經濟部 Ministry of Economic Affairs
科技專案成果

ISSN1021-7932 BCRC News 中心新聞 1

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

第 140 期

生物資源保存及研究簡訊 第37卷第4期

中華民國 113 年 12 月發行
補助單位：經濟部產業技術司 / 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

◎ 通過 ISO 17025 多能幹細胞特性分析認證與啟動服務

◎ 參訪荷蘭 Westerdijk 真菌生物多樣性研究所 (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, WFBI)

研發成果 4

◎ 誘導性多能幹細胞分化的造血幹細胞增殖培養基之開發

◎ 多能幹細胞之胚球體形成技術介紹

◎ 實驗室黴漿菌汙染及防控措施

通過 ISO 17025 多能幹細胞特性分析認證與啟動服務

生資中心 / 研究員
張育甄

隨著生物技術的進步，細胞治療與再生醫療成為醫學研究和臨床應用的重要領域，而多能幹細胞（pluripotent stem cells, PSCs）在其中扮演著極為關鍵的角色。多能幹細胞具有分化為多種細胞類型的潛力，因此被視為未來再生醫療的核心。為了實現這一願景，多能幹細胞的特性分析與品質控制至關重要。近期，生物資源保存及研究中心（以下簡稱「生資中心」）於經濟部科技專案支持下，成功取得 ISO 17025 多能幹細胞兩項特性分析認證：抗原表現分析與體外分化能力分析。此二項目為國內首件多能幹細胞特性分析認證申請，顯示生資中心於細胞特性分析的專業能力，同時反應產業對於推進多能幹細胞品質管控上具有相當之需求。

多能幹細胞是一類具有自

圖、生資中心新增二項 TAF/ISO 17025 測試項目認證。

我更新和分化潛能的細胞，多能性指的是這類細胞可以分化為三個胚層：外胚層、中胚層和內胚層的所有細胞類型，包括神經細胞、心肌細胞、肝臟細胞等。由於多能幹細胞可以分化為任何組織或器官的細胞，它們被認為是治療許多因細胞老化或衰退而造成的難治癒型疾病（如神經退化性疾病、心血管疾病、糖尿病等）的理想細胞來源，因此多能幹細胞於實現再生醫療方面具有無限潛力。這類細胞的主要來源有胚胎幹細胞（embryonic stem cells, ESCs）和誘導性多能幹細胞（induced pluripotent stem cells, iPSCs）。然而，也由於其多能性的細胞本質，使其應用必須具備高度的安全性和一致性，以確保臨床應用的安全和有效。因此必須要求對細胞進行嚴格的品質控制，包括其安全性檢測與多能性的評估驗證等。

ISO 17025 是國際上針對檢測與校正實驗室的品質管理體系認證標準，其認證包含對實驗室管理體系、技術能力和品質保證的全面評估，確保實驗室具有準確和可重複的檢測能力，以確保檢測結果的準確性與可靠性。生資中心於今年 (2024) 經由申請、通過稽查並取得 ISO 17025 多能幹細胞的抗原表現分析和體外分化能力分析認證，抗原表現分析藉由分析 Oct-4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60 標記確認幹細胞表面標誌的特性，而體外分化能力分析則檢驗多能幹細胞在特定條件下分化為三胚層細胞的能力，確保其分化潛能的有效性。ISO17025 認證的通過顯示，生資中心不僅為多能幹細胞的抗原表現和體外分化能力提供了標準化的品質評估方法，同時也證實生資中心在細胞分析和品質保證方面的技術能量。此二項分析已可接受委託，將提供產官學研符合標準的第三方檢測服務，確保產品符合高標準的安全性和一致性，為未來臨床應用奠定基礎。

參訪荷蘭 Westerdijk 真菌生物多樣性研究所 (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, WFBI)

生資中心 / 研究員
林宛柔

荷蘭 Westerdijk 真菌生物多樣性研究所 (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, WFBI) 隸屬於荷蘭皇家藝術和科學院 (Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, KNAW)，位於烏特勒支。該研究所原名為 CBS-KNAW (Centraalbureau voor Schimmelcultures - Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences)，是全球知名的微生物資源中心，擁有豐富多樣且高品質的真菌、酵母菌和細菌菌種收藏及相關數據庫。

本所謝松源主任、林宛柔博士、國衛院羅秀容副座、東海大學博士候選人劉人丞與海洋大學碩士生謝昕如一行，在 IMC12 大會 (International Mycological Congress) 後，前往 WFBI 訪問所長 Prof. Wieland Meyer、醫用真菌研究組組長 Prof. Ferry Hagen、生物資源收藏庫 (BIOBANKS CBS and NCCB) 負責人 Dr. Gerard J. Verkleij。訪問會議針對雙邊國際合作計畫、菌株交換以及京都議定書生效後的菌種寄存問題等議題，雙方交換了意見與經驗，並商討解決方案。Wieland 所長對台灣與 WFBI 在「高通量晶片檢測技術」領域的合作表達了高度興趣，並表示願意與台灣在該領域展開進一步合作。未來，雙方將持續保持聯繫，並跟進相關合作事務。

Prof. Wieland Meyer 現任 WFBI 所長，同時擔任澳洲科廷大學健康科學學院教授、雪梨大學醫學院分子醫學真菌學教授以及奧斯瓦爾多克魯茲基金會（FIOCRUZ）的客座教授。他也

是國際真菌學協會（IMA）主席，領導全球真菌學界。Meyer 教授擁有超過 35 年的臨床醫學研究經驗，其研究方向包括真菌菌株分型、系統發育學與流行病學、病原體分子鑑定技術等。他領導的研究團隊建立了感染性黴菌物種鑑別之全球參考資料庫，在國際真菌學界與臨床醫學界具有重要影響力。

Prof. Ferry Hagen 是 WFBI 醫用真菌研究組組長，同時擔任阿姆斯特丹大學生物多樣性和生態系統動力學研究所「真菌功能多樣性」特別講座教授。他的研究專長在於醫學分子微生物學，並致力於真菌病原體的分子流行病學和診斷技術的開發。他目前參與多項歐盟計畫，皆與臨床黴菌相關，開發多重 qPCR 技術、以及生物感測技術。

Dr. Gerard J. Verkleij 是 Biobanks CBS 與 NCCB 的負責人，領導的團隊負責菌株的系統化管理與國際流通，並建立與菌株相關的科學數據庫，這些資源對全球科研社群開放共享。

在參訪 WFBI 中，Prof. Wieland Meyer 介紹所內保存的微生物菌株逾 130,000 株，為全球最大的真菌資源收藏庫之一，供全球學術和產業界使用。WFBI 的研究團隊由研究員、博士後研究者、技術人員及博士班學生、實習生和訪問學者組成。主要研究領域包括真菌多樣性、分類學、系統學與基因組學等。該所致力於探索微生物資源在醫學、農業和工業中的應用，並定期開設相關課程。本所謝松源主任簡介了 BCRC 的研究能力，並介紹了跨單位國際合作研究案。

圖一、台灣參訪團隊與荷蘭 WFBI 所長合照。由右至左為 Prof. Wieland Meyer、謝昕如、羅秀容、劉人丞、林宛柔、謝松源。

圖二、討論合作研究案與 MOU 相關議題。

會議中，Prof. Wieland Meyer 對合作議案表示支持，但對於菌株交換法規有所保留。Dr. Gerard J. Verkleij 提及由於京都議定書生效後，生物材料交換須依照 MAT/PIC 或 ABS 相關文件進行，台灣在此方面仍面臨挑戰。為了突破這些障礙，我們分享了瑞典研究人員與台灣菌株交換的案例，並討論了在類似情況下的可能解決方案。Prof. Ferry Hagen 則

對晶片設計與檢驗技術提出了多項建議，強調了檢驗流程中的控制組需求、引子的長度與專一性等實驗技術設計的細節。最終，Wieland 教授對合作議案給予了積極回應，並表示願意從 MOU 的簽訂開始展開合作。雙方維持聯繫，推進後續合作事宜。參訪期間，Dr. Gerard J. Verkleij 與同事帶領我們參觀了 WFBI 的菌種收藏與保存技術。WFBI 採用類似飲料吸管之物料進行菌種的冷凍保存，這種方法經濟實惠且節省儲存空間，但可能僅適用於酵母菌或可產孢真菌的保存。最後，Prof. Ferry Hagen 介紹了 WFBI 的研究團隊與實驗室，圓滿結束了此次 WFBI 的訪問。

誘導性多能幹細胞分化的造血幹細胞增殖培養基之開發

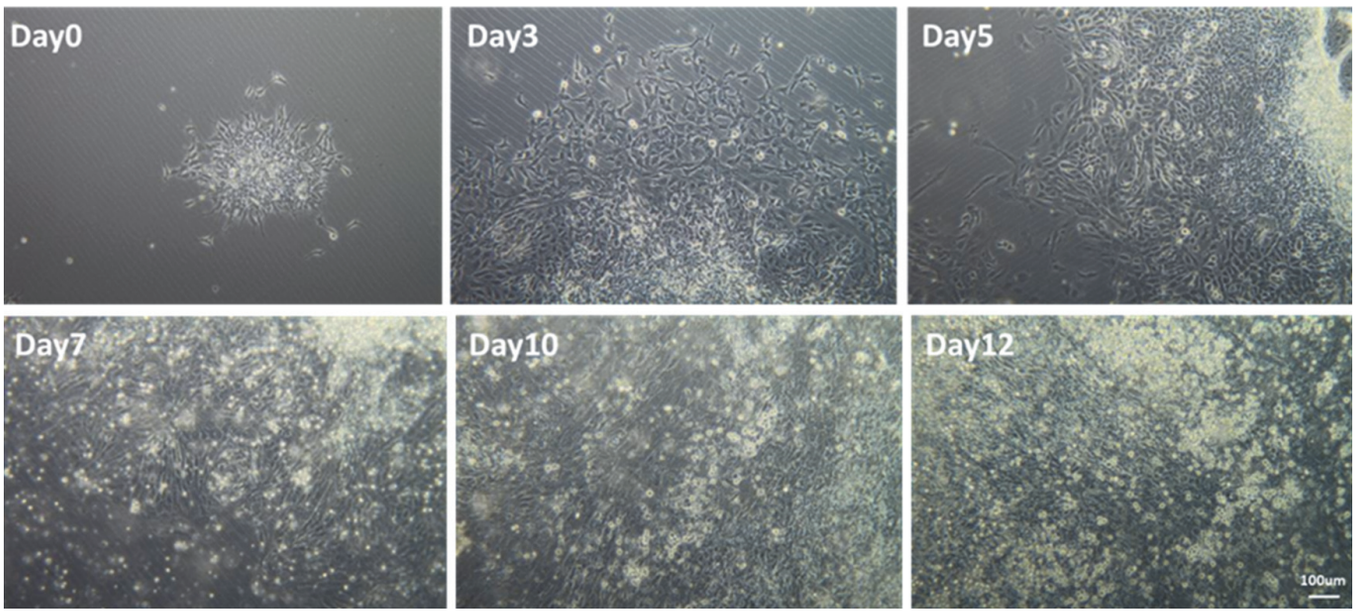
生資中心 / 副研究員
蘇敏汶

幹細胞具有自我更新與分化能力，在特定條件下可多向分化成細胞、組織甚至是器官。幹細胞可依照細胞潛能分類 : (1) 全能性幹細胞 (totipotent stem cell) 可發育成一個完整的個體，如受精卵；(2) 多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) 可分化成各式細胞但無法透過單顆細胞形成個體，如胚胎幹細胞 (embryonic stem cells，ESCs) ；(3) 多潛能幹細胞 (multipotent stem cell) 分化能力較受限，如造血幹細胞 (hematopoietic stem cells，HSCs) 。其中胚胎幹細胞雖具有強大的分化潛能但礙於道德倫理，因此於 2006 年時，日本京都大學山中伸彌教授的團隊以四個轉錄因子 : OCT3/4、SOX2、Klf2 與 c-Myc 送入小鼠皮膚的體細胞內，使其重新編程形成類似胚胎幹細胞的誘導多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells，iPSCs) ，其亦可形成外胚層、中胚層和內胚層等三個胚層組織及分化成各種體細胞，於 2007 年山中伸彌團隊使用人類的體細胞 (如血液細胞、皮膚細胞) 製備出人類的 iPSCs，此操作技術相當簡便，且可避免涉及倫理問題，因此 iPSCs 的發明使山中伸彌教授獲得 2012 年諾貝爾生理醫學獎，開創再生醫學的新領域。而多潛能幹細胞中的 HSCs 於第 2 至 3 周的胚胎時由卵黃囊產生，而第 2 至 3 個月則由肝臟與脾臟產出，第 5 個月胚胎後主要生成的位置為骨髓。其造血作用是在胚胎時間源自中胚層的紅骨隨中增殖及分化的過程，其現象大多在骨髓內，從有限的造血幹細胞分化出體內所有成熟的血球甚至是其他免疫細胞，如幫助凝血的血小板、可運輸氧氣的紅血球、可抵抗感染的白血球或是產生抗體的淋巴球等。CD34 抗原分子是一種單鏈跨膜醣蛋白，而該細胞於以往研究發現可行成血液型細胞群落，而骨髓中分離之 CD34+ 細胞也快速恢復患者的造血功能，因此表面抗原 CD34 的表現一直都是判斷造血前驅細胞特性重要的依據，可透過篩選具有 CD34+ 表現之細胞而獲得相當純度的造血幹細胞。

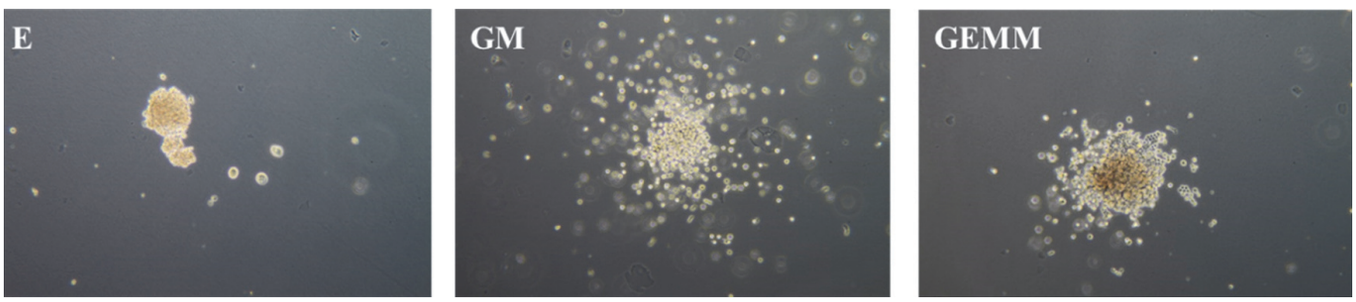
造血功能的發現最早可追溯於 1909 年，俄國科學家 A. Maximow 提出所有造血功能源自於同一種前驅細胞的理論，但多年都未能得到證實。直到 1945 年二次世界大戰末期，因原子彈後放射線導致產生許多造血功能遭到破壞的病患，隨後 1950 年 Lorenz 等人在動物實驗中，藉由骨髓移植治療放射線導致造血功能低下的老鼠，才真正開啟了造血幹細胞研究大門。爾後 10 年間，Thomas 的團隊完成了人類第一次骨髓移殖成功。經移植後，二週內病患體內短暫恢復造血功能，Thomas 也因此開創性的療法獲得諾貝爾獎的肯定。1963 年，Till 與 McCulloch 於動

物實驗中發現，單一顆骨髓細胞具有大量複製與展現出幹細胞多潛能性的特性，可分化各種型態之血液細胞與細胞群落 (Colony-Forming Unit，CFU) 的產生，更加確定了造血幹細胞的存在。此後 1960 年代免疫學與細胞學領域的發展，奠定了異體移植間血型與 HLA 配對的需求對於移植成功率的重要性，也讓後續不同個體間骨髓移植的成功率大大提升。直到 1980 年代，發現白血球生長激素 (G-CSF，Granulocyte colony stimulating factor) 可將骨髓內的造血幹細胞引導進入血液的特性，因此利用 G-CSF 搭配周邊血可大量收集造血幹細胞，促成另一種取代骨髓移植的方式。1986 年科學家 Broxymyer 發現孕婦產後臍帶血中含有豐富的造血幹細胞，並於 1988 年法國成功的進行第一例人類的臍帶血移植案例。現今認知已將骨髓移植、週邊血移植以及臍帶血移植合併稱為「造血幹細胞移植」的技術。近些年再生醫療蓬勃盛行，造血幹細胞來源大致可以來自三種方式：骨髓、周邊血液、臍帶血。骨髓內部所含的幹細胞比例為三者內最高，為醫學上最早使用拿來治療血液疾病的方式，時至今日使用骨髓移植仍是治療血液疾病的主要療法之一。其中臍帶血因人類白血球抗原 (HLA) 相容性限制較寬鬆，亦較不易有免疫排斥問題，且細胞尚未受到藥物或病菌污染且分化能力強，但單次收集數量有限且不足以供給成年患者使用。另外常見的為骨髓，但汲集骨髓時需要承擔麻醉的危險，而另一來源個為周邊血，其須連續數日注射白血球生長激素 (Filgrastim，G-CSF)，此激素可大量促使骨髓釋放造血幹細胞於血液中以便透過血液分離程序收集，骨髓與周邊血移植需花費長時間尋找配對者且有可能因宿主排斥作用導致失敗。因此為了解決以上問題，目前食品所奠基於與人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟 (iPSC) 合作之優勢，以既有完整培養與保存國內 iPSCs 細胞株之技術，再開發後續衍生造血分化與分析系統。iPSCs 由健康人或病患身上取得的少量檢體產製而成，以解決來源不穩定的問題。此分化過程主要是透過 STEMdiff™ Hematopoietic Kit (StemCell)，首先將 iPSCs 培養 1 天後，更換成 kit 中的 medium A 培養 2 天，再更換 medium B 培養至第 10 至 12 天即可收集 iPSCs 分化的 HSCs (iPSCs-HSCs)，食品所成功將三株人類 iPSCs 分化成 HSCs (CD34+ 表現量 >90%)，且於分化第 12 天時可獲得最大量且高純度的 iPSCs-HSCs。而後為了維持 HSCs 幹細胞的狀態，所以研究冷凍劑對細胞保存有其重要性。食品所開發一款冷凍劑 (簡稱 FIRDI BANKER)，並與另外三種冷凍劑 (HSC BANKER (ZENOAQ)、HSC BANKER 中添加白蛋白與 mFreSR (StemCell)) 進行比較，結果顯示市售 GMP 等級且適用於 HSCs 的 HSC BANKER 其細胞存活率為 77%，但回收率僅 46%。若另外添加白蛋白的 HSC BANKER 則存活率提高至 86%；回收率提高至 60%。而另一款市售適用於多能性幹細胞的 mFreSR (存活率為 87%；回收率為 66%) 與添加白蛋白的 HSC BANKER 結果相似。FIRDI BANKER 之存活率為 92%；回收率為 88%，其結果皆較市售冷凍劑結果佳，因此表示食品所開發之冷凍劑適用冷凍保存 iPSCs 衍生的 HSCs。

而目前鑑定造血幹細胞是否具有分化能力，大部分都是採用 MethoCult Methycellulos-based 培養基進行鑑定。MethoCult 培養基為半固體培養基，可用於檢測骨髓、周邊血、和臍帶血的造血幹細胞特性。具有多分化能之造血幹細胞可形成各種細胞群落形成單位。一般具有多分化能之造血前驅細胞，常有以下幾類細胞群落形成：紅血球系 (BFU-E 或 CFU-E)、顆粒球系 (CFU-GM) 和多能綜合系 (CFU-GEMM) 等細胞群落的生長。藉由上述細胞群落的種類與比例，可以判定此系統增殖之造血前驅細胞適合培養成



圖一、iPSCs 分化 HSCs 過程。



圖二、iPSCs-HSCs 之 methocult 分析。

何種支系之血液細胞。Methocult 試驗分析為將 CD34+ 細胞，為表明臍帶血與 iPSCs 兩種不同來源之 HSCs 皆具有造血相關的分化能力，回溶於 Methocult 培養基中，並以不同濃度種植於培養皿上，待生長 7 至 14 天後，細胞群落出現且形態可判定時即可觀察。根據結果顯示臍帶血來源的 HSCs 之 BFU-E/CFU-E 約 9 個群落 (於所有分化類別之佔比為 26.5%)；CFU-GM 約 14 個群落 (於所有分化類別之佔比為 41.2%)；CFU-GEMM 約 11 個群落 (於所有分化類別之佔比為 32.3%)。而 iPSCs-HSCs 之 BFU-E/CFU-E 約 8 個群落 (於所有分化類別之佔比為 17.8%)；CFU-GM 較臍帶血來源多約 19 個群落 (於所有分化類別之佔比為 77%)；CFU-GEMM 較臍帶血來源少約 8 個群落 (於所有分化類別之佔比為 5.2%)。從數據上觀察 iPSCs-HSCs 未來可能適合用於淋巴系 (Lympoid lineage) 細胞，如自然殺手細胞 (NK cells)、T 細胞與 B 細胞等免疫型細胞之分化與應用。

因應臍帶血供應逐年降低，且骨髓或周邊血有其他風險問題與細胞數量不確定性，因此將造血幹細胞擴增有限為當前的瓶頸。目前最普遍的方式是體外透過小分子調節細胞機制以刺激 HSCs 發育生長，使用此方式於臨床增殖臍帶血來源的 HSCs 具有有效性與安全性，而最常使用的小分子為幹細胞因子 (Stem cell factor，SCF) 、血小板生成素 (Thrombopoietin，TPO)、FMS 樣酪氨酸激酶 3 配體 (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand，Flt3) 與白細胞介素 6 (Interleukin-6，IL-6) 等，因這些生長因子對於長期培養之發展較受限，因此有研究發現以下方式來優化，使

Hoxb4、Dppa5a 基因大量表現與活化 Notch 與 Wnt 信號以促進 HSCs 生長。善用細胞外基質微環境以 3D 水凝膠培養 HSCs，此材料有益於抑制分化。近年研究發現添加化合物可有效改善 HSCs 擴增，如 SR-1 (抑制 AhR 的嘌呤衍生物，與 UM171 具有協同作用)、TEPA (銅螯合劑)、UM171 (抑制賴氨酸特異性組蛋白去甲基化酶 1 與組蛋白去乙醯化酶可抑制 HSCs 走向分化)、菸鹼醯胺 (抑制 NAD- 依賴性去乙醯化酶 Sirtuin-1 以增加增殖) 等。牛血清白蛋白或胎牛血清與生長因子一起添加於培養基，可發揮作為載體蛋白的重要作用，2019 年有研究指出在聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol) 中添加生長因子以替代血清白蛋白，可長期穩定小鼠造血幹細胞生長。近期台灣因應醫療新技術而開放其法規，衛生福利部於 2018 年 9 月發布並實行「特管辦法」，開放六項細胞治療技術，其中包括自體 CD34+ 周邊血幹細胞，此細胞之特性為包含具有可促進血管新生的內皮前驅細胞與未分化的血液細胞 (部分可繼續細胞分裂維持再生能力，另部分還可分化成其他血液或免疫細胞)。而國際間已經有部分商品化的臨床級 CD34+ 造血幹細胞增殖培養基應用於臨床血液相關疾病治療，如 HSC-Brew (Miltenyi Biotec) 與 StemSpan™ (StemCell Technologies)，其價格昂貴且增殖效能參差不齊。而國內尚未有適合造血幹細胞培養基之產品，因此開發此技術具有其潛力。食品所過去取得培養臍帶血來源造血幹細胞之專利配方 (US 8762074)，以此作為基礎進行配方上調整以適合 iPSCs 分化的 HSCs 生長 (此培養基簡稱 *f1*HSC)。為了未來可符合臨床等級，因此將其中的成分從研究等級更換成具有 cGMP 符合性或取得 ISO15189 的供應商之生長因子 (此培養基簡稱 *f2*HSC)。

為了確認 *f1*HSC 增殖培養基之分化能力，新鮮分化 iPSCs-HSCs 培養 7 天後使用 Methocult 培養基檢測，結果顯示無 BFU-E/CFU-E 與 CFU-GEMM 之群落，可取得約 22 顆 CFU-GM 群落，而臍帶血來源的 HSCs 培養 7 天後之 BFU-E/CFU-E 約 20 個群落 (於所有分化類別之佔比為 58.8%)；CFU-GM 約 10 個群落 (於所有分化類別之佔比為 29.4%)；CFU-GEMM 約 4 個群落 (於所有分化類別之佔比為 11.8%)。臍帶血來源的 HSCs 與未增殖之 BFU-E/CFU-E 之佔比從 26.5% 提高至 58.8%，表示增殖後的臍帶血來源之 HSCs 較易往紅血球生成。而 iPSCs 分化的 HSCs 只表現 CFU-GM，因此較適合往免疫細胞類型的應用。

而後將 *f1*HSC 增殖培養基中的基礎培養基從研究等級更換成 cGMP 符合性，但其中的成分仍使用研究等級。解凍 iPSCs-HSCs 凍管培養 7 天後，增殖倍數結果顯示 cGMP 符合性 (9.2 倍) 顯著高於研究級 (7.5 倍) 之基礎培養基，CD34+ 表現量約 58 至 63%。以新鮮分化 iPSCs-HSCs 進行培養 7 天，CD34+ 細胞數之 cGMP 符合性 (12 倍) 亦較研究級 (9.5 倍) 具有顯著差異，CD34+ 表現量約 36 至 42%。而將基礎培養基與其中成分全更換成 cGMP 符合性或取得 ISO15189 之 *f2*HSC 增殖培養基培養新鮮分化的 iPSCs-HSCs 7 天後，其生長倍數約 6.3 倍；CD34+ 表現量約 81.5%。以市售增殖培養基培養新鮮分化 iPSCs-HSCs 7 天後，其增殖能力 (約 0.9 至 2.8 倍) 與 CD34+ 表現量 (約 34%) 較差。因此 f2HSC 增殖培養基與市售培養基相比具有較佳之顯著差異。故本所開發的無外源且無血清的 *f2*HSC 增殖培養基能有效使誘導性多能幹細胞衍生的造血幹細胞增殖與維持其特性，將來亦有可能成為免疫治療的起始細胞，具有再生醫療臨床應用之前景。目前食品所於誘導多能性細胞與造血幹細胞相關的研究上，已有相當的成果與能量，期許未來能在細胞治療法規持續開放下繼續努力，協助帶動台灣幹細胞研究、醫療與產業更高的發展。

多能幹細胞之胚球體形成技術介紹

生資中心 / 副研究員
徐詩涵

一、前言

多能幹細胞包括胚胎幹細胞 (ESC) 及誘導型多能幹細胞 (iPSC)，因其能分化為三胚層 (內胚層、中胚層和外胚層) 細胞的潛力，成為再生醫療領域中最受關注的研究焦點。這種獨特的分化潛力使其在修復受損組織、治療退化性疾病以及創新藥物開發中展現出廣泛的應用價值。ESC 和 iPSC 的分化過程對細胞替代療法至關重要，需要透過可重複的方式精準調控其分化進程。目前，細胞分化主要採用兩種策略：直接分化和胚球體 (Embryoid Body，EB) 的形成。直接分化是一種透過添加特定分化因子來誘導細胞朝特定組織或器官方向分化的策略，具有精準且高效的特點。然而，EB 的形成則更接近於模擬早期胚胎發育過程。多能幹細胞在懸浮培養條件下形成的 EB 是一種三維細胞聚集體，內含之細胞具有分化為三胚層細胞的潛力，這種方法也提供了一個更為自然的分化環境。在 EB 形成過程中，細胞間的相互作用、細胞數量的精確控制以及 EB 大小的調節是決定分化效率和質量的關鍵因素。因此，嚴格監控 EB 的形成質量，不僅對分化策略的優化至關重要，也為細胞產品的標準化和一致性提供了保障。同時，EB 形成的三胚層分化技術已成為評估多能幹細胞品質的重要指標，對於細胞產品的品質管控具有重要意義。隨著技術的不斷進步，我們有望更有效地利用多能幹細胞推動再生醫學的發展，為臨床治療開創更多可能性，邁向更高的里程碑。

二、胚球體形成之方法

(一) 懸滴法 Hanging drop method

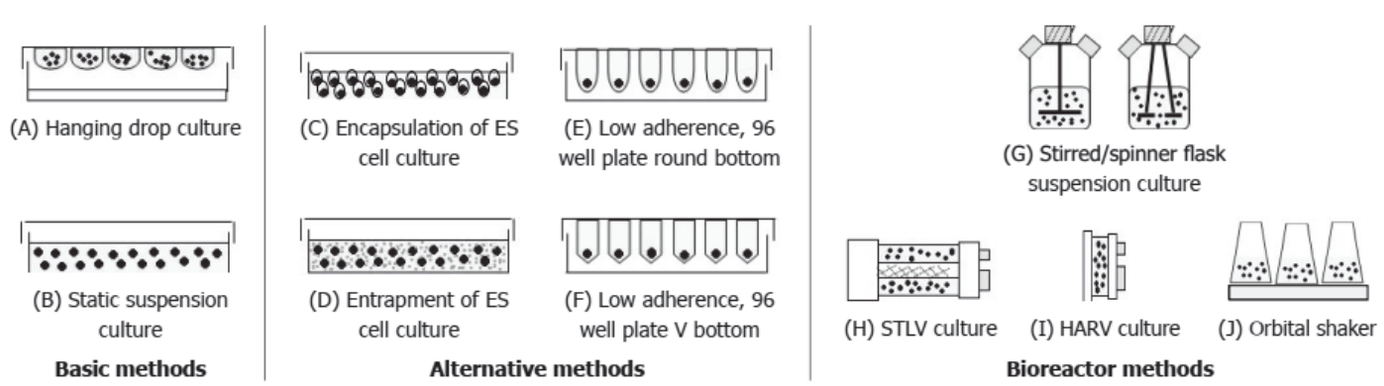
懸滴法 (見圖一、A) 透過將相同數量的多能幹細胞滴在培養盤的蓋上形成液滴 (droplet)，這種方法透過重力誘導細胞的聚集，在每個液滴內提供了相似的環境以形成個別單獨且大小均勻的 EB。

(二) 靜態懸浮培養 Static suspension culture

靜態懸浮培養法是一種用於製備大量 EB 的方法 (圖一、B)，其步驟包括將多能幹細胞的懸浮液接種至低附著性的細菌培養盤、超低附著性培養盤或塗有細胞黏附抑制劑的培養盤上。在這個過程中，細胞會自發性地聚集形成球狀體。

(三) 封裝 / 包埋 Encapsulation/ entrapment

將多能幹細胞透過酵素處理成單顆細胞懸浮液或將細胞切割



圖一、由多能幹細胞形成 EB 的方法中使用的培養容器之示意圖表示。

成小片狀的細胞集群封裝 / 包埋在水膠 (hydrogels) 中 (分別如圖一、C 和 D)，透過在半固態懸浮培養基中產生個別分離的 EB。

(四) 多孔培養盤和微加工 Multi-well and microfabrication

圓底的 96 孔盤，表面塗有或不塗有試劑 (例如 2- 甲基丙烯氧乙基磷酸膽鹼 (MPC)、糖胺聚糖 (CS) 和 2- 羥乙基甲基丙烯酸聚合物 (poly 2-HEMA))，用來防止細胞附著在塑料表面。強制聚集系統包括圓底 (U 形，圖一、E) 和三角底 (V 形，圖一、F) 的 96 孔盤，可使細胞在離心的過程中比懸滴法更快速地聚集，這個程序提高了 EB 生產的再現性。微加工的是部分使用光刻法製作的微孔盤 (microwells) 相較於其他方法，能夠以等效或更高的密度形成胚球體，得以擴展製備 EB 同時控制 EB 大小，實現 EB 形成的可重複性。

(五) 生物反應器 Bioreactor

與靜態懸浮培養方法相比，生物反應器具有顯著的優勢，包括：規模擴大、效率、空間與參數監控。

1. **攪拌瓶** Spinner flasks (**圖一、**G)

攪拌瓶具簡單的設計、可擴展的配置、以微載體 (microcarrier) 或支架 (scaffold) 形式靈活培養細胞，以及易於連續監測嚴格調控培養環境。

2. **旋轉容器培養系統** Rotating Wall Vessel Culture System (RCCS)

於傳統攪拌器培養的細胞雖然可降低 EB 聚集但暴露於流體力學的剪切應力，導致細胞易損傷。另一種控制 EB 聚集的方法是使用 RCCS 生物反應器，包含慢速旋轉的橫向容器 slow turning lateral vessel (STLV) (圖 一、H) 和高方面旋轉容器 high aspect rotating vessel (HARV) (圖一、I)，為一種較溫和的生物反應器。

3. **旋轉軌道培養** Rotary orbital culture

生物反應器可以提供更均勻的分化環境，用以支撐產量增加的 EB 和分化細胞，維持培養系統之平衡。軌道旋轉搖床 (圖一、J) 已用於生產 EB，系統提供的恆定圓周運動有利於提高 EB 形成效率。

三、結論

多能幹細胞的分化和應用對再生醫療至關重要。傳統懸滴法操作繁瑣，不適合大量生產。科學家提出多種替代方法，如封裝、多孔培養盤及微加工技術，但這些方法仍有程序複雜和結果變異性高的挑戰。生物反應器培養系統顯示出顯著優勢，可實現穩定的細胞擴增和分化，減少變異性，更適合工業化和臨床應用。細胞品質管控是再生醫療發展的關鍵，多能幹細胞的分化能力評估是檢測品質的重要指標。

四、本所技術能量

食品所於 2024 年建立並通過 ISO17025 認證的「人類多能幹細胞分化能力分析」技術服務平台，正是為了解決產業界對多能幹細胞品質管控的嚴格需求，更為再生醫療應用的推廣提供了強而有力的技術支援。這一平台的建立，將研究與產業需求緊密結合，進一步促進多能幹細胞技術在臨床和商業領域的應用。

五、參考文獻

Sharma VS, Khalife R, Tostoes R, Leung L, Kinsella R, Ruban L, Veraitch FS. 2017. Early retinal differentiation of human pluripotent stem cells in microwell suspension cultures. Biotechnol Lett. 39:339-350.

Mahmood A, Napoli C, Aldahmash A. 2011. In vitro differentiation and maturation of human embryonic stem cell into multipotent cells. Stem Cells Int. 2011: 735420.

實驗室黴漿菌汙染及防控措施

生資中心 / 副技師
田桂娥

一、前言

黴漿菌的汙染一直是細胞培養過程中必須面對的問題，通常在實驗室中被視為常見的細胞培養汙染源之一。其能夠輕易侵入實驗系統，引起實驗結果的失真。估計研究中使用的細胞培養物中約有 15%~35% 是受到黴漿菌的感染，且在不同實驗室中預估有 10% 到 85% 的細胞可能受到其污染。

二、黴漿菌汙染率和來源

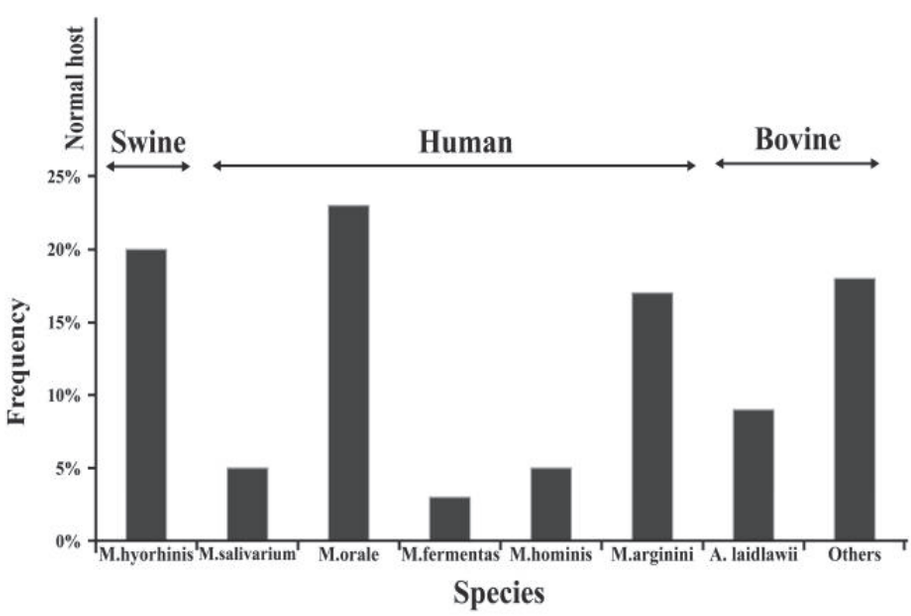
在各種黴漿菌中，*M. orale*、*M. arginini*、*M. hyorinis*、*M. fermentans*、*A. laidlawii*、*M. hominis*，為較常見的汙染菌種 (圖一)，其汙染源可能來自於實驗室內共用的培養基、PBS、pipettman、操作人員等，如 *M. fermentans*、*M. hominis* 便存在於人的口腔、呼吸道中，過往甚至是培養液中添加的血清製劑 (如胎牛血清，FBS)，都可能一開始就含有這些黴漿菌 (FBS 中以 *M. arginini*、*A. laidlawii* 較為常見)，豬來源的 Trypsin 也常有 *M. hyorinis* 的汙染 (Nikfarjam & Farzaneh, 2012)。如今，來自聲譽良好供應商的血清和培養基很少是黴漿菌污染的來源。

三、實驗室中黴漿菌汙染來源

McGarrity 的研究顯示，黴漿菌在無菌操作台上能迅速且輕易擴散。他將一個細胞感染上黴漿菌後並在無菌操作台中對感染的細胞以胰蛋白酶處理繼代培養，黴漿菌可在培養瓶外、血球計數器和微量吸管表面存活，且四至六天後仍能在操作台表面檢測到活菌。未污染的細胞與受污染的細胞在相同無菌台操作六週後，未污染的細胞也呈現陽性，顯示黴漿菌易於擴散並污染其它培養物。

實驗室人員被視為黴漿菌污染的主要來源。表一顯示了細胞培養污染的潛在來源。表二顯示了在細胞培養中發現的主要黴漿菌物種，以及早期研究在不同年份各類型黴漿菌污染百分比的研究結果。

日常服裝和骯髒的實驗衣是塵埃和氣溶膠的主要來源。在日常細胞培養處理過程中不穿乾淨實驗衣和手套是導致粒子傳播的主要原因。此外，說話和打噴嚏也會產生大量的氣溶膠。強烈建議避免不戴手套工作，因為頻繁洗手可能導致乾燥和剝落的皮膚，這是粒子的主要來源之一。



圖一、細胞培養中常見的 mycoplasma 種類及發生頻率 (Nikfarjam & Farzaneh, 2012)。

表一、細胞培養污染的潛在來源
Potential sources of cell culture contamination

Human	Foot	100-1000 organisms/cm^2
	Scalp	106 organisms/cm^2
	Forehead	105 organisms/cm^2
	Sneeze	104-105 organisms
	Saliva	107 organisms/ml
Sterile clothing	After 6 hours	1-6 organisms/cm^2
Air	Outdoor	100-500 organisms/m^3
	Indoor	500-2000 organisms/m^3

表二、細胞培養黴漿菌污染主要種類和其來源
Major mycoplasma species found in cell cultures and their likely sources

Species	Source of origin	1958-1972	1966-1982	1973-1979	1988	2002
Mycoplasma *hyorhinis*	Swine	15.9%	30.1%	2.0%	26%	10-40%
Mycoplasma *arginine*	Bovine	21.4%	24.8%	2.3%	21%	20-30%
Acholeplasma *laidlawii*	Bovine	8.5%	9.7%	20.0%	5%	5-20%
Mycoplasma *hominis*	Swine	6.1%	2.4%	1.8%	---	---
Mycoplasma *salivarium*	Human	---	<1%	16.2%	---	20-40%
Mycoplasma *orale*	Human	38.8%	34.4%	41.3%	34%	10-20%
Mycoplasma *fermentans*	Human	0.36%	4.1%	1.3%	13%	
Unidentified species			1.2%	15.1%		

四、預防黴漿菌汙染的方法

1. 改進無菌技術與練習

由熟練的操作員對實驗室新工作人員進行精確監督，遵循良好的無菌技術，有助於降低黴漿菌污染的風險。

2. 測試培養物是否污染

由於黴漿菌的主要來源之一是外部帶來的細胞，因此建議細胞來源是從可靠的細胞庫。

3. 謹慎使用抗生素

不含抗生素的細胞培養物中的微生物污染可透過細胞培養基中的濁度或顏色變化來觀察檢測。

4. 丟棄或處理黴漿菌污染的細胞

對於真正有價值且稀有的

細胞被黴漿菌污染的情況，建議對其進行處理以消除黴漿菌感染。否則，丟棄黴漿菌污染的細胞。

5. 隔離任何來源的新細胞

其他實驗室帶來的新細胞需在細胞用於任何目的之前，有必要對其進行隔離並檢查黴漿菌污染。

6. 減少氣溶膠的產生

在無菌操作台或培養箱中操作細胞期間的氣溶膠以及人員產生的氣溶膠。

7. 黴漿菌的檢驗

確認黴漿菌污染的唯一方法是透過例行檢測。

五、結論

由於黴漿菌體積小且不可見，黴漿菌可以在細胞培中廣泛傳播。防止細胞黴漿菌污染的最佳和最有效的方法是遵循嚴格的無菌技術規則並控制氣溶膠的來源。黴漿菌污染檢測需要進行靈敏度和特異性的測試。建議至少進行兩種測試方式來確認細胞是否受黴漿菌污染。消除黴漿菌的最佳方法是丟棄受污染的細胞。因此只有當細胞有價值且無法再次提供時，才建議用抗生素處理黴漿菌污染的細胞。

六、本所技術能量

近年來，隨著細胞治療的應用興起，細胞產品應用於人體治療時，對於細胞產品之安全性控管需相當嚴謹。為了確保細胞製品及其生產過程不受黴漿菌的汙染，進行檢驗則是非常必要之品管過程。因此衛生福利部食品藥物管理署頒布“人類細胞治療製劑查驗登記審查基準”中也指出細胞產品的特性分析中必需做黴漿菌的檢測。總而言之，黴漿菌的污染檢測及防治是細胞治療重要課題之一，因此針對客戶對於細胞產品品質安全性檢測的需求，生資中心細胞單元已於 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，提供高品質的黴漿菌試驗之檢測服務。檢測方法參考美國藥典 USP <63> Mycoplasma Tests、歐洲藥典 EP 2.6.7 Mycoplasmas 及中華藥典 黴漿菌檢測建立之方法。提供檢測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，檢測黴漿菌汙染的準確度極高 , 並且本試驗經 ISO 17025 認證。

參考文獻

Nikfarjam L, Farzaneh P. 2012. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell J. 13:203-12.

https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/TW/en/mycoplasma-contamination-in-cell-culture

生物資源保存及研究簡訊 第140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：吳琰奇、許璨文、黃喬盈、吳明德

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

ISSN 1021-7932
9 771021 793004