞建立成疾病 iPSC，在體外分化成表現疾病特徵之細胞模式，作為基礎研究或篩選藥物平台用，提高 iPSC 在基礎醫學研究上的價值。因此 2015 年台灣生技醫藥國家型科技計畫成立人類疾病誘導型多能幹細胞服務聯盟，聯合中研院、台大醫院、台北榮總、國衛院與食品研究所等國內具 iPSC 建立經

驗之研究團隊，協助申請服務之單位建立多潛能性幹細胞株。截至 2019 年，目前已完成公開分讓 10 株正常 iPSC 與涵蓋了 20 種疾病之 58 株疾病 iPSC (圖一)。這些疾病 iPSC 株包含單基因，多基因和染色體遺傳性疾病，目前細胞株已公開上架提供全台灣科研人員申請分讓使用。這些豐富之細胞資源也進一步促進台灣 iPSC 研究的發展與提升台灣 iPSC 國際的能見度。詳細細胞資訊請參考 BCRC 網頁 <https://catalog.bcrc.firdi.org.tw/Welcome> 與聯盟網頁 <http://ipsc.ibms.sinica.edu.tw/>

生資中心生物材料銷售與服務價格調整公告

食品所於 108 年 9 月 1 日起調整生物資源保存及研究中心 (簡稱生資中心) 生物材料銷售及試驗鑑定服務價格。微生物材料調整為 2,500、5,000 與 6,000 元，細胞株價格維持 6,000 元，其他特殊生物材料另計 (如表一，https://www.bcrc.firdi.org.tw/c_service/c01-profile/)。並新增

絕對厭氧菌委託培養與潔淨室環境檢測等技術服務，試驗與鑑定服務價格異動已更新公告於生資中心網頁。委託試驗項目與價格請參見 https://www.bcrc.firdi.org.tw/c_service/c03-profile/，菌種鑑定與人類細胞複核服務價格請參見 https://www.bcrc.firdi.org.tw/c_service/c04-profile/。

生資中心現為 TAF 認可之測試實驗室 (L1865) 與參考物質生產機構 (R002)，持續通過 ISO 9001、ISO 17025、ISO 17034 國際品質系統 (圖一) 並提供生物資源客製化服務，歡迎各界委託洽詢與合作研究。

其他未盡相關事宜請來電洽詢，電話：03-5223191 —

生物材料購買：

黃小姐，分機 248。

林小姐，分機 509。

委託試驗與鑑定服務：

唐先生，分機 512。

生物材料寄存：

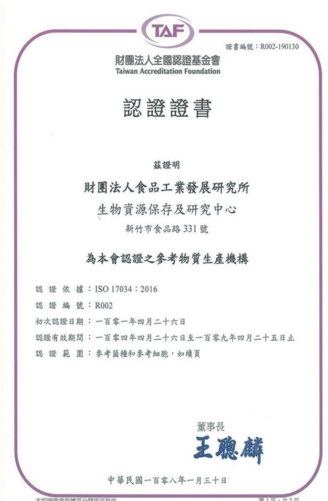
詹小姐，分機 711。



ISO 9001



ISO/IEC 17025



ISO 17034

圖一 生資中心獲得並持續維持 ISO 9001:2015、ISO 17025:2018 及 ISO 17034:2016 之多項國際標準驗證。

表一 109 年菌株價格參考

菌株費用類別	收費價格	類別說明
一般菌株	2,500	一般細菌、酵母菌、放線菌、絲狀真菌、質體、宿主及噬菌體
特殊培養處理菌株	5,000	如菇類、微好氧菌及不適合凍乾之各類菌株及微藻株。
特殊難培養菌株	6,000	如幽門螺旋桿菌、黴漿菌、甲烷菌及其他絕對厭氧菌等。
一般細胞株	6,000	特殊細胞株如參考細胞株、人類胚胎幹細胞或 HUVEC 等材料價格不在此限。
基因庫	6,000	
GenomicDNA	6,000	

註 1：各類生物材料每筆訂單需收取處理費，若同時有多溫層運送處理需求時，需依實際寄送溫層貨件數量加收處理費，但同訂單中每類處理費以一筆為限。惟若是客戶指定分次運送時衍生之多筆處理費用，則不受上限。

註 2：國外銷售服務以美金計價，運費另計。

生物資源保存及研究簡訊 第120期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啓成所長

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

