



財團法人 食品工業發展研究所

第 64 期

# 生物資源保存及研究簡訊

第18卷第4期

中華民國94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

- ◎ 2005年台灣首辦『人類胚幹細胞培養訓練課程』於食品工業發展研究所舉行

### 研發專欄 2

- ◎ 生資中心之細胞資源介紹
- ◎ EB病毒轉型人類B淋巴球細胞株之建立與應用
- ◎ 冷凍管封膜機開發---CRYOSEALER
- ◎ 初代細胞之供應

### 知識專欄 7

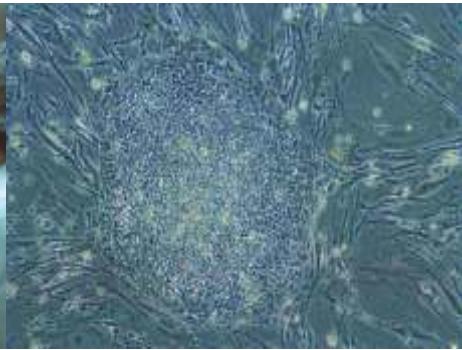
- ◎ 自然殺手細胞在癌症免疫療法上的應用

### 科技報導 11

- ◎ 骨髓及血液可分化成卵嗎？

### 專利微生物 12

- ◎ 審定公告之專利寄存生物材料



▲ 2005年『人類胚幹細胞培養訓練課程』於7月20日至8月16日共舉行三個梯次，課程總計三十餘人參加。左圖：訓練班實習操作課程實驗室一隅。右圖：培養於飼養層細胞上之人類胚幹細胞。

(圖：生資中心許瓊文提供)

## 2005年台灣首辦『人類胚幹細胞培養訓練課程』 於食品工業發展研究所舉行

幹細胞的研究與發展，儼然已成為二十一世紀的一大顯學。目前國內在人類幹細胞的相關研究上，仍處於較為起步的階段。為了提升台灣在人類胚胎幹細胞之研究發展領域的基礎，食品工業發展研究所與工業技術研究院合作，首次於今年七月份至八月份之間，舉辦了三梯次的『人類胚幹細胞培養訓練課程』，地點分別在食品所生資中心及工研院生醫中心舉行。

本次訓練課程的內容，主要著重在觀念的建立與實驗操作方面的實用性，包括：胚幹細胞的解凍、培養、繼代與冷凍，飼養層細胞的分離與建立，胚球體的形成技術，以及如何判定胚幹細胞是否仍具有多重分化能力等特性之實驗技術的學習。參加的學員來自全台各個對於人類胚幹細胞相關研究有興趣的學界、產業界以及臨床等研究單位，包括了教授、醫師、研究員、醫檢師與研究生等共計三十餘人參加。為了提供學員最佳的學習品質，本訓練課程採小班制教學，將每梯次之人數控制在十二人以下，配合每班二位講師，及六位助教的詳細示範和督導，務使每位學員都能有實際操作與學習互動的機會。

此次課程不僅將胚幹細胞正確的培養技術和觀念，與國內各個有志於此的研究人員共同分享，更建立起彼此間合作溝通的一個橋樑管道。課後應眾多學員的要求，未來亦預計提供進一步的進階課程。而此次首辦的『人類胚幹細胞培養訓練課程』，相信必能為台灣將來在幹細胞方面的相關研究與產業發展上，提供一個重要的平台。

(文：生資中心許瓊文)



## 生資中心之細胞資源介紹

生資中心／資深研究員  
黃效民

常有第一次碰面的朋友問我，為什麼食品工業發展研究所(以下簡稱食品所)會從事動物細胞培養和保存工作？甚至於許多國外友人第一次拿到我的名片後，都會訝異的以懷疑的方式問我：動物細胞和食品工業有何關聯？我總是長話短說的回答：因為動物細胞的使用已普及到幾乎所有生命科學領域了。

食品所在民國71年七月成立菌種保存及研究中心後就積極規劃朝向專業、完整的生物資源中心運作，在人才培訓和軟硬體設施上均投入相當多的資源。在收集和提供生物資源之種類上，也由早期的細菌、酵母菌、真菌等，依序擴充至重組DNA物質(包括質體和宿主)、噬菌體、動物細胞和人類細胞、genomic DNA等等。

食品所的動物和人類細胞之保存和研究工作，外界簡稱為細胞庫(Cell Bank)，我們從民國78年即有實際規劃，79年被選派職赴美修讀動物細胞相關培養與品管之博士論文，83年初回國後適逢我國專利法修訂通過開放微生物專利，動植物細胞亦可申請專利之保護。食品所遂成為經濟部中央標準局(智慧財產局之前身)唯一指定之專利微生物寄存機構，也開啟了我們積極發展動物細胞和人類細胞的收集保存和研究工作。以下簡短的將動物細胞庫之發

展和工作重點，劃分為三個時期(圖1)：

**第一期(民國 83-86年)建立期：**此階段之工作，主要在建立細胞庫之初期硬體工作，並完成相關細胞培養之標準作業程序，人員招募和訓練，對於每一項作業細節和技術之建立，例如細胞培養和冷凍程序、微生物污染檢測、黴漿菌檢測、細胞種源鑑定等標準作業程序和文件管理，要求必需嚴謹。此階段有計劃的進行經濟部技術處細胞資源之初期建置、經濟部智慧財產局有關動物細胞之專利寄存、國家衛生研究院細胞庫核心設施之預備等。

**第二期(民國 86-91年)成長期：**此階段之工作，主要在將既有資源和作業系統對外拓

展，同時接受外界之檢驗。我們針對細胞培養和冷凍保存、細胞株對外提供之服務系統等，引進國際品質管制驗證系統 ISO 9001:2000，並順利取得 ISO驗證。由於國家衛生研究院細胞庫核心設施之建置和公告(民國87年)，對細胞資源業務拓展之補助和指導，建議大量引進在學術界較常用之細胞株(此部份由國家衛生研究院進行調查和資料彙整後，交由本所執行引進保存)，同時對外界每年提供之細胞批次，均呈倍數增加，使細胞庫之服務品質和效率，受到許多之讚揚和肯定。在技術建立上，除完成細胞品管方面之染色體核型分析、DNA指紋分析鑑定外，此階段之另一項重點在發展利用動物細胞進行各種安全性和功能性的 *in vitro* 分析系統，以配合我國健康食品管理法於民國88年起實施，大量之委託服務案之需求，同時配合國際上對於動物試驗之要求必需符合 3R(refining, reducing and replacing)，尤其強調許多體外之動物細胞試驗結果可以取代動物試驗，相關已獲得驗證的 protocols，均在此時期建立，作為擴大服務之功能。

**第三期(民國 91-96年)發展期：**此階段細胞庫之工作，除了維持優良的服務傳統外，也

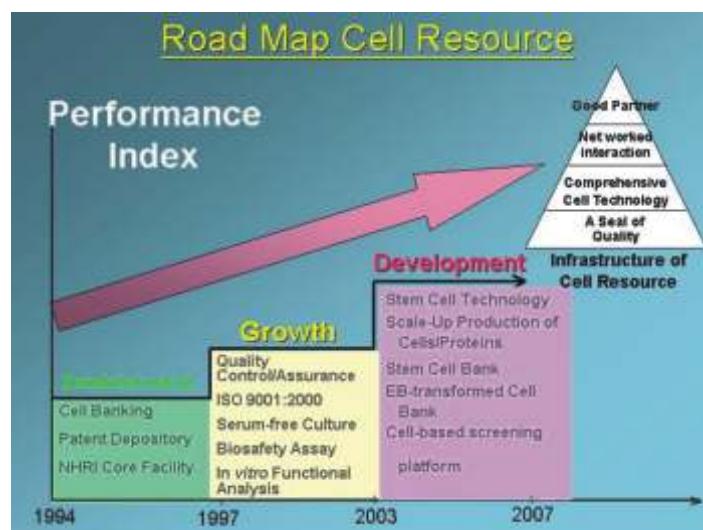
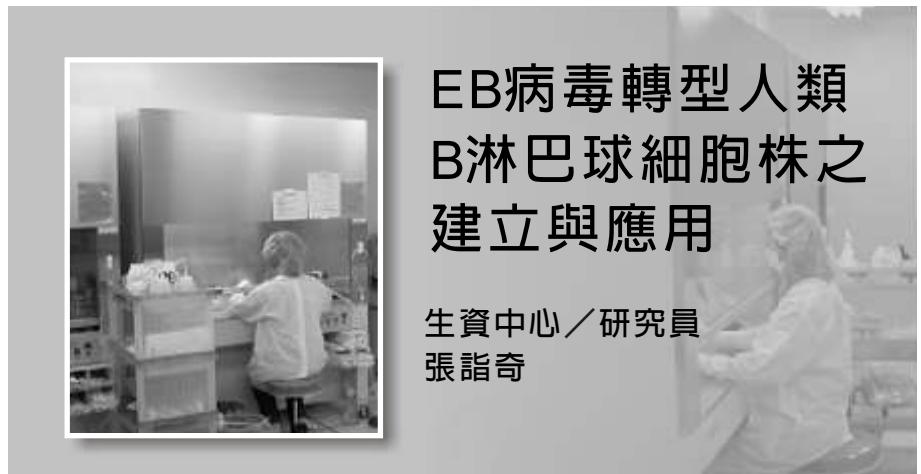


圖1、動物細胞庫之發展和工作重點之三個時期

積極發展許多細胞庫可能面臨和未來的技術挑戰和服務需求，其中最大的衝擊就是幹細胞領域和生物銀行(BioBank)。幹細胞具有極大分裂增殖能力和誘導為特定組織細胞之特徵，在藥物設計開發、活性物質篩選、安全性評估和基因表現、細胞發育與分化等，均具有重要之角色，故本所亦積極將幹細胞庫之工作納入常規細胞庫業務中，以提供研究人員對幹細胞材料和資訊之需求。BioBank則是隨著人類基因體定序完成，許多之研究工作可專注於特殊遺傳性疾病基因之研究，尤其是藉由生物統計和流行病學之原理，對於特定疾病基因之比對和探勘，可以快速的尋找到與疾病相關的基因和位置，故許多國家相繼投入BioBank的建置。BioBank主要是將收集之人類血液細胞以EB病毒進行轉染，使成可以無限增殖的細胞株，研究時則將細胞加以培養並抽取其genomic DNA進行研究比對。然而，如何有效率又合乎經濟的處理數量龐大的血液檢體，並將建立的血液細胞株進行冷凍保存和品管，對於後續之研究提供絕對之保障，均需要專業的細胞庫方能勝任。本所已接受中研院生醫所的委託，提供BioBank的服務，同時也將此core facility對外提供，協助有需要進行EBV轉染血液細胞之服務(詳見下文)。

細胞資源之使命和願景，在於建置一基礎平台，提供研究人員具有多樣和一定品管的細胞資源、廣泛的細胞培養技術、細胞資訊交流的網路、並以成為值得信賴的研究夥伴為職志。本專輯中將介紹細胞庫在BioBank之服務(EB病毒轉型人類B淋巴球細胞株之建立與應用)、冷凍管封膜機之研發和初代細胞之提供，以下分別介紹說明，若需要進一步的資訊和服務，歡迎與本所聯絡。



## EB病毒轉型人類 B淋巴球細胞株之 建立與應用

生資中心／研究員  
張詣奇

隨著生物醫學的進步，基因變異與疾病間的關係已逐漸地確認。例如杭亭頓舞蹈症(Huntington's Disease)便是huntington基因的CAG三核苷酸重複序列異常擴增所導致的。這些有關致病基因的各項資料與研究，都必須依賴各種分子生物及醫學的檢測。而穩定的檢體來源作為實驗材料，對於這些檢測與研究的進行是必要的。依靠患者持續供應檢體絕非是長久之計！所以如何保有穩定的檢體來源，成為人類疾病相關研究中重要的一環。

Epstein-Barr virus (EBV) transformation目前已被廣泛運用在建立人類B淋巴球細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)。LCL將能源源不絕的提供各種臨床或遺傳實驗所需的實驗材料。這項技術所運用的原理，簡單的說便是B淋巴球細胞帶有Epstein-Barr virus的受體，EBV會專一性的感染B淋巴球細胞。感染後的B淋巴球細胞，其基因表現因為受到EBV感染而有所改變(Carter *et al.* 2002)。這些基因表現的改變，包酶含了端粒(telomerase)的活性增加(Kataoka *et al.* 1997)及p53基因的突變(Sugimoto *et al.* 2004)。這些變化都會使得已受感染的B淋巴球細

胞具有旺盛的增生能力。利用這項特性，便可以在實驗室中持續的增殖培養B淋巴球細胞。由於Carter *et al.* (2002)發現LCL與株化前的B淋巴球細胞其基因表現是不同的，所以利用LCL進行致病基因的確認時，必須先確認健康族群的LCL其基因表現，然後以此為對照組，比較疾病族群的LCL其基因表現有否不同。如此便可釐清與疾病相關的基因表現。

目前國際知名的生物資源中心例如，歐洲的European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)、英國的Medical Research Council (MRC)、美國的American Type Culture Collection (ATCC)及Coriell Institute for Medical Research與我國生物資源保存暨研究中心Bioresources Collection and Research Center (生資中心)都利用這項技術建立LCL。由於LCL可以應用在人類疾病的基因等臨床研究上，所以上述的生物資源中心也開始籌建人類生物銀行(human biobank)。舉例來說，MRC於2002年資助英國生物銀行計畫(UK biobank project)以及ECACC成立Human Genetic Cell Bank。生資中心於2001年開始，便著手規劃建立

人類血液B淋巴球細胞株標準實驗室、標準操作程序、冷凍保存及品管流程。目前已完成符合無塵室1,000等級規格之血液分離標準實驗室(圖1)與EB病毒轉型人類血液B淋巴球細胞標準實驗室(圖2)。相關實驗設施有EB病毒庫、無菌操作臺(8台)、細胞培養箱(8台)、倒立式顯微鏡(3台)與離心機(3台)。由專職技術人員負責血液檢體的單核球細胞之分離保存與EB病毒的轉染培養，目前單日的處理件數可達30件以上。在相關文件上，業已完成人類血液單核球細胞之分離保存與EB病毒轉染的標準操作程序書。此外，另有專屬的庫房管理人員登錄血液檢體的隨件資料，並以條碼系統管理操作記錄與株化完成之細胞株。由於這些實驗基礎的建立，生資中心於2002年開始與中央研究院生物醫學科學研究所合作，建構台灣人群細胞庫，迄今已完成5000株以上的人類淋巴球細胞株。這些人類淋巴球細胞株，將可作為臺灣人群DNA比對組細胞株需求之基礎。此外，生資中心的長期合作對象更包含了台北榮民總醫院、台北馬偕醫院與國家衛生研究院，協助這些單位建立具有特定疾病，例如脊髓性小腦萎縮症、成骨不全症與皮膚類澱粉症的人類淋巴球細胞株。短期實驗委託者亦有台中榮民總醫院與台北婦幼醫院。目前生資中心更積極持續的發展改善EBV transformation相關技術，例如自動化的操作流程，期望能夠提供國內有需要建構人類淋巴球細胞株的實驗室相關的協助。

### 參考文獻

- Kataoka H., Tahara H., Watanabe T., Sugawara M., Ide T., Goto M., Furuichi Y., and Sugimoto M. 1997. Immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation* 62:203-211.
- Sugimoto M., Tahara H., Ide T., and Furuichi Y. 2004. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Research* 64: 3361-3364.
- Carter K. L., Cahir-McFarland E. E. & Kieff E. (2002) Epstein-Barr virus induced changes in B lymphocyte gene expression. *Journal of Virology*, 76, 10427-10436.



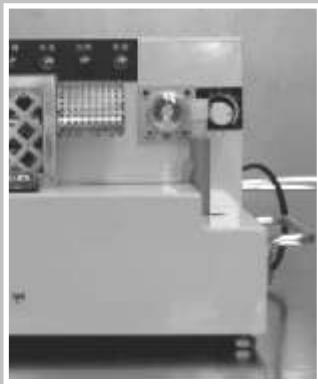
圖1、血液分離標準實驗室



圖2、EB病毒轉型人類血液B淋巴球細胞標準實驗室



圖3、人類血液B淋巴球細胞條碼系統管理儲存與背景資料庫



## 冷凍管封膜機開發 ---CRYOSEALER

生資中心／助理技師  
陳欣怡

為了確保冷凍的細胞及組織在長期保存後仍具有活性，操作人員通常都是將細胞樣品或切成小塊的檢體，添加冷凍保護劑後，裝入塑膠冷凍管內，依一定的降溫步驟，再移入液態氮儲存槽中作為長期的保存。然而塑膠冷凍管之製造商，警告使用者不可將塑膠冷凍管浸入液態氮中，否則將會面臨三個嚴重的問題：(1)因為液態氮會滲入冷凍管內，當研究人員將冷凍管從液氮中拿出時，會使得冷凍管內的液氮快速揮發而有氣爆的危險。(2)因為液氮是非無菌的，滲入冷凍管內的液氮會導致保存物受到微生物污染。(3)因為液氮的流進流出冷凍管，而造成冷凍管與冷凍管間的交互感染。標準

的儲存方式是將冷凍管放置於液態氮的氣相層中(溫度低於-150°C)，即可作為長期之保存。

食品所生資中心細胞庫在推廣細胞培養的品質管制觀念上，特別強調研究人員不應將塑膠的冷凍管浸入至液態氮中作為保存之方式；然而十年來效果不大，大部分的操作人員仍然將塑膠冷凍管浸在液態氮中保存。究其原因，主要是液態氮可提供非常穩定的超低溫度(-196°C)，不會有溫度梯度之問題，而且不必常需要注意儲存槽中液態氮的含量和充填之動作；然而卻常聽聞操作人員面臨不知原因的微生物污染問題，一直無法改善。作為長期細胞保存工作的我們，不得不站在操作人員之立場，積極思

考是否可以有兩全其美的辦法，既保有穩定的超低溫，又可免於液態氮進入塑膠冷凍管內？最好的辦法就是將塑膠冷凍管以簡易的方式密封，完全阻止液態氮進入塑膠冷凍管內，因為這個信念我們與工研院機械所合作，共同開發一台可以自動封膜於冷凍管的機器，稱之為冷凍管封膜機(如圖1)。

冷凍管封膜機利用簡單的機械原理和膠膜受熱密封作用，將一小段可耐液氮低溫的塑膠套膜(cryoflex™, Nunc)套在冷凍管之蓋子邊緣，以自動化快速旋轉和加熱的方式，達到密封效果(圖2)，操作簡單且品質一致，最重要的是對細胞樣品沒有任何傷害，且完全可使用現有的保存冷凍盒或鋁夾之保存方式。經長期測試結果，經冷凍管封膜機密封之塑膠冷凍管可以完全阻隔液態氮的侵入，對於細胞或組織的冷凍保存提供一值得信賴的工具和保障。該冷凍管封膜機已取得中華民國、日本等多國專利，很快即可推廣至市場，若對此冷凍管封膜機感興趣之讀者，可與陳欣怡聯繫([hic@firdi.org.tw](mailto:hic@firdi.org.tw) 或電話03-5223191 轉分機577)。

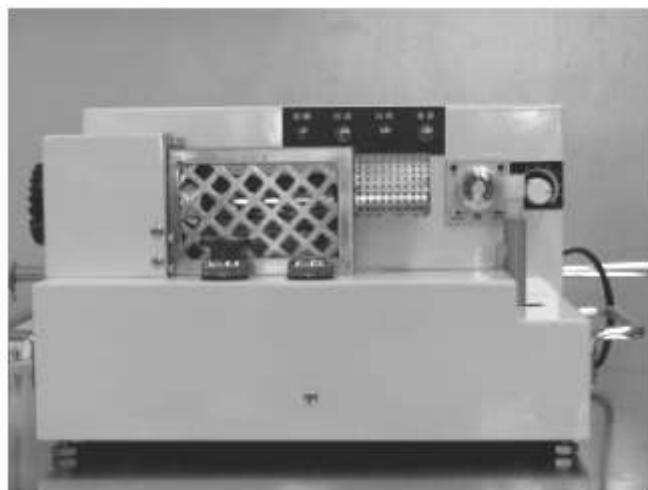


圖1、冷凍管封膜機

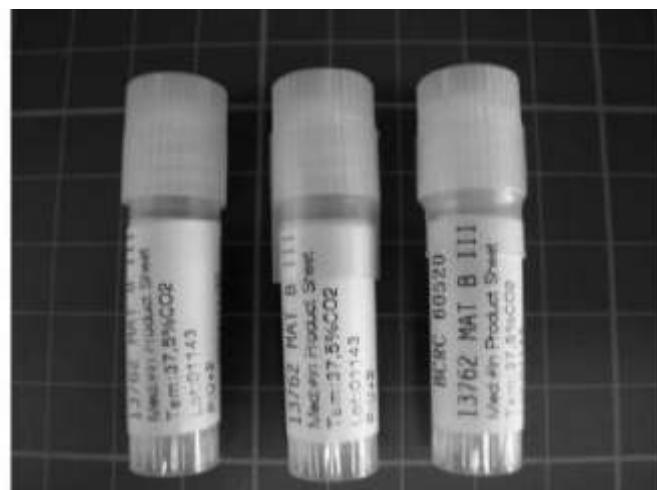
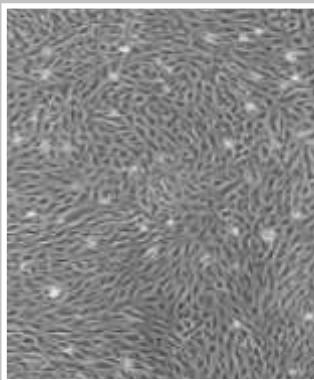


圖2、從左至右分別為冷凍管、套上cryoflex  
的冷凍管及封膜後之冷凍管



## 初代細胞之供應

生資中心／副研究員  
廖麗娟

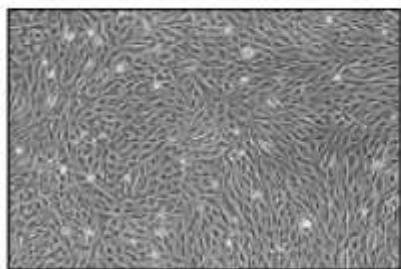
動物細胞為研究生命科學重要的生物資源和研究材料，本所生物資源保存及研究中心(BCRC)自民國83年1月起開始進行動物細胞株之收集與保存工作，並於民國85年7月起接受國家衛生研究院委

託設立細胞庫核心設施，積極發展動物細胞庫工作，目前正積極開發初代細胞的新業務，提供穩定及高品質的初代細胞來源，以滿足國內研究人員之需要。目前已提供之初代細胞包括：

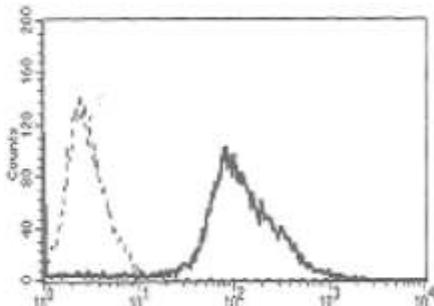
### 1. Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVEC)

**BCRC No.: H-UV001**

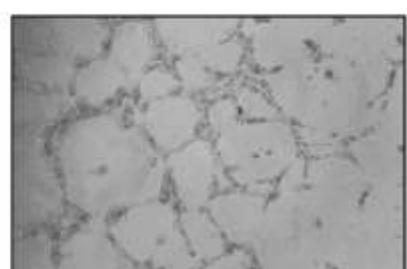
- 凍後存活率>90%，細胞數: >10<sup>6</sup>/管, passage No.: 2
- CD31(+) cell>95%
- 價格：6000元/每管



(a)100X視野下HUVEC型態



(b)以細胞流式儀分析  
HUVEC CD31(+)>95 %

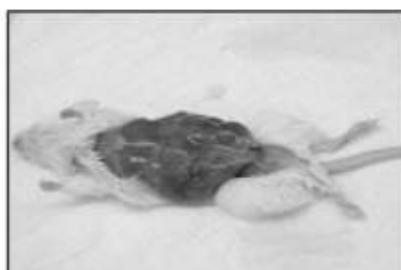


(c)類血管新生試驗(100X)  
VEGF-A 50ng/ml處理6hrs

### 2. Mouse(ICR) Embryonic Fibroblasts (MEF)

**BCRC No.: M-EF001**

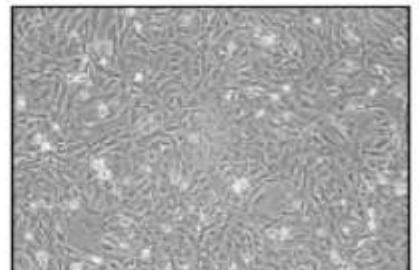
- 凍後存活率>90%，細胞數: >10<sup>6</sup>/管, passage No.: 2
- 用途：為embryoic stem cells培養時所用的feeder layer
- 價格：2000元/每管
- 另mitomycin C 處理者以5管為單位 (5000元/單位)



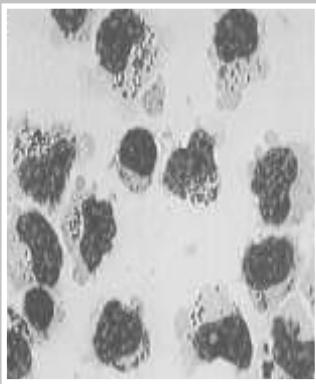
(a)懷孕12.5天的ICR母鼠



(b)12.5天大的胎鼠胚



(c) 100X視野下MEF型態



## 自然殺手細胞在癌症免疫療法上的應用

生資中心／副研究員  
高宜廷

藉由使人體免疫系統產生或提升對病原體的免疫反應，以達到消滅病原體並治癒疾病的醫療方式被稱之為免疫療法。癌症為目前人類全力對抗的疾病之一，目前治療癌症的方式仍以外科手術、化學療法及放射線療法為主。然而上述方式所造成的副作用不但給癌症患者帶來極大的痛苦，仍無法避免再度復發的可能性。免疫療法目前被廣泛地研究如何有效治療癌症，相較於目前治療癌症的方式，免疫療法在理論上具有副作用及復發率較低的優點，因此極具發展潛力。

免疫療法的種類可依提升免疫反應的方式分為四種，分別為免疫調控療法 (cytotoxic immunotherapy)、主動免疫療法 (active immunotherapy)、被動免疫療法 (passive immunotherapy) 及回復免疫療法 (restorative immunotherapy)。

免疫調控療法：主要為注射免疫調控相關之細胞激素，如干擾素 $\alpha$  (interferon  $\alpha$ , INF)、干擾素 $\gamma$  及腫瘤壞死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ )；上述這些細胞激素可以提升自然殺手細胞 (natural killer cell, NK cell) 的活性，同時亦可增強癌細胞之主要第一型組織相容性抗原 (major histocompatibility complex class I, MHC class I) 的表現，如此細胞毒殺 T 淋巴細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 更易於辨識癌細胞，並予以毒殺。

### 主動免疫療法：

注射癌症疫苗，以主動免疫的方式使免疫系統對癌細胞產生免疫反應。癌症疫苗通常是處理過的癌細胞碎片或是已呈現腫瘤相關抗原的

抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell)。

### 被動免疫療法：

主要為注射單株抗體來消滅癌細胞。

### 回復免疫療法：

投與病患藥物以降低體內抑制者 T 細胞 (suppressor T lymphocyte) 的活性，使 CTL 對癌細胞的活性能夠提升。

免疫療法的發展策略眾多，其中 NK 細胞由於為先天性免疫作用 (innate immunity) 中的主要作用細胞，具有相當重要的免疫特性，因此被認為是具有發展潛力的免疫療法之一。

NK 細胞為血液中，淋巴細胞的主要成員之一。由於 NK 細胞不需透過抗原呈現細胞的作用，即可辨識並攻擊病原體，因此在先天性免疫中扮演著極為重要的角色。近年來，學術界著眼於 NK 細胞特殊的生理特性，因此廣泛地研究其在癌症免疫療法上的應用。隨著發展的過程中，NK 細胞的特性被更深入地瞭解，且更加確定了其臨床應用

上的價值及可能性。以下將就 NK 細胞的特性及臨床應用研究的發展加以整理說明。

### I. NK 細胞之生理特性

NK 細胞的外觀型態為大型顆粒淋巴球細胞 (large granular lymphocyte, LGL)，在人體週邊血的淋巴球細胞中，約佔 10~15%。以 May-Grunwald-Giemsa 染色法對 NK 細胞進行切片染色，可以觀察到 NK 細胞的細胞核呈腎臟狀，且在細胞質中有許多顆粒 (圖 1)。NK 細胞在休止狀態下，直徑約 7~8 μm；在活化狀態下，直徑約 10~12 μm。在細胞表面抗原的表現上，NK 細胞皆表現 CD56 表面抗原，但不表現 CD3。NK 細胞為人體免疫系統的第一道防線，能夠不經由抗原呈獻細胞的作用，即可辨識並毒殺被病毒感染的細胞或是癌細胞。此外還能夠透過 antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 及分泌調控免疫作用之細胞激素來達到毒殺細胞之目的 [1]。

人體內的 NK 細胞可分為兩個細胞子群，一群表現 CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>，約佔全部 NK 細胞的 90%；另一群表現 CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>，約佔全部 NK 細胞的 10% (圖 2)。

CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK 細胞具有較強的細胞毒殺能力，且為 ADCC 的主要作用細胞，但是此群細胞無法分泌的豐富細胞激素；CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 細胞的細胞毒殺能力較弱，但是可分泌大量豐富的細胞激素，來調控免疫機制，如 INF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-13 及 GM-CSF 等 [2]。

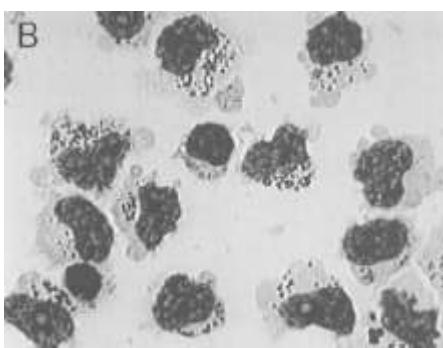


圖 1、NK 細胞 May-Grunwald-Giemsa 染色

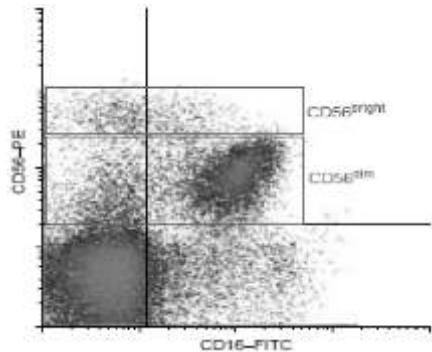


圖 2、NK 細胞流式細胞儀分析圖。NK 細胞可分為 CD56<sup>bright</sup> 及 CD56<sup>dim</sup> 兩個子群

## II . NK細胞之細胞毒殺機制

NK細胞不像T細胞或B細胞，需要透過與抗原呈現細胞作用來啓動免疫作用，具有快速且直接對病原體的產生免疫反應的特性，所以為人體免疫系統中重要的防禦角色。NK細胞並不需經由抗原呈現細胞的作用，即可以辨識癌細胞或是受病毒感染細胞，並予以攻擊。NK細胞的辨識機制主要是藉由細胞表面的活化受器(activating receptor)及抑制受器(inhibitory receptor)訊號之間的平衡，來決定所接觸的細胞是否為攻擊的目標。這些NK細胞的受器(NK receptor, NKR)主要可以分為三類，第一類是屬於killer cell immunoglobulin receptor(KIR)，主要是辨識人類白血球抗原A、B及C(human leukocyte antigen-A, B and C, HLA-A, -B and -C)；第二類是屬於C-type lectin，主要是辨識HLA-E；第三類被命名為natural cytotoxicity receptors(NCR)，但其辨識之補器(ligand)尚不清楚[3]。透過這些成對抑制受器及活化受器所接受之訊號的平衡，NK細胞可以辨識出癌細胞或是被病毒感染的細胞，而展開攻擊。當NK細胞由活化受器接收到的訊號大於抑制受器的訊號時，NK細胞會立即被活化，並啓動一連串的細胞毒殺機制，毒殺目標細胞(target cell)；反之則視為自體細胞，而不予以毒殺(圖3)。

NK細胞毒殺目標細胞的機制，主要可分為兩類。當NK細胞辨識出目標細胞之後，本身會被活化，

並以穿孔酵素(perforin)在目標細胞表面穿孔，再將顆粒酶B(granzyme B)送入目標細胞之內，引發細胞凋亡(apoptosis)；此外NK細胞亦可利用Fas ligand及TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing) ligand與目標細胞上的受器結合，啓動細胞凋亡訊號來毒殺目標細胞[4](圖4)。

## III . NK細胞的發育

NK細胞為血液細胞中淋巴系細胞的一員。在人體中，主要是由骨髓中的造血幹細胞分化而來。就目前所知，無論骨髓、臍帶血或周邊血中的造血幹細胞皆可以被誘導分化為NK細胞。然而在體外，造血幹細胞僅可被誘導成CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK細胞，並無法誘導成細胞毒性較強的CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK細胞。如何體外誘導造血幹細胞分化為CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK細胞是有待突破的問題之一[2]。在造血幹細胞分化為NK細胞的過程中，細胞表面抗原的表現主要分為兩個階段。造血幹細胞原先表現CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>，在FL及SCF的作用之下，會逐漸分化，並表現CD34<sup>+</sup>IL-15R<sup>+</sup>，此為第一階段。接著IL-15可以進一步誘導細胞分化為成熟的NK細胞，表現CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>，此為第二階段(圖5)。事實上，在體外僅能誘導造血幹細胞分化為CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK細胞，而無法得到CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK細胞，因此推測CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK細胞為分化層級較為末端之細胞。Interleukin 15(IL-15)可

以單獨地使用在體外誘導造血幹細胞分化為NK細胞。Flt-3 ligand(FL)及stem cell factor(SCF)可以增加造血幹細胞分化為NK前趨細胞(progenitor)的數量。IL-2及IL-15可以增強CD56表現量，使NK細胞趨於更成熟的狀態[2, 5]。

## IV . 體外純化NK細胞

體外純化NK細胞之目的是為了要移除不要的細胞，如會引起免疫排斥反應的T細胞。此外為了讓NK細胞能夠在成分確定的培養環境增殖及活化，因此必須將NK細胞純化，以避免別的細胞產生抑制NK細胞的細胞激素或與NK細胞競爭養份而造成影響。為了製備能夠打回患者體內進行免疫療法的NK細胞，純化及增殖NK細胞的過程均須在符合GMP的條件下進行。目前可行的系統為Miltenyi公司所推出的CliniMACS(Miltenyi, Auburn, CA, USA)。CliniMACS主要是利用免疫磁珠的原理，將僅會在磁場中產生磁性的磁珠皆在抗體後面，並以此抗體標定在細胞特有的表面抗原上，以外加磁場的方式分離出想要的細胞。這套系統目前已通過FDA的認證，所純化出來的細胞，可用在人類臨床實驗上。純化出的NK細胞若要用來進行臨床實驗，注入試驗者體內的細胞中，T細胞的數量必須低於 $3 \times 10^4 / \text{kg}$ 。文獻曾報導使用CliniMACS所分出的NK細胞，在符合GMP規格的環境中，以含有IL-2的X-Vivo 10無血清培養基培養2-3週，可培養出純度約70%的CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK細胞。

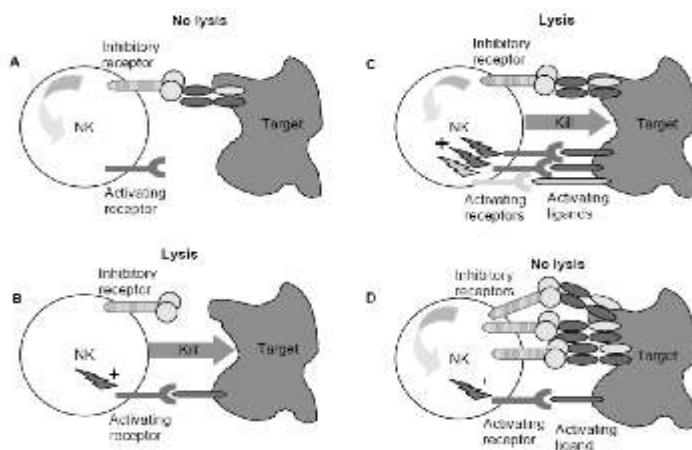


圖3、NK細胞辨識癌細胞之機制原理  
May-Grunwald-Giemsa 染色

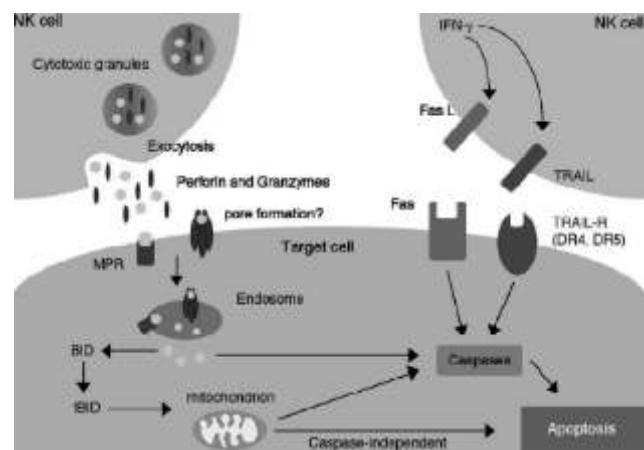


圖4、NK細胞利用穿孔酵素、顆粒酶B及FAS ligand毒殺癌細胞之機制原理

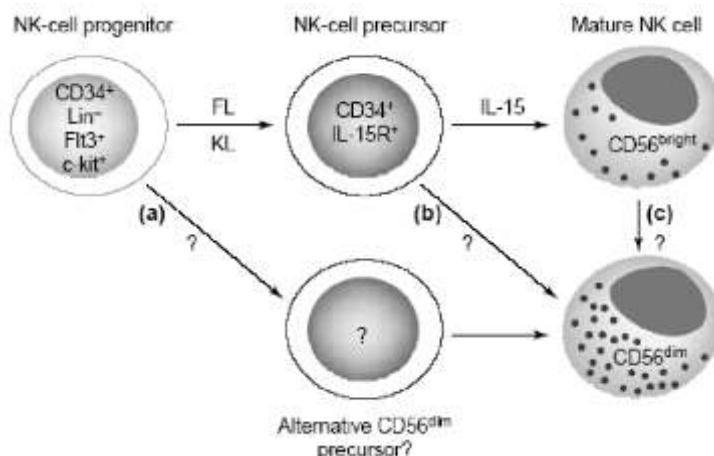


圖5、NK細胞之分化路徑

## V. NK細胞在癌症免疫療法上之應用

[6]。

### A. IL-2療法

過去有臨床研究報告指出，注射IL-2及LAK(lymphokine-activated killer)細胞到癌症病人體內，可看到癌細胞被毒殺的程度有明顯的提升，同時癌症病人的存活率亦有顯著的提升[7, 8]。NK細胞對IL-2的刺激產生反應後，對癌細胞產生毒殺能力，可稱之為LAK細胞。曾被報導過對此療法有反應的癌細胞有renal cell carcinoma、melanoma、non-Hodgkin's lymphoma (NHL)、sarcoma、neuroblastoma及acute myeloid leukaemia (AML)[3]。注射IL-2或是IL-2活化過的NK細胞到癌症病人體內，其療效尚無法定論。從過去的臨床報告來看，IL-2療法的效果是有限度的。其原因可能是施打進病人的IL-2，除了可以提升NK細胞的細胞毒殺能力之外，也同時會影響NK細胞所接收到活化及抑制訊號之間的平衡。IL-2除了會活化NK細胞之外，也會刺激癌細胞增加MHC class I分子的表現量。表現增加的MHC class I分子與NK細胞上的抑制受器結合，使NK細胞誤認癌細胞為自體正常之細胞，而降低了療效。但是從現有文獻可知，AML blasts、multiple myeloma、renal cell carcinoma及melanoma並不會有上述的現象，因此可以IL-2療法進行治療。IL-2療法仍具有臨床應用潛力，但必須選

擇施行在特定對此療法有較佳感受性的癌症病人上，另外搭配其他細胞激素，如interferon  $\alpha$ (INF- $\alpha$ )、granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)或IL-12等，來加強NK細胞的作用[3]。

### B. 單株抗體與ADCC療法

ADCC是體內重要的免疫防禦機制之一，其中NK細胞又是重要的作用細胞。ADCC的機制主要是體內的免疫系統經過辨識後，會先產生抗體來標定癌細胞，然後NK細胞再藉由Fc receptor (CD16)來與標定抗體結合，並啟動毒殺作用來毒殺癌細胞(圖6)。ADCC為被動免疫作用(adaptive immunity)的一種，因

此NK細胞同時具有主動免疫及被動免疫的特性，為體內免疫系統中重要的一員。文獻曾報導過利用單株抗體藥rituximab來標定癌細胞，並搭配IL-2、IL-12及GM-CSF治療癌症[9]。

### C. 阻斷抑制受器與MHC class I的作用，增強NK細胞毒殺能力

癌細胞同樣會表現自體MHC class I，與KIR結合所產生的抑制訊號可能抑制NK細胞的細胞毒殺能力，而無法達到治療癌症的效果。因此文獻曾報導在小鼠動物模式中，利用抗體結合到癌細胞之抑制補體上，然後再注射經IL-2活化之NK細胞[10]。實驗結果發現與對照組相比，經抗體阻斷抑制受器訊號的實驗組小鼠皆可存活下來。雖目前尚無臨床上的人體研究報導，但仍為頗具發展潛力的療法之一。

### D. NK細胞在異體幹細胞移植上的應用

癌細胞所表現的自體MHC class I分子會侷限NK細胞的毒殺能力，因此在 HLA半相合(HLA-haploidentical)的異體幹細胞移植(allogeneic stem cell transplantation)配對中，選擇捐贈者(donor)的KIR epitope和受贈者(recipient)的HLA無法相容。如此患者體內的幹細胞，

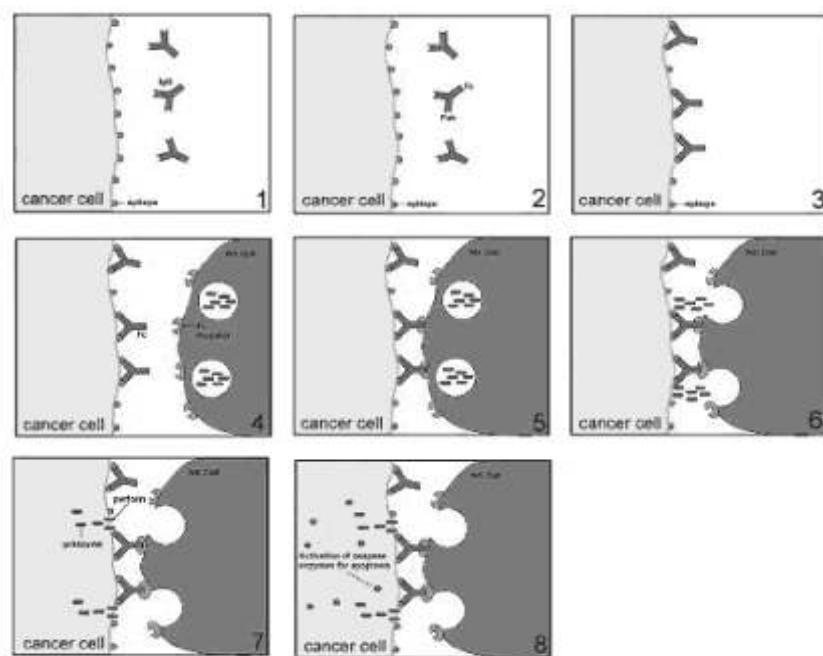


圖6、NK細胞之antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 原理機制

在重建免疫系統時，由捐贈者的造血幹細胞分化而來的NK細胞就能夠有效地辨識患者體內的癌細胞，並予以毒殺。臨床研究曾報導NK細胞在異體幹細胞移植中，除了可有效提升NK細胞對癌細胞的毒殺能力(graft-versus-tumour, GvT)外，還可降低術後 graft-versus-host disease(GvHD)的機率。此外術後的存活率可明顯提升，且復發率也明顯降低。其原因为捐贈者的NK細胞毒殺了受贈者的T細胞及樹突狀細胞(dendritic cell, DC)，使樹突狀細胞無法呈現受贈者的抗原給捐贈者的T細胞，以避免術後引發GvHD [11, 12, 13](圖7)。

### E. 利用NK細胞生產細胞激素

NK細胞可細分為兩種子群，個別為CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK細胞及CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK細胞。其中CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK細胞雖然細胞毒殺能力較弱，但卻能夠分泌種類及數量皆相當豐富的細胞激素。NK細胞所分泌的細胞激素中，與免疫調節相關的有INF- $\alpha$ 、INF- $\beta$ 、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-10及IL-13等。文獻中曾提出NK細胞經不同的單核激素(monokine)的共同刺激下，可以提高特定細胞激素的產量 [14]。例如以IL-12加上IL-15可以刺激NK細胞提高INF- $\alpha$ 的產量。此外CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>NK細胞還可以被大量增殖培養，因此利用NK細胞的這些特性來量產特定細胞激素，亦具有發展的潛力。

至今許多學者專家投注心力與時

### VI. 結語

間在研究利用NK細胞來進行癌症免疫療法，最終目的是希望利用NK細胞之免疫特性來克服癌細胞容易轉移及躲避免疫系統攻擊的頑強特性。從初期移植自體NK細胞的療效有限，到後來發展利用異體NK細胞搭配各種細胞激素或是抗體的共同作用，逐漸有改進治療效果及缺點的趨勢。然而以NK細胞來進行癌症免疫療法尚有許多地方極待研究與改進。目前NK細胞免疫療法若要實際應用在臨床治療上，僅有搭配放射線治療或幹細胞移植等其他療法才能確實發揮作用。在整個發展NK細胞免疫療法的過程中，NK細胞的特性已逐漸被深入瞭解，未來發展的趨勢將以基因工程的方式增強或是改變NK細胞辨識及毒殺癌細胞的能力。人類幹細胞技術目前正蓬勃發展，利用幹細胞移植或是體外誘導及增殖技術來進行NK細胞免疫療法，也同樣具有發展的潛力。目前NK細胞免疫療法仍有許多亟待解決的問題，但因為新技術的快速發展，其應用在臨床治療上將指日可待。

### VII. 參考文獻

1. Whiteside TL, Herberman RB (1994) Role of human natural killer cells in

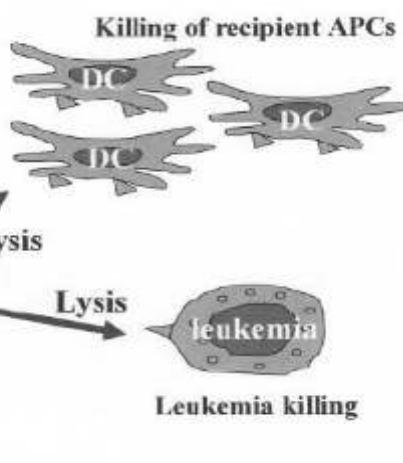


圖7、捐贈者的NK細胞在HLA半相合之異體幹細胞移植細胞中，可以毒殺受贈者之DC及T細胞，具有術後抑制GvHD的效果

- health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 125
2. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633
  3. Farag SS, Fehniger TA, Becknell Brian, Blaser BW, Caliguri MA (2003) New directions in natural killer cell-based immunotherapy of human cancer. *Expert Opin Biol Ther* 3: 237
  4. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42: 501
  5. Carson W, Caligiuri MA (1996) Natural killer cell subsets and development. *Methods* 9: 327
  6. Klingemann HG (2005) Natural killer cell-based immunotherapeutic strategies. *Cytotherapy* 7: 16
  7. Kimura H, Yamaguchi Y (1997) A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or noncurative resection of primary lung carcinoma. *Cancer* 80: 42
  8. Robertson MJ, Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421
  9. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. (2000) Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 95: 3900
  10. Koh CY, Blazar BR, George T, et al. (2001) Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 97: 3132
  11. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097
  12. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Martelli MF, Velardi A (2005) Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 17: 211
  13. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploididentical NK cells in patient with cancer. *Blood* 105: 3051
  14. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* 97: 3146



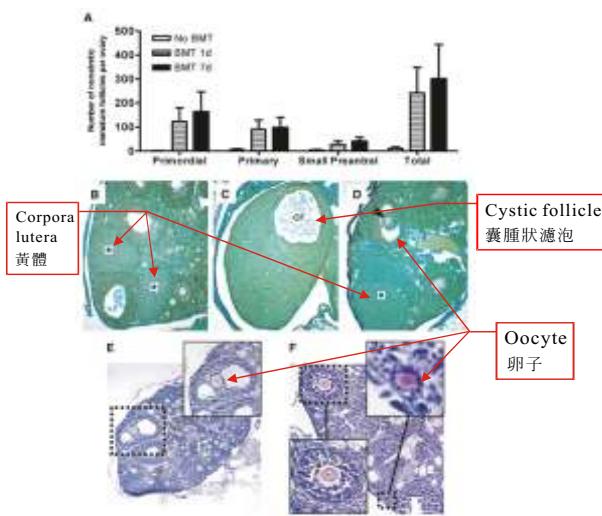
## 骨髓及血液可分化成卵嗎？

生資中心／副研究員  
洪啓仁

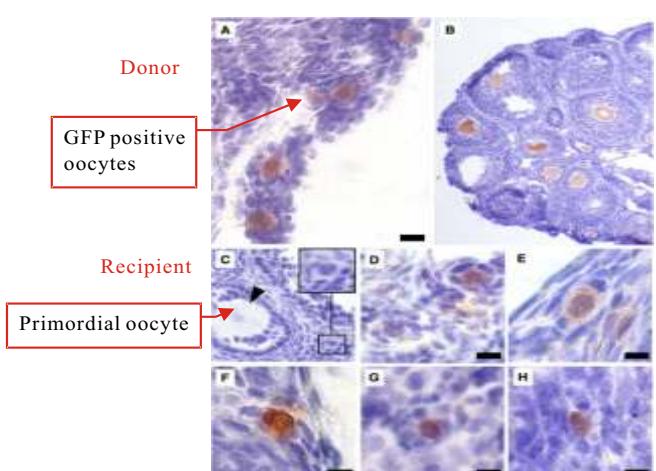
不孕一直困擾著不少求子若渴的夫婦。中國醫學自古以來則是以「腎藏精主髓、腎主生殖」等理論，以補腎、活血化瘀為主來治療不孕。骨髓、血液除了產生血液細胞及滋養全身體細胞外是否仍具有其它的功能呢？過去生殖生物學的中心準則是大部分的哺乳動物在生育年齡期間僅有數百個濾泡發育接近完全成熟，其餘數十萬顆的均退化，換言之出生前即已決定卵子的數量，然而，近來Johnson等人之研究發現將挑戰這個中心準則，他們發現哺乳動物的生殖幹細胞(germ line stem cell, GSCs)將有能力產生新的帶有卵子之濾泡，雖然如此，實際上卵巢中GSCs的量是不多的，因此推測GSCs主要貯存於卵巢外的組織。以基因表現及免

疫組織化學染色實驗發現GSCs中含有一些在卵巢中參與生殖細胞發育的germ line marker分子會同時存在於骨髓中，更進一步地分析其中一個germ line marker—MVH，發現骨髓中所含有的germ line cells是主要的表現該分子的細胞，且表現量會隨著動物之動情週期的改變使得表現量會隨之變化，因此推測這可能是受到卵巢所控制，隨後這項推測已經由卵巢切除手術實驗證實。含有生殖細胞的骨髓是否可以提供卵子的發育呢？過去的臨床實驗指出，有位患有Fanconi's anemia的女性病患在十二歲時只有一次月經來潮後即已停經，之後從她的姐妹取得骨髓後進行骨髓移植實驗(bone marrow transplantation, BMT)發現可以恢復月經週期，且之後又生下

兩個小孩。這樣的線索是否意味著骨髓即是提供卵子發育的來源呢？為了證實這項推測，因此先以化療用藥-cyclophosphamide與busulfan加以破壞老鼠的卵巢使其無法製造新的卵子，然後再進行骨髓移植實驗。為了確認骨髓並非提供保護作用而使得被破壞的卵巢再度恢復生殖能力，因此分別選擇卵巢破壞後的第一天及第七天進行BMT實驗，並在第四十二天後計算卵巢內未成熟的濾泡數，結果發現有進行BMT實驗之老鼠卵巢內的濾泡數遠多於沒有進行的，且無論是第一天或第七天進行的BMT實驗，其卵巢之濾泡數並沒有明顯的差異，這點釐清骨髓並非只是提供保護作用，而是提供卵巢產生卵子的來源。骨髓是否以產生血液然後再藉其運送至卵巢以提供卵的發育形成呢？研究人員將會產生螢光卵的OCT4-GFP基因轉殖鼠之週邊血取出，然後再打入已接受或未接受化療的老鼠體內，結果發現接受者均含有發螢光的卵子，這樣的結果證實了血液確實會轉變為卵子。雖然骨髓、血液細胞可以分化成卵，然而這樣的結果仍待日後實驗確認卵是否具有受孕能力，儘管如此仍帶給不孕婦女求子的希望。另外值得思考的是中國醫學以補腎、活血化瘀為主來治療不孕的理論是否早已點出骨髓、血液細胞可能分化為卵子？



圖A. 注射cyclophosphamide(破壞卵巢)後一天或七天進行BMT實驗，並在第四十二天計算未成熟之濾泡數。圖B-D. 未注射([B],control)或注射cyclophosphamide後未進行BMT[C]或進行BMT七日後之卵巢組織切片圖[D]。圖E與F.十一個半月大的老鼠經化療後進行BMT後第四十二天之卵巢組織切片圖。



圖A與B. OCT4-GFP基因轉殖老鼠卵巢中的濾泡含有會發螢光(褐色)的卵子。圖C.接受者(老鼠)尚未接受OCT4-GFP基因轉殖老鼠的血液細胞之卵巢組織。圖D-F.接受者接受OCT4-GFP基因轉殖老鼠的血液細胞之卵巢組織。圖G-H.接受者經化療後接受OCT4-GFP基因轉殖老鼠的血液細胞之卵巢組織。

## 審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自94年10月至94年12月

專利名稱關鍵字/公告號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
生產丁四醇之莫尼里業拉屬突變株/589382	<i>Moniliella acetobutens</i> N 61188-12	930046	財團法人食品工業發展研究所
製造丁四醇之酵母菌菌種 / 587097	<i>Moniliella</i> sp. 262-1 <i>Moniliella</i> sp. 166-2 <i>Moniliella</i> sp. 278-3 <i>Moniliella</i> sp. 442 <i>Moniliella</i> sp. 440 <i>Moniliella</i> sp. 441	930033 930034 930035 930036 930037 930038	財團法人食品工業發展研究所
耐熱性及高醋酸生產性醋酸桿菌/I225890	<i>Acetobacter</i> sp. I14-2	910126	財團法人食品工業發展研究所
轉穀氨醯胺酵素DNA分子及表現載體與細胞/I227273	pAE053(in <i>Streptomyces lividans</i> JT46)	940430	財團法人食品工業發展研究所
紅麴菌突變株及製備黃色素用途/I240000	<i>Monascus purpureus</i> M011	930045	財團法人食品工業發展研究所
可分解有機高分子化合物之菌株/I240001	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> TX1	910228	國立中央大學
樟芝產物治療癌症或腫瘤疾病藥學組成物/I241344	<i>Antrodia camphorata</i>	930032	財團法人食品工業發展研究所
豬瘟組織培養活毒疫苗、培養方法/I241346	LPC-TS豬瘟組織培養活毒疫苗病毒株(於PK-15-KL細胞)	970036	行政院農業委員會家畜衛生試驗所
具有降低與同化膽固醇能力的新穎耐酸與耐膽鹽乳桿菌分離株/I241912	<i>Lactobacillus acidophilus</i> B6T7 <i>Lactobacillus gasseri</i> B21T1 <i>Lactobacillus gasseri</i> B21T6 <i>Lactobacillus gasseri</i> B38T38 <i>Lactobacillus gasseri</i> C21T1 <i>Lactobacillus gasseri</i> X21B7	910194 910195 910196 910197 910198 910199	財團法人食品工業發展研究所
可專一與人體G-CSF受器結合反應單株抗體/I242563	用於生產抗-GCSF受體單株抗體174-74-11 用於生產抗-GCSF受體單株抗體163-93	960105 960106	泰諾士公司(美國)
連續培養哺乳動物細胞株製備馬立克氏病病毒方法/I243208	Mareks Disease Virus Infected Feline Kidney Cell Line 3G4/MD5	960091	輝瑞製品股份有限公司(美國)
新穎之乳酸菌於魚肉及豆類食品加工方法與產品/I243646	乳酸四鏈球菌( <i>Pediococcus pentosaceus</i> ) YJL 乳酸四鏈球菌( <i>Pediococcus pentosaceus</i> ) YJS	910210 910211	金衣生命科學股份有限公司
安定之抗體組合物及注射製劑/I243683	質體hMBC1 Lg λ pUC19在大腸桿菌JM109 質體hMBC1 Hc DNA/pUC19在大腸桿菌JM109 質體MBC1L24在大腸桿菌JM109 質體MBC1H04在大腸桿菌JM109 細胞株：小白鼠-小白鼠融合瘤#23-57-137-1	940177 940178 940179 940180 960069	中外製藥股份有限公司(日本)
雙歧桿菌屬細菌及使用該菌之發酵食品/I244374	短雙歧桿菌( <i>Bifidobacterium breve</i> ) YIT 10001 短雙歧桿菌( <i>Bifidobacterium breve</i> ) YIT 10002	910207 910208	養樂多本社股份有限公司(日本)
新穎骨礦化作用蛋白質、DNA、載體表現系統/I244503	pHis-A:hLMP-1s pRc/CMV2:RLMP	940231 940232	美國·艾莫里大學(美國)

說明：1. 上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公告號及專利申請人資料如上表。

2. 任何人可依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供上述生物材料，作為研究及實驗用。  
3.洽詢專線：(03)5223191轉233或513。

## 生物資源保存及研究簡訊 第64期

發行者：財團法人食品工業發展研究所

發行人：劉廷英所長

主編：陳倩琪

編輯：鄭銘仁、傅惠美、邱雪惠

陳智偉、許名宜、廖麗娟

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)522-3191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：彥光打字印刷商行

電話：(03)530-1116

ISSN:1021-7932

GPN:2009001214

ISSN 1021-7932

