

產學合作案結案報告書

華生技 101 產學字 009-1 號(4/5)

建構免疫細胞低溫 P2 保存實驗室之設計及開發- / 免疫細胞培養之設備規劃

甲方：光輝生命醫學股份有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

生物科技系

計劃主持人：鍾竺均、吳思節

摘要

近年食品安全與環境污染問題頻傳，因此，人身安全可透過食用與環境暴露而造成健康危害。衛生福利部公布民國 104 年國人十大死因，以慢性疾病為主，死亡率第一名為惡性腫瘤，並已連續 34 年高居國人死因首位。惡性腫瘤之治療或預防可透過切除(外科手術)、化學治療、免疫療法、輻射線治療與單株抗體(標靶)療法等。其中光輝生命醫學公司所專利發展之NK殺手細胞療法，為目前市場之主流發展技術，因為此法可達到預防及治療之雙重功能，對於某些腫瘤，雖然無法治癒，但可以達到減輕病痛與阻止病情惡化之功效。為將自身抽取之少量NK殺手細胞於體外活化或增殖培養，選擇適合之硬體設施，以達成防止細胞污染與增加細胞複製之成效，是非常重要的。本計畫歷經四年之執行與評估，考量人物流之動線規劃、設備之功能性/穩定度與四年平均維修及硬體成本，對於設置之細胞培養、儲存與分析設備，進行整體評估，根據最新之維護情形及報價，建議二氧化碳培養箱採用編號I₃機型，高速離心機採用編號C₃機型，冷凍高速離心機採用編號F₁機型，液態氮儲存桶採用編號N₁機型與酵素免疫分析儀採用E₁機型，如此之組合將可滿足免疫細胞培養室設備運用、效能與經費運用之最佳規劃。

關鍵詞：效能檢核、細胞培養、細胞療法、NK 殺手細胞

前言與文獻回顧

免疫細胞(immunocyte)，乃指能夠參與免疫反應的細胞，其包括可辨識外來抗原，同時產生相對應的細胞，這些細胞常常歸屬為淋巴細胞。這些細胞中最重要的是 T 淋巴細胞(T lymphocytes)與 B 淋巴細胞(B lymphocytes)，其次還包括單核細胞(Monocytes)、巨噬細胞(Macrophages)、顆粒細胞(Granulocytes)、肥大細胞(Mast cells)與輔佐細胞(Accessory cells)，有時還包括所謂的前體細胞(Precursor cells)。這些免疫細胞中，自然殺手細胞(Natural killer cells, NK cells)屬於非特異性，對於殺滅之對象有廣泛之特性，而常見之特異性免疫細胞，例如 T 細胞和 B 細胞，專一性較高。

殺手細胞或所謂自然殺手細胞，則為本研究五年期主要分離、培養及儲存之對象。因為有關特異性細胞對於免疫或疾病預防或治療之功能，已有眾多科學家投入研究，而殺手細胞此類非特異性細胞被研究的相對較少，殺手細胞除了具有治療或減緩病情惡化之功能，亦兼具做為藥物標靶或檢測之功能。因此，殺手細胞有機會發展為一套可病前預防或病後治療腫瘤或舒緩病情惡化之技術。

目前惡性腫瘤常見之處理技術包括：切除、輻射線治療、免疫療法、化療與單株抗體療法等。以預防醫學之角度考量，與治療成本及風險安全之考量，採取「免疫療法」是目前最被接受的一種方式。目前已上市的免疫檢查點抗體有 3 項，分別為 Bristol-Myers Squibb(簡稱 BMS)的 CTLA-4 抗體 Yervoy®、PD-1 抗體 Opdivo®和 Merck 公司的 PD-1 抗體 Keytruda®。據估計，到 2020 年，全球癌症免疫療法銷售總額將達 308 億美元。

目前在台灣免疫療法之生技公司包括：(1)台灣浩鼎生技股份有限公司，核心技術為免疫調控之轉移性乳癌的癌症疫苗；(2)藥華醫藥股份有限公司，核心技術為免疫抑制抗體藥物之 PEG 長效型 α 干擾素新藥；(3)台灣醴聯生技醫藥股份有限公司，核心技術為癌症免疫治療之發展醴質抗原及人源單株抗體藥；(4)鑫品生醫科技有限公司，核心技術為細胞治療之免疫細胞療法技術；(5)台灣尖端先進生技醫藥股份有限公司，核心技術為臍帶血幹細胞；(6)光輝生命醫學股份有限公司，核心技術為第三代自然殺手細胞(NK 細胞)體外複製技術。由此可知，這些生技公司所發展之技術包括：免疫調節技術、免疫抑制與提升自體免疫力三個方向。其中光輝生命醫學股份有限公司所主推之自然殺手細胞(NK 殺手細胞)，為一種大顆粒淋巴細胞，但數量僅佔淋巴細胞的 3%-5%，可透過抽取血

液、離心及分離等程序，於體外加入特定細胞激素增殖培養，達到活化與增生之目的。若有需要，未來可透過合法回打之技術，將增殖後的免疫細胞注回人體，達到預防或毒殺腫瘤細胞的目的。

為了達成將 NK 細胞儲存、增殖培養與分析之目的，本研究將四年內所使用之設備，依據各設備之重要規格、功能性與四年使用情形進行分析，同時評估設備效能及四年所攤提之軟硬體成本，最後做出適合之培養與分析設備建議。

材料及方法

1.實驗設備

- 1.高速離心機(C_1 、 C_2 、 C_3 三型)
- 2.二氧化碳培養箱(I_1 、 I_2 、 I_3 、 I_4 四型)
- 3.冷凍高速離心機(F_1 、 F_2 兩型)
- 4.液態氮儲存桶(N_1 、 N_2 、 N_3 三型)
- 5.酵素免疫分析儀(E_1 、 E_2 兩型)
- 6.顯微鏡+CCD+電腦
- 7.微量加樣槍 20 μ l、200 μ l、1000 μ l
- 8.超純水系統
- 9.-20 $^{\circ}$ C 冷凍櫃
- 10.-80 $^{\circ}$ C 冷凍櫃
- 11.4 $^{\circ}$ C 雙門冷藏櫃
- 12.超淨工作台
- 13.筆記型電腦

2.儲存設備、功能評估、使用情形及效能檢核

評估項目包括：依據各設備之重要規格所分析之功能性、過去四年使用情形之調查、與分析目標符合度之效能檢核及軟硬體成本等要項，特別分析四年之維修成本與故障情形，最後做出最佳設備組合建議。

結果與討論

在免疫細胞培養室之規劃，特別是需要培養 NK 細胞或幹細胞，最主要的規

劃為無塵室之設計(P2 與 P3)、人物流之動線規劃及最佳操作設備之評估。本年度結合前三年之設施使用狀況，評估之硬體設施包括：二氧化碳培養箱、高速離心機、冷凍高速離心機、液態氮儲存桶與酵素免疫分析儀等五項。表二為細胞培養設備機型、功能評估與四年使用分析。

- (1)在高速離心機方面，考慮控溫範圍、離心力與離心容量，發現C₁與C₃為較優之機種，特別是C₃機種最優。
- (2)在二氧化碳培養箱方面，考慮消毒效果、操作便利性與氣體濃度控制之方便性，發現I₁與I₃為較優之機種，其中I₃具有TC Sensor系統，功能上更加分。
- (3)在冷凍高速離心機方面，考慮離心效果、操作方便性與轉速之選擇性，發現F₁為相對較優之機種。
- (4)在液態氮儲存桶方面，考慮容量與儲存量，發現N₁與N₃特性相當。
- (5)在酵素免疫分析測讀儀方面，考慮再現性/準確度、精準度、濾鏡選擇性、操作方式多元性，發現E₁與E₂兩者各有千秋。

表三為細胞培養設備四年使用情形。這些已購置之各種設備，經過四年之使用後，我們將其使用情形(故障情形)進行完整評比，並且詳細說明期間所發生之異狀。根據表三之結果，可知在高速離心機方面，發現C₁發生卡機3次，因此，完全不予考慮，C₂與C₃為相對較佳之機種；在二氧化碳培養箱方面，發現I₁、I₂及I₄都有不同層次之故障問題，因此，I₃為較優之機種；在冷凍高速離心機方面，發現F₂在使用情形表現良好，故為較優之機種；在液態氮儲存桶方面，發現N₁與N₃在四年期間使用情形表現良好，故為相對較優之機種；在酵素免疫分析測讀儀方面，發現E₁在使用情形表現良好，E₂則發生光源故障3次的問題，因此，E₁為較優之機種。表四則依據四年使用狀況評估細胞培養設備各機型效能。此部分則同時考慮設備應用時之維護與故障情形及維修時之軟硬體費用。根據表四之結果，可知在高速離心機方面，C₃為最佳之機種；在二氧化碳培養箱方面，I₃為最優之機種，I₄雖未維修，但曾發生軟體錯誤之問題；在冷凍高速離心機方面，發現F₁在四年平均軟硬體成本為較優之機種，但其效能上略遜於F₂機種；在液態氮儲存桶方面，發現N₃與N₁在效能檢核上表現相當，但N₃成本稍低，考慮本設備並非關鍵設備，故建議N₁為較適合之機種；在酵素免疫分析測讀儀方面，發現E₁在效能檢核表現與成本皆相對優於E₂，故E₁為較優之機種。

表二、細胞培養設備機型、功能評估與四年使用分析

品名	機型	各機型重要規格	功能評估	使用分析
高速離心機	C ₁	➤ 控溫範圍：-9℃~40℃	✓ 控溫範圍	☆☆☆
		➤ 離心力：3,000 g	✓ 離心力	☆☆☆
		➤ 離心容量：3 種	✓ 離心容量	☆☆
	C ₂	✓ 控溫範圍：-9℃~40℃	✓ 控溫範圍	☆☆☆
		✓ 離心力：3,000 g	✓ 離心力	☆☆☆
		✓ 離心容量：2 種	✓ 離心容量	☆
	C ₃	➤ 控溫範圍：-9℃~42℃	✓ 控溫範圍	☆☆☆
		➤ 離心力：3,000 g	✓ 離心力	☆☆☆
		➤ 離心容量：4 種/37℃ 恆溫離心	✓ 離心容量	☆☆☆
二氧化碳培養箱	I ₁	➤ 主動式背景汙染控制	✓ 滅菌效果	☆☆☆
		➤ 直熱氣夾式可穩定控制溫度	✓ 操作便利	☆☆☆
		➤ 穩定的CO ₂ 控制	✓ 氣體濃度控制	☆☆☆
		➤ UV 燈消毒功能		
	I ₂	➤ H ₂ O ₂ 滅菌系統	✓ 滅菌效果	☆☆☆
		➤ inCu saFe 結構(殺菌保護)	✓ 操作便利	☆☆☆
		➤ 對話式 LCD 控制面板	✓ 氣體濃度控制	☆☆
		➤ 雙紅外線偵測		
	I ₃	➤ 主動式背景汙染控制	✓ 滅菌效果	☆☆☆
		➤ 直熱氣夾式系統	✓ 操作便利	☆☆☆
		➤ 穩定的CO ₂ 控制	✓ 氣體濃度控制	☆☆☆
		➤ TC Sensor 系統		
	I ₄	➤ 含加熱滅菌程式	✓ 滅菌效果	☆☆
		➤ Class100 Replacement Hepa Filter	✓ 操作便利	☆☆☆
			✓ 氣體濃度控制	☆☆
冷凍高	F ₁	➤ 最大離心力：52,490 xg	✓ 離心效果	☆☆☆

速離心 機		➤ 控制方式：微電腦控制，離心力、時間、溫度、加減速、20 組記憶	✓ 操作極為方便	☆☆☆
		➤ 加速/減速：10 段快慢選擇	✓ 速度選擇性	☆☆☆
		➤ 最大離心力：48,700 xg		
F ₂		➤ 控制方式：微電腦控制，轉速，離心力、g·sec 值，時間、溫度、加減速、5 組程式記憶，變頻驅動	✓ 離心效果	☆☆
			✓ 操作方便	☆☆☆
		➤ 加速/減速：3 組常用設定	✓ 速度選擇性	☆
液態氮 儲存桶	N ₁	➤ 液態氮容量：340L	✓ 容量	☆☆
		➤ 儲存量：24,000 2mL 凍存管	✓ 儲存量	☆☆☆
	N ₂	➤ 液態氮容量：200L	✓ 容量	☆☆
		➤ 儲存量：13,000 2mL 凍存管	✓ 儲存量	☆
	N ₃	➤ 液態氮容量：552L	✓ 容量	☆☆
		➤ 儲存量：38,500 2mL 凍存管	✓ 儲存量	☆☆☆
酵素免 疫分析 測讀儀	E ₁	➤ 光源：鹵素燈	✓ 再現性/準確度	☆☆☆
		➤ 再現性/準確度：0.5%	✓ 精準度	☆☆☆
		➤ 精準度：≤ 1%	✓ 濾鏡選擇性	☆☆
		➤ 標配濾鏡：405/450/490/620 nm 共 4 組 (for ELISA reader)	✓ 操作方式	☆☆☆
		➤ 操作方式：單機或電腦控制		
	E ₂	➤ 光源：鹵素燈	✓ 再現性/準確度	☆☆☆
		➤ 再現性/準確度：0.5%	✓ 精準度	☆☆☆
		➤ 精準度：≤ 1%	✓ 濾鏡選擇性	☆☆☆
		➤ 標配濾鏡：405/450/490/570/595/620 nm 共 6 組	✓ 操作方式	☆☆
		➤ 操作方式：電腦控制		

表三、細胞培養設備四年使用情形

品名	機型	使用情形	說明
高速離心機	C ₁	☆	卡機 3 次
	C ₂	☆☆☆☆	操作順暢
	C ₃	☆☆☆☆	操作順暢
二氧化碳培養箱	I ₁	☆☆	故障 2 次
	I ₂	☆	故障 3 次
	I ₃	☆☆☆☆	操作順暢
	I ₄	☆	程式錯誤 3 次
冷凍高速離心機	F ₁	☆☆☆	卡機 1 次
	F ₂	☆☆☆☆	操作順暢
液態氮儲存桶	N ₁	☆☆☆☆	操作順暢
	N ₂	☆☆☆	無法順利開啟 1 次
	N ₃	☆☆☆☆	操作順暢
酵素免疫分析測讀儀	E ₁	☆☆☆☆	操作順暢
	E ₂	☆☆	光源強度不足 3 次

表四、依據四年使用狀況評估細胞培養設備各機型效能

品名	機型	四年效能檢核情形	四年平均軟硬體成本
高速離心機	C ₁	☆	☆☆/維修偏高
	C ₂	☆☆☆☆	☆☆
	C ₃	☆☆☆☆	☆☆☆☆
二氧化碳培養箱	I ₁	☆☆	☆☆/維修偏高
	I ₂	☆	☆/維修偏高
	I ₃	☆☆☆☆	☆☆☆☆
	I ₄	☆/軟體錯誤	☆☆☆
冷凍高速離心機	F ₁	☆☆☆	☆☆☆☆
	F ₂	☆☆☆☆	☆☆☆
液態氮儲存桶	N ₁	☆☆☆☆	☆☆☆

	N ₂	☆☆☆	☆☆
	N ₃	☆☆☆☆	☆☆☆☆
酵素免疫分析測讀儀	E ₁	☆☆☆☆	☆☆☆
	E ₂	☆	☆☆/燈源組件費用高

結論

根據四年之執行、設備檢核與維護後，考量需達到P2 或P3 GLP等級之規範、設備功能性與軟硬體成本等適切性，對於已設置之細胞培養、儲存與分析等設備，在使用四年後，建議液態氮儲存桶採用編號N₁機型，高速離心機採用編號C₃機型，冷凍高速離心機採用編號F₁機型，二氧化碳培養箱採用編號I₃機型與酵素免疫分析儀採用E₁機型，如此之組合將可滿足免疫細胞培養室設備運用、效能與經費運用之最佳規劃。

致謝

感謝華生技 101 產學字 009-1 號(4/5)之經費協助完成此產學合作案。

參考文獻

- 1.鍾竺均及陳治宇。生物技術概論第五章，新文京出版社。
2. Roitt I, Brostoff J., and Male, D., Immunology (6th ed.), 480p. St. Louis: Mosby. 2001.
- 3.Alberts, B., Molecular biology of the Cell. New York, Garland Science. 2002.
- 4.Matsudaira, P.T., Lodish, H.F., Arnold B., Kaiser, C., Monty K. and Hidde P., Molecular Cell Biology. W.H.Freeman & Co Ltd. 2007.
- 5.Smyth, M.J., Hayakawa, Y., and Takeda, K., New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. Nature Review 2: 850–852. (2002)
6. Klingemann HG, Martinson J., Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. Cytotherapy. 6(1): 15-22 (2004)
7. Arai S., Meagher R., and Swearingen M., Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. Cytotherapy 10: 625-632 (2008)
8. Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, Kubota T, Isono N. Life-prolonging effect of immunocell BAK (BRM-activated killer) therapy for advanced solid cancer patients: prognostic significance of serum immunosuppressive acidic protein levels. Cancer Immunol Immunother. 52(9): 555-60 (2003)
- 9.Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M., Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. Cancer Sci. 97(9): 807-12 (2006)

- 10.Woan K., Reddy V., Potential therapeutic role of natural killer cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 7(1): 17-29 (2007)
- 11.Richards JO, Chang X, Blaser BW, Caligiuri MA, Zheng P. Liu Y., Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow. *Blood.* 108(1): 246-52. (2006)
- 12.Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Sakuragi N, Fujimoto S., High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol.* 46(2): 132-6 (2001)
- 13.Ishida F., Recent progress of diagnosis and treatment in NK cell neoplasms. *Rinsho Ketsueki.* 56(6):645-50 (2015)
- 14.Lisnić B, Lisnić VJ, Jonjić S., NK cell interplay with cytomegaloviruses. *Curr Opin Virol.* 15:9-18 (2015)