

以水產原料作為細胞培養用血清替代物之可行性



高淑雲、吳純衡

水產試驗所水產加工組

前言

目前動物細胞培養已成為生醫藥品生產、再生醫療及基因治療等產業所重視的技術。但是在進行細胞培養時，如果僅以鹽類、胺基酸、糖類及維生素等營養素作為培養基是不夠的，必須另外添加哺乳動物血清，其中又以牛胚胎血清為主（添加量為 5—20%）（李，2006）。可是，利用培養動物細胞來生產蛋白質（例如：醫療用蛋白質、疫苗與抗體等）（田，1997），會因為牛胚胎血清的批次品質不穩定及組成分複雜（血清成分中含有 500 種以上的蛋白質）與不明確（劉，2001）等因素，而造成蛋白質在純化與精製的過程中更加複雜化。近年來，使用源自於哺乳動物的培養基，更有狂牛症（mad cow disease），又稱牛海綿狀腦病（bovine spongiform encephalopathy, BSE）（寺田，2008）所衍生出的安全隱憂及血清價格昂貴（約佔培養基成本的 75—95%）（Yoshimizu and Kasai, 2005）等問題。因此，作為細胞培養用的培養基原料，必須具備高度的安全性及可大量生產且能穩定供應等經濟條件。基於上述各項因素，開發不添加牛胚胎血清之動物細胞培養技術，已成為生醫藥品生產、再生醫療及基因治療等產業應用上非常重要的課題（高木等，2004）。

血清的種類及成分組成

目前大多數動物細胞在進行體外培養（*in vitro*）時，皆會添加血清。血清的功能除了供應細胞營養成分外，還能促進細胞合成 DNA（李，2006）。但是血清成分十分複雜，除了包含蛋白質、無機鹽類外，另含許多生長因子、激素、細胞附著因子（attachment factors）。作為動物細胞培養主要以牛胚胎血清為主。一般所謂牛胚胎血清不論 FBS（fetal bovine serum）或 FCS（fetal calf serum），指的都是母牛體內尚未出生的牛胚胎，生長因子一般也較豐富。除了牛胚胎血清（FBS）外，還有小牛血清（newborn calf serum）、成牛血清（calf serum）或是其他物種的血清也被應用在一些特殊的細胞培養。

胎牛血清的獲得及產量

由於散養方式的乳牛或肉牛，會透過自然交配而懷孕，在屠宰的過程中，如發現母牛懷孕，就會立即取出生殖系統，將其送至與屠宰場隔離的一個加工區域。而從子宮中取出的牛胚胎，會先將臍帶作打結處理並清理掉羊水及消毒。在不麻醉的情況下，於牛胚胎的兩肋之間直接插入一根針頭到心臟，在真空的條件下血液通過導管被抽入無菌的

血液收集袋內 (Carlo et al., 2002)。迨血液收集後，置於低溫條件下凝集，再以離心方式去掉凝集物而獲得血清。經採血後的牛胚胎，則會被加工成動物飼料或製成脂肪和蛋白質的萃取物 (賀等, 2003)，牛胚胎血清的獲得量取決於牛胚胎的大小和年齡。採血的牛胚胎至少要 3 個月，否則因心臟太小而不易進行採血。1 個 3 月齡的牛胚胎可產生 150 mL 的血清，6 月齡和 9 月齡的牛胚胎可分別產生 350 mL 和 550 mL 血清 (Hodgson, 1995)。據估計，全球每年生產的牛胚胎血清大約為 50 萬公升。因此，要達到這樣的產量，每年需要 100 萬多個牛胚胎 (Anonymous, 1993)，而且牛胚胎血清的生產過程仍有道德上的爭議存在 (賀等, 2003)。

中國倉鼠卵巢細胞應用於蛋白質生產

據文獻指出，中國倉鼠卵巢細胞 (chinese hamster ovary cell, CHO) (圖 1) 為經過美國食品與藥物管理局 (FDA) 核准，可以用來生產臨床用生物藥品的細胞株 (田, 1994)，此細胞株是在 1957 年被分離出來，由於生長快速，是目前生物工程上廣泛使用的細胞株，其所製造出來的蛋白質與天然蛋白質的特性最為相似 (具有生物活性)，而且大部分蛋白質會分泌到培養液中，容易回收。CHO 可用以生產人類顆粒-巨噬細胞群落刺激因子 (hGM-CSF)、抗體及干擾素 (γ -interferon) 等蛋白質。而其中的 hGM-CSF 為具有刺激造血細胞之增生及分化的功能 (Ichiko et al., 1997)。

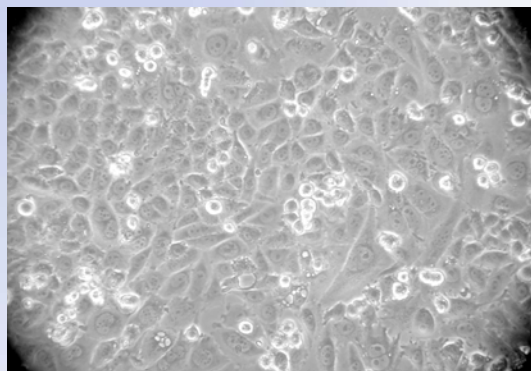


圖 1 中國倉鼠卵巢細胞 (chinese hamster ovary cell, CHO)

魚類血清應用於細胞培養用血清替代物之可行性研究

2004 年高木等人，以嘉鱻 (*Pagrus major*) 血清 (製備流程如圖 2 所示) 取代牛胚胎血清進行細胞培養實驗，結果發現經添加 20% 嘉鱻血清，可促進 CHO 細胞增生能力，效果為添加 10%FCS 的 74%左右，而在提升 hGM-CSF 的分泌能力的表現上，其可達添加 10%FCS 的 60%以上，且相較未添加血清組，具有顯著的差異。根據 Benny 等人 (1999) 報告可知，血清在使用前於 56°C 加熱 30 分鐘，稱之為補體去活化。補體為血清中之蛋白質，因補體參與的反應包括：細胞的溶解反應、平滑肌的收縮及活化淋巴、巨噬細胞及肥大細胞等。Fujiwara 等人 (2009) 採用嘉鱻與青甘鰺 (*Seriola quinqueradiata*) 兩種魚類血清進行取代牛胚胎血清之細胞培養實驗。在實驗設計部分，將青甘鰺、嘉鱻採血，經處理後，得到魚類血清 (未加熱處理組)。另外，以不同溫度 (46、51、56 及 61°C) 進行 30 分鐘加熱 (加熱處理組)。結果顯示，在青甘鰺血清經不同溫度加熱處理對 CHO

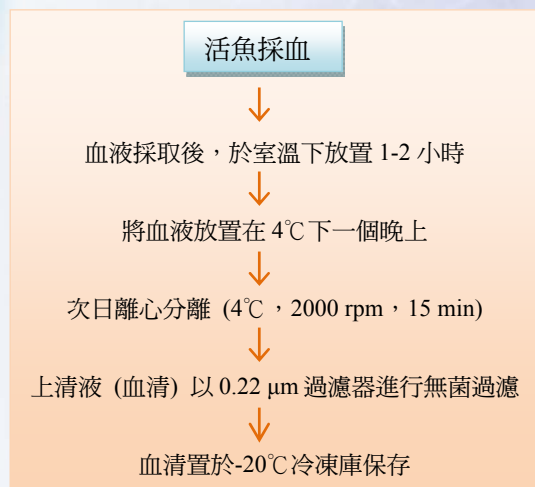


圖 2 嘉鱾血清之製備流程圖 (高木等, 2004)

細胞增生的實驗上，其細胞先以 10%FCS 培養 24 小時後，待細胞黏附後，去除 FCS，以 PBS 清洗。此時加入未經加熱及不同溫度加熱之青甘鰲血清。經培養 120 小時後，以添加經 56°C 加熱 30 分鐘之 10% 青甘鰲血清，促進細胞增生的效果最佳。此外，在不同濃度的青甘鰲血清對 CHO 細胞增生實驗中，以添加 1.25% 青甘鰲血清，促進細胞增生的效果最佳，增生效果可達添加 10%FCS 的 80% 左右，顯示青甘鰲血清在低濃度下即能促進細胞的增生。評估青甘鰲血清與牛胚胎血清未加熱及加熱處理，對 CHO 細胞增生的影響，結果顯示添加 1.25% 青甘鰲血清，可促進細胞增生，經加熱後，細胞增生效果越佳。而嘉鱾血清經加熱處理後，添加 2.5% 即能促進細胞增生，可達添加 10%FCS 的 80% 左右，顯示嘉鱾血清經加熱後，更能提升細胞增生的活性。此外，在添加 1.25% 青甘鰲血清，亦能提升細胞增生能力及促進 hGM-CSF 分泌，且經加熱後，更能促進細胞的增生及提高 hGM-CSF 分泌量。

魚類酵素水解物應用於細胞培養之可行性研究

據日本專利指出 (特開 2003-334068)，以專利方法製造所得之魚類 (含肉、內臟) 酵素水解物，其具有增加細胞活存率及提高細胞生產蛋白質的效果。在本篇專利是以內臟和魚肉之不同比例 (75 : 25 - 40 : 60、65 : 35 - 55 : 45) 混合，經酵素水解後，所得之酵素水解物，添加至無牛胚胎血清之培養基中，進行細胞培養，結果發現以內臟和魚肉之 60 : 40 的比例之酵素水解物，具有增加 CHO 細胞活存率的效果。另在評估 CHO 細胞生產抗體的表現上，也以內臟和魚肉之 60 : 40 的比例之酵素水解物，其促進細胞分泌抗體的效果，優於單獨使用魚肉或單獨使用內臟之酵素水解物。在另一篇的日本專利 (特開 2004-033227)，亦以專利方法製造所得之魚肉酵素水解物與牛肉酵素水解物作比較，兩者皆能促進 CHO 細胞增生，但在提升分泌抗體的效果，以魚肉酵素水解物較佳。

結語

據上述文獻與專利得知，魚類血液或魚類 (含肉、內臟) 酵素水解物，應用於動物細胞培養，不僅能提高細胞增生能力及促進細胞生產蛋白質的效果，更具備高度的安全性 (可避免疫病問題) 與有效的降低培養成本及減少哺乳動物血清的使用量 (牛胚胎血清的生產過程仍有道德上的爭議) 等。由此顯見，水產原料深具開發作為細胞培養用之哺乳動物血清替代物的潛力。