



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 109 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

研發成果 1

- ◎ 新收細胞 --- 『家族性高膽固醇血症』細胞株介紹

科技新知 3

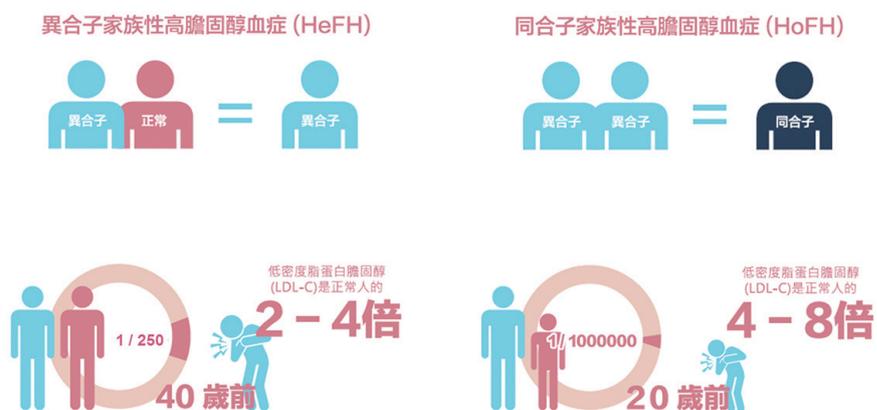
- ◎ 體外眼睛嚴重刺激性試驗 - 螢光滲漏測試法介紹
- ◎ iPSC 在帕金森氏症之治療
- ◎ 生物墨水結合 3D 列印器官的應用

新收細胞 --- 『家族性高膽固醇血症』 細胞株介紹

家族性高膽固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一種顯性家族遺傳性的脂質代謝異常疾病，盛行率約為 1/250，但僅有 <10% 的病例被診斷確診。臨床上 FH 患者的低密度脂蛋白膽固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 會較正常值高出 2-8 倍，並且可能在四十歲之前罹患早發性動脈粥狀硬化心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)，發生率是正常人的二十倍 (圖一)。目前已知與 FH 有關的突變基因有三個，皆會造成血液中的 LDL-C 無法有效被移除，而使

血中 LDL-C 濃度顯著升高，包括：低密度脂蛋白膽固醇受體基因 (low-density lipoprotein receptor gene, *LDLR*)、表面脂蛋白 B-100 基因 (apolipoprotein B-100 gene, *APOB-100*) 以及 PCSK-9 基因 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9, *PCSK-9*)。這些染色體變異都會導致低密度脂蛋白膽固醇受體 (LDLR) 無法發揮正常的功能，其中超過九成的 FH 患者都是屬於 *LDLR* 的基因突變。

由於 FH 屬於顯性遺傳疾病，當調控膽固醇的成對基因其中之一發生突變，即會造成膽固醇明顯升高，此種異合子突變



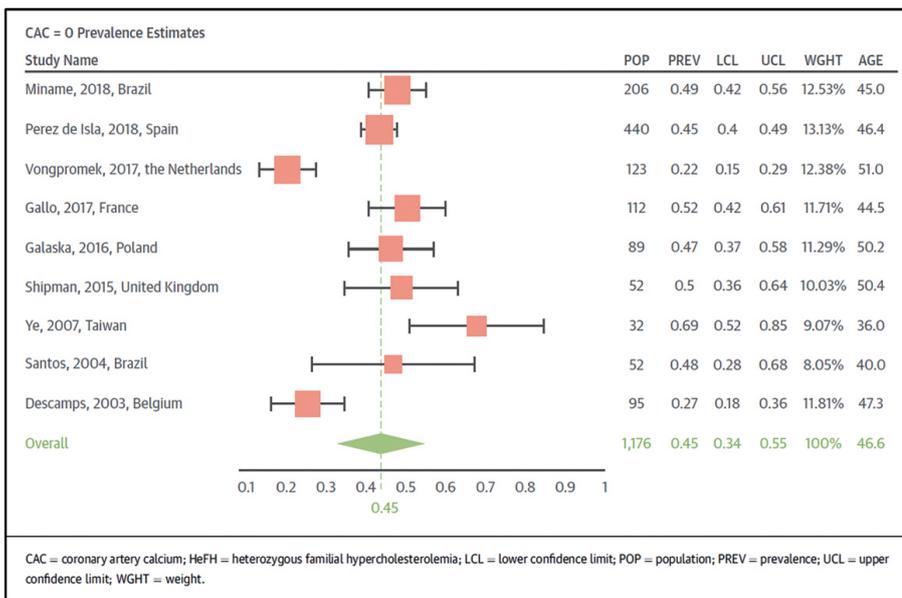
圖一、家族性高膽固醇血症遺傳模式。(modified from 家族性高膽固醇血症衛教手冊 (2017)，中華民國血脂及動脈硬化學會 <http://www.tas.org.tw/>)

Coronary Artery Calcium (CAC)

CAC Score	Presence of Coronary Artery Disease (CAD)
0	No evidence of CAD No plaque. Your risk of heart attack is low.
1 – 10	Minimal evidence of CAD Small amount of plaque. You have less than a 10 percent chance of having heart disease, and your risk of heart attack is low.
11 – 100	Mild evidence of CAD Some plaque. You have mild heart disease and a moderate chance of heart attack. Your doctor may recommend other treatment in addition to lifestyle changes.
101 – 400	Moderate evidence of CAD Moderate amount of plaque. You have heart disease and plaque may be blocking an artery. Your chance of having a heart attack is moderate to high. Your health professional may want more tests and may start treatment.
Over 400	Extensive evidence of CAD Large amount of plaque. You have more than a 90 percent chance that plaque is blocking one of your arteries. Your chance of heart attack is high. Your health professional will want more tests and will start treatment.

https://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=ct_calscoring
<https://www.umms.org/ummc/health-services/imaging/diagnostic/cardiac-calcium-scoring>

圖二、統計異合子家族性高膽固醇血症 (HeFH) 患者 CAC=0 總體合併盛行率之森林圖。(J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging. 2020; 13:1090-2.)



圖三、Line 推播 DM 之二。細菌快速鑑別服務。

(heterozygous mutation) 稱為異合子家族性高膽固醇血症 (heterozygous familial hypercholesterolemia, HeFH)；若成對的染色體控制膽固醇基因都發生變異，則稱為同合子家族性高膽固醇血症 (homozygous familial hypercholesterolemia, HoFH)。

目前臨床上使用電腦斷層 (computed tomography, CT) 來進行心臟冠狀動脈鈣化指數 (coronary artery calcium, CAC) 分析，CAC 指數與冠狀動脈內斑塊形成程度有關，藉由測量冠狀動脈的鈣化程度，可用以評估 ASCVD 的發生率。當 CAC 指數越高，表示血

管的鈣化程度越高，心血管疾病發生的機率也就越大。

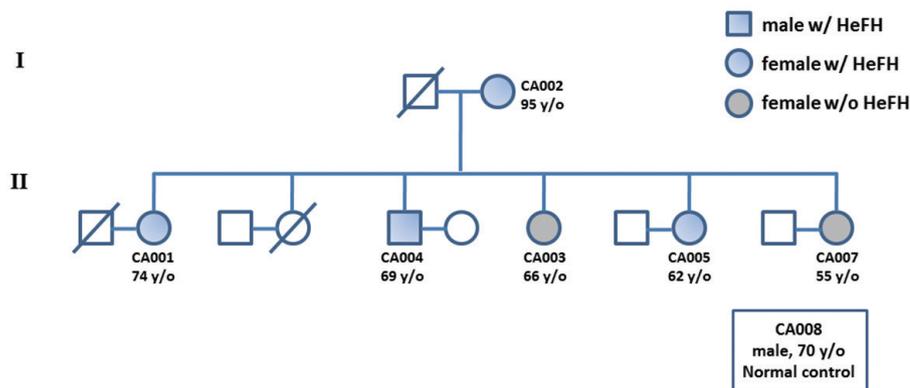
根據 2020 年一篇統計 2003 至 2018 年期間發表的研究報告指出 (共計 1,176 個病例)，有約五成比例的 HeFH 中年患者不具有 ASCVD 臨床表徵，且其 CAC 指數為 0 (圖二)，代表罹患 ASCVD 之風險程度評估結果為極低 (圖三)。生資中心本年度新收集由國內學者建立之 HeFH 人類淋巴球細胞株 (human B lymphoblastoid cell lines) 即具有此特性 (圖四)，可應用於轉譯醫學研究，探討這類型 HeFH 患者對於早發性 ASCVD 抗性之作用機制、藥物開發與個人化精準醫療 (precision medicine) 等之相關研究。此七株細胞株即將提供分讓及線上的目錄查詢，近期內請密切注意相關資訊的公開在食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心網頁 <https://www.brc.firdi.org.tw/>，或電洽 03-5223191 轉 591 或電子郵件 lwh@firdi.org.tw 許璣文研究員諮詢。

參考文獻

1. 家族性高膽固醇血症診斷及治療建議 (2017)。生物醫學，第十卷，第一期，12-20。
2. 家族性高膽固醇血症的藥物治療 (2016)。藥學雜誌，第 129 冊，第 32 卷，第 4 期，76-81。
3. Mszar R, Nasir K, Santos RD. *Circulation*. 2020; 142:1406-7.
4. Mszar R, Grandhi GR, Valero-Elizondo J, et al. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging*. 2020; 13:1090-2.
5. Varghese MJ. *Ann Pediatr Card*. 2014; 7:107-17.

(文：生資中心 許璣文研究員)

Heterozygous Familial Hypercholesterolemia (HeFH) Family Tree



	Total-cholesterol (正常值<200 mg/dL)		LDL-cholesterol (正常值<130 mg/dL)		LDLR Genotyping	Total Calcium Score
	用藥前	用藥後	用藥前	用藥後		
CA001	>400	219	N/A	132	LDLR:c664T>C heterozygous LDLR mutation	186.6
CA002	>400	218	N/A	144	LDLR:c664T>C heterozygous LDLR mutation	N/A
CA003	165	---	60	---	LDLR:c664T w/o LDLR mutation	0
CA004	>400	186	N/A	101	LDLR:c664T>C heterozygous LDLR mutation	0
CA005	>400	452	N/A	328	LDLR:c664T>C heterozygous LDLR mutation	4.9
CA007	236 (unknown drug history)		123 (unknown drug history)		LDLR:c664T w/o LDLR mutation	N/A
CA008	N/A	161	N/A	98	LDLR:c664T w/o LDLR mutation	167.2

圖四、新收人類異合子家族性高膽固醇血症 (HeFH) 細胞株家族圖譜說明。

激性，試驗方式參照 OECD TG 460 標準方法建立，其測試樣品須為水溶性化學物質，不適用於強酸、強鹼、具細胞固定特性之化合物、固體、高揮發性物質與高黏性之物質。體外眼睛嚴重刺激性試驗 - 螢光滲漏測試法為一個基於細胞毒性及細胞功能所建立的體外試驗方法，將 MDCK CB997 細胞 (腎小管上皮細胞) 種植於一個半透性的膜小室 (semi-permeable inserts) 中，來模擬體內眼角膜上皮的非增殖狀態，MDCK 細胞於過滿的狀態下，細胞與細胞之間可形成緊密連接 (Tight junctions) 和橋粒連接 (desmosomal junctions) 之細胞連結，其連結類似於在結膜和角膜上皮的連結結構，因此該細胞可用來作為體外檢驗試驗物質是否對眼角膜具有嚴重刺激性的細胞試驗模式，其模式如圖一所示，表二為眼睛刺激性試驗之替代性試驗，本試驗方法歸類於表中體外眼睛刺激性試驗的細胞培養法，藉由螢光有無滲漏的方式來判定單層細胞的通透性。

試驗流程為解凍活化培養 MDCK CB997 細胞，且需至少繼代 3 次以上，待細胞恢復正常之生長，方可進行試驗，但細胞解凍後繼代數不能超過 30，繼代數應為 3-30 代。細胞稀釋至 4×10^5 cells/ml，取 400 μ L 細胞懸浮液均勻分佈於 Inserts (小室) 中 (Day 0)。於 37 度 C 二氧化碳培養基培養 3 天後更換 24 孔培養平盤及 Inserts (小室) 之培養基，各 400 μ L 新鮮培養基 (Day 3) (圖一)，處理試驗物質，以 HBSS 配製成 1, 25, 100, 250, 750 (近飽和濃度) mg/mL，處理細胞 15 分鐘後，經由 2 次清洗，加入螢光染劑 (Fluorescein solution) 後

體外眼睛嚴重刺激性試驗 - 螢光滲漏測試法介紹

生資中心 / 副研究員
廖麗娟

國際間歐美日過去二十年積極發展動物替代方法研究，用其他可達到同樣實驗目的的方法來代替動物實驗，落實羅素和伯齊 (Russell and Burch) 於 1959 年發表的動物科學應用 3R 原則概念 -- 替代 (Replacement)、減量 (Reduction)、及精緻化 (Refinement)。本篇所介紹之體外眼睛刺激性試驗替代試驗為螢光滲漏測試法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物 (Fluorescein leakage

test method for identifying ocular corrosives and severe irritants) 為 OECD TG 405 急性眼睛刺激 / 腐蝕動物試驗替代方法之一，其他眼睛替代試驗如表一所示。

眼睛刺激性試驗替代試驗為螢光滲漏測試法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物 (Fluorescein leakage test (FL test) method for identifying ocular corrosives and severe irritants) 用於檢驗試驗物質是否對眼角膜具有嚴重刺

表一、根據「新化學物質與既有化學物質資料登錄工具說明」所提，進行化學品標準登錄時須提供毒理與生態毒理資訊，其詳細內容之測試評估終點與建議利用之 OECD 測試規範 (Testing Guidelines, TG) 如下：

毒理資訊項目	動物 (體內) 測試方法	替代方法	試驗分類替代方式
眼睛刺激性	OECD TG 405 急性眼睛刺激 / 腐蝕 1. 得以一種動物進行試驗，以白兔為佳。 2. 最初試驗 1 隻動物；在進行第二隻動物的確證試驗之前，觀察應該允許確定嚴重性和可逆性。 3. 確認試驗最多不超過 2 隻。	1. OECD TG 437 角膜混濁和通透性試驗 2. OECD TG 438 離體雞眼試驗 3. OECD TG 460 螢光素滲漏測試法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物 4. OECD TG 491 短時間暴露體外試驗：鑑別 i) 導致眼睛嚴重損傷的化學物質與 ii) 不需分類眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學物質 5. OECD TG 492 重建人類角膜上皮細胞 (RhCE) 試驗法：鑑別不需分類與 6. OECD Daft 細胞傳感微生理紀錄儀試驗 7. OECD GD 69 指導文件：定量結構活性關係模型之驗證	1. 離體試驗替代 2. 離體試驗替代 3. 體外試驗替代 4. 體外試驗替代 5. 體外試驗替代 6. 體外試驗替代 7. 電腦模擬替代

資料來源：產品上市前動物測試替代方法研究報告 (2018)

表二、體外評估刺激性的替代方法

替代性試驗種類	結果評估方式
In vitro eye irritation tests	
Red blood cell test	Haemolysis and haemoglobin denaturation
Haemoglobin denaturation	Spectrophotometric changes in haemoglobin
Chorioallantoic membrane	Haemorrhage, vasoconstriction, coagulation, trypan blue adsorption
Isolated cornea	Corneal opacity
Isolated eyes	Corneal swelling, corneal opacity, fluorescein retention
Cell culture	LDH, MTT, fluorescein leakage, neutral red release
Commercial kits	
Eytex	Cloudy
Reconstituted corneal epithelium	Cell death

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 97, 46–59 (2008)

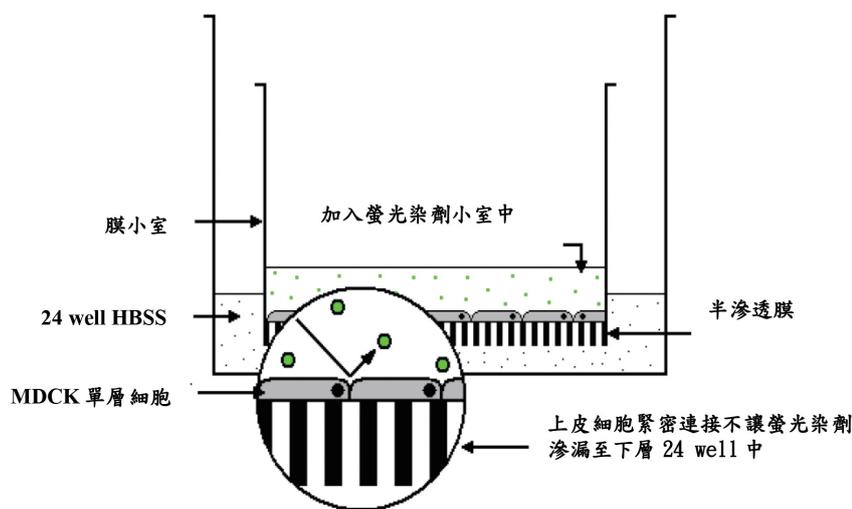
室溫作用 30 分鐘，於螢光免疫分析儀分析螢光數值 (激發波長 (excitation filter):485 nm, 發射波長 (emission filter):530 nm)。藉由螢光強度來判定單層細胞的通透性，於測試濃度可求得 % 螢光滲漏平均強度，其計算公式為 $\%FL = [(m-y) / z] \times 100\%$ ，x: 最大螢光滲漏平均強度 (無細胞組)，y:0% 螢光滲漏平均強度 (陰性對照組)，z:100% 螢光滲漏平均強

度， $z=x-y$ ，m: 試驗物質該濃度螢光滲漏平均強度。FL₂₀ 為造成 20% 螢光滲漏平均強度之化學物質濃度，FL₂₀ 計算公式為 $[(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$ ，A=20% 螢光滲漏強度 B = 螢光滲漏強度之數值 < 20%，C = 螢光滲漏強度之數值 > 20%，M_C = C 之濃度，M_B = B 之濃度，若測試之濃度範圍無法求得 FL₂₀ 之數值，應視試驗結果重新調整濃度區間

再重新進行試驗 (Day 4)。FL₂₀ 數值判讀如下：試驗物質 FL₂₀ 濃度 ≤ 100 mg/mL，表示對眼睛具有腐蝕性 / 嚴重之刺激物。

大部分化學物質及其製品的安全性評估測試是使用實驗動物進行體內試驗 (*in vivo*)，近年由於考慮實驗動物福祉及使用倫理，加上動物科學應用 3R 原則概念推行，國際間發展的非活體動物替代方法例如化學測試、細胞 / 組織

FL ₂₀ (mg/mL)	UN GHS C&L	EU CLP C&L	U.S. EPA C&L
≤ 100	Category 1	Category 1	Category I



圖一、FL 試驗細胞模式，MDCK CB997 細胞（腎小管上皮細胞）種植於一個半滲透性的膜小室 (semi-permeable inserts) 中，將膜小室放入 24 well 的孔中。加入螢光染劑 (Fluorescein solution) 後室溫作用 30 分鐘，於螢光免疫分析儀分析螢光數值（激發波長 (excitation filter):485 nm, 發射波長 (emission filter):530 nm）。藉由螢光強度來判定單層細胞的通透性。(OECD 460)

的體外試驗 (*in vitro*)、電腦模擬預測 (*in silico*) 等，有些經過驗證的替代方法也已經被某些國家政府管理機構接受，並推廣給業界（相關製造業與檢測公司）使用。生資中心建立之替代性試驗為分別依據 OECD 460 及 OECD GD442E 規範，建立眼睛嚴重刺激性和皮膚敏感性兩種試驗平台，未來將積極擴展建立其他替代性試驗，一同為動物福祉努力。

參考文獻

1. OECD/OCDE 460.
2. INVITTOX Protocol No. 71 (EC-ECVAM) (1999).
3. 產品上市前動物測試替代方法研究報告 (2018) 中華實驗動物學會。
4. <http://nehrc.nhri.org.tw/taat/alternatives.php> 非動物性替代方法資訊網。

歲，隨著年齡增加，患病機率就越高。而帕金森氏症的多數患者病因不明，極少數可能性歸為環境因子造成，如農藥、重金屬累積在腦部黑質區、頭部創傷等等，或基因突變，而基因編碼蛋白質 SNCA 和 LRRK2 是目前研究最深入的帕金森氏症相關基因。

其病理變化為中腦黑質緻密部區塊退化，神經元大量死亡，使腦部傳送肌肉運動訊息的多巴胺 (dopamine) 分泌不足。此疾病為漸進式的神經系統病變，所以臨床表現上患者的四肢會陸續出現顫抖、僵硬、動作遲緩、失去平衡等症狀，甚至伴隨著睡眠障礙、憂鬱症、記憶障礙等，如果腦中多巴胺的數目低於正常量的 50%，這些症狀就會開始出現^[1]，而晚期患者可能會癱瘓。

帕金森氏症因為退化的速度

iPSC 在帕金森氏症之治療

生資中心 / 副技師
柯惠文

前言

帕金森氏症為一種腦部中樞神經系統的慢性神經退化性疾病，更是僅次於阿茲海默症（俗稱失智症）的第二大老年神經退化性疾病，影響著全球 2% 的 60 歲以上老人，且男性比例大於女性。不同於阿茲海默症是從認知、理解功能開始退化，所以會先出現記憶、情緒、行為失常的症狀；帕金森氏症則是從動作、協調功能開始退化，因此手腳顫抖、僵硬、步伐緩慢是主要的表

現。而以往傳統的治療方法都只治標不治本，無法真正的根治此疾病。這幾年，日本的研究團隊藉由細胞療法將誘導型多功能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 分化成的多巴胺神經元 (dopaminergic neuron) 植入人腦中，成為治療因中腦多巴胺神經元逐漸退化的帕金森氏症希望來源。

帕金森氏症介紹

罹患帕金森氏症最大的危險因子是年齡，好發年齡介於 55-60

緩慢，所以疾病初期的症狀非常輕微，不容易發現，可以從生活中的小細節來著手觀察。其主要症狀發病歷程分成三期：早期、中期及後期。早期症狀為臉部表情不自然，常常眼神呆滯、缺乏眨眼動作，走路時某一側的手臂擺動變小，而且出現同一邊的手腳漸漸變得不靈活；偶而出現肩膀僵硬疼痛，類似五十肩的症狀，漸漸喪失嗅覺、發聲沒有力量、輕度而不自覺地單邊顫抖也常常隨之而來。有時憂鬱焦慮、失眠多夢的症狀也會同時悄悄地出現。病程發展至中期時，症狀開始變得明顯，分成動作障礙症狀與非動作障礙症狀，前者會有四大動作障礙，分別為：靜止型顫抖、動作僵硬、動作遲緩及平衡困難；而後者則為自律神經失調、睡眠障礙及出現單調嗓音^[2]。到了後期，除了已出現的症狀會持續惡化外，也會因為平衡感嚴重退化而導致跌倒次數越來越頻繁，加上手腳僵硬漸趨嚴重而需要拐杖或輪椅輔助，以維持一般日常生活。

過往帕金森氏症的三大治療方向為：1. 補充藥物 "L-DOPA"，2. 利用外科手術 - 腦部深層電刺激，3. 物理性方式，如：瑜珈、太極、舞蹈，以改善身體平衡，而以上這幾種方式皆只能症狀治療，治標不治本，完全無法根治。在近期的研究上則朝著動物模式、基因療法、神經保護療法以及最熱門的神經移植這幾個方向進行。

細胞移植過往問題

近年來，治療帕金森氏症除了傳統的三大治療方向外，一些研究人員開始考慮其他的創新治療方案。其中，細胞移植吸引了

不少科學家的關注。幾項研究發現，移植胚胎細胞中的多巴胺神經元，在猴子身上的實驗顯示動物不但能成功存活，也減少了行為異常，改善了帕金森氏症的症狀，但，胚胎組織的使用一直充滿著爭議。2012年，諾貝爾醫學獎得主山中伸彌教授就是因為將血液中分離到的細胞，經過誘導產生誘導型多功能幹細胞，再將其進一步分化為具有特定功能的細胞用於細胞療法，這樣一來，倫理問題就得到了完美的迴避，而這個里程碑式的事件也標誌著幹細胞療法時代的全面到來。因此，在避免倫理問題產生的同時，研究人員近年來皆朝向使用較無爭議的誘導型多功能幹細胞來進行研究。

動物試驗方法及結果

日本京都大學 CiRA（京都大學 iPS 細胞研究與應用中心）研究團隊在進行人體試驗前，也歷時了一段長達2年的動物試驗，之後在2017年於 Nature 期刊上發表了 "Human iPS cell-derived

dopaminergic neurons function in a primate parkinson's disease model"，文章中也已經證明移植多巴胺神經元前驅細胞能改善猴子帕金森氏症的症狀^[3]。

當時，此研究團隊對38隻彌猴進行每周2次靜脈注射神經毒素 MPTP，直到實驗前12周皆持續觀察到有震顫、運動遲緩等帕金森氏症狀況，再從中挑選11隻，將其分為3組，分別將從健康人和帕金森氏症患者皮膚細胞誘導的 iPSC 分化成的多巴胺神經元前驅細胞去移植到此11隻帕金森氏症彌猴中，最終去分析其帕金森氏症改善程度^[4]（圖1）。

在分析猴子的行為上，實驗過程中會藉由 Video 影像來分析猴子的自發性行為動作，接受細胞移植的猴子其行為恢復率顯著提高，且移植來自健康人體或帕金森氏症患者間的細胞是沒有差異的。此舉證明了此幹細胞療法降低了猴子的帕金森氏症積分，並改善了40%-55%的活動能力，也一併證明移植 iPSC 分化的多巴胺神經元前驅細胞有發揮類似

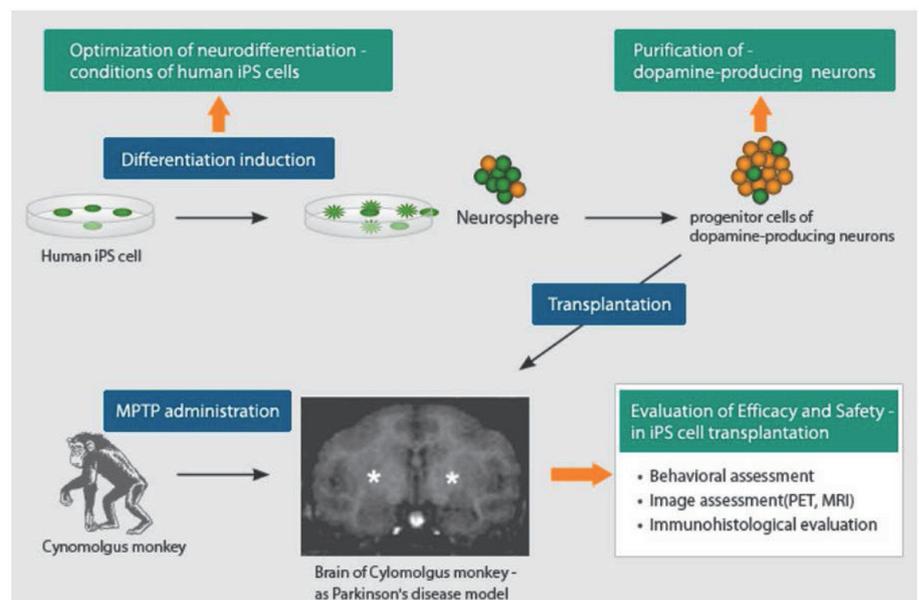


圖 1、從 iPSC 誘導成多巴胺神經元前驅細胞移植到靈長類動物模型^[4]

補充 L-DOPA 藥物的效果。另一方面，也藉由對猴子大腦做核磁共振 (MRI) 及腦組織染色來觀察移植細胞隨著移植時間拉長，其體積的變化，結果證明移植的多巴胺神經元前驅細胞在腦內的生長及存活情形隨著移植時間拉長，移植的細胞體積也逐漸增加，直至 6-9 個月才逐漸趨緩。酪胺酸氫化酶酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 為中腦多巴胺神經細胞相關因子，藉由測定 TH+ marker 及電生理分析來證明所分化的細胞確實為多巴胺神經元細胞。無論移植來自健康人體或帕金森氏症患者 iPSC 誘導分化的多巴胺神經元前驅細胞，用免疫螢光染色 (Immunofluorescence stain) 及流式細胞技術 (Flow cytometry) 做分析，發現其 marker 表現都沒有顯著的差異。

此動物實驗的結果證明：
(1) 移植的細胞可在猴子的大腦分化成多巴胺神經元，並存活了至少兩年，且與猴子的腦細胞形成了連結。(2) 猴子四肢僵硬和震顫的現象逐漸消失了，運動能力也得到了顯著的改善。(3) 除了細胞移植沒有引發嚴重的免疫反應外，也沒有觀察到移植細胞有發育成腫瘤的跡象，這是以往使用多能細胞治療上面臨的一個最大關鍵問題。就因為這個動物試驗的成功，確認了細胞移植的有效性和安全性，於是日本政府於 2018/7/29 批准了 CiRA 的第三例 iPSC 人體試驗。

臨床試驗過程與初步結果

日本京都大學 CiRA 歷經兩年動物試驗，確認了移植多巴胺神經元前驅細胞至獼猴大腦中的有效性及安全性後，於 2018/4/6 向京都大學人體試驗倫理委員會

(IRB) 申請，於 4/24 被批准，再於 6/4 藉由醫藥品醫療機器總合機構 (PMDA) 向厚生勞動省提交臨床試驗通知^[5]，而日本政府更於同年 7/29 批准了 CiRA 的第三例 iPSC 人體試驗，而這也是全球第一例 iPSC 被用於治療人類帕金森氏症，這也為帕金森氏症研究領域迎來了一個新的突破。京都大學收到日本政府批准 CiRA 第三例 iPSC 人體試驗的通知後，也立即於隔日 7/30 召開記者會，招募 7 名藥物治療效果不佳的帕金森氏症患者參加試驗，而該計畫於 8/1 日起正式實施，由 CiRA 神經外科醫師高橋淳 (Jun Takahashi) 教授與京大醫院合作進行。而這個人體試驗的即將進行也獲得了 Science 期刊的報導^[6]。此研究團隊於 2018/10 月進行第一例手術後，也在 11/14 於 nature news 發佈這起人體試驗手術進行的過程及初步觀察結果^[7]。

試驗策略為先從 CiRA 庫存

自健康人體取出的皮膚細胞去誘導成 iPSC，再分化成多巴胺神經前驅細胞，預計將移植共約 500 萬個細胞到帕金森氏症患者大腦中，預期移植的細胞能釋放多巴胺以平衡腦中多巴胺的濃度而達到治療效果。

手術過程先將一名帕金森氏症患者的頭骨鑽數個 12 公釐小孔，再透過腦部立體定位，將自皮膚細胞誘導成的 iPSC 分化成的 240 萬多巴胺神經前驅細胞植入左腦的前腦殼核中 12 個多巴胺活動中心部位 (圖 2)，希望於患者的腦組織中長出替代的多巴胺神經細胞，而試驗過程中，患者也必須服用免疫抑制藥物 tacrolimus 來將免疫排斥的風險降至最低。至 11/14 nature news 發佈前，受試驗的患者狀況良好，也沒有重大的不良反應，持續觀察六個月若沒有併發症發生，則將會在他的右腦中再植入另外 240 萬個多巴胺神經前驅細

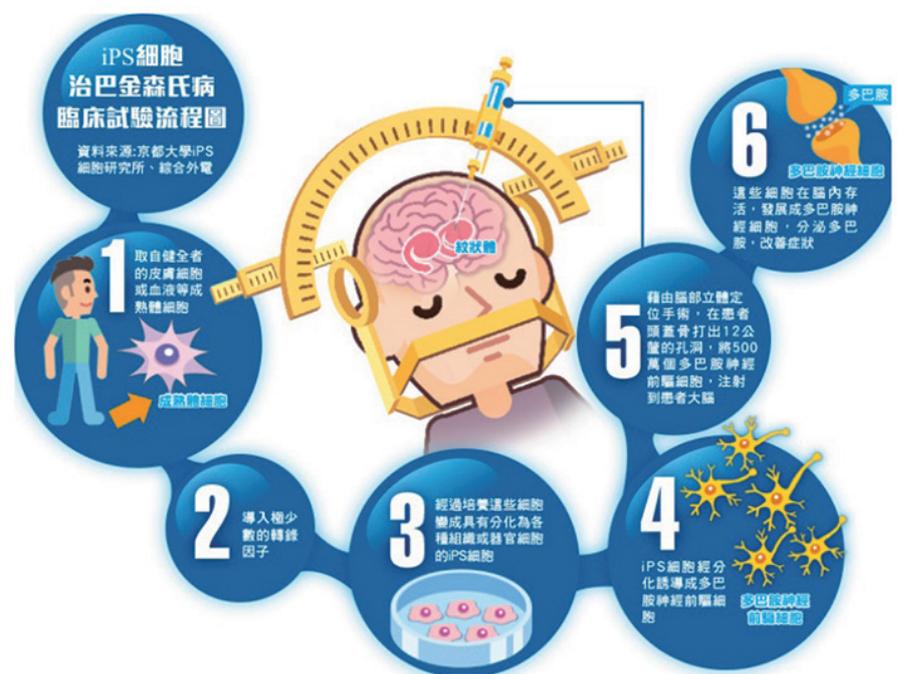


圖 2、臨床試驗流程

(資料來源 <https://tw.appledaily.com/headline/daily/20180812/38095875/>)

胞，並持續觀察 2 年，看移植細胞是否有癌化現象。之後，計劃在 2020 年底前再治療另 6 名帕金森氏症患者，如果試驗進展順利，在證據足夠的前提下，可望在 2023 年根據日本藥物審批制度將這一療法出售給患者，當然，這得取決於效果有多好。而這個手術的進行更是試驗帕金森氏症新療法一個里程碑的進步。

結語

日本的 iPSC 研究除了已應用在老年性黃斑部病變、缺血性心臟病外，用於脊髓損傷等疾病的臨床應用也在準備階段，而 iPSC 的第三例人體試驗，也是第一例 iPSC 被用於治療人類帕金森氏症的臨床試驗也有了初步的良好結果，期待今年 2020 年底第二階段的另 6 名帕金森氏症患者的療程啟動，若試驗順利並將此療法核可上市，相信此細胞療法將對帕金森氏症患者帶來莫大的福音。

參考文獻

1. <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E5%B8%95%E9%87%91>

%E6%A3%AE%E6%B0%8F%E7%97%87

2. <https://www.careonline.com.tw/2017/07/parkinson.html>

3. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, and et al. Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*. 2017; 548:592-6.

4. https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/takahashi_summary.html

5. <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/pressrelease/news/180730-170000.html>

6. Normile D. First-of-its-kind clinical trial will use reprogrammed adult stem cells to treat Parkinson's. *Science* (30 July, 2018) doi:10.1126/science.aau9466

7. Cyranoski D. Reprogrammed stem cells implanted into patient with Parkinson's disease. *Nature News* (14 Nov, 2018)

doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07407-9>

形式 (solid freeform)^[1]。於 1986 首次由 Charles Hull 提出^[2]，此 3D 列印技術可透過堆疊材料來減少浪費，同時又可達到令人滿意的高度精確度^[3]。其可透過獲取的圖像數據或自行建置於計算機輔助設計 (CAD) 軟件中的結構來創建 3D 模型，其允許使用的材料為金屬、陶瓷或聚合物等，無須傳統成型與機械加工，因此 3D 列印已成為計算機輔助設計與快速製造的多功能技術平台^[4]。目前市面上常見的 3D 列印主要分為三大類，包含熱熔層積 (Fused deposition modeling, FDM)、光固化 (Stereolithography, SLA) 和雷射粉末燒結 (Selective laser sintering, SLS)。每種技術在生產複合產品中都有其自身的優點和局限性。製造技術的選擇取決於起始材料、處理速度、分辨率的要求、最終產品的成本與性能的要求。熱熔層積是最常用來製造聚合物複合材料，諸如 PC、ABS 和 PLA 的熱塑性塑料，在熱熔層積中，細絲在噴嘴處熔化成半液態，然後逐層擠出到構建平台上，在此處將各層融合在一起，然後固化成最終零件^[1]；光固化是透過紫外線激光控制在所需的路徑內，使其射入樹脂容器中，並且光固化樹脂將聚合成 2D 圖案化層，而光固化常見使用的典型聚合物材料是丙烯酸和環氧樹脂^[5]；雷射粉末燒結則是將粉末散佈在構建平台上，然後透過可控路徑的激光束對粉末進行掃描以通過加熱將其燒結。在高功率激光下，相鄰的粉末通過分子擴散而融合在一起，而後再處理下一層，除去未融合的粉末以獲得最終產品^[6]。其特異性取決於粉末的粒徑，激光功率，掃描間距和掃描速度^[7]。儘管理論上

生物墨水結合 3D 列印器官的應用

生資中心 / 副研究員
蘇敏汶

器官或組織再生的需求日益增加，但捐贈器官的數量遠遠不夠。而組織工程已成為一種替代策略，旨在透過建構或體外培養具有活性的生物物質來修復組織或器官。雖然製造複雜的生物組織仍是一巨大的挑戰，但隨著具有生物相容性的材料蓬勃發展，

3D 列印可製作客製化零件也相對多樣性。近幾年 3D 列印的技術蓬勃發展，它可精確地控制細胞與生醫材料在組織中沈積並圖案化。

3D 列印又稱增材製造 (additive manufacturing)、快速成型 (rapid prototyping)、無固體

任何粉末形式的熱塑性聚合物都可以通過雷射粉末燒結技術進行處理，但燒結過程中複雜的固化行為和分子擴散過程限制了雷射粉末燒結中所用材料的選擇^[8]，故以聚己內酯和聚酰胺為廣泛使用在雷射粉末燒結的材料。

隨著科技技術的迅速發展，3D 列印除了客製化零件外，此技術也可在捐贈匱乏時，有效達到運用在人體組織或器官的移植。例如在 2012 年 2 月時，有位 6 週大的男嬰生下就有氣管支氣管軟化症的嚴重病症，可能會因為氣管的壓迫導致隨時可能停止呼吸，美國密西根大學的醫生利用 3D 列印技術以塑膠原料印製出一條呼吸管，透過手術移植後讓他終於可以正常呼吸，這也是醫學史上第一起 3D 列印器官成功移植的案例。在同年有位 29 歲男子因車禍導致臉部重創，手術後臉部嚴重變形，醫療團隊以電腦斷層掃描男子的頭骨推斷出原型，再以此列印出對稱的頭骨模型讓醫生可以在手術前先練習如何植入金屬支架，經過手術後，男子臉部成功植入 L 型鈦金屬支架，這成為全球首例在手術演練與手術進行都使用 3D 列印的病患。

3D 生物列印技術為透過不斷添加的過程並在電腦的軟體控制下層層堆疊製備出可讓活細胞增殖與附著的材料。生物 3D 列印基於三種主要策略為仿生 (biomimicry)、自主自組裝 (autonomous self-assembly) 和微型組織構造塊 (mini-tissue building blocks)^[9]。其一策略為仿生，在 3D 生物列印中的應用涉及製造組織或器官的細胞和細胞外基質^[10]，例如模仿血管網狀的分支或製造精確的生物材料模型，為了使該方法成功，必須在微觀尺度

上複製生物組織，且需要了解微環境，包括功能性和支持性細胞類型的特定排列、可溶或不可溶因子的梯度、細胞外基質的組成以及微環境中生物力學性質；其二策略為自主自組裝，使用胚胎器官發育作為複製生物組織的一種參考，發育中組織的早期細胞成分源於自身產生的細胞外基質、細胞信號傳導與自主組織化，從而產生所需的生物學微結構和功能^[11]，此方法依賴於細胞做為組織發生的主要驅動力並指導組織的組成、定位、功能和結構特性^[12]，故對胚胎組織與器官的發育機制要深入了解且需能夠操縱環境來驅動生物 3D 列印中的胚胎機制；其三策略為微型組織構造塊，此概念與上述兩種技術都相關，且分為兩大類，首先是利用生物學來設計和組織方法將自組裝細胞球組裝成大組織^[13]，再來第二是設計出具有準確率以及高分辨率的產物然而自組裝成具有功能性的組織。要列印出具有多個功能、結構和機械組件及特性的複雜 3D 生物結構，主要涉及的過程是成像和設計、材料和細胞的選擇以及組織構造的列印 (圖一)。

而所謂的 3D 生物列印技術則是利用生物墨水並結合電腦軟體設計以製備出仿造活組織的支架使細胞附著在材料上生長並增殖，其類型分為三大類^[9]，第一類型為噴墨列印 (inkjet bioprinter)，其原理為使用源自電流的熱使噴頭產生熱漲壓力來擠出生物墨水或運用壓電晶體產生電流使晶體變形；第二類型為微擠出法 (microextrusion bioprinter)，其原理為使用活塞、旋轉或氣體的螺絲來輸送生物墨水到印刷版上，此方式可操控黏稠度較高的生物墨

水，而改變溫度時可使其變成固態形狀；第三類型則是雷射輔助列印 (laser-assisted printer)，其原理為將生物墨水塗覆在印刷版上，透過雷射光照射後即可脫離印刷版 (圖二)。

目前 3D 生物列印的限制為因客製化而造成難以標準化、仿生材料的精確度、細胞的來源與活性、為組織輸送營養到血管與將細胞是否可以在材料上繼續存活或增殖等。其中 3D 生物列印仿生材料的精確度在 2019 年 4 月的文獻中有了大突破^[14]，心血管疾病是工業化國家的頭號死因，迄今為止心臟移植為末期心力衰竭患者的唯一治療方法。由於心臟捐贈數量有限，因此需要開發新的方法來再生梗塞的心臟細胞。而主要常見的就是利用心臟組織工程，其通過整合心臟細胞與生物材料來提供新的方法，例如將心臟貼片移植到心臟的缺陷處或開發利用 3D 列印來列印出人工心臟，但目前 3D 列印的人工心臟並沒有血管或血管細胞在其中，所以新的文獻則是先從網膜中分離出體細胞來重新編程成具有多功能性的幹細胞 (pluripotent stem cells)，而具有多功能性的幹細胞再重新分化成心臟主體的心肌細胞與血管的內皮細胞，將其置於水凝膠中培養以生產出所需的生物墨水原料。再來對患者心臟進行電腦斷層掃描，主要先辨別患者心室內主要血管的 3D 結構與方向，由於電腦斷層掃描不能夠呈現小血管的圖像，故後續透過數學模型計算心臟中的血氧濃度，將較小的血管合理的分配至基本的設計中，確認後就使用繪圖程式重現在血管外的心肌尺寸與幾何形狀 (圖三)。

最後使用 3D 生物列印出約兩公分長的人工心臟，其不僅有心臟細胞也有血管與其他支持結構，雖然這顆人工心臟可收縮，但是尚未將它與外部血管先連(圖四)。而在 2019 年 5 月對於血管運輸營養也有新的突破^[15]，此文獻為利用 3D 生物列印出可呼吸的肺臟，這項新技術是透過照射藍光讓水凝膠層層固化，且為了不影響下層的水凝膠凝固狀態，添加了食用染料作為生物相容性強的光吸收劑以確保凝膠精細凝固，此方式可提高血管設計的自由度並且可短時間內可形塑出複雜的通道網絡構造。研究團隊將紅血球細胞流動於 3D 生物列印的血管中來評估血管間運輸氣體的效率。結果發現當紅血球流經氣囊周圍的血管時是可吸收氧氣，這與肺泡的氣體交換相似(圖五)，故此 3D 生物列印出肺臟的模型可仿造人類呼吸的頻率與壓力。而後為了先行評估優化的生物工程肝組織是否能夠在慢性肝損傷的嚙齒動物模型中存活，故在列印的肝臟組織中植入原代肝細胞，並將其放入了帶有慢性肝損傷的小鼠體內。研究表明肝細胞也能在體內生存，表明打造的血管能有效為這些細胞輸送養分。

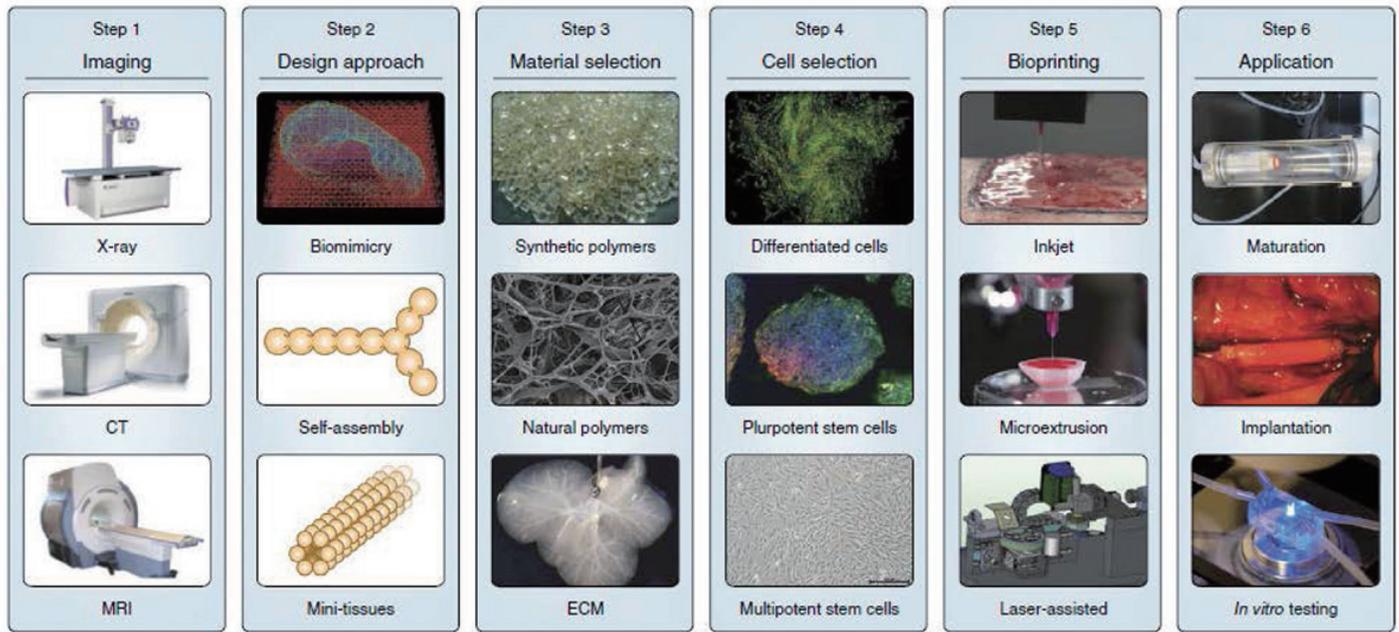
3D 列印人工心臟運用患者本身的材料能有效地避免異體器官移植中的排斥問題。這也是人類第一次成功使用 3D 列印印出一顆帶有細胞、血管、腔室的完整心臟。另外 3D 列印肺臟突破過去列印器官無法因應活體複雜管線運作的困難，建構出環繞於器官更精細的血管網路，模擬人體中血液、空氣、淋巴液和其他組織液的輸送。雖然 3D 生物列印器官與真正替換人體臟器還有

一段距離，但以目前越來越先進的技術是具有相當大的潛力。

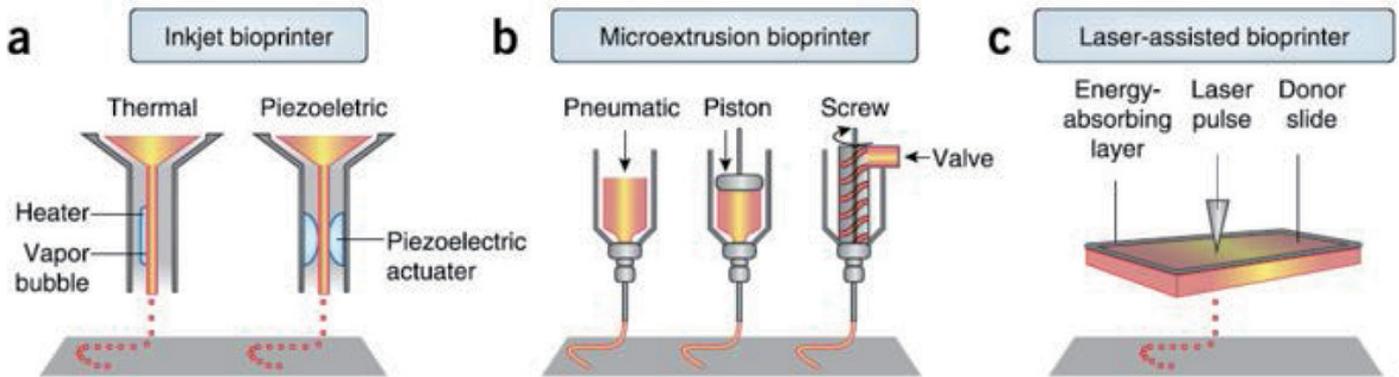
參考文獻

1. Wang X, Jiang M, Zhou Z, and et al. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Composites Part B: Engineering*. 2017; 110:442-58.
2. Hull CW, and Calif A (1986, Mar.) Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. U.S. Patent No. 4,575,330.
3. Levy GN, Schindel R, Kruth JP. Rapid manufacturing and rapid tooling with layer manufacturing (LM) technologies, state of the art and future perspectives. *CIRP Annals*. 2003; 52:589-609.
4. Ligon SC, Liska R, Stampfl J, and et al. *Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing*. *Chemical reviews*. 2017; 117:10212-90.
5. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010; 31:6121-30.
6. Gu DD, Meiners W, Wissenbach K, Poprawe R. Laser additive manufacturing of metallic components: materials, processes and mechanisms. *International materials reviews*, 2012; 57:133-64.
7. Gibson I, and Shi D. Material properties and fabrication parameters in selective laser sintering process. *Rapid prototyping journal*. 1997; 3:129-36.
8. Goodridge RD, Shofner ML, Hague RJM, and et al. Processing of a Polyamide-12/carbon nanofibre composite by laser sintering. *Polymer Testing*. 2011; 30:94-100.
9. Murphy SV, and Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*. 2014; 32:773-85.
10. Ingber DE, Mow VC, Butler D, and et al. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue engineering*. 2006; 12:3265-83.
11. Marga F, Neagu A, Kosztin I, Forgacs G. Developmental biology and tissue engineering. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2007; 81:320-8.
12. Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*. 2012; 338: 921-6.
13. Kelm JM, Lorber V, Snedeker JG, and et al. A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks. *Journal of biotechnology*. 2010; 148:46-55.
14. Noor N, Shapira A, Edri R, and et al. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science*. 2019; 6:1900344.
15. Grigoryan B, Paulsen SJ, Corbett DC, and et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science*. 2019; 364:458-64.

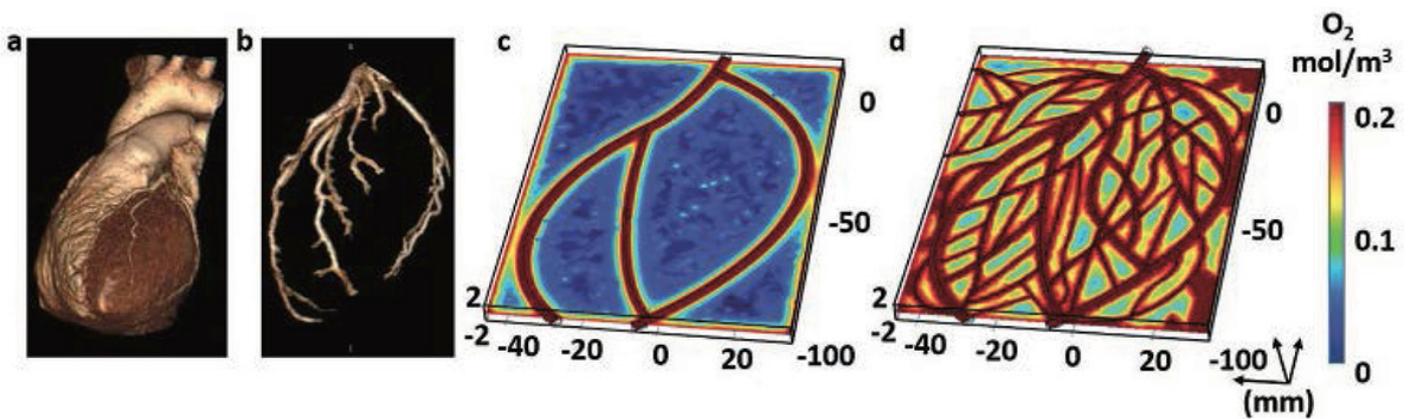
附錄 (圖一、圖二、圖三)



圖一、3D 生物列印機的典型過程 [9]

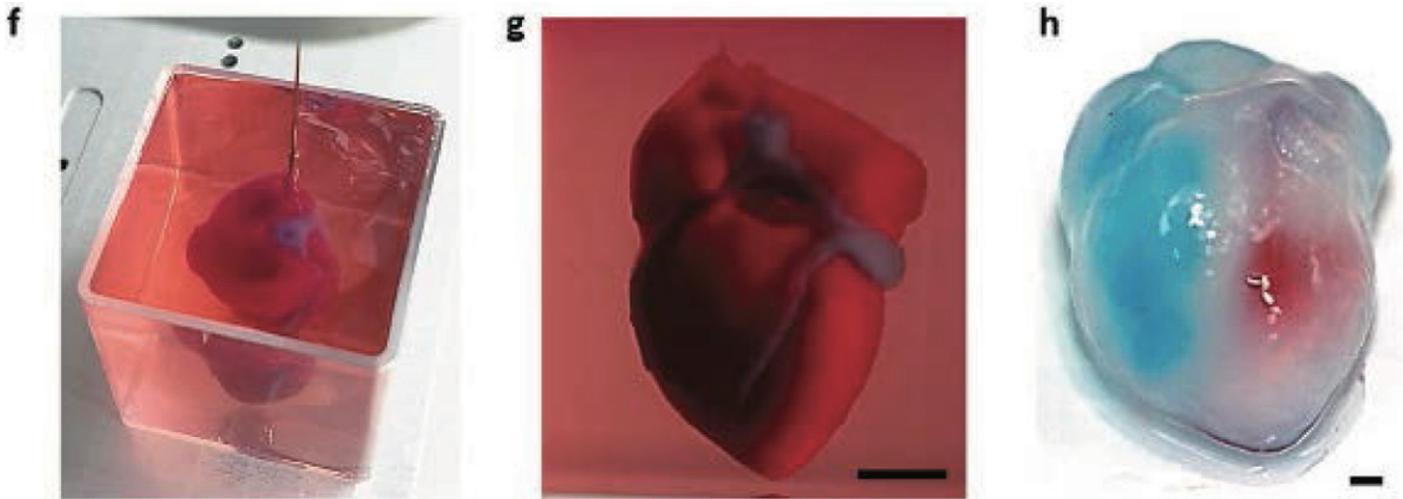


圖二、不同類型的 3D 生物列印 (a) 噴墨列印；(b) 微擠出法；(c) 雷射輔助列印 [9]

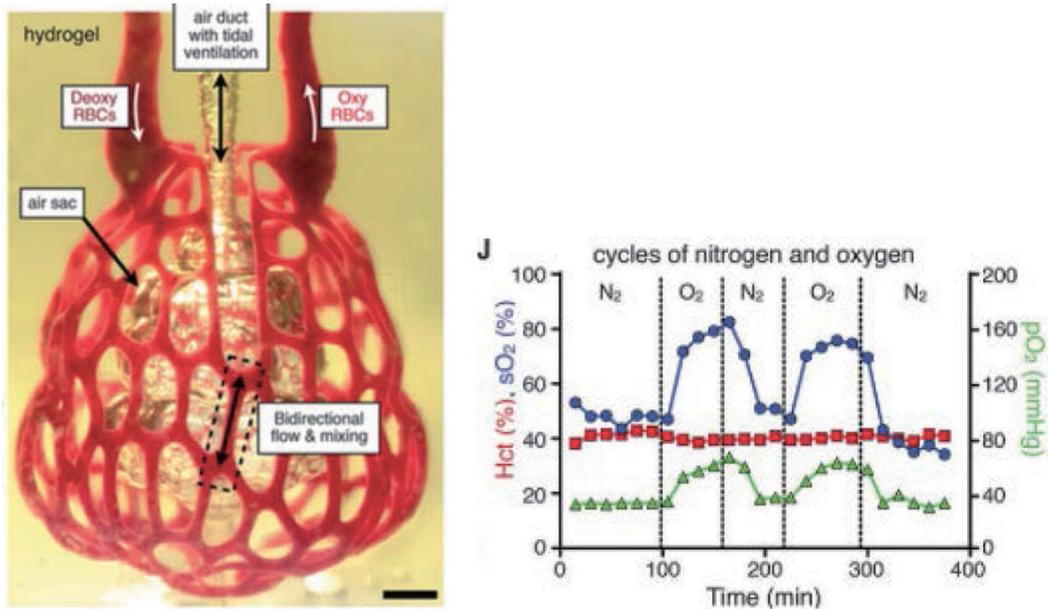


圖三、(a) (b) 電腦斷層掃描患者心臟；(c) (d) 建構數位模型 [14]

附錄 (圖四、圖五)



圖四、(f) (g) 3D 生物列印出的心臟，(h) 在左心室和右心室分別注入紅色和藍色染料，以顯示空腔和它們之間的隔膜^[14]



圖五、3D 列印人工肺臟模型；(J) 肺泡中氣體交換^[15]

生物資源保存及研究簡訊 第124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、許瓊文、黃學聰、梁克明

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

