

財團法人食品工業發展研究所

第 80 期

生物資源保存及研究簡訊

第22卷第4期

中華民國98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

- ◎ 本所生資中心舉辦「促進微生物之流通與利用論壇」邀約國際專家參與座談，分享各國在生物資源流通與利用之管理經驗

研發成果 2

- ◎ 新服務
- 台灣幹細胞庫介紹

知識專欄 9

- ◎ 造血幹細胞之發展及應用

專利微生物 12

- ◎ 審定公告之專利寄存生物材料

本所生資中心舉辦「促進微生物之流通與利用論壇」

邀約國際專家參與座談，分享各國在生物資源流通與利用之管理經驗



本所生資中心舉辦「促進微生物之流通與利用論壇」，邀約參與論壇之國內外五位專家包括美國菌種保存中心顧問鍾順昌博士(前排左一)及前排左三依序為歐洲菌種聯盟主席Dagmar Fritze博士、世界菌種中心聯盟副主席鈴木健一朗博士、荷蘭菌種中心所長Pedro Crous博士、台灣科技大學教授陳曉慧博士與本所所長陳樹功博士(前排左二)、副所長與生資中心同仁合影。

(圖：生資中心田桂娥小姐)

近年來生物科技發展迅速，展現強大的研發與商業潛力，但也因此使微生物的流通受到更多法規與契約條款的限制。作為國際上生物資源交流平台之菌種中心或生物資源中心(Biological Resource Center, BRC)，必須對此潮流發展採取因應措施，促進微生物流通應用，以協助本國生技產業發展，因此本所於98年11月20日舉辦「促進微生物之流通與利用」論壇，特別邀請到歐洲菌種聯盟(European Culture Collections' Organization, ECCO)主席 Dr. Dagmar Fritze、世界菌種中心聯盟(World Federation of Culture Collections, WFCC)副主席鈴木健一朗博士，以及美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)顧問鍾順昌博士，本所生物資源保存及研究中心智慧財產管理與加值單元主持人陳玉芬女士等人，就上述議題發表專題演講。會中

同時也邀請到我國微生物進出口相關主管機關之代表：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局副局長葉瑩博士和行政院衛生署疾病管制局第五組科長吳文超先生參加與談和報告我國行政上動植物相關微生物輸出入檢疫流程和感染性生物材料輸出入簡介。台灣科技大學科技管理研究所助理教授陳曉慧博士則以學術研究角度參加與談，提出相關微生物流通契約之個人研究心得與討論；同時也邀請產業界代表中天生物科技公司微生物資源處處長莊明恆博士，就產業之心聲提出建言。

會議中各國專家針對微生物流通之契約限制，就各生物資源中心的因應措施提出經驗交流與分享，並報告各國主管機關對於微生物流通之法規限制，以及各菌種中心申請分讓之流程設計，其要點在於需符合各國法律規範，以及生物多樣性公約之要求。其中鈴木健一朗博士更進一步說明日本NBRC與東南亞各國菌種中心間，於生物多樣性公約(Convention of Biological Diversity, CBD)之架構下，進行雙邊合作交流之經驗與案例，並說明日本NBRC建立多種寄存模式，供顧客依不同需求決定寄存方式，進一步提供NBRC於微生物探勘、引進、鑑定與特性分析方面的服務案例。鍾順昌博士則以建立微生物管理新典範為題，針對由菌種中心(Culture Collections)轉型為生物資源中心(BRC)過程中，開發加值服務與以BRC為中心積極建立相關產品與操作標準的發展過程，提出詳細的報告，期許本所能以轉型為真正生物資源中心作為發展目標。會中與談人則建議各國菌種中心應先確定其中心任務後，再就微生物流通建立符合其任務之運作模式。而與會專家則就我國法規與執法經驗提出說明，並建議進行微生物相關研究或商業應用，於起始階段便應注意到相關法規的規範，以及早採取必要之因應措施。

本次論壇集合各國專家以及我國產官學代表，針對促進微生物流通應用，以及日後生物資源中心發展方向兩項重要課題，各方專家都提出具有前瞻性與國際視野的寶貴意見，並依各個面向的需求，進行廣泛的意見交換，可促進我國生技產業對生物材料的需求與政策制訂之交流，並可作為本所訂定日後發展策略的重要參考指標。

(文:生資中心 葉慧蓉小姐、陳思齊先生)

新服務

台灣幹細胞庫介紹

生資中心／研究員
陳韶瑩

I. 台灣幹細胞庫建構 之緣起

胚胎幹細胞：

當受精卵形成囊胚(約5~7天)時，它的外表是一層扁平細胞組成的滋養層，可發育成胚胎的支援組織如胎盤等，它的中心有一群內細胞團，這些細胞在體外環境下培養時，可進一步分裂和分化形成內、中、外三個胚層，每個胚層再分別分化，最後形成人體的各種組織和器官。在此處值得特別注意的是，胚胎幹細胞不同於其它種類細胞，其分化功能是多元而且幾乎沒有限制的。所以胚胎幹細胞具有應用於細胞療法的潛力，用以修補取代受損害的任一組織與器官。除臨床應用外，在基礎研究上胚胎幹細胞也可做為從事細胞發育、分裂、更新、誘導分化、癌化等的研究模式細胞和藥物篩選上進行細胞毒性或功能分析上極佳的平台。

一九九八年，美國科學家詹姆士·湯姆生(James Thomson)從不孕症治療過程中產生的多餘受精卵取得內細胞團，成功的將其在體外大量複製培養，此即所謂的人類胚胎幹細胞，世界各國皆意識到胚胎幹細胞即將帶來新一波的醫學革命，紛紛成立專屬的幹細胞庫。

台灣幹細胞庫：

胚胎幹細胞之培養技術需要有專業的技術人員來執行，食品工業發展研究所「生物資源保存及研究中心(簡稱生資中心)」長期以來執行經濟部技術處之科技專案計畫--產業用生物資源的收集與開發，也是我國唯一被指定之專利生物材料寄存場所，同時提供農委會的農業微生物種原庫及國家衛生研究院的細胞庫核心設施。為因應後基因體時代的來臨，生資中心於2001年開始投入微生物基因體學研究，建立系統化基因庫及遺傳資

源保存與管理體系，成為兼具微生物資源、細胞資源與基因資源的保存與開發應用的多功能生物資源中心。基於以上的充分經驗與已建制之服務平台，生資中心進一步成為台灣幹細胞庫建構的設置處。

在「行政院國家科學技術發展基金」經費支助下，生資中心自97年七月開始執行「台灣幹細胞庫建置計畫」。首先為結合產學研各界研發資源及能力，促進幹細胞庫建置計畫執行績效，本所特別成立『幹細胞指導委員會』，推動幹細胞庫之合作計劃及幹細胞資源分享平台。幹細胞指導委員會的成員皆為產、官、學、研、醫界的首選菁英，其成員與專長如表1。另為建置符合GLP精神的幹細胞操作室和幹細胞實驗室之設施，本所亦成立『幹細胞實驗室建置審查委員會』，邀集所外具有實際相關經驗的專家九位和本所人員三位組成，負責研議討論和審查實驗室之規劃與建置廠商遴選等。同時，計畫收集現有台灣的研究學者所建立的人類胚胎幹細胞株，保存並公開於台灣幹細胞庫，提供國內其他研究人員申請使用。台灣幹細胞庫也將建立符合國際規格和學術期刊要求之人類胚胎幹細胞株的品管與鑑定的相關資料和標準操作規範，並將幹細胞相關資訊和服務即時公佈於網站，協助研究人員可專注於開發與應用之研究工作。

幹細胞指導委員會

人類胚胎幹細胞株之建立必須經過機構之倫理委員會審查同意操作，並取得捐贈者簽署書面同意後，將不孕症治療過程中，藉由體外授精產生的多

餘冷凍胚胎進行內細胞團之取出和體外培養，來源珍貴，且需要長時間細心照顧和技術支援，方能成功建立胚胎幹細胞株。政府方面，行政院院會(第三一〇二次院會)於2008年7月24日通過「人類胚胎及胚胎幹細胞研究條例」草案，在尊重人性尊嚴及胚胎生命，同時保障研究自由之平衡下，台灣幹細胞庫已完成人類胚胎幹細胞株的細胞取得流程的程序，申請人於網路上下載「生物材料移轉使用承諾書」，簽署後，郵寄給細胞株原始「寄存人」以獲得「寄存人」同意。此外申請人申請胚胎幹細胞株時，應出具所屬機構之生物安全委員會和機構倫理委員會之同意書，經食品所「幹細胞指導委員會」審查。幹細胞指導委員會將針對人類胚胎幹細胞研究的倫理學及科學性進行綜合審查與建議。

II. 符合GLP原則的幹細胞操作室和幹細胞實驗室之設施

自一九九八年第一株人類胚胎幹細胞問世，新興的「幹細胞醫學」掀起空前的熱潮，各國積極招募學者傾力於幹細胞或再生醫學研究，擬一舉提升科技水準、商業利益及國際形象。為了儘速建立優異的幹細胞操作環境，本計劃經長時間的討論和徵詢許多專家意見，已於98年5月29日完成招標(240 m²)實驗室硬體工程公告發包，包括101m²幹細胞操作區，內含3間 class 1000之幹細胞操作室，和139 m²之一般幹細胞實驗室)，九月完工。幹細胞操作室的空氣皆經高效能率網淨化

去除污染物。此外操作室保持正壓以避免未經高效能率網的非潔淨空氣進入，達到1000等

表1、食品工業發展研究所幹細胞指導委員會委員名單

名稱	姓名	專長
主任委員	陳樹功	1.生技產業 2.專案管理
委員 (醫學主管)	周松男	1.胚胎學 2.婦產科醫學 3.幹細胞生技
委員 (所外專家)	游正博	1.幹細胞學 2.基因體學 3.國際合作
委員 (所外專家)	林欣榮	1.神經修復 2.幹細胞學 3.臨床試驗 4.國際合作
委員 (所外專家)	邱英明	1.神經發育 2.幹細胞學 3.組織工學
委員 (所外專家)	王德原	1.GTP 2.法規 3.細胞治療規範
委員 (所外專家)	陳信孚	1.生殖細胞學 2.幹細胞學
委員 (所外專家)	陳婉昕	1.幹細胞學 2.組織工學 3.生物技術
委員 (所外專家)	李茂盛	1.不孕症治療 2.胚胎學 3.生殖細胞
委員 (所外專家)	呂志鋒	1.臍帶血保存 2.血液幹細胞 3.生技產業
委員	廖啓成	1.生物資源 2.專利管理 3.專案管理
委員	袁國芳	1.生物資源 2.專案管理 3.生技研發
委員	黃效民	1.細胞庫管理 2.台灣幹細胞庫建置計畫 主持人

級的標準(ISO 6或每立方英尺大於0.5微米之顆粒少於1000個)。實驗人員在進入更衣室後，需依照一定更衣程序，以杜絕污染物的帶入，最重要的是我們要把幹細胞操作室和幹細胞實驗室之硬體設施和軟體操作達到優良實驗操作之要求。優良實驗室操作 (Good Laboratory Practices，以下簡稱 GLP) 是一種嚴謹的管理概念，在進行研究過程中，有關其執行、監督、記錄、歸檔等行政組織運作要有優質記錄系統。

人員動線應單純化以避免交叉汙染。製劑的傳遞動線需經由傳遞箱傳遞於各個房間。各個子空間以「互鎖式設計」的觀念做為規劃，以確保單一方向進出，以避免交叉汙染，並且安裝壓差計及各項警報裝置。幹細胞庫設施還有門禁管理系統、監視系統及中央自動監控系統，以管理人員進出，及溫溼度、壓差、各項儀器之參數等監控(圖1)。希望藉由這樣嚴謹的幹細胞操作室和幹細胞實驗室之設施所出來的試驗品質可以與國際接軌，以利我國幹細胞研究和將來的研發成果與產品進軍全球國際市場。我們能夠把招標與工程設計做好必須要特別感謝本所「幹細胞實驗室建置審查委員會」、本所行政採購人員和系統之協助，尤其是衛生署藥物食品檢驗局王德原科長、工研院量測技術發展中心顏君哲博士、工研院生物醫學所幹細胞研究室陳婉昕博士、施冰如博士等在規劃時期的各項具體建議與協助。

成員

台灣幹細胞庫計畫主持人是生資中心資深研究員兼副主任

黃效民博士。黃博士長期以來從事於細胞培養、鑑定、品管和細胞庫的管理，尤其是ISO9001系統的認證和品質管制，針對細胞的培養、冷凍保存均有豐富資歷，也是國際幹細胞學會的會員、體外生物學學會會員、美國細胞生物學會會員、台灣幹細胞學會會員、台灣食品科學技術學會會員。此外，黃博士熱忱教導傳授與分享各種細胞相關的知識與經驗，並主持許多國內外的細胞培養之訓練課程和研討會。陳韶瑩博士受到黃博士的熱忱所感動，在今年初加入這項計劃。陳博士在美時曾參與跨基礎研究與臨床團隊的轉譯醫學(translational medicine)的計劃，也曾是智慧局的專利審查員。現今任務是協助黃博士訓練台灣幹細胞庫人員進行幹細胞培養與鑑定，並促進國際協同合

作與新智慧財產權產出的機會。

與兩位博士一同努力的，還有在本所服務皆超過十二年的許麗鳳小姐與陳瓊雲小姐，這兩位同仁，對本所細胞庫的運作系統以及一般細胞培養十分熟悉，她們豐富經歷也成現在新實驗室硬體工程與幹細胞服務平台的建立。而吳美玲小姐自七年前加入黃博士團隊，負責血液與間葉幹細胞之分離、增殖培養以及DNA指紋分析鑑定，協助胚胎幹細胞之特性鑑定。官佳儀小姐和黃冠融先生負責台灣幹細胞庫網站設計工作，他們賦予網站豐富的架構和美麗活潑的圖表、照片與影像。楊瑤貞小姐剛加入這個團隊，學習並參與胚胎幹細胞的培養與鑑定技術，將來也會為幹細胞網站錄製相關檔案(圖2)。



圖1、台灣幹細胞庫設施



圖2、台灣幹細胞庫成員由左至右依序為黃效民資深研究員、陳韶瑩研究員、陳瓊雲副研究員、楊瑤貞副研究員、吳美玲助理技師、許麗鳳助理技師及官佳儀助理技師。

III. 人類胚胎幹細胞的繼代與鑑定

人類胚胎幹細胞的繼代培養

人類胚胎幹細胞的繼代培養不同於一般細胞的兩大要點是(1)維持胚胎幹細胞不分化的狀態大多需要用餵養細胞(Feeder cells)(2)做繼代培養時以酵素作用，若將細胞打散成單一分開細胞時，幹細胞就不易存活，即使存活細胞亦容易分化，所以要以團塊繼代。

餵養細胞(Feeder cells):

餵養細胞(Feeder cells)的角色是提供營養物質和生長激素，營造一個類似in vivo的環境，來幫助胚胎幹細胞的生長。最常用的餵養細胞是小鼠胚胎纖維母細胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)或STO 纖維母細胞株。有些科學家考慮到動物性污染問題，則會使用人類包皮纖維母細胞(human foreskin fibroblast, HFF)作為餵養細胞。不論是用那一種餵養細胞，皆在培養滿盤時使用Mitomycin C或者是 γ 射線處理，來使細胞停止分裂增生，以達到單純幹細胞支持者的角色。

繼代培養

有二種處理方式，一為機械式切割法(mechanical dissection)，另一種為酵素處理法(enzyme digestion)。機械式切割法主要是利用玻璃刀，將人類胚胎幹細胞團塊於解剖顯微鏡下，小心地將團塊切割成數小塊到數十小塊，再將此些小塊收集後，置於新的培養基或小鼠胚纖維母細胞上，此方式最大之優點為可以將已分化的細胞剔

除，而收集未分化之幹細胞；然而此種方式之缺點為耗時和耗力，且須由有經驗和訓練之嫻熟技術人員操作。另一種方法為使用collagenase IV 酵素處理胚胎幹細胞，只要將酵素溶液加入培養盤，胚胎幹細胞團塊會自動脫落，再以微量吸管上下吸放數次以收集團塊(圖3)。有學者認為此種方式無法將已/未分化之胚胎幹細胞作有效區隔和去除，在連續數次繼代培養之過程中，容易造成細胞分化比率愈來愈高，科學家有不同喜好，依不同之使用目的選擇繼代之方式。

台灣幹細胞庫也負責胚胎幹細胞之特性鑑定，以欲鑑定未分化胚胎幹細胞為例，細胞之細胞膜表面會呈現一些專一標誌抗原如SSEA-3 (stage-specific embryonic antigens)、 SSEA-4、 TRA-1-60 和 TRA-1-81而可被抗體偵測(圖4)。雖然網路上

可以查詢實驗步驟供參考，但實驗效果卻可能不同。最近數年來，國際間對於人類胚胎幹細胞之實驗用藥劑都走入標準化建立，比如進行固定胚胎幹

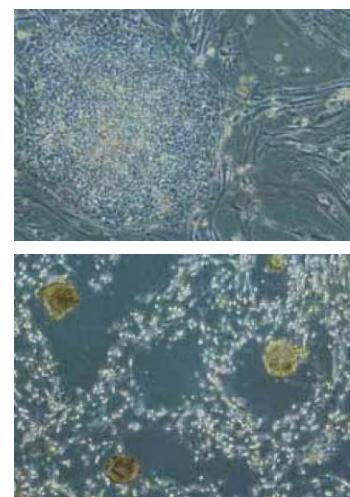


圖3、人類胚胎幹細胞之生長形態：(上)未分化之胚胎幹細胞群落，周圍為飼養層細胞(下)利用collagenase IV處理，人類胚胎幹細胞脫落之情形(圖：黃效民博士提供)

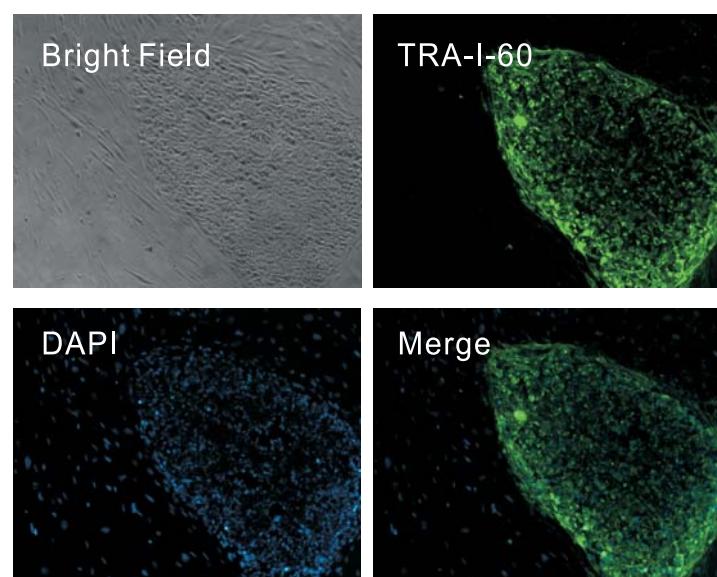


圖4、人類胚胎幹細胞培養在餵養細胞上，明視野(左上)。免疫細胞化學染色法進行TRA-1-60表現偵測，綠色螢光為TRA-1-60正反應(右上)，DAPI是一種可以與DNA結合的螢光染料，用以標示細胞核之所在(左下)，右下為TRA-1-60與DAPI圖片之重疊。(圖：楊瑤貞與陳韶瑩提供)

細胞的固定液，抗體廠牌與產品碼，抗體作用的最佳溫度與時間等等，都應該清楚陳述。台灣幹細胞庫正努力當中，希望在不久的將來有完整的人類胚胎幹細胞株的品管與鑑定的相關標準操作規範，圖文甚至影音並茂。現階段為與國際胚胎幹細胞研究團隊之水準接軌，陳博士將依據國際幹細胞論壇(ISCF)所發表之文獻，制定國際胚胎幹細胞培養之標準操作流程 (Standard Operation Procedure, SOP)，英文版初稿已完成。預計在明年出版中文版與針對臺灣本土幹細胞株的標準操作流程。

IV. 教育訓練

生資中心與工研院生醫所合作，每年舉辦數次相關的人類胚胎幹細胞培養與鑑定等教育訓練課程，教材內容涵蓋各項技術原理、操作實驗及應用，學員大多肯定藉由分組操作實習，能有效瞭解基本的胚胎幹細胞培養知識與技術、纖維母細胞之製作、胚胎體之製備與幹細胞之免疫化學鑑定及分子生物鑑定。96-98年度我們已開



圖5、人類胚胎幹細胞教育訓練

過8梯次的人類胚胎幹細胞教育訓練(圖5)。參加的學員來自全國對於人類胚胎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，職業別囊括教授、醫師、研究員、醫檢師、生技公司員工、研究生等等。希望學員在生資中心上完課之後，不只是對幹細胞有進一步的認識，學員間之人脈與情感的建立連結也必有所助益，應該有助跨領域和跨機構之合作研究，落實產業技術應用的理想。

V. 台灣幹細胞庫網站設置

台灣幹細胞庫網站架設，先由陳韶瑩博士以英文起草，再由陳瓊雲小姐做中文翻譯，官佳儀小姐負責圖表、照片與影像，由生資中心資訊與加值單元協助，現在公開在 <http://tscb.brcrc.firdi.org.tw/> (圖6)，中英文雙語對照，以方便華人與全

球國際學者搜尋資料與了解我們台灣對幹細胞科學與應用的積極與熱忱。此外網站也包含了對於臺灣幹細胞庫的服務說明及相關契約文件之下載(圖7)。為方便網路使用者，我們也提供常用聯結至國內外重要的幹細胞研究網站和學會。

VI. 台灣幹細胞庫之未來發展

擴增幹細胞的收藏種類

台灣幹細胞庫已完成兩梯次國內人類胚胎幹細胞之引進，分別為李茂盛醫師團隊與工研院合作所建立的5株人類胚胎幹細胞株 (hESC TW01-05) 以及台大醫學院陳信孚醫師團隊所建立的3株人類胚胎幹細胞株 (hESC NTU1-3)，未來台灣幹細胞庫希望除積極與美國接洽



圖6、台灣幹細胞庫網站首頁一角

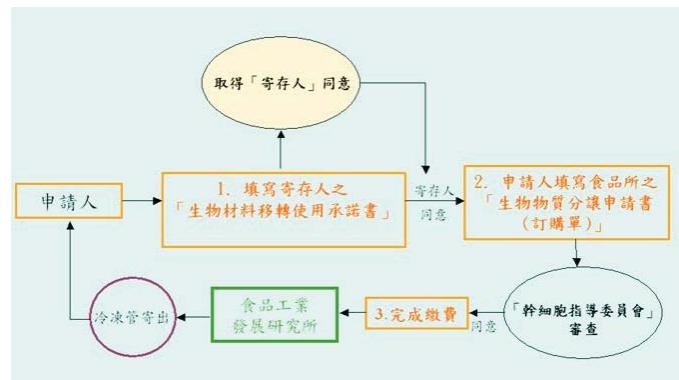


圖7、台灣幹細胞庫網站介紹幹細胞申請流程

引進國外的胚胎幹細胞株外，可以擴增幹細胞的收藏數量與種類，使學者能研究它們在再生醫學之應用或人類發生學上的角色。仔細說明如下：幹細胞之廣泛定義為舉凡具自我更新(self renewal)能力並於適當環境調節下，可分化為不同細胞系(cell lineage)之細胞即稱為幹細胞。若依幹細胞之來源可區分為胚胎幹細胞(embryonic stem cells)及成體幹細胞(adult stem cells)。若是依幹細胞之分化潛能，則可分為1.全能性幹細胞(totipotent stem cells)：每一個全能性幹細胞有能力可發育成一個完整的生物個體，包括胎兒及胎盤，目前只有受精卵和胚胎最初期之8細胞時期前之細胞才能符合此條件。2.多能性幹細胞(pluripotent stem cells)：細胞具有分化成多種細胞或組織能力，此種幹細胞可發育成胎兒，但無法發育成胎盤組織部份，如胚胎幹細胞株即屬多能性幹細胞。此外，源自胚胎性腺之初始生殖細胞(primordial germ cells, PGCs)和胚胎瘤細胞(embyronal carcinoma cells, ECs)亦具有分化成內、中及外胚層等三種胚層細胞之潛能。3.複能性幹細胞(multipotent stem cells, MSCs)：指可以分化成特異性組織之不同細胞，包括造血幹細胞、間葉幹細胞及神經幹細胞等等。成體幹細胞領域因為研究發跡比胚胎幹細胞早，研究成果較為豐碩，在臨床治療使用上有比較多成功的案例，再加上考量到若能用患者自體或是近親的幹細胞進行體外培養、擴增後再植回該病患體內，不僅可避免胚胎幹細胞上倫理道德之爭議，也較無免疫

排斥性等問題的發生，有鑑於此，未來台灣幹細胞庫希望多方收集不同種類的成體幹細胞，目前已有的庫藏包括人類羊膜幹細胞、人類造血幹細胞、脂肪間質幹細胞、人類臍帶間質幹細胞等等。

此外，由產業利益的角度評量，預估2010年國際幹細胞產業達10兆元台幣，其中80%集中於造血幹細胞相關之產品，生資中心之前已開發造血幹細胞相關之無血清培養技術，申請二項多國專利，SCI期刊8篇論文，英文專書一章。相信生資中心將可繼續在幹細胞多元化的課題中獲得具前瞻性之研發成果，以回饋社會。

建立誘導型多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cell-iPSCs)

目前，科學家發現特殊的條件下，可使體細胞「再程式化」，產出具有類幹細胞的狀況，最早由日本京都大學Dr. Shinya Yamanaka (山中伸彌)所提出。他的實驗室曾將四個蛋白質(Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4)的表現基因置入已分化皮膚細胞，竟然使其回轉成具有胚胎幹細胞功能的細胞，Dr. Yamanaka將此種細胞命名為“誘導型多能性幹細胞(iPS: induced pluripotent stem cells)”。美國 Dr. James Thomson 研究團隊也發表利用 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 也可以將人類體細胞重回幹細胞狀態，科學家與醫學家立即想到如果能將病人的體細胞先再程式化變成誘導型多能性幹細胞，再適當地誘導成為特定細胞(如欲治療糖尿病就誘導成胰島細胞或欲治療神經退化病變就誘導成神經

細胞)再移植回病人體內，如此就可以避免長久以來異體移植所耽心的免疫排斥的問題了！所以此iPS技術具極大臨床應用性。科學家正朝如何改善形成誘導型多能性幹細胞的效能與安全性繼續努力，例如c-Myc本身是一個致癌基因，以這樣的iPS細胞所生出的老鼠有兩成會長出腫瘤。另外，傳遞基因的工具是反轉錄病毒(retrovirus)，所以在臨床使用上也有安全性之顧慮。

加強與醫藥界的戶動

在臺灣幹細胞庫計劃下，我們聘請台大醫學院榮譽教授周松男博士擔任醫學主管。周教授曾榮獲國際與國內多項大獎，在臨床學術界具舉足輕重的領袖地位，獲獎無數，包括成為美國婦癌醫學研究院(SGO, USA)首位台灣外籍院士、接受肯定而被美國Marquis Who's Who in Medicine and Healthcare(1999-2000年，2nd Edition)登錄在醫學與醫療世界名人錄等等。周教授獲得1998年台灣省立台南第一高級中學第三屆校友傑出成就獎，更加深與年輕學子互動的熱忱，積極參加入學甄試評審與論文委員之工作。他所指導的團隊發表了多篇高品質的研究論文在優秀期刊上。周教授實為不可多得的學者，對青年學人亦是良師，依其豐富之相關經驗，應可指引臺灣幹細胞庫走向更美好的未來。

VII. 台灣幹細胞庫宣傳推廣活動

為方便日後學界和產業界使用幹細胞庫之資源，台灣幹細胞庫宣傳推廣活動也熱絡進行

中。台灣幹細胞庫資料經由台灣幹細胞學會創始會長游正博博士和國家衛生研究院之協助已收入於國際幹細胞論壇組織(International Stem Cell Forum, ISCF)之網頁，同時加入國際幹細胞庫論壇會議等，增加台灣幹細胞成果之國際能見度。今年5月16日時黃效民博士參加台灣幹細胞學會年會，受邀簡報台灣幹細胞庫建置計畫、7月23~26日在台北世貿中心舉行的第七屆臺灣生技月展覽(Bio Taiwan 2009)，本所也呈現台灣幹細胞庫的計劃成果，11月6~8日 Biotechnology Taiwan 2009 國際幹細胞、疫苗與分子醫學研討會我們也積極參與介紹台灣幹細胞庫之平台(圖8)。我們衷心希望透過不斷的推廣與交流，展現台灣幹細胞庫計劃成果，惟有讓大家知道這個資源，才有被善加利用的機會。

VIII. 結語

歷經十多年的努力，生資中心細胞庫的發展如圖9所示，細胞庫不只庫存量上升，保存的種類也越來越廣，而且藉由幹



圖8、陳韶瑩博士參加國家生技醫療發展基金會舉辦的 Biotechnology Taiwan 2009，周松男教授蒞臨台灣幹細胞庫海報展示區給予指導。

細胞庫的連結，細胞庫不再單純的從事生物資源保存，延伸至新興生醫技術研發及產業發展的層面。

在本所前所長劉廷英博士、現任陳樹功所長、廖啓成副所長、生資中心袁國芳主任的大力支持下，同時國內優秀的幹細胞研究人員，願意將他們花費時間與心力所建立之人類胚胎幹細胞，公開寄存在台灣幹細胞庫，以提供國內外研究人員申請使用，特別是李茂盛醫師、陳信孚醫師、楊壁嘉小姐、呂仁博士、游正博博士等和許多人員慷慨相助與無私的幫忙和建議，使台灣幹細胞庫一步步由構想、建置、進步與增進。也期待各界透過台灣幹細胞庫網站的資料分享，提供更多意見，交換研究心得，共同為台灣幹細胞的研究而努力。

參考文獻

- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R. & Itskovitz-Eldor, J. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 68(6):2150-6.
- Brandenberger, R., Wei, H., Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G. J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M. S., Mandalam, R., Lebkowski, J. & Stanton, L. W. 2004. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat. Biotechnol.* 22:707716.
- Chen, H. F., Kuo, H. C., Chien, C. L., Shun, C. T., Yao, Y. L., Ip, P. L., Chuang, C. Y., Wang, C. C., Yang, Y. S. & Ho, H. N. 2007. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Human Reproduction* 22(2):567-577.
- Cheng EH, Chen W, Chang SY, Huang JJ, Huang CC, Huang LS, Liu CH, Lee MS. 2008. Blastocoele volume is related to successful establishment of human embryonic stem cell lines. *Reprod Biomed Online* 17(3):436-44.
- Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, Ying SY. 2008. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*. 14(10):2115-24.
- Lu J, Hou R, Booth CJ, Yang SH, Snyder M. 2006. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(15):5688-93.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. SS., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-20.

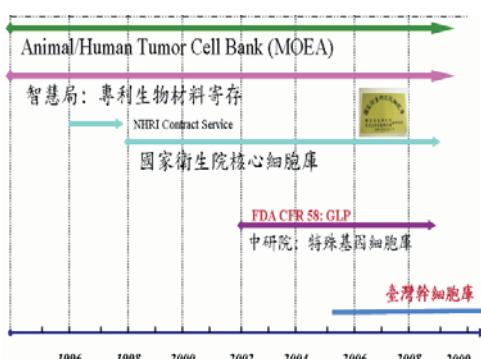


圖9、本中心細胞庫的發展示意圖。

造血幹細胞之發展及應用

生資中心／副研究員
張頤賓

I、前言

食品所生物資源保存及研究中心(簡稱生資中心)自民國83年起開始進行細胞庫之工作，迄今已保存超過一萬株以上的細胞(包括了細胞株、癌細胞、轉形細胞與初代細胞)，除了快速、穩定的提供台灣產、學、研界品質優良的各種細胞外，為了因應近年來幹細胞研究的快速發展，今年更完成建立了台灣幹細胞庫第一期計畫(詳見本期簡訊之研發成果介紹)，並積極從事幹細胞資源應用的開發與研究，以下將針對造血幹細胞相關的最新研究與技術發展上，做一個深入淺出的介紹。

II、造血幹細胞的簡介

造血幹細胞是指從血液或是骨髓中分離出的一種具有1.自我更新能力(self-renewal)；2.能分化成各種成熟的血液與淋巴細胞；和3.能夠從骨髓移動到全身的循環系統，也具有回歸骨髓(homing)能力的成體幹細胞。

人體內的血液中存在著多種不同血球細胞，主要分為淋巴系細胞與髓系細胞，都是由原始的造血幹細胞分化而來。淋

巴細胞包括B淋巴細胞(B lymphocyte)、T淋巴細胞(T lymphocyte)和自然殺手細胞(nature killer cell)，負責全身性的免疫系統。髓系血球細胞包括白血球(leucocyte)、紅血球(erythrocyte)與血小板(platelet)。白血球為有核細胞，壽命多半在36小時至數天，可再細分為顆粒性白血球(granular leucocyte)與無顆粒性白血球(agranular leucocyte)。顆粒性白血球包括嗜中性白血球(neutrophil)、嗜酸性白血球(eosinophil)與嗜鹼性白血球(basophil)；無顆粒性白血球則包括了單核球(monocyte)與巨噬細胞(macrophage)。白血球具有吞噬異物、消除病變衰老所造成的不正常細胞、調節免疫反應與防止體內血塊形成的功能。成熟紅血球不帶有細胞核，壽命為120天，內含有大量的血紅素，具有攜帶氧氣與二氧化碳的功能。血小板亦不帶有細胞核，也不具有完整的細胞結構，是由巨核細胞(megakaryocyte)胞質碎裂而來，壽命約為5-9天，功能為造成凝血反應，以避免體液與血液的大量流失。

III、造血幹細胞的應用

目前造血幹細胞已經成熟的

應用在治療惡性血液方面的疾病(血液性腫瘤與遺傳性血液功能缺陷疾病)達五十年之久，針對患者進行大劑量的化療(chemotherapy)以及放射線治療(radiotherapy)，以破壞全身的造血系統，再進行造血幹細胞的移植，以達到造血與免疫功能重建的目的。

此外，根據造血幹細胞的增殖與分化能力，若能將造血幹細胞於體外大量的增殖並予以專一誘導，可產生大量的成熟功能性血液細胞，以做為未來細胞與免疫治療的基礎。例如誘導為血小板與紅血球以做為細胞之治療之用，或是誘導為自然殺手細胞與樹突狀細胞以為免疫治療之用。

雖然造血幹細胞是目前在臨床治療上的應用層面最廣泛，也是技術發展最成熟的幹細胞，然而應用上仍有細胞數量不足的瓶頸有待突破。本所細胞單元也在92-95年生資科專四年計畫中，積極投入“造血幹細胞體外無血清增殖培養系統”，以突破造血幹細胞數量不足等的限制，不僅能在七天內使得造血幹細胞大量增殖30倍以上，在其功能性上，包括細胞表面抗原、細胞群落形成能力、細胞長期生長能力、端粒酶活性以及動物移植試驗上都證實其仍保有造血幹細胞特性。

除了探討如何於體外增生造血幹細胞數量以便於臨床移植使用，目前的研究更著重於幹細胞本身的分化地位，希望可以體外培養方式，使造血幹細胞更進一步誘導成末端的特定血液細胞，用來取代或恢復某種血液細胞不足所造成的疾

病，期盼能比移植造血幹細胞有更專一且快速的治療。以下針對幾種血液細胞的研究發展進行探討。

首先是最常見的紅血球細胞。世界各地的醫院每年需要大量血液，但捐獻與庫存的血液量卻無法滿足此一需求，原因也包括了紅血球之血型與抗原配對性的問題，而人造血液或許可解決這種難題。一般健康人平均每200毫升血液中有2萬億個紅血球，其主要功能是運輸氧、二氧化碳、電解質、葡萄糖以及氨基酸等物質，因此科學家們首先需要解決體外大量的培養人造紅血球的課題。有關造血幹細胞在血液細胞的體外誘導增殖方面，已有許多相關的研究，近年來則有更大的進步。2002年時Neildez-Nguyen等人發展了可大量增殖並誘導分化成紅血球之前趨細胞的方法，這是近年來第一個可從造血幹細胞誘導分化成紅血球細胞的例子。Neildez-Nguyen等人接下來更發展了一連串的成熟紅血球誘導的培養方法，為接下來相關類型的研究開啓序幕。到了2006年，Miharada等人更是改進之前的培養方法，利用了無血清與不需Feeder Layer的方式，發展了另一套成熟紅血球之體外增殖培養的系統，可以大量的增殖與誘導造血幹細胞往紅血球分化，這對於日後臨床醫學的應用上，有著極大的貢獻。2008年Baek與同事在實驗室內發展了另一套系統，藉由模擬骨髓之造血幹細胞生存環境，以臍帶血分離之間葉幹細胞作為Feeder Layer並培養出成熟紅血球細胞。Baek等人接下來也發現加入一些介面活性劑使得紅血球分化過程中之去核

(Enucleation)階段更能維持完整的形態，也提供相關研究者另一種可行的做法。而利用造血幹細胞增殖的人造血液還能有效避免輸血時的感染，包括肝炎、愛滋病等靠著血液感染的疾病。另一方面人造紅血球因沒有攜帶細胞核的構造，也避兔了移植後產生癌化的風險。大體來說造血幹細胞分化成紅血球的特性，具有很高的治療潛力得以解決有關紅血球方面的疾病。

另一部分為巨核細胞(Megakaryocytes, MKs)，主要在骨髓中成熟以及釋放成血小板，也因此被稱為血小板的前驅細胞，巨核細胞與血小板在凝血過程(thrombopoiesis)上扮演重要的腳色。在人體中，巨核細胞的多寡會直接影響到血小板的產生，而血液的凝固以及血栓(thrombus)的形成則是與血小板息息相關，因此，一些血液疾病的產生可歸咎於不正常的巨核細胞功能或是不正常的血小板功能，例如原發性血小板過多症(Essential thrombocythemia, ET)、血栓囊血球減少(Amegakaryocytic thrombocytopenia, AMT)等。而巨核細胞在體外實驗，可追溯到1996年由Schattner團隊將骨髓內的巨核細胞於體外進行增生放大，到了1997年Bertolini等人可將周邊血的前驅細胞進一步於體外誘導成巨核細胞，而由臍帶血造血幹細胞誘導成巨核細胞，則要到2002年由Dr. Woo及其團隊開始，該團隊利用Thrombopoietin (TPO)細胞激素於體外刺激造血幹細胞，使其走向分化路徑成為巨核細胞，實驗中也證實TPO對於巨核細胞的分化以及成熟上扮演重要的角色。也因上述的實驗開啓了

許多體外誘導生成巨核細胞的技術，但在造血幹細胞經過體外誘導培養成巨核細胞的過程中，如何調節細胞所處培養環境，對巨核細胞誘導效果的好壞影響甚大，包括：溫度、pH值、溶氧壓力(oxygen tension, pO₂)以及添加生長因子等因素都是重要的影響因子。

由臍帶血造血幹細胞為來源誘導分化成血小板前驅細胞-巨核細胞，雖然具有誘導增殖快速的優點，但是，其中仍然有許多尚未解決的缺點與問題如下說明：

- 1.由於臍帶血所含之造血幹細胞總數不足，直接體外誘導成有功能之巨核細胞數目太低以及培養時間過長。
- 2.以臍帶血幹細胞進行移植所產生之巨核細胞的多核性(ploidy)不足(2N細胞佔大多數)，如此會進一步影響形成血小板的數量，並且延長了移植後恢復所需的時間。
- 3.直接使用造血幹細胞移植進入患者體內，無法有效的直接形成特定的血小板細胞，因此無法有效控制及預測針對某一特定疾病進行移植治療。
- 4.造血幹細胞進行體外誘導成血小板前驅細胞的過程中，不同的物理環境(例如：pH, pO₂)以及提供的化學刺激物(例如：cytokine, chemokine)，甚至無血清(serum-free)化後之培養環境，都會影響造血幹細胞的分化特性，最適化的培養環境條件參數尚未有定論。

造血幹細胞移植後的血小板低下症(post-transplantation thrombocytopenia)，常發生於經化療後再移植幹細胞之血癌病患身上。因此額外移植體外誘

導之巨核細胞做為體內生成血小板的前驅細胞，被考慮成為一種可行的解決方法。動物實驗是一種臨床前的實驗，用以評估使用於臨床治療之可行性與否。而在目前關於巨核細胞的移植探討與血小板生成之動物實驗文獻與數據較少，主要原因為目前尚未建立一種與血小板不全相關之動物模式。

最後一部分是自然殺手細胞(Nature killer cells)，簡稱為NK細胞，是一種淋巴細胞，屬於先天性免疫系統的一部份，可直接殺死癌細胞和被病毒感染的細胞，非特異性地抵抗外來病原與微生物。此細胞也是由造血幹細胞分化而來，目前被認為是個極富潛力用來作為細胞免疫療法的生物材料。但近年來能將造血幹細胞分離並誘導出NK細胞的文獻很少，在1992年時Dr. Miller及其研究團隊從骨髓誘導培養出NK細胞，到了2007年Dr. Chan等人也從循環的周邊血液中誘導培養出NK細胞，但從臍帶血來源的造血幹細胞，發展卻是相對緩慢的。在2000年Kobari等人發表了無血清增殖臍帶血CD34⁺(造血幹細胞表面抗原)細胞與小鼠基質細胞株MS5共同培養可以

誘導出具有CD3⁻CD56⁺表現之NK細胞。人類身體中的NK細胞可分為2個族群，其中90%人類NK細胞為中度表現CD56，即為CD56^{dim}，高度表現CD16⁺(Fc_yRIII)，CD16⁺會與抗體結合，主導ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)的作用，具有較高的細胞毒殺能力。另外10%NK細胞則為CD56^{bright}CD16^{dim}或CD56^{bright}CD16⁻，雖然其細胞毒殺能力較弱，但卻富有製造細胞激素的能力，像是IFN-γ、TNF-β、IL-10、IL-13和GM-CSF。而近年發表的文獻中，從造血幹細胞體外誘導成的NK細胞，幾乎都是表現CD56^{bright}CD16⁻，但當CD56^{bright}CD16⁻NK細胞，注入小鼠體中或人類的自體移植與異體移植，均會使CD56^{dim}CD16⁺NK細胞大量增加，也因此目前推測CD56^{bright}CD16⁻NK細胞被認為是形成CD56^{dim}CD16⁺NK細胞的

前驅細胞，惟目前缺乏直接實驗證據能支持這種假說。本所細胞單元也於2008年利用兩階段體外培養方法，大量增殖造血幹細胞並進而誘導成NK細胞，且驗證其具有NK細胞功能性，更有初步的結果證實能在體外製造出 CD56^{dim}CD16⁺ 的NK細胞，使得利用造血幹細胞在體外誘導培養NK細胞更能接近臨床應用，且在純度、數量及功能性上都有不錯的成效。

IV、結語

經過多年來的努力，細胞單元在經濟部、國科會與多方的經費支持下，建立了造血幹細胞一系列的分離、鑑定、保存、培養與誘導分化的技術，並發表多篇專業期刊論文(表1)。此外，多項研究均完成了動物實驗(圖1)，且能提供多樣的應用平台供各界應用。

表1、生資中心細胞單元歷年造血幹細胞相關研究之論文發表

期刊	年份;卷期:頁數	題目
Exp Hematol.	2009;37:1330-9	Characterization and transplantation of induced megakaryocytes from hematopoietic stem cells for rapid platelet recovery by a two-step serum-free procedure
Biochem Biophys Res Commun.	2009;378:112-7	Large Generation of Megakaryocytes from Serum-Free Expanded Human CD34 ⁺ Cells
J Biomed Sci.	2008;15:357-63	Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1β expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages
Methods Mol Biol.	2007;407:165-75	Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells from Human Cord Blood in Serum-Free Conditions
Stem Cells Dev.	2007;16:1043-52	Generation of natural killer cells from serum-free expanded human umbilical cord blood CD34 ⁺ cells
Stem Cells Dev.	2006;15:70-80	Characterization of serum-free ex vivo-expanded hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood CD133 ⁺ cells
Exp Hematol.	2005;33:1273-4	Systematic strategy approach in medium design
Exp Hematol.	2004;32:720-7	A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells
Enzyme Microb Technol.	2003;33:343-52	Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells



圖1、造血幹細胞於NOD/SCID小鼠的動物移植實驗。

審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自 98年10月至98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
α -異麥芽糖基轉移酶製造方法及用途 /I315741	<i>Bacillus globisporus</i> C9	910171	林原生物化學研究所股份有限公司 (日本)
	<i>Bacillus globisporus</i> C11	910172	
	<i>Bacillus globisporus</i> N75	910173	
	<i>Arthrobacter ramosus</i> S1	910174	
	<i>Arthrobacter globiformis</i> A19	910175	
新穎性鼠李糖乳桿菌及代謝產物用途/I316545	鼠李糖乳酸桿菌 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) LV108	910316	統一企業股份有限公司
毛髮生長活性評價方法/I316604	融合瘤(Hybridoma)mAb27	960204	住友電氣工業股份有限公司(日本)
藉由發酵產製標的物質之方法/I316957	<i>Enterobacter agglomerans</i> AJ13355	910121	味之素股份有限公司 (日本)
	<i>Enterobacter agglomerans</i> AJ13356	910122	
	<i>Enterobacter agglomerans</i> AJ13601	910157	
	大腸桿菌(<i>Escherichia coli</i>)237	910230	
	大腸桿菌(<i>Escherichia coli</i>)AJ13069	910231	

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80期

發行者：財團法人食品工業發展研究所

發行人：陳樹功所長

主 編：陳倩琪

編 輯：劉桂郁、黃麗娜、陳美惠、陳韶瑩

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：彥光打字印刷商行

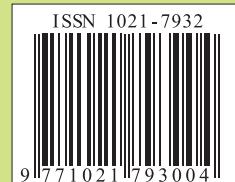
電話：(03)5301116

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