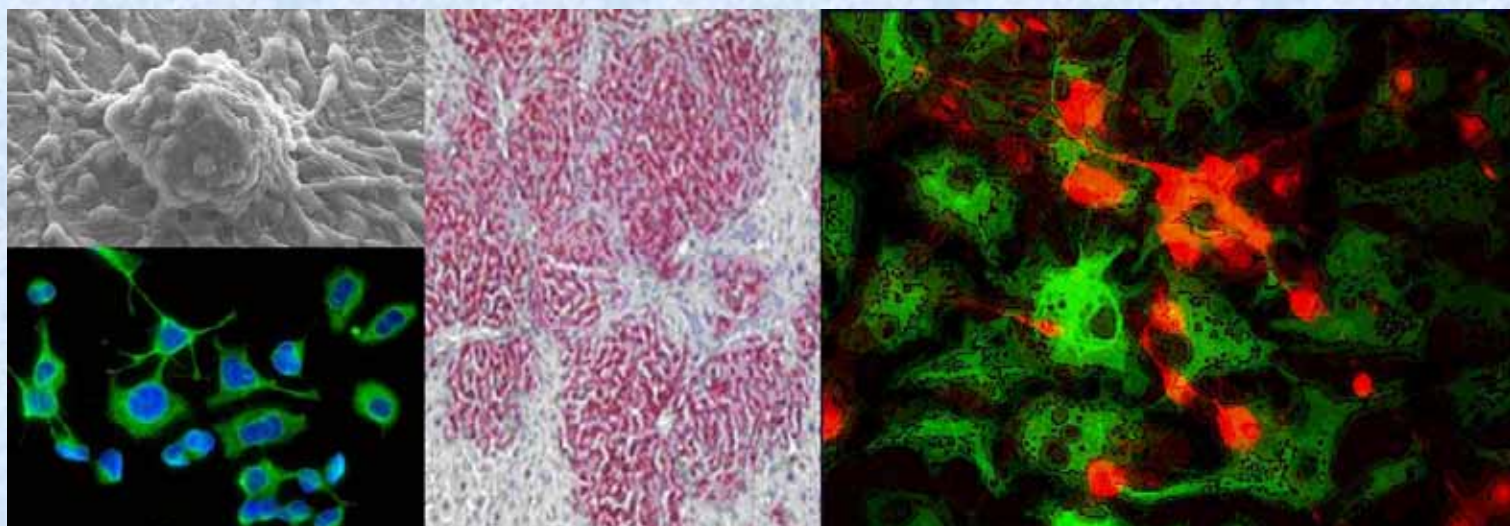


教育部「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

再生醫學



幹細胞與組織工程 教學資源中心 主編

教育部顧問室 補助

中華民國九十七年二月出版

序

在人類基因體計畫完成後，生物技術科技邁入了一個新的紀元，成為二十一世紀最具發展潛力的科技，各科技大國莫不投入大量人力及經費從事教育、研究及產業開發。為因應生物科技突破發展與應用，行政院推動「挑戰 2008—國家重點發展計畫」，由經濟部擬定「兩兆雙星產業發展計畫」，明確勾勒出我國核心與新興產業政策方向。其中生物科技產業就是雙星產業之一，是政府規劃的未來明星產業。為配合政府推動「加強生物技術產業推動方案」，培育生物科技產業人才，教育部顧問室於八十七年七月提出「生物技術科技教育改進計畫」，輔導補助各大學院校提升生物技術教育之內容與層次，全力培育生物科技人才。在第一階段「生物技術科技教育改進計畫」執行四年的成果之基礎上，教育部顧問室從九十年度起推動第二階段的教育改進計畫，期望能引進後基因時代之基因體與蛋白質體，將我國生物技術科技教育與國際接軌。根據生技中心資料，2005 年我國生技人才畢業生高達 6,876 人，其中包括碩士 2,382 人及博士 237 人，但產業需求的是要跨領域、具高度創造力及產業實務經驗的研發人才仍需強化培育。因為生物技術係利用分子生物學及細胞生物學方法，經由生物體或生物程序生產製造可應用的產品，包括一系列關鍵技術如基因工程技術、細胞工程技術、酵素及蛋白質工程技術及生化工程技術的整合。隨著基因體學及蛋白質體學研究的進展，生醫工程、生物光電與奈米科技的興起，以及利用幹細胞改善人類疾病治療，跨領域以及尖端的生物科技人才培育已被認為是二十一世紀生物科技產業創新最重要之關鍵。為確保我國在二十一世紀生物科技競賽的人才優勢，從民國九十三年度起教育部擬在現有的成果上推動第三階段「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」。為加強第三階段計畫的推展，故整合第二階段「生物技術科技教育改進計畫」之六大資源中心，並加入新興領域，如生醫奈米及幹細胞與組織工程，成立七大領域之教學資源中心，此七大領域分別為基因體與蛋白質體醫學、農業與海洋生物技術、生醫奈米科技、幹細胞與組織工程、生技中草製藥、生物資訊與系統生物學及醫衛分子檢驗等，總目標為培育具有前瞻性、跨領域、加強產業經驗及國際觀之尖端生技人才，並特別針對新興領域生醫奈米科技及幹細胞與組織工程兩項主題，邀請學界及產業界之專家學者規劃課程並編撰教材。在計畫辦公室及各資源中心主持人努力下完成具特色之

教材，這些教材內容涵蓋各項新的技術原理、操作實驗及應用，將提供全國大學院校及國、高中學校作為教學之重要參考。在這關係我國生物技術科技教育發展之教材付梓之時，本人在此感謝各位撰稿的先進賢達辛苦的付出與努力，同時也感謝諸位諮議委員與顧問們的熱心指導以及教育部顧問室同仁的鼎力協助，使得這些專書能順利出版，特以為序。

「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」總計畫主持人

中央研究院細胞與個體生物學研究所 特聘研究員 吳金洌

吳金洌

中華民國九十六年八月三日

教育部顧問室「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

再生醫學

作者 王德原、王一中、王文志、田郁文、李伯皇、李啟明、
李宣書、李裕滄、李旺祚、吳耀銘、林頌然、許致榮、
張至宏、張志豪、陳旭照、陳盈憲、陳敏慧、詹智傑、
葉龍坤、楊卿堯、劉華昌、蔡瑞芳、錢宗良

(依姓氏筆劃為序)

總編輯 劉華昌、錢宗良

助理編輯 陳佩芬、韓善國、吳少文、曾唯嘉、林宗逸、侯珮珊

幹細胞與組織工程教學資源中心主編

教育部顧問室補助出版

中華民國九十七年二月出版

目 錄

頁碼

第一章	再生醫學綜論 劉華昌 Introduction of Regenerative Medicine.....	1
第二章	肝細胞移植 吳耀銘、李宣書、李伯皇 Hepatocyte Transplantation.....	15
第三章	糖尿病之細胞治療-胰島細胞移植 楊卿堯、田郁文、李伯皇 Cell Therapy for Diabetes-Islet Transplantation.....	35
第四章	幹細胞在腦神經再生醫學的應用 陳旭照、錢宗良 The Applications of Stem Cells in the Neural Regeneration.....	47
第五章	再生醫學於骨科疾病之應用 劉華昌、張至宏、張志豪、王文志、李裕滄 Regenerative Medicine Application for Orthopaedics Disease.....	57
第六章	心臟幹細胞治療 陳盈憲、李啟明 Cardiac stem cell therapy.....	73
第七章	再生醫學在牙科疾病之運用 陳敏慧 Application of Regenerative Medicine in Dental Disease.....	91
第八章	再生醫學在角膜疾病之運用 王一中、葉龍坤、蔡瑞芳 Regenerative Medicine in the Treatment of Corneal Diseases.....	105
第九章	再生醫學在皮膚疾病之運用 林頌然、詹智傑、許致榮 Regenerative medicine in skin diseases.....	115
第十章	神經退化性疾病的細胞替代療法 李旺祚 Cell Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases.....	129
第十一章	再生醫學之法令與規範 王德原 Regulations for Regenerative Medicine.....	143
作者簡歷	157
索引	161

第一章

再生醫學綜論

Introduction of Regenerative Medicine

劉華昌

臺灣大學醫學院 骨科

一、前言

本書的內容將提供完整幹細胞、組織工程與再生醫學之基本知識。主要以深入淺出方式探討幹細胞與組織工程的尖端技術及未來發展之趨勢。

再生醫學的定義：所謂再生醫學就是利用健康細胞來修復、取代已受損或壞死的細胞及因疾病、外傷而受損的組織或器官。其所涉及的領域，以幹細胞與組織工程為主軸。其中須整合臨床醫療、材料工程、細胞生物學以及基因工程等科學。這些技術在骨折、軟骨缺損、燒傷和心肌缺氧等都有不錯的研究成果。新的再生醫學技術已於骨頭、軟骨、皮膚、膀胱、輸尿管、腎臟、肝臟及神經都有快速的發展。例如，2004年8月德國的科學家利用電腦掃描，模擬患者下顎骨的尺寸，做出「鈦合金」的金屬架，再從患者骨髓取出幹細胞，並且將「促進生命體生長蛋白」(somatotropin)與幹細胞一起塗抹在金屬架上，最後移植到患者的右肩胛骨裡，由外圍肌肉血液提供幹細胞所需營養，經過8星期的培養後，成功複製患者的下顎骨，不但讓56歲的患者變臉成功，也重獲正常的飲食生活，成為世界首例使用背部肌肉血液培養下顎骨的成功案例¹。1999年比利時的科學家也成功的將患有白斑症的病患以自體移植正常部位的皮膚治療白斑症的成功案例²。

在美國修補缺損的組織器官這方面的需求，以骨科為例，每年約進行558,200次的膝關節置換手術；皮膚燒燙傷治療每年約進行2,150,000次。其他像骨髓移植、輸血等等的治療加起來所花費的費用更可以說是一筆天文數字，而美國在1993年共花費4000億美元於器官移植上。隨著人類壽命的延長，六年後等待器官移植的病患人數會倍增兩倍。目前所使用的人造器官都有其功能不足之處：無法永久而且完整替代人類的真正器官；器官移植除了免疫排斥的問題外，捐贈者的數量不足其及感染問題也無法克服，因此再生醫學的應用變得相當重要³。

再生醫學有兩個重要的分野，分別是幹細胞及組織工程。幹細胞是一種能自我增生並且具有分化成一到數種細胞潛能的細胞。依據它分化潛能可分為單效性(unipotent, 分化為一種細胞)、複效性(pluripotent, 分化成胚胎期同源細胞)和全效性(totipotent, 幾乎可分化成身體中任何一種細胞)。幹細胞因具有以上這些特性，所以用來修補受損的組織或器官甚至還可以建構出完整的器官。目前的研究中利用幹細胞治療的疾病有：

腦部的阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、巴金森氏症 (Parkinson's disease)

血液：白血病、鐮狀細胞貧血症 (leukemia, sickle cell-anemia)

心臟：心肌梗塞 (myocardial infarction)

骨組織：軟骨缺損 (articular cartilage defect)、退化性關節炎 (osteoarthritis)

肌肉：肌肉營養不良症 (muscular dystrophy)

胰臟：糖尿病 (diabetes mellitus)

肝臟：肝炎 (hepatitis)

皮膚：燒傷 (burns)

脊椎：脊椎損傷 (spinal injury)

這些疾病的治療方式大多使用病人自體幹細胞移植到受傷部位，由於幹細胞具有再生及分化的特性，所以植入體內之幹細胞或是在體外由幹細胞建構的組織再植入體內，可進行分化再生成器官。目前使用的幹細胞通常分為成體幹細胞和胚胎幹細胞。成體幹細胞通常為單能性或多能性，數量稀少，能分化的細胞總類也受限制，而且只存在人體特定的某些部位中⁴。胚胎幹細胞為多能性或全能性細胞，從人類早期胚胎或受精卵中取得，因胚胎幹細胞具全能性可分化成人體內 200 多種細胞且較沒有端粒 (telomere) 減短引起細胞老化的問題。然而因為在倫理和道德上具有爭議性所以世界各國政府限制其應用⁵。

幹細胞對於培養的環境相當敏感，因此選擇培養的材料是非常重要的，同時，使用的材料機械特性及孔洞結構也影響植入後組織修復及生長。近年來關於這方面的研究有長足的進展。目前成體幹細胞的研究大多使用骨髓間葉幹細胞，在某些特殊的培養環境下或加入特定的生長因子可分化成脂肪細胞、軟骨細胞、成骨細胞或肌肉細胞。間葉幹細胞也可以從脂肪中取得。成體幹細胞常與組織工程的研究做結合。

二、幹細胞種類及應用

1. 骨髓間葉幹細胞 (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell)

骨髓是一般最常用的間葉幹細胞來源，以人類為例，同種骨髓移植時，從捐贈者的骨髓抽取血液，此骨髓抽取液去除紅血球及血漿後，將單核細胞稀釋成低濃度，培養在含有胎牛血清 (胎牛血清需經過篩選) 的基礎培養基中，所衍生出來貼附在塑膠培養皿上的細胞即為初代骨髓間葉幹細胞。其形態和造血幹細胞有極大的差別，造血幹細胞通常為懸浮性細胞，骨髓間葉幹細胞則成為均質的纖維母細胞型態。在適當的培養條件下，單一骨髓間葉幹細胞可形成細胞群落，又稱為 Colony Forming Unit-F (CFU-F)。細胞週期研究發現只有約 10% 的骨髓間葉幹細胞積極的進行細胞分裂，其他大部分的細胞處於細胞週期的 G0/G1 時期，這些 G0/G1 時期的細胞可能具有高度的分化能力，G0/G1 時期的細胞還包含有一小部分處於休眠狀態。造血幹細胞通常只能在體外培養基中保持原狀或做有限次的複製分裂，然而骨髓間葉幹細胞則具有高度的增生潛能，有的可在體外培養基中複製分裂高達 35 次，有的細胞卻在複製 4 代後即停止生長⁶，這些生長速度的差異可能是來自骨髓蒐集的方式差異、蒐集的骨髓所含間葉幹細胞的數目較低或者骨髓捐贈者的年紀也

可能影響。骨髓間葉幹細胞在繼代培養後仍然保有其正常染色體數目及染色體終端酶活性。然而，繼代培養太多次會造成細胞功能缺失、細胞老化或死亡等問題。若外加生長因子，如：血小板生長因子（PDGF）、上皮細胞生長因子（EGF）、鹼性纖維母細胞生長因子（bFGF）或類胰島素生長因子（IGF-1）等等可以使骨髓間葉幹細胞生長速度更快。截至目前為止，科學家們仍然無法由骨髓分離出單一純種的骨髓間葉幹細胞。用來鑑定骨髓間葉幹細胞的方式一般使用細胞表面標的，科學家們根據骨髓間葉幹細胞的細胞表面標的而發展出一系列的單株抗體來對這些幹細胞進行免疫定性，這些骨髓間葉幹細胞的表面標的並非具有專一性，同時也表出間葉細胞、內皮細胞、上皮細胞及肌肉細胞的特性，如 SH2、SH3、SH4、STRO-1 等，但骨髓間葉幹細胞並不表現出造血表面抗原，如：CD45、CD34 及 CD14。特別是骨髓間葉幹細胞表現出很高的 CD44。CD44 是許多配位體如 hyaluronan 及 osteopontin 的受體，在骨髓或骨細胞外間質的排列扮演著重要的角色⁶。目前有許多體外培養研究在探討骨髓間葉幹細胞的分化潛能，同時也在尋找適當的培養條件、分化的刺激因子以及鑑定這些已分化細胞的方法。實驗結果證實在適當的生長因子刺激下，骨髓間葉幹細胞可以分化成脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、肌腱細胞、造血細胞支持基質、骨骼肌細胞、平滑肌細胞、心肌細胞、星形細胞、間質膠細胞及神經細胞⁶。

胚胎幹細胞比目前所找到的任何一種成體幹細胞具有更高的分化潛能。然而，胚胎幹細胞的來源牽涉到社會道德及倫理等問題，而且胚胎幹細胞的研究也尚未達到臨床使用的階段。相較之下，成體幹細胞的取得及使用不但較不具有法律、倫理的爭議，而且成體幹細胞的可塑性更增加其應用的潛能；另外，若將病人自體取出的成體幹細胞應用於病人本身，也不會產生免疫排斥等問題。未來在醫學上的用途包括：（1）骨髓間葉幹細胞可取代因疾病或化學治療破壞的骨髓基質。（2）和其他幹細胞，如造血幹細胞共同移植，以促進骨髓破壞後造血系統的再生。（3）應用於細胞療法，治療或減輕間葉組織疾病，包括：骨骼再生不良、骨質疏鬆症、骨關節炎、關節半月板修補、肌肉異常。（4）應用於基因療法。利用腺病毒或反轉錄病毒將正常基因送進間葉幹細胞，可以修正不正常基因，再將正常、有功能的幹細胞送入人體，以治療癌症或遺傳性疾病。雖然骨髓幹細胞已經有超過 50 年的研究歷史，骨髓間葉幹細胞的研究仍然有很大的發展空間，目前成體幹細胞尚未被發現具有和胚胎幹細胞一樣分化成三種胚層細胞的能力，但難保未來沒有這種發現⁷。

2. 臍帶血幹細胞（Cord Blood Stem Cell）

臍帶血庫的紛紛設立，臍帶血幹細胞最近也十分熱門，臍帶血幹細胞是取自於出生嬰兒的胎盤及臍帶血液所分離出來的，屬於成體幹細胞的一種。臍帶血具有以下幾項優點：（1）相當純淨，尚未受到放射線、藥物、毒物、病菌等污染；（2）細胞生命力強。臍帶血幹細胞產生新細胞的能力較骨髓內的幹細胞強；（3）來源容易：臍帶血的取得較容易又不具傷害性；（4）及時性：許多疾病的治療時效相當重要，臍帶血於出生時即以冷藏方式備用，可隨時取用；（5）排斥性較低：以臍帶血做異體移植時，較少有排斥反應，發生移植抗宿主疾病的程度亦較輕；（6）感染性少：尤其與病人本身之周邊血幹細胞相比較時；（7）組織相容性（histocompatibility）較佳，相較於其他移植而言兄弟姐妹間的臍帶血移

植，合適機會可能高達 50% 等。因此使得臍帶血應用的範圍更為寬廣，甚至逐漸取代骨髓移植與周邊血移植等治療方式。自 1988 年發現以來已被用來治療 Gunther's disease、Hunter syndrome、Hurler syndrome、acute lymphoblastic leukemia 等，但是因為所能取得幹細胞數目稀少，導致被廣泛的應用。

臍帶血移植主要應用於血液惡性疾病、先天代謝性遺傳和惡化腫瘤經化療、放射線治療後，病患恢復造血機能和免疫系統的重建。也由於臍帶血的收集對於產婦、嬰兒沒有任何危險，冷凍保存臍帶血細胞的技術也日益成熟，故有愈來愈多的家庭願意捐贈或以私人保存方式，將以往被視為廢棄物的胎盤／臍帶，先行收集其中之血液並交由專業的機構和人員處理保存⁸。

3. 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cell)

胚胎幹細胞的珍貴之處，在於其具有完全能力發展成一個完整生命個體所需之各式各樣的細胞組織。也因此，胚胎幹細胞研究若成熟的話，未來將可被廣泛地應用在藥物的發明以及與細胞相關的疾病的治療上，例如：巴金森氏症、阿茲海默症以及與心臟有關的疾病等。胚胎幹細胞是從著床前的胚胎中分離出之一種萬能性的細胞。在實驗室之環境下，胚胎幹細胞可被長期的培養、增殖而且不會失去其多能分化之能力且保有正常之遺傳組成。近年來，研究人員已成功地自靈長類到人類分離出胎幹細胞並證明這些細胞就如同老鼠之胚胎幹細胞一樣可被大規模的培養並具有多能分化之潛力⁵。這些發現進一步支持以胚胎幹細胞對人類退化性疾病及組織損傷作臨床細胞性治療之可行性。

三、幹細胞於組織工程之發展與應用

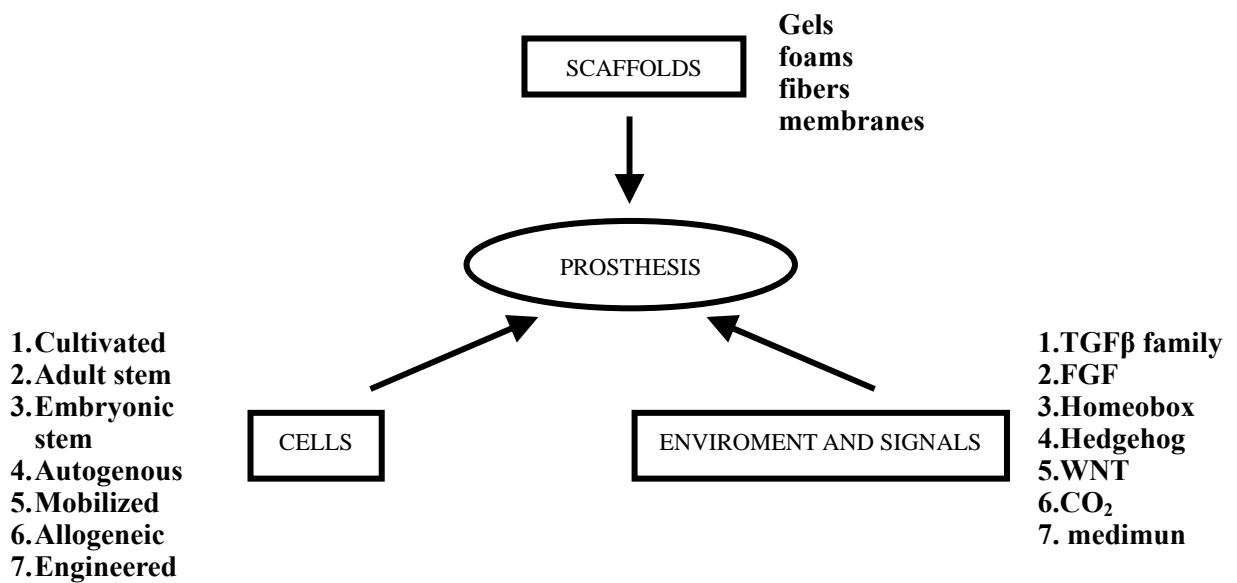
組織、器官的損傷及功能障礙是危害人類健康的主要因素之一，目前常用的治療方法是器官或組織的移植。移植的來源包含自體、異體或異種。自體移植有來源不足及再次手術受限；異體和異種移植除來源供應也有問題外，還有免疫及排斥等問題。因此組織工程或稱再生醫療之技術應運而生⁹。

組織工程學的研究領域涉及到了材料學、工程學及生命科學。在醫學領域，包括基礎醫學的遺傳學、組織胚胎學、細胞生物學、分子生物學等；在臨床醫學領域包括骨科、整形外科、胸外科、神經外科、口腔頷面外科、五官（眼、耳、鼻、喉、顏、面）科、一般外科、復健醫學等。在材料學方面，主要涉及可降解高分子材料、陶瓷材料；生物衍生材料包括天然生物衍生材料和提純衍生材料（如膠原蛋白）等。在 1980 年代，美國首先由國家科學基金組織資助建立了一系列組織工程實驗室。在波士頓麻省大學醫院，由 Vacanti 博士首先創制了應用組織工程技術生產的軟骨細胞株¹⁰。上海的曹誼林博士在 Vacanti 的實驗室中，於 1996 年在世界上第一個成功地在裸鼠身上培養製成了人形耳廓

軟骨支架¹¹。組織工程有三大要素，必須先建構一個適合細胞生長的立體支架，同時引入細胞進行培養，再加上細胞生長所需的環境及訊號因子，使細胞在此支架內能保持原來之功能性。待進行體外培養長成組織後，即可植入受損之組織或器官進行修復¹¹。

1. 支架

組織工程三個構成要素為：支架、細胞及訊息因子（圖一）。「組織工程」不僅是利用細胞來達到再生的功能，更利用活體取出的細胞，進一步結合適當的可分解材料或其他生物分子，再生出新的組織，以取代病態的組織。一般是把可分解材料先加工成為組織的形狀，有許多的孔洞，再像播種一樣把細胞灑進去。因此，這些材料就叫做「支架」材料，就像蓋房子時使用的鷹架一樣，等房子蓋好後，鷹架就拆除掉而消失。



圖一、組織工程三合體 Tissue Engineering Triads

組織的構成除了細胞及細胞外液體之外，就是「細胞外基質」(extracellular matrix)了，其中最重要的當屬膠原蛋白 (collagen) 纖維，而膠原蛋白又分為很多型，各組織之間或同組織的不同區域所含之膠原蛋白型式會有所不同。細胞外基質另外包含許多其他的

物質，相互之間會有連結，這些事情不在這裡詳述。細胞外基質及纖維基本上就是支架，用以支撐著組織的形狀，而組織工程的做法是先架好支架，再讓細胞依附、生長在支架上，最後逐漸形成組織。支架的外型可以依照我們所要的形狀來塑造，以期適合將來嵌入人體組織的缺陷處。支架的來源有很多，大抵可區分為天然及人工兩類。目前最常用的天然材料是由動物取得的膠原蛋白及一些含水膠質如藻膠、洋菜膠；人工合成的材料更是多樣，例如目前最被看好的聚乳酸（polylactate）、聚甘醇酸（polyglycolate）。這些膠原蛋白、聚乳酸、聚甘醇酸等高分子化合物常被塑造成多孔性的結構，如同我們日常使用的海綿的縮影，以便讓細胞進入黏附。基本上這類材料不管天然或人工合成的都必須要細胞喜歡而能黏附上去並生長與分化，其硬度及性質必須盡量符合該組織的特性，植入人體後，最好能被漸漸分解而由身體該處組織的基質來取代，而且材料本身或分解後的產物不會對身體造成毒性傷害，同時最好不會引起身體的免疫或發炎反應，並能夠與接著部分的原本組織能夠密切而正常的接合¹²。

2. 細胞

細胞是組織形成的第一重要因素。在胚胎發育中，受精卵經過一再地分裂複製，而且分裂後的細胞又分化為成熟的細胞，如神經細胞、肌肉細胞、肝臟細胞等具有特殊功能的細胞以維持身體各種功能之所需。因此組織工程所需要的細胞必須符合以下條件：1) 最好能在體外大量培養，希望從捐贈者提供少許的組織放大到許多許多倍，以滿足移植者之所需；2) 培養出來的細胞必須具有正常的分化功能，譬如神經細胞要有傳導的功能、肝臟細胞需要能製造蛋白及代謝毒物、胰島細胞需要會分泌胰島素等；3) 種入身體後不會傳染病菌也不會形成腫瘤。目前的組織工程使用的細胞來源可為活體、屍體、甚或動物。動物來源因為有排斥性的問題，鮮少能成功，屍體來源的缺點是怕病媒的感染。活體來源也有其問題：第一，細胞數量不會多，第二，大多數已分化的細胞不容易在體外培養而分裂複製，如神經、心臟、肝臟細胞，但例外的是現在可行的皮膚細胞（由嬰兒包皮取得）做成人工皮膚，以及由患者自身的軟骨取得軟骨細胞培養後移植入關節缺損處（屬於一種自體移植）。另一種細胞來源則是最近很熱門的幹細胞（stem cell）。

3. 培養環境及訊息因子

胚胎發育時，左右細胞生長、趨向與分化的另一種很重要的因素就是各種生長因子與荷爾蒙。這些物質與細胞的受體結合後會於細胞內引發一系列的訊息傳遞，啟動某些基因的表現，而影響細胞的許多種行為，如生長、趨向與分化，個體才得以長成，組織才得以成型。若缺乏這類訊息因子也難以盡全功，例如若要誘導骨髓間質幹細胞分化為軟骨時，需要加入一種生長因子叫做 Transforming Growth Factor- β 1（TGF- β 1），若要誘導它們變成骨骼細胞，則另一種因子叫做 Bone Morphogenetic Protein（BMP）。生物學家正努

力在研究最好的配方，以引導幹細胞往我們想讓它發展的各種方向去分化，譬如讓它們分化成神經細胞、心臟細胞、肝臟細胞或胰島細胞等等。

早期的組織工程研究是伴隨著人工生醫材料的發展而行進的。1960 年代就開始嘗試使用人工材料合成的人工皮膚來治療燒傷病人。1970 年代將肝素（heparin）塗在人工皮膚上以防止血液的沾黏。人工皮膚經過三十年的努力，終於獲得具體成果，Organogenesis 公司所生產的 Apligraf 人工皮膚目前已通過美國食品藥物管理局（FDA）認證，臨床上並證實對腿部潰瘍有不錯的療效。1990 年代，許多人工骨頭材料也陸續被開發出來。到今天，組織工程的發展已有長足的進步，不僅是人工皮膚，許多其他的組織及器官都有研究進行，目前可能會先成功的包括骨骼、軟骨、角膜等組織。由於組織工程的產品被認為具有相當大的市場潛力，許多國家及研究機構正爭相介入這塊大餅，1997 年美國投資於組織工程方面的研究經費約 5 億美元，且其年增率約為 22%，相信未來發展可期¹²。

組織工程的未來仍充滿著許多的挑戰，生物學家仍需繼續研究幹細胞的培養以及引導至各種不同組織分化的最有效方法。而且將來組織工程的標的除了目前的皮膚、骨骼、軟骨、角膜外會越來越多，例如神經、血管、內分泌腺體等。另外要面臨的挑戰是需要建立一套安全的系統，證明如此培養出來的細胞，如此製造出來的支架，所發展出來的組織，移植到人體後不但有效而且安全。這些步驟都需要在一個嚴格控管的環境下進行，也就是說需要符合 Good Manufacturing Practice（GMP）的規格。

四、幹細胞與組織工程於再生醫學之應用

1. 骨髓移植

骨髓移植分兩類：一類為異基因骨髓移植。1970 年代以來臨床應用，已取得很大的成功。它需有與患者的組織相容性抗原（HLA）相匹配的家庭成員間如父母和子女的骨髓移植或極少數的無親緣關係的供髓者但 HLA 相匹配的異體骨髓；同胞的兄弟姐妹雖 HLA 相匹配，但易發生輕重不等的移植物抗宿主病（GVHD），無親緣關係但 HLA 相配發生的 GVDH，情況更嚴重。另一類為同基因骨髓移植，即極少數的同卵雙胎孿生兄弟或姐妹間的骨髓移植。還有一類為自體骨髓移植（ABMT）。此類骨髓移植開展較晚，80 年代應用於臨床。用自身的骨髓不需供髓者，此法簡便易於推廣，可用於獨生子女，並且無 GVHD 的發生。用於白血病、淋巴瘤和多種實體瘤的治療。

約 60% 的成人急性白血病患者，經過異基因或同基因骨髓移植可達 3 年以上長生存期，部分已達 5~6 年以上。在慢性粒細胞白血病慢性期，約 80% 的病人可存活 3 年以上，部分已存活 5~6 年以上，可謂根治。有人比較了只用常規聯合化學治療，不做骨髓移植的急性白血病，僅有 10~15% 的人存活到 3 年，平均生存期僅一年左右¹³。慢性粒細胞白血病的生存期平均 3~4 年，病程雖緩慢，但用目前化療方法無根治的可能。因此，骨

髓移植所取得的療效較常規化療為佳。對淋巴瘤及其他實體瘤應用自體骨髓移植亦可達到根治的目的。

異基因與自體骨髓移植各有優缺點，ABMT 的最大缺點為復發率高，因此，必須清除急性白血病及晚期實體瘤病人骨髓中所殘存的白血病或腫瘤細胞。目前所研究的清除手段有：利用單克隆抗體加補體、單克隆抗體加植物凝集素、單克隆抗體和磁性微顆粒法、以及骨髓長期培養法，採用特殊培養體系，選擇性地僅供正常造血細胞生長，以上均可以達到殺滅殘留的白血病或腫瘤細胞或干擾其生長，以達到淨化的目的。

2. 骨頭重建

骨組織工程將成為一個項非常有前途的研究項目。近二十年來的研究成果已經給整形外科、口腔頰面外科及手外科醫師提供了治療骨缺損的新希望，儘管體外合成的骨組織在動物實驗中可在動物體內存活，但日前尚不能應用於臨床¹⁴。主要原因有：(1) 體外合成的組織不能完全替代病損的功能，特別是負重部位的功能替換，涉及生物力學，移植效果尚難確定；(2) 體外培養的組織能否適應體內環境繼續生長還未得到確實的證明，體外培養液是一種優化培養環境，不受其它因素干擾，而體內骨的癒合需受神經、體液、周圍環境的影響¹⁵ (3) 用於臨床治療，手術費用較高，患者難以承受。

骨組織工程在近幾年中需深入研究的問題計有：(1) 繼續完善動物實驗機制，得到確實可靠的證據，為臨床實驗鋪平道路；(2) 骨生成和形態發生的影響因子的研究，與其它基礎學科相聯系，以確定哪些因子能有效促進新骨形成及影響其發揮最佳作用的因素。(3) 深入細胞外基質和種子細胞的開發，尋求更為理想的替代物和細胞來源。

3. 軟骨組織工程

關節軟骨是一種特殊的結締組織，能夠忍受長時間且高重量負載，其組成包含了軟骨細胞以及細胞外基質，如主要為第二型膠原蛋白 (type II collagen)、醣蛋白 (proteoglycans) 等。Hunter 指出，軟骨受到破壞後，自行修復能力非常有限¹⁷。因為軟骨中並沒有血管以及神經的分佈¹⁸，這種結構上的特异性 (anatomical specificity) 使軟骨受到傷害時，當然不會流血，同時也不能經由血管系統引發發炎反應 (inflammatory) 或缺乏修復的功能，導致不能產生使軟骨恢復正常的新組織¹⁹。另一個假設是，在受損軟骨的鄰近軟骨細胞的數目非常有限，不足以修復損傷，並且受限於細胞外基質的包覆²⁰，難以遷移 (migration) 到受傷的部位。而當受傷的程度到達軟骨下層硬骨 (subchondral bone) 時，會引發修復的反應，但是所生成的新組織大多為纖維性軟骨 (fibrocartilage)，其中主要包含了第一型膠原蛋白 (type I collagen)，其缺乏與關節軟骨相似的生物機械特性，因此會逐漸降解 (degradation)，且無透明軟骨 (hyaline cartilage) 的功能²¹。

然而其受傷後的軟骨降解機轉目前尚未明確，能確定的是關節軟骨受到創傷缺損

後，常常會出現疼痛及發炎，最後產生退化性關節炎，促使學者尋求解決之道，發展軟骨缺損的治療方法²²⁻²⁴。

Pridie 將軟骨受損的部位以軟骨下層鑽孔 (subchondral drilling) 的方式，鑽透軟骨下層硬骨 (subchondral bone)，讓骨髓能夠流出，進而在軟骨受損的部位長出新的軟骨；後來在 Ficat 參照 Pridie 的模式，發展出 spongyalization 的治療方式，將缺損的膝蓋骨的軟骨下方硬骨移除，使鬆質骨 (cancellous bone) 露出，利用流出來的骨髓長出新的軟骨組織。但是最後長出來的軟骨是屬於纖維性軟骨²⁵。另外還有一種是 microfracturing²⁶ 及 abrasion arthroplasty²⁷⁻²⁸ 也是利用骨髓的流出，使間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 在微小的空間中聚集，然後進行修復。然而這些方法所新長出來的軟骨，短時間內大多呈現纖維性軟骨或類似透明性軟骨 (hyaline-like cartilage)，對於關節軟骨的缺損，並無法達到良好修復的效果。因為纖維軟骨的抗壓程度，並不能取代透明軟骨，而最終常因骨化作用 (ossification) 而轉變成硬骨。

Wagner 在 1964 首先使用自體移植的技術²⁹，將身體非荷重部位，或是運動時很少會用到的軟骨連帶把硬骨組織取下，植入受損部位，來治療軟骨的缺損，稱為 osteochondral graft。例如用股骨末端的關節前側面所取下的軟骨組織，便可以用來填補於承受重力面的關節面，本方法稱為 mosaicplasty，為目前較理想的治療方法，能夠避免異種或異體移植所引發的免疫系統的排斥反應。但必須犧牲自體其他部位的軟骨組織，造成新的傷害，若受損部位較大，所需的 osteochondral graft 較多，但身體可取的 osteochondral graft 有限，這便成了自體移植的限制³⁰。

4. 心肌重建

心臟梗塞而引起的心肌缺血常導致心肌組織壞死而喪失功能，大部分患者會產生心因性休克的現象。心肌梗塞導致心臟功能衰竭的治療是先把心肌梗塞現象排除後，再加以治療；目前臨床上心肌缺血的治療方法有：(1) 心臟移植手術，而心臟手術雖然是最理想的治療方式，但是因為手術風險高與能接受心臟移植的人數不到總病患的十分之一，為其最大之缺點。(2) 機械性輔助器 (mechanical circulatory support)。例如：主動脈氣球幫浦 (intra-aortic balloon pump)、左心室輔助器 (left ventricular assist device)、全人工心臟 (Total Artificial Heart) 以及心肺體外循環系統 (cardiopulmonary bypass) - 葉克膜體外維生系統 (ECMO; extracorporeal membrane oxygenation)：整個 ECMO 系統包含了幫浦、氧合器、加溫器以及動脈及靜脈導管，當我們使用 ECMO 系統時，靜脈血從股靜脈，或是內頸靜脈引流出來，經由氧合器而成為含氧血，再經由加溫器加溫之後，由動脈導管流回體內。而以機械性輔助器最大的缺點就是必須要克服血栓的形成，因此接受機械性輔助器的病人通常要服用抗凝血劑以防止血栓形成³¹。最近，有許多的研究希望以再生醫學觀念將幹細胞移植入心肌梗塞引起心肌壞死的部位，促使心肌再生並加以治療心臟

功能衰竭。

關於幹細胞修復心肌的研究上可分為：(1) 直接將幹細胞注入受損的心肌組織中，為最直接快捷的方法。但是新生與分化的心肌細胞範圍並不大；(2) 動脈血管內注射幹細胞，到已貫通的冠狀動脈，以修補冠狀動脈因貫通時所受的損害，然而需注意其注射量，以避免在血管內形成過多的新生細胞，再導致心肌梗塞；(3) 靜脈注射幹細胞，一種被視為侵入性最小的方法，但是幹細胞能到達所需器官組織的數量是否足夠？尚須再深入研究；(4) 組織工程支架作為載體方式將大量幹細胞藉由支架輸入受損器官組織，然而幹細胞是否會分化或移動至受損器官組織部位，仍須研究³²。

5. 肝臟之組織工程

關於肝臟的組織工程研究，始於 1990 年代。目前關於肝細胞的系統研究有兩個方面，即體外系統和植入性應用方法。

體外系統適用於肝臟功能正在恢復中的病人，或作為移植前的一個橋樑。其優點是：(1) 能更好地控制細胞周圍的介質，如獲得氧、營養物質、交換運輸及廢物排除；(2) 更好地控制使用時間和應用階段；(3) 降低排斥反應，因為病人的白血球可以用血漿去除法分離。植入性肝細胞法可以使永久性肝臟代替物的應用成為可能。如果能將肝細胞正規地植入於人體，可避免目前應用體外系統所誘發的血栓性併發症。目前，是將肝細胞植入一種附著於微孔支架、有包裹、可降解的聚合物載體上，製成人造肝臟。成功地生產可用於移植的肝細胞，該新生肝細胞可生產蛋白質及其他肝功能標記物，同時還可清除膽紅素和尿素代謝產物。而所用載體是一種多孔碳水化合物衍生基質，即聚苯乙烯 (polystyrene) 海綿，微孔孔徑約 10nm，用均勻的茶液製作，並用乳糖和肝素浸泡過。利用該多孔海綿載體可望培養出大量肝細胞，此構造可使鼠肝細胞獲得更好地吸附功能和維持細胞的分化。實驗中，肝細胞可以增生及分泌蛋白質。此外，肝細胞的移植成功與否還依賴於以下各種關鍵性問題能否妥善解決：(1) 肝細胞必須是在體外培養，然後移植於體內；肝細胞必須置於二層去膠原夾持之間才能具有分泌功能；(2) 肝細胞必須和聚合物緊密相貼，才能維持它的分泌功能；(3) 肝細胞必須移植於有充分供血條件的部位，以便提供氧和營養物質；(4) 肝細胞必須繁殖到足夠數量，才能維持其代謝功能；(5) 肝細胞移植，目前尚不能完全替代肝臟所具有的複雜形態和功能³³。有關再造肝膽通道問題仍在繼續研究中。

5. 皮膚之組織工程

在皮膚方面，一般燒燙傷傷口處理最常用的是合成性的敷材。它一般是 pH 中性材料，可貼附在傷口，具有彈性，可讓傷口液體流出，又可避免細菌感染較適合表淺性傷口，傷口癒合時間由 7 到 15 天不等³⁴。ConvaTec 的 DuoDerm™ (NJ, U.S.A.) 為一常用在褥瘡或腳部潰瘍的產品，以豬皮或牛皮為人工皮膚來源。最常使用的為豬皮，因為其和

人類皮膚構造相近。常用作二度燒傷傷口的暫時性覆蓋，最長可使用 10 天，Biocore Medical Technologies (Topeka, KS, U.S.A) 運用 Kollagen™ 技術所發展出來的 Medifil™ 及 SkinTemp™，為將牛的 type I 膠原蛋白重組後，以膠體或敷料的形式應用在傷口，對表面性傷口的癒合較傳統方式快 3 週。SYNTACOLL AG (Herisau, Switzerland) 利用牛跟腱所萃取出來的 type I 膠原蛋白製造成膠原蛋白膜，用在促進腳部潰瘍或急慢性傷口癒合。

五、參考文獻

1. Smiler, D., Soltan, M. & Lee, J. W. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent.* **16**(1):42-53 (2007).
2. Van Geel, N. A., Ongenaes, K., Vander Haeghen, Y. M. & Naeyaert, J. M. Autologous transplantation techniques for vitiligo: how to evaluate treatment outcome. *Eur J Dermatol.* **16**(3):319-20 (2006).
3. Rozen, N., Lewinson, D., Bick, T., Meretyk, S. & Soudry, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **17**(3):197-213 (2007).
4. Väänänen, H. K. Mesenchymal stem cells. *Ann Med.* **37**(7):469-79 (2005).
5. Lerou, P. H. & Daley, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.* **19**(6):321-31 (2005).
6. Minguell, J. J., Erices, A. & Conget, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* **226**:507-520 (2001).
7. Stem cells: scientific progress and future research directions
<http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.
8. Mayani, H. & Lansdorp, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* **16**:153-165 (1998).
9. Robert, P. L., Robert, L. & Joseph, V. *Principles of Tissue Engineering 2th.* Academic Press, 2000.
10. Hannouche, D., Terai, H., Fuchs, J. R., Terada, S., Zand, S., Nasser, B. A., Petite, H., Sedel, L. & Vacanti, J. P. Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **13**(1):87-99 (2007).
11. Shieh, S. J., Terada, S. & Vacanti, J. P. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* **25**(9):1545-57 (2004).
12. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* **28**(25):3587-93 (2007).
13. Messina, C., Valsecchi, M. G., Arico, M., Locatelli, F., Rossetti, F., Rondelli, R., Cesaro, S.,

- Uderzo, C., Conter, V., Pession, A., Sotti, G., Loiacono, G., Santoro, N., Miniero, R., Dini, G., Favre, C., Meloni, G., Testi, A. M., Werner, B., Silvestri, D., Arrighini, A., Varotto, S., Pillon, M., Basso, G., Zanesco, L., et al. Autologous bone marrow transplantation for treatment of isolated central nervous system relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. AIEOP/FONOP-TMO group. Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica. *Bone Marrow Transplant* **21**(1):9-14 (1998).
14. Nagy, A. H. & Myrtle, Y. G. *Stem cell repair and regeneration*. Imperial College Press, London, 2005.
 15. Linda, J. S. & Alan, J. G. *Tissue Engineering in Musculoskeletal Clinical Practice 1th*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2002.
 16. Hunter, W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res.* **317**:3-6 (1995).
 17. Pamela, K. L. & Cynthia, C. N. *Joint Structure and Function: A Comprehensive Analysis*. Philadelphia: F.A. Davis, 3rd ed. 2001, 39.
 18. Ehrlich, M. G., Armstrong, A. L., Neuman, R. G., Davis, M. W. & Mankin, H. J. Patterns of proteoglycan degradation by a neutral protease from human growth-plate epiphyseal cartilage. *Bone Joint Surg Am.* **64**(9):1350-4 (1982).
 19. Mow, V. C., Fithran, D. C. & Kelly, M. A. Fundamentals of articular cartilage and meniscus biomechanics. In *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. Raven Press, New York, 1990, 1-18.
 20. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C. & Hunziker, E. B. Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods of facilitating repair. In: J. Ewing ed. *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic science and Arthroscopy*. Raven Press, New York, 1990, 19-56.
 21. Benya, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**(1):215-24 (1982).
 22. Dandy, D. J. Arthroscopic debridement of the knee for osteoarthritis. *Journal of Bone & Joint Surgery* **73**:877-8 (1991).
 23. Johnson, L. L. Arthroscopic abrasion arthroscopy. Historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* **2**:54-9 (1986).
 24. Durrani, C. M. & Donald, A. M. Compositional mapping of mixed gels using FTIR microspectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **28**:297-303 (1995).
 25. Ficat, R. P., Ficat, C. & Gedeon, P. Toussaint JB. Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **144**:74-83 (1979).
 26. Steadman, J. R., Rockey, W. G., Singleton, S. B. & Briggs, K. K. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operative Orthop.* **7**:294-9 (1997).

27. Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K. & Rodrigo, J. J. The microfracture technique to treat full thickness articular cartilage defects of the knee. *Orthopade* **28**(1):26-32 (1999).
28. Friedman, M. J. Berasi, C. C. Fox, J. M. Del Pizzo, W., Snyder, S. J. & Ferkel, R. D. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clinical Orthopaedics & Related Research* **182**:200-5 (1984).
29. Wagner, H. Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenks. *Z Orthop.* **98**:333 (1964).
30. Hangody, L., Feczko, P., Bartha, L., Bodo, G. & Kish, G. Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Relat Res.* S328-36 (2001).
31. Field, M. L., Al-Alao, B., Mediratta, N. & Sosnowski, A. Open and closed chest extrathoracic cannulation for cardiopulmonary bypass and extracorporeal life support: methods, indications, and outcomes. *Postgrad Med J.* **82**(967):323-31 (2006).
- 32 Siepe, M., Heilmann, C., von Samson, P., Menasche, P. & Beyersdorf, F. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. *Eur J Cardiothorac Surg.* **28**(2):318-24 (2005).
33. Rahaman, M. N. & Mao, J. J. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng.* **91**(3):261-84 (2005).
- 34 Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface.* **4**(14):413-37 (2007).

第二章

肝細胞移植

Hepatocyte Transplantation

吳耀銘¹ 李宣書² 李伯皇¹

¹臺大醫院外科部 ²臺大醫院內科部

一、前言

肝細胞和幹細胞一樣具有很強的再生能力，也因此肝細胞移植具有很強的潛力成為將來臨床上肝臟疾病新的治療方式。從過去眾多的動物研究經驗裡我們可以了解移植肝細胞如何進入受贈者體內，並發揮功能以達到治療的效果。在小動物模式及有限的臨床經驗裡，我們也看到肝細胞移植的確可達到多種肝臟疾病的治療目的，包括急性肝臟衰竭，慢性肝硬化及代謝性肝臟疾病。如何將這個有希望的經驗從實驗平臺轉移到臨床應用是很重要也值得期待的挑戰。在過去的十年間，肝細胞移植的臨床經驗累積的相當緩慢，無可置疑地，這項開發中的治療方式緩慢的發展主要是由於細胞捐贈來源的缺乏。選擇不同的細胞來源，運用前置治療來刺激捐贈者本身細胞的繁殖以增加數以百倍細胞數目，分離之肝細胞獨特的異體免疫性的了解和調整冷凍保存方法將有助於臨床上肝細胞移植的應用。

臨床上選擇器官移植替換機能不全器官已經發展超過 50 年。這些成果已經在得知異體免疫反應（alloimmune response）以及有效的免疫抑制藥物的開發之後得到改善。儘管有了改善，器官的短缺依然是移植主要的障礙。而且，數種不同種類細胞的組成，構成不同的生理功能並維持每個器官的代謝。通常器官機能不全並不意味著在這器官內構成的所有細胞均失去作用，而是僅僅一特定的細胞組成受到影響。這個理論就像是血液成分療法代替全血輸血治療，針對不同血液問題的病人使用不同的血液成分治療就可達到治療的目的，例如：貧血的病人需要紅血球，凝血病變的是血漿，血小板減少症的是血小板等等...。藉此方式，我們不會浪費任何細胞組成要素，並讓捐贈的血液更加有用。同樣地，我們不需要所有的細胞同時工作以維護我們的生理需求。例如評估整個健康器官提供正常的代謝需求的百分比是肝臟 15%，腎臟 25%和胰臟 10%。我們不需要 100%替換來恢復細胞機能不全。用健康捐贈者的細胞，部分地重組機能不全細胞，可達到治療的目標，這將可能使一名捐贈者可以分享給更多受贈者，並且擴大有限的捐贈器官其實用的效率。完整的器官無法長期保存，但是分離的細胞可以冷凍保存且在任何我們需要的時刻解凍，這造就了便利性，特別是對於需要儘快移植以及沒有時間等待的急性器官衰竭病人。最後，完整的器官移植仍然有潛在的外科手術風

險。細胞移植可以透過經皮注射的方式達到治療目的，這個過程相對來說是比較安全的。所有這些有益的要素將促成細胞移植作為器官衰竭或代謝性疾病病人考慮的選擇。胰島細胞（islet cells）移植已經廣泛應用於臨床上的糖尿病病人，代替整個胰臟移植，並達成不錯的結果¹⁻²。肝細胞移植也已發展成為一項治療的新選擇。來自動物實驗研究的結果令人鼓舞，但有限的臨床經驗需進一步努力。在本文中，我們回顧肝細胞移植發展的歷史，整理肝細胞移植過去的基礎研究成果及有限的臨床經驗，並嘗試指出當前發展此項新的再生醫學治療方式所需克服的瓶頸，以作為將來臨床廣泛使用此新治療方式的努力方向。

二、肝細胞移植的發展歷史

將肝細胞從一個完整肝臟分離出來的酵素消化法已經發展超過 30 年³。使用肝細胞移植作為肝臟疾病治療的概念在 1977 年由動物開始⁴。第一例臨床上肝細胞移植完成於 1992 年（自體移植）用來治療慢性肝硬化病人，而 1994 年開始有人用異體肝細胞移植治療猛爆性肝臟衰竭病人⁵⁻⁶。最早且唯一在臨床上透過體外病毒轉染（viral transfection）-肝細胞基因治療的是於 1995 年對家族性高膽固醇血症病人的治療⁷。從動物研究所累積的結果了解到移植的細胞如何作用和透過細胞移植的治療效率。例如，我們證明只有 20%移植的細胞會嵌入（engraft）宿主肝臟⁸。細胞移植後細胞-細胞間的交互作用已經改變，透過這些細胞-細胞間交互作用的巧妙操作可以達到嵌入（engraftment）的改善。進一步我們知道單一次的細胞移植無法達到有效的治療目的，通常需要多次的移植才能達到較好的療效⁹。宿主前置治療（preconditioning treatment）的操作可誘導有限的捐贈者細胞的繁殖（proliferation）；並增強捐贈者細胞的再增殖改善治療的效率。宿主前置治療這個概念的應用以及將動物實驗的結果轉移至臨床將是個重要且值得期待的挑戰，也將有助於解決器官短缺的問題。例如僅需移植 0.5~1%的細胞，然後透過宿主的前置治療致使細胞本身複製和增殖宿主的肝臟以達到治療的目的。

此外，同種異體捐贈者對於臨床應用是更實際的。從同源的（syngenic）模式我們累積先前大部分細胞變化的結果。透過同種異體肝細胞增加異體免疫（alloimmune）反應後，細胞-細胞間交互作用將更複雜。就目前臨床上肝細胞移植而言我們通常使用和肝臟移植相同的免疫抑制劑。我們不知道這個策略是否正確，肝細胞獨特的異體免疫反應特性的認知有助於解決這個問題。大部分的免疫抑制（immunosuppression）藥物不單影響免疫細胞也會影響非免疫細胞¹⁰。這些免疫抑制藥物附加效應有可能透過細胞-細胞間交互作用來干擾影響細胞移植的效率。這些免疫抑制藥物引起之附加效應的確認將有助於我們選擇最適合的免疫抑制機制作為臨床上同種異體肝細胞移植的應用。

三、肝細胞移植的基礎研究成果

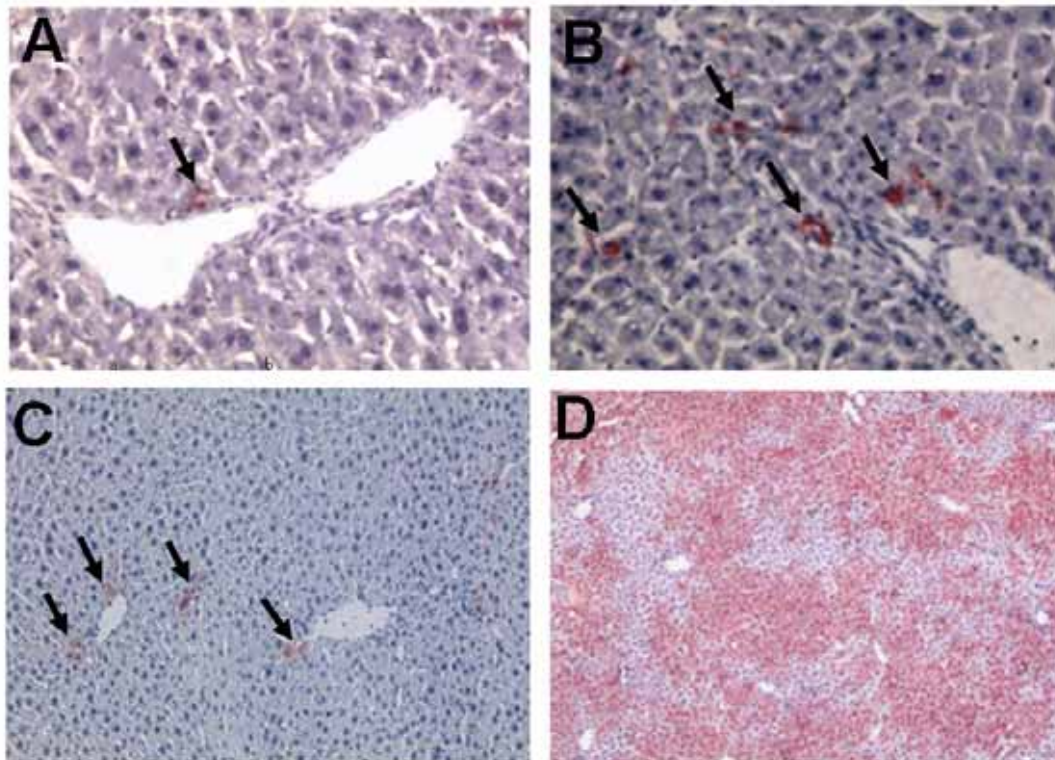
1. 細胞嵌入，繁殖和細胞-細胞相互作用（cell engraftment, proliferation, and cell-cell interaction）

哪裡是移植肝細胞最理想的位置？這是我們首先需要提出的問題。肝臟有它獨特的解剖結構和環境，例如雙重的血流供應，並且主要從門靜脈系統，這個結構維持細胞的附著、生存和細胞-細胞相互作用。為了應用上的方便，某些研究團體嘗試移植肝細胞到肝外位置像是脾臟、膜腔、腎臟包膜下、皮下、胸腺、肺臟和足被等等¹¹。在這些肝外位置之中，脾臟和膜腔是最可能被選擇作為移植肝細胞的位置。最近 Ohashi 證明移植的肝細胞能存活並且在腎包膜下和皮下裡正常運作¹²。但是這些肝外位置不是生理上正常的肝細胞生長環境，需要生長因子和大量的細胞外間質來重建。相比較下，移植的肝細胞其功能基因表現顯示當移植入宿主肝臟時其表現較好¹³。因此理論上，肝內（intrahepatic）移植應該是作為移植肝臟細胞取代機能不全宿主細胞的理想環境並且改善代謝缺乏。

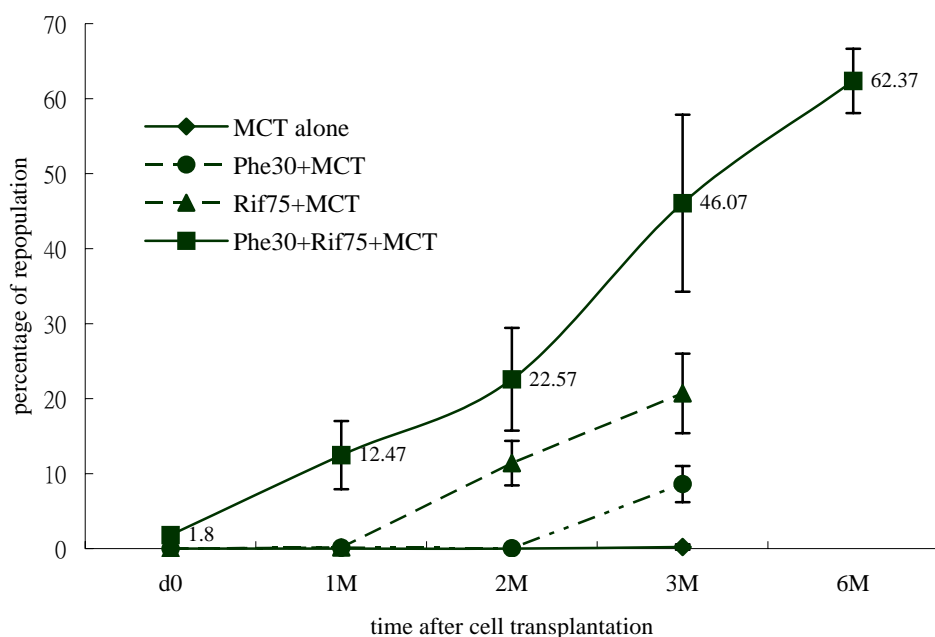
細胞如何移植進入到宿主肝臟且在移植細胞嵌入期間發生哪一種細胞-細胞交互作用？儘管有提供兩種血液系統，假如移植是經由肝動脈，移植的細胞仍將由於受到較高的壓力而損害。過去研究證明經由門靜脈捐贈者細胞可以被成功地移植進入肝臟⁸。移植的細胞佔據門靜脈分枝而引起短暫缺血性的再灌流傷害，此種傷害會導致接著發生的 Kupffer cell 活化，單核白血球和嗜中性白血球的浸潤以及內皮細胞的破壞。僅僅只有 20% 移植的細胞透過內皮細胞的裂縫能夠嵌入到宿主肝板內，在較早的時間點-細胞移植後的第一天其他 80% 移植的細胞被活化的 Kupffer cell，浸潤的單核細胞和嗜中性白血球所清除¹⁴⁻¹⁵。移植細胞的嵌入造成宿主細胞外環境和細胞間訊息傳遞的改造（remodeling）是通過活化的星狀細胞，向上調節 metalloproteinases 的表現，減少 gap 結合蛋白質的表現，以及誘導 rGT 表現¹⁶。這樣的改造（remodeling）促進移植的細胞之整合到宿主肝臟。細胞間訊息傳遞的重組介於嵌入的捐贈者細胞和鄰近的宿主細胞之間，發生在細胞移植後三天，並且在細胞移植之後 1~2 週期間完成整合¹⁷。沒有重組細胞間訊息傳遞會擾亂捐贈者細胞的存活。

需要多少細胞去達到治療效果？當下我們當然不知道。它取決於肝臟疾病的特性和嚴重程度。如果在宿主肝細胞中有多種機能（合成，代謝，解毒）失調，例如急性肝臟衰竭導致突然的肝細胞大量流失，我們需要更多的細胞修復生理的功能。假如只有一種機能失調而其它的肝細胞功能是正常的，例如經由遺傳得到的代謝性肝臟疾病，我們需要較少的細胞修復其功能。通常一次的肝細胞移植只能移植約宿主肝臟質量 2~5% 的捐贈者細胞，來防止因缺血傷害造成宿主無法忍受的損害¹⁸。因此嵌入的移植肝細胞約佔整個宿主肝臟質量的 0.4~1%。這裡喚起一個重要的問題---單一次移植所嵌入的細胞足夠達到治療的目的嗎？正常的肝臟可以忍受切除 80~85% 並且迅速地再生。意味著 15~20% 的肝臟足以在急性肝臟損失之後保持生理的功能。相對的，5~10% 的肝臟足夠去修正部分代謝性肝臟疾病。無論如何，

很明確的可以知道，單次移植中小於 1%的移植肝細胞是不足以達到治療的目標。如何提高移植的效率？有兩個主要的方向-增加細胞嵌入的比例和刺激移植細胞本身的繁殖致使宿主肝臟重分布。如何改善移植細胞的嵌入？在細胞嵌入期間認識細胞-細胞交互作用之後透過數種不同的操作可增加細胞嵌入的百分比。大部分的細胞在進入宿主肝臟之前會被宿主發炎細胞清除。宿主先天免疫系統的抑制將延緩或是減少移植細胞的清除並且增加細胞嵌入的機會。我們已經證明以 gadonium 使 Kupffer 細胞失去活性可以改善細胞嵌入¹⁹。同樣的單獨使用 rapamycin 或是加上 tacrolimus 可透過單核白血球和嗜中性白血球的浸潤干擾明顯的改善細胞嵌入。移植的細胞必須遷移通過完整的內皮細胞結合進入宿主肝板。因此破壞完整的內皮細胞的操作是另一種改善細胞嵌入的方法。我們已經證明血管擴張劑和 cyclophosphamide, doxorubicin 和 monocrotaline (MCT) 化學藥劑引起內皮細胞的破壞改善細胞嵌入²⁰。改善細胞嵌入第三種可能有效的操作是多次的移植。宿主無法容許一次大量細胞的移植。移植少量的細胞並且在合適的時期重複移植以累積達到目標數目的細胞可達到治療的效果¹⁰。如何刺激嵌入之細胞的繁殖和宿主肝臟的再生？改善細胞嵌入提高細胞移植的效率，還不足以達到治療的目標。即使 100%的移植細胞嵌入，單次移植只有不到 5%的宿主細胞被取代，此外捐贈者的短缺是一個普遍的問題。眾所皆知肝細胞像幹細胞一樣，有大量繁殖的能力。正因如此刺激嵌入之捐贈者細胞的繁殖將解決這項問題。建立一個肝細胞生長有利的環境（部分肝臟切除，局部缺血，CCl₄，肝細胞生長因子）可刺激肝細胞的繁殖。但是這些操作同時刺激宿主和捐贈者細胞。達到生理的需求之後，將在 1~2 次細胞循環 (cell cycle) 後停止繁殖。因此這些單獨的肝細胞生長有利環境的運作，還不足以達到大量的宿主肝臟重分佈，需要結合其它有選擇性抑制宿主細胞繁殖能力或是提升捐贈者細胞繁殖能力的操作。動物模式選擇性的抑制宿主細胞的繁殖的能力，包括 genotoxic 轉基因宿主 (uPA Tg 小鼠，FAH 小鼠)，或是細胞移植前透過以輻射或化學藥劑 (retrosine, monocrotaline, cytochrome P450 酵素誘導物+ MCT) 獲得之基因損害的宿主²¹⁻²² (圖一~二)。帶有基因損害的宿主前置處理的策略是達成移植細胞大量肝臟再增生的一項關鍵點。除了甲狀腺素以外，大部分額外添加的藥物在細胞移植後干擾宿主和捐贈者細胞，並且對重分佈無益。對於肝細胞而言，甲狀腺素是一種強烈的繁殖刺激因子。但是它也會促進細胞凋零的程序，特別是先前帶有基因損害的細胞。因此細胞移植後運用甲狀腺素提高了捐贈者細胞的繁殖競爭並且有助於大量的繁殖。



圖一、用 DPP IV 化學組織染色法來對移植肝細胞做形態學上的分析。移植肝細胞可顯現 DPP IV 染色（紅色，箭頭）因此可輕易的被認出。(a) 在控制組我們得到只有 169 ± 7 個移植細胞在每 100 個門脈區。(b) 宿主前置訓練後細胞嵌入率顯著改善，增加 3 倍到 517 ± 31 個移植細胞在每 100 個門脈區。(c) 嵌入的移植肝細胞假如沒有前置訓練的話，永遠都保持著單個細胞的狀態，即使在移植後兩個月仍沒有任何繁殖跡象。(d) 宿主在經過前置訓練及細胞移植後的甲狀腺素治療後，移植肝細胞可在宿主肝臟內大量繁殖並取代原有的宿主肝細胞。在肝細胞移植後兩個月，宿主肝臟已有 70% 被捐贈肝細胞所取代 (a、b—400X，細胞移植後 7 天，c、d—100X，細胞移植後 2 個月) (參考文獻 30)。



圖二、定量分析宿主在前置訓練後，移植肝細胞在宿主肝臟內的繁殖效率 (參考文獻 30)。

2. 健康動物模式和疾病模式下的細胞功能

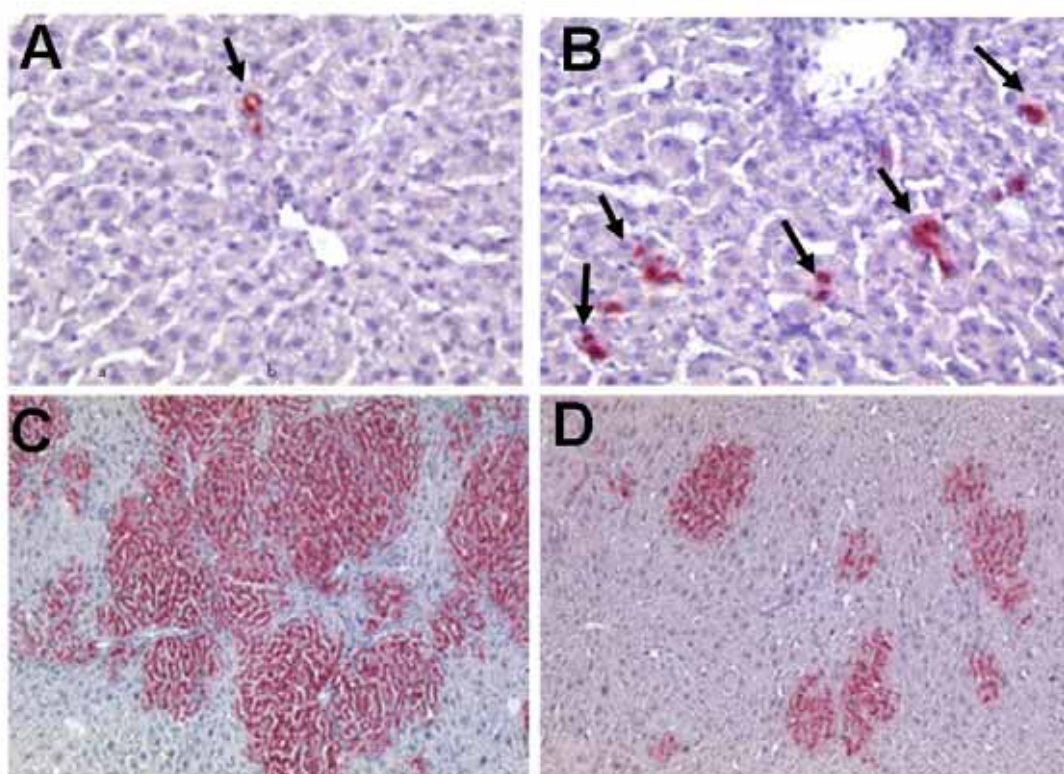
移植的肝細胞不僅能嵌入宿主肝臟中並繁殖而且能像正常的宿主肝細胞一樣工作。它們能合成特殊的肝細胞蛋白 (albumin, G6PD) 以及基因²²。主要有三種類型的疾病可能透過肝細胞移植治療，包括慢性肝病，急性肝病和先天性代謝障礙肝病。肝細胞移植的治療策略已經應用在數種不同的動物疾病模式上。先前研究顯示利用四環素 (tetracycline) 和苯巴比妥 (phenobarbital) 誘導之慢性肝硬化的老鼠，移植的肝細胞能夠嵌入，長期存活 (超出一年的時間) 並且繁殖²³。Kobayashi 研究顯示移植的肝細胞能改善代謝缺乏並且和這些帶有慢性肝功能衰竭的老鼠一起生存²⁴。Nagata 研究進一步顯示異體移植豬的肝細胞改善肝臟代謝且和在免疫抑制相同的慢性肝硬化老鼠模式下一起生存²⁵。因此肝細胞移植可以作為慢性肝病治療的選擇。我們的研究也顯示移植的細胞能夠在利用 galactosamine 引起急性肝衰竭老鼠的肝臟裡結合和繁殖。Kim 利用切除 90% 的肝臟切除術引起的急性肝衰竭老鼠在肝細胞移植後表現生物化學的利用。我們需要更多的研究來確認急性肝臟衰竭移植的效率。利用肝細胞移植治療代謝性肝臟疾病有幾種不同的動物模式，包括 (Apo-E knock out mice, Watanabe rabbit)²⁶⁻²⁷，Wilson's disease (toxic milk mice, LEC rat)²⁸⁻²⁹，hemophilia (factor VIII knock out mice)，tyrosinemia (FAH knock out mice)，progressive familial intrahepatic cholestasis (Mdr2 knock out mice)³⁰，Crigler-Najjar type 1 (Gunn rat) 和 urea cycle defects (Dalmation dog)。肝細胞移植在這些動物模式中顯示代謝缺乏已經受到改善。然而單次移植在宿主沒有前置處理的情況下，這些研究中代謝缺乏的改善受到限制。我們需要更進一步的操作協議包括重複的移植或是宿主前置處理得到更好的改善。Attaran 研究證明以異體肝細胞移植改善代謝缺乏的 Watanabe 兔子，透過重複移植後為 11%，然後在瞬間局部缺血之後並且重複移植之後增加至 42%²⁷。這個結果顯示宿主的前置處理可以改善同源的健康小動物的再增生 repopulation，也能有效的應用在同種異體疾病的大型動物。當然，更接近於應用在臨床的前置處理概念上。Mitchell 的研究顯示 plasma ApoE protein (正常為 17%) 透過再增生的捐贈者肝細胞的釋放降低了 Apo-E/-mine 血清中 LDL 至 34%²⁶。他們也指出在細胞移植之後 2 個月，30% 的再增生 repopulation 比例降低血清中 LDL 到正常範圍。這項結果提供我們一個清楚的目標，透過肝細胞移植需要大量的再增生完整的改善代謝缺乏。Yoshida 研究顯示 LEC rat 在細胞移植 6 個月後，4~20% 再增生的捐贈者細胞會降低銅的沉澱達到 60%²⁸。Mali 的顯示 LEC rats 在細胞移植後 20 個月，更大量的再增生 repopulation 完全的改善代謝缺乏和肝病變在細胞移植²⁹。說明了對代謝疾病而言肝細胞移植的效率是不同的，取決於疾病的特性和嚴重程度。

3. 細胞排斥機制和免疫抑制

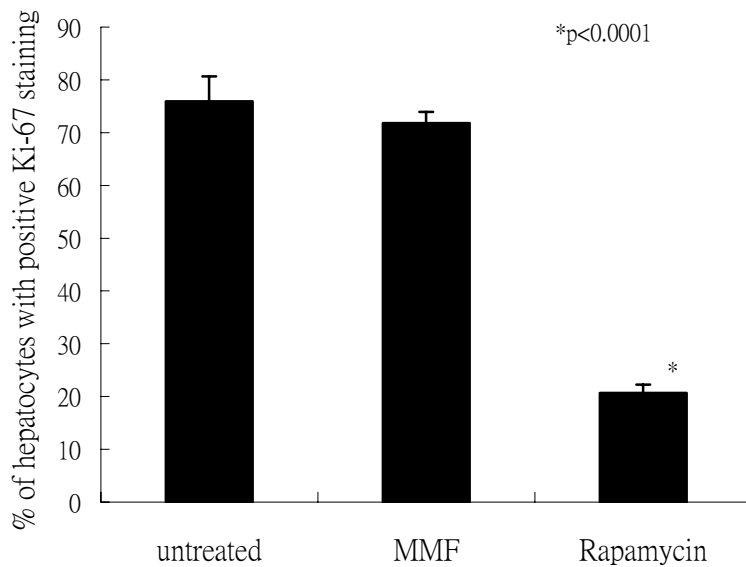
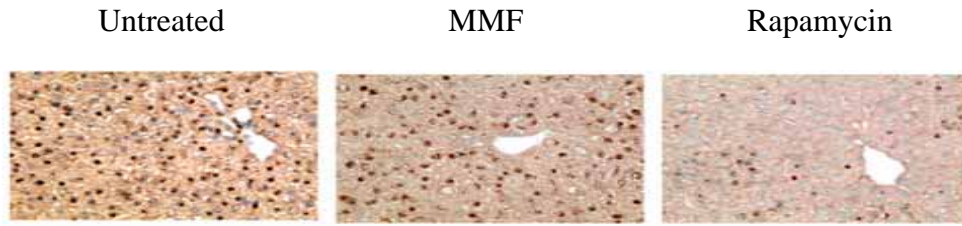
肝臟是一個免疫豁免 (immunoprivileged) 器官。數種不同種類的品種組合作為同種異體 allograft 肝臟移植之動物模型能達到自發的耐受狀況 (spontaneous tolerance status)³¹。與臨床上其他固體器官移植相比較，肝臟移植大鼠較少有急性排斥被注意到。因此肝臟

同種異體移植的免疫反應似乎更容易調節。早期分離的肝細胞移植被認為比起整個肝臟移植引起較少的免疫反應，因為前者會在缺乏捐贈者 antigen-presenting cells (APCs) 下不能和受贈者內皮細胞 (endothelial cell) 直接辨識誘導排斥反應 (direct recognition-induced rejection response)³²。以前人們認為比起整個肝臟，分離的肝細胞免疫反應力 (immunogenicity) 應該較低，由於表面主要的 histocompatibility complex (MHC) class I 和沒有表現的 MHC II 分子的表現較少。但是相反的，最近的動物實驗研究中分離的肝細胞較容易受到攻擊並且引起強烈的異體免疫反應 (alloimmunity)³³。同時被證明有效的延長固體器官移植存活的免疫抑制方法卻不能延長同種異體肝細胞移植的存活³⁴。在我們移植肝細胞模式中 (從 LEA 到 F344 大鼠) 不同免疫抑制藥物組合的劑量應用在維持同種異體移植的存活與在固體的器官移植裡有效的劑量相比較是較高的³⁵。而且，如果沒有任何免疫抑制處理下，固體器官的同體異體移植存活時間大約是在 7~10 天左右。但是在我們的經驗中同種異體移植的肝細胞總是在第 7 天前被清除。所有的證據皆顯示肝細胞的免疫反應力比固體器官的強烈。有些研究集中在肝細胞異體免疫反應獨特的特性上。當灌流和分離肝細胞 (parenchymal cell) 時，我們會破壞這個微環境並且丟掉非肝細胞 (nonparenchymal cell)，對於肝細胞來說異體免疫反應為什麼比整個肝臟強烈，有一種可能性可以來解釋。肝內微環境和非肝細胞 (nonparenchymal) 細胞 (特別是 hepatic dendritic cell) 兩者被認為與整個肝臟同種異體移植的低免疫原性有關³⁶。因此當我們單獨只移植分離的肝細胞，我們也會喪失對於肝臟高免疫耐受性 (tolerogenicity) 有益的因子。先前的研究顯示實心異體器官 (solid allograft) 典型的異體免疫反應主要依賴 CD4 和 CD8 T cell 調節反應。但是 Bumgardner 證明，肝細胞在異體免疫反應中 CD4 和 CD8 T cell 兩者的關聯是分開獨立的。CD8 T cell 甚至能在沒有 CD4 T cell 幫助下被活化並且與其它固體器官相比較下，CD8 T cell 在肝細胞異體免疫反應中扮演更重要的角色³³。大家所熟知的信號 2 B7.1, B7.2/CD 28 costimulation 途徑與 CTLA 4lg 的堵塞不能有效的防止肝細胞的排斥。大部分的研究發現要是新的 costimulation 途徑，特別集中在肝細胞異體免疫反應相關之 CD8+T cell 活性有關之分子 (PD-1, OX40, 4-1BB, CD7 等等)，將有助於確認肝細胞異體免疫反應的抑制目標³⁷。肝細胞的同種異體免疫反應比器官還要強烈。我們測試了許多不同在臨床上使用的免疫抑制藥物，包含了 cyclosporine、tacrolimus、rapamycin、certican、MMF 和 FTY720，並試著找出最有效的藥量以及混合出可以增加在我們同種移植模式 (從 LEA 到 F344 大鼠) 中的肝細胞的存活率。我們所選用的任一種藥物或是藥量都無法增加存活率，但以 calcineurin 抑制劑為基礎的混合法 (Tacrolimus 2mg/Kg+Rapamycin 0.4~0.8mg/Kg, Tacrolimus 2mg/Kg+MMF 100mg/Kg, Cyclosporine 20mg/Kg+FTY 6mg/Kg)，可以有效的增加同種肝細胞的存活率。但是在混合法時我們所選用的有效藥量比起器官等級還要高，這又再次證明肝細胞有較強的同種異體免疫反應。當我們選用適合的免疫抑制實驗方法來進行同種肝細胞的移植，我們也須將這些藥物在免疫抑制之外所帶來的額外影響列入考慮。肝細胞的移植能力和增殖能力需要有所精進以增加肝細胞移植的效率。所以我們必須專研於是否這些藥物會對此兩部份產生

額外的影響。前人研究指出在進行部分肝切除之後，calcineurin 抑制劑可增加肝臟的再生，並且在 *in vitro* 細胞培養時可增加 DNA 的合成。因此以 calcineurin 抑制劑為基礎的免疫抑制實驗方法會是同種肝細胞移植的選擇。雖然在我們的 *in vivo* 肝細胞移植系統中並未發現 tacrolimus 會產生利肝的效應，但我們也沒有看到在肝細胞的移植和增殖上有任何的不良影響。³⁵ Rapamycin 和 MMF 不僅對免疫細胞，也對非免疫細胞產生抗增殖的效應。最近我們發現單獨使用 MMF 或是結合 tacrolimus 施用都不會對肝細胞的移植和增殖能力有不良的影響。但是 rapamycin 卻有雙重效應—增加細胞移植和降低細胞增殖的能力³⁵。(圖三~四) 這種雙重效應對於只需移植能力不需增值能力的細胞移植是有利的(胰島細胞)，但對於具備高增殖能力的細胞移植則是有害的(肝細胞和幹細胞)。



圖三、Rapamycin 在肝細胞移植的雙向效果。在 DPPIV 組織化學染色後移植肝細胞可被輕易認出(紅色箭頭)。(a) 在控制組的動物可發現只有 970 ± 375 移植肝細胞在每立方公釐的宿主肝臟內。(b) 在 rapamycin 治療後，移植肝細胞的嵌入率可增加 2 倍以上到 2318 ± 74 移植肝細胞在每立方公釐的宿主肝臟內。(c) 控制組的動物宿主在經過 retorsine 及部分肝切除的前置訓練後，移植肝細胞可在移植後 3 個禮拜取代 50% 的宿主肝細胞。(d) 動物宿主在接受 rapamycin 的治療後抑制了移植肝細胞的繁殖(a、b—400X，肝細胞移植後一個禮拜，c、d—100X，肝細胞移植後三個禮拜)(參考文獻 52)。



圖四、Ki-67 免疫染色來偵測肝細胞的複製。在部分肝切除後 30 個小時，在控制組或 MMF 治療的動物有超過 70% 的肝細胞在積極的複製，但 Rapamycin 治療後，積極複製的肝細胞被抑制到 20%（參考文獻 52）。

4. 冷凍保存

分離出來的細胞可能無法馬上使用，所以如何將冷凍保存細胞一段時間將是件重要的課題。建立一個有良好冷凍細胞品質的細胞銀行將提供治療的方便性，特別是對於不能長時間等待的急性肝衰竭病患來說。經過冷凍保存的小鼠和人類肝細胞在體外實驗中仍保有功能的完整性，並且就算在經過長時間的冷凍保存之後（超過兩年）亦能在小鼠的肝臟中存活、移植和增殖³⁸⁻³⁹。從肝臟分離出來的人類肝細胞能被冷凍保存，並藉由人工生物儀器的協助，可使解凍後的肝細胞當成對患有猛爆性肝炎病人的有效治療橋樑。但是經過冷凍保存的肝細胞在經過解凍之後其存活率會降低。此外跟新鮮的肝細胞相比，在體內的實驗中發現經過冷凍保存的肝細胞在改善代謝缺失方面的功能是比较沒有效率的⁴⁰。已有許多的研究試圖修改冷凍保存的實驗流程以減少對細胞的傷害。經由 UW 或 HypoThermosol (HTS) 處理的初級分離肝細胞，在經過冷凍保存和解凍之後其存活率和代謝功能都會增加⁴¹。施以抗氧化劑和 caspase 抑制劑於冷凍保存的培養基中也可以增加在經過冷凍保存和解凍之後的存活率以及

細胞功能⁴²。統整這些實驗的結果並且建構出適合的冷凍保存實驗流程將會對於建立細胞銀行和得到可供臨床應用的高品質細胞有莫大的幫助。

5. 替代的肝細胞來源（不朽的肝細胞—immortalized hepatocytes，異種肝細胞—xenogenic hepatocytes，幹細胞—stem cells）

因為捐贈者的不足所以肝細胞有許多種不同的替代來源。藉由 simian virus (SV) 40 T 抗原的傳染或是使用 telomerase 進行基因重組，肝細胞可以變成不朽的狀態⁴³。在體外的情況下這些細胞可以一直分裂並且可以一直擴大。利用這些不朽的細胞進行細胞移植於有急性或是慢性肝炎的動物時，發現會有治療的功效⁴⁴。在小鼠和豬的動物模式中，從人類取出分泌胰島素的不朽細胞或是胎兒的 hepatoblasts 可以矯正血糖過高的問題⁴⁵。因為這些細胞具有高效能以及我們不需要擔心如何取得這些細胞，不朽的肝細胞是個可靠的來源。但是在廣泛的應用之前，我們仍然需要有更多的研究來排除這些不朽細胞潛在的致癌性。當我們論及捐贈者短缺的問題時，跨品種的異種捐贈總是另一種選擇，有報導指出在患有急性和慢性肝衰竭的動物中進行異種移植也可以對其存活率和生化功能有所助益^{46,25}。現在於隨機的臨床實驗中已被證實異種肝細胞可被應用於多種不同的人工生物儀器上，以增進患有猛爆性或是次猛爆性肝炎病患的存活率，特別是在豬的動物模式⁴⁷。但是在臨床使用之前我們仍然需解決潛在的超級性排斥反應和寄生病傳染的問題。在經由適當的刺激之後幹細胞具有各種可塑性且能分化成許多不同的細胞品系。所以幹細胞的再生療法在臨床上已被運用在代謝缺失、退化的疾病等等。有許多不同的幹細胞已被指出在體外或是體內的培養下，可以分化為成熟的肝細胞或是具有肝細胞代謝功能的類肝細胞，包含了肝先驅細胞（卵圓細胞），胚胎幹細胞和骨髓細胞⁴⁸。在動物實驗中骨髓細胞也被指出可以改善肝臟代謝的疾病⁴⁹。幹細胞如何變成肝細胞？原本我們相信幹細胞可以轉變分化成肝細胞是因為他的可塑性。最近某些研究團隊指出這些幹細胞轉成的肝細胞是經由與宿主細胞進行融合而生成，並不是自己轉變分化而成的⁵⁰。但是也有其他證據指出幹細胞可以不經由融合的過程就變成肝細胞⁵¹。因此究竟幹細胞變成肝細胞的過程究竟是經由融合還是轉變分化而成的仍然還不是非常清楚。或許兩條路徑會同時進行。總之在利用細胞治療肝臟疾病時，幹細胞是最值得注意的細胞替代來源。

6. 人類細胞的研究

利用人類細胞在動物模式中進行細胞移植提供了我們有關細胞行為的資訊。在 uPA-NOD-SCID 小鼠進行的人類化模式中近乎完全的人類初級肝細胞移植重建顯示了捐贈者肝細胞強大的增殖能力並且提供了研究人類肝臟疾病的模式，像是 B 型和 C 型肝炎病毒感染和藥物代謝的研究⁵¹⁻⁵²。冷凍保存的人類早期胎兒 hepatoblasts 被指出具有較高的增殖能力，以及在無胸腺小鼠的肝臟中，就算在其接受者（成熟肝細胞無法增殖）沒有先行經過處理的情況下，移植後也較能分化為成熟的肝細胞⁵³。從人類骨髓中取的造血幹細胞或是臍帶血被指出於免疫缺陷小鼠的肝臟中會分化為肝細胞或是類肝細胞⁵⁴。人類骨髓的間葉系幹細胞也被指出在異種移植的情況下可以於大鼠的肝臟中分化成人類的肝細胞⁵⁵。這些研究對幹

細胞移植入有肝臟疾病的臨床研究應用上提供了有用的資訊。從人類骨髓中取得的造血幹細胞或是臍帶血以子宮內異種移植的方式於大型動物模式（綿羊，山羊）中進行的實驗顯示出人類肝細胞可長時間存活和進行分化⁵⁶。子宮內幹細胞移植的研究提供了另一條治療先天遺傳缺陷的方法和 immunoprivilege 的優點。

四、肝細胞移植的臨床治療經驗

1. 臨床治療經驗

在過去十年中有關臨床肝細胞移植的案例相當有限（60 個案例）。這些疾病的種類可被分成三大類—慢性肝硬化、猛爆性肝衰竭和肝臟代謝疾病。第一個臨床肝細胞移植案例是由 Mito 等人於 1992 年提出報告⁵。他們對十位肝硬化病患施以從自體切除所分離出來的肝細胞進行自體移植。因為有許多的肝細胞在切除和分離時會流失而導致這個治療方針窒礙難行。雖然在 1 至 11 個月內他們可以觀測到移植的肝細胞出現在脾臟中，但並沒有證據提出此移植有任何貢獻。雖然在動物實驗中提出肝細胞移植對於患有慢性肝硬化的動物在代謝功能和存活率上有幫助，但在臨床上卻只有 6 個慢性肝硬化施以同種肝細胞移植的案例^{32,57}。其中三個案例存活下來，另外三個則在細胞移植後死亡。從這些有限的案例中很難作出任何結論，特別是只移植入相對於受捐者肝臟少於 0.05% 的細胞量。有 28 個案例關於在猛爆性肝衰竭的病患中施以 0.5~5% 的同種肝細胞移植，其中包含了 6 個完全康復，6 個改為肝臟移植而順利存活，但仍有 16 個案例在細胞移植之後還是死亡^{6,32,58}。Habibullah 等人指出七分之三的高等腦病變（advanced encephalopathy）病患在施以腹膜腔的同種胎兒肝細胞移植後會康復⁶。Strom 指出 6 位患有急性肝衰竭的病患在施以肝細胞移植後進行整個肝臟的移植能改善腦部和心血管的不穩定性和撤除強烈的藥物施予^{32,58}。Bilir 表示 5 位患有猛爆性肝衰竭的病患在施以肝細胞移植後，其在腦病變（encephalopathy）、氮代謝和前凝血時間方面上都有所改善。雖然最終 5 位病患還是都死了，但其中三位有延長存活時間（12、28 和 52 天）。雖然因為其偶發性和沒有非常嚴謹的實驗研究讓我們很難做出任何結論，但是肝細胞移植在治療急性肝衰竭病患的策略上的確扮演著相當的角色。這也增大另一種角色，也許是一個對於急性肝衰竭病人進行肝細胞移植上比較可行的角色，將此作為整個器官移植的治療橋樑或是等待自體康復時的一個治療橋樑。關於施予肝細胞移植來治療肝臟代謝疾病的 16 個案例中，有 4 例是自體肝細胞，另外 12 例是異體肝細胞移植。Grossman 等人報導 4 個家族高血膽固醇的病人在施以經由體外的反轉錄病毒感染入人類 LDL 受體基因的自體肝細胞移植後⁷，在長時間的觀察之下，只能對代謝缺失產生有限的助益（最多能降低 20% 的膽固醇）。反轉錄病毒感染治療效率的低落可能導因於沒有足量的細胞進行移植。12 位進行異體肝細胞移植的病人，包括 ornithine transcarbamylase (OTC) deficient 4、Crigler-Najjar syndrome 2、alpha-1-antitrypsin deficiency (A1AT) 2、glycogen storage disease 1、hemophilia 2 和

infantile Refsum disease (IRD) 1^{32,59-60}。簡單來說，代謝缺失可以在經由 0.1~5% 的肝細胞移植之後，藉由像是生化研究、其他替代的醫藥治療和飲食控制來進行部份的改正。有兩個雖然只是部分更正代謝缺失的移植案例顯示可以增加存活時間(超過 1 年)。有 5 個案例顯示在經過細胞移植之後的初期，其代謝缺失會有改善，但是經過一段時間之後又會回復原狀(11 天到 6 個月)^{10,13-15}。不適當的免疫抑制被高度懷疑為移植失敗的主因。在這些案例中免疫抑制的施加是混合 steroid 和 tacrolimus 或是單獨使用 tacrolimus。我們需要調整出使適當的免疫抑制實驗流程來抑制越發強烈的自體免疫和增加這些異體移植細胞的存活時間，卻又不能都依照我們從整個器官移植所得的經驗來實行。終於有 8 個案例接受了肝臟移植，其中包含了 Fox 所提出的一名存活最久的移植病患^{2,8,10,13-15}。這些流程的運用是相對安全的。唯一被報導出來主要的併發症是一名進行完肝臟移植的急性移植衰竭病患，在他被施以冷凍保存肝細胞移植後於門靜脈形成血栓，而這位病人最後沒能存活下來⁶¹。

2. 近期經驗的限制

導致臨床上肝細胞移植進步緩慢的主因是器官取得的不易。整個器官的移植有良好的結果並且在近幾年來已成為在末期肝臟疾病上有完整建構的治療選擇，但對於肝細胞移植來說卻有諸多難處—從有效利用捐贈器官的觀點看來，就算這項新策略比起已有完整建構的整個器官移植具有許多潛在的優勢，但以一項新的治療策略來與整個肝臟移植競爭仍有難處。不過對於每個尚未廣泛使用的新治療方法而言，這也是項不可避免的議題。所以現今整個器官移植仍是移植的最佳選擇。我們只能使用無法進行移植的移植片當作細胞移植的來源。當然這些細胞的品質將不會是最好的。這也是為何要累積臨床的經驗會如此的困難。肝臟的 immunoprivilege 是由微環境和非肝細胞所產生。在我們進行灌流時將微環境和非肝細胞的部份給去除掉。僅移植肝細胞可能不會像整個肝臟移植般有低的免疫反應，甚至可能會因為失去保護構造而導致更加容易被宿主的免疫細胞所攻擊。這些專研於肝細胞自體免疫反應的研究相當的有限。我們不能將整個肝臟移植的經驗運用到肝細胞移植上。所以自體肝細胞移植的效率可以在更清楚界定肝細胞自體免疫反應的特質後有所精進。第三個限制是我們仍然沒有方便的測定方法來對存活率、移植的百分比或是移植肝細胞的重建進行估算。我們藉由能在數量上可被監測的特殊遺傳物質或是酵素的動物模式來累積所移植的肝細胞行為模式。但這在臨床研究上是不實際的。現今在臨床上我們僅需利用病人的存活率和一些生化因子的改變去觀測所移植的細胞是否存活和正常的運作。這些方法將有效的去估算有代謝缺失之病人的移植存活率，因為代謝缺失的問題可被捐贈者健康的細胞完全矯正。但是病人的存活率和生化因子的改變在估算移植功能上來說是相當主觀的方法。因為這些改善可能導因於宿主自發性的重建。之前我們能藉由組織 in situ 的 Y 染色體在 sex mis-matched combination 的雜交實驗辨認出宿主細胞⁶²。Soriano 研發出利用 RT-PCR 對 Y 染色體上 SPY 基因進行定量分析以計算宿主細胞移植效果的方法⁶³。但這方法只能運用在 sex-mismatched combination 上。Fisher 利用 ELISA 偵測宿主專一性的可溶性 HLA I 和利用 PCR 分析 short tandem

repeats 去估算宿主細胞的移植程度⁶⁴。這兩種分析方法亦能被運用到 sex-mismatched combination 上，不過我們仍然在靈敏度（前者）和專一性（後者）上有所擔憂。研發出更可靠和更方便的分析方法來追蹤和估算移植效率將對把這些方法運用在臨床上大有益處，不過仍須繼續努力。

3. 最近於進階運用上的挑戰

現今在肝細胞移植上仍有一些問題尚待解決。如何將我們從動物實驗上得到的可信結果轉移到臨床上將是最近在進階運用上的挑戰。在細胞上的缺點是我們需要移除的首要障礙。有兩個可能解決此障礙的方案—替代的細胞來源和改善效率的操作方法。不死的細胞具有致癌的潛在危險。異種細胞則有強烈的跨種免疫反應和寄生病傳染的問題。所以最佳的替代細胞來源應該是幹細胞。從胚胎來的幹細胞會有道德問題上的擔憂。從其他像是骨髓或是臍帶血來的已經由 *in vitro* 和 *in vivo* 的動物模式實驗證明可以分化成有功能的肝細胞。利用幹細胞治療臨床肝臟疾病將是一個巨大挑戰但卻也值得期待。第二個挑戰是增加有前處理之受捐者有限細胞的效率。在動物模式中有許多的操作方法可以增加移植能力和刺激移植細胞的增生能力。因為怕會有副作用發在其他器官，系統性的運用化學藥物是不能使用在臨床上。因此在臨床上用以改善細胞移植的操作方法為局部施加血管擴張劑或是在進行細胞移植時於細胞外基質施藥。在臨床上可用來刺激移植細胞進行增生的方法是利用局部肝切除以造成利肝環境或是短暫的局部缺血和利用局部輻射來抑制宿主細胞的增殖能力。局部肝切除是一個侵入性的過程，所以不會是第一的選擇。因此在臨床上對受捐者而言最適的前處理方針應該是施以短暫的局部缺血和局部輻射。於臨床上將此概念運用在受捐者的前處理也是一項重大的挑戰。

五、總結和未來方向

肝細胞移植已被研發為一種臨床治療的選擇有超過十年之久。雖然在動物模式上已有許多研究結果，但在臨床經驗上卻非常有限。而造成此緩慢進步的主要障礙就是細胞來源的短缺。利用替代的細胞來源（尤其是先驅細胞）進行治療效率的鑑定將會是在未來廣泛運用的最大課題。在動物模式上已被證實有許多操作方法可以有效的藉由改善細胞的移植力和增殖力來增加細胞移植的效果。如何運用對受捐者施行前處理的概念將會是在臨床上增加肝細胞移植的一個挑戰。在臨床運用上最適合的前處理應該是局部的輻射和短暫性的缺血。鑑定出肝細胞自體免疫反應的專一特性和研發有效的免疫抑制實驗方法將會是另一項重要的課題。修改冷凍保存的實驗流程也有助於增加所分離之細胞的品質。所有這些項目都將是我們在未來需要投注心力的研究方向。

Acknowledge：感謝林欣緣和許弼強的文書整理

六、参考文献

1. Gaglia, J. L., Shapiro, A. M. & Weir, G. C. Islet transplantation: progress and challenge. *Arch Med Res.* **36**:273-80 (2005).
2. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Paty, B. W., Senior, P. A., Bigam, D. L. & Ryan, E. A. Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* **79**:1304-7 (2005).
3. Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**:29-83 (1976).
4. Matas, A. J., Sutherland, D. E., Steffes, M. W., Mauer, S. M., Sowe, A., Simmons, R. L. & Najarian, J. S. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: Decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* **192**:892-4 (1976).
5. Mito, M., Kusano, M. & Kawaura, Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc.* **24**: 3052-3053 (1992).
6. Habibullah, C., Syed, I., Qamar, A. & Taher-Uz, Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* **58**:951-952 (1994).
7. Grossman, M., Rader, D., Muller, D., Kolansky, D., Kozarsky, K., Clark, B. J., Stein, E. A., Lupien, P. J., Brewer, H. B. Jr. & Raper, S. E. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med.* **1**:1148-54 (1995).
8. Gupta, S., Rajvanshi, P. & Lee, C. D. Integration of transplanted hepatocytes in host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV deficient rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:5860-4 (1995).
9. Rajvanshi, P., Kerr, A., Bhargava, K. K., Burk, R. D. & Gupta, S. Efficiency and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology* **111**:1092-1102 (1996).
10. Morath, C. & Zeier, M. Review of the antiproliferative properties of mycophenolate mofetil in non-immune cells. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **41**:465-9 (2003).
11. Gupta, S., Malhi, H. & Gorla, G. R. Re-engineering the liver with natural biomaterials. *Yonsei Med J.* **41**:814-24 (2000).
12. Ohashi, K., Waugh, J. M., Dake, M. D., Yokoyama, T., Kuge, H., Nakajima, Y., Yamanouchi, M., Naka, H., Yoshioka, A. & Kay, M. A. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* **41**:132-40 (2005).
13. Gupta, S., Vemuru, R. P., Lee, C. D., Yerneni, P., Aragona, E. & Burk, R. D. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: Implications for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther.* **5**: 959-67 (1994).
14. Gupta, S., Rajvanshi, P., Sokhi, R., Slehria, S., Yam, A., Kerr, A. & Novikoff, P. M. Entry and

integration of transplanted Hepatocytes in liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* **29**:509-19 (1999).

15. Gupta, S., Vasa, S. R., Rajvanshi, P., Zuckier, L. S., Palestro, C. J. & Bhargava, K. K. Analysis of hepatocytes distribution and survival in vascular beds with cells marked by ^{99m}Tc or endogenous dipeptidyl peptidase IV activity. *Cell Transplant* **6**:377-86 (1997).
16. Gupta, S., Rajvanshi, P., Malhi, H., Slehria, S., Sokhi, R. P., Vasa, S. R., Dabeva, M., Shafritz, D. A. & Kerr, A. Cell transplantation causes loss of gap junctions and activates GGT expression permanently in host liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **279**:G815-26 (2000).
17. Koenig, S., Stoesser, C., Krause, P., Becker, H. & Markus, P. M. Liver repopulation after hepatocellular transplantation integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* **14**:31-40 (2005).
18. Ponder, K. P., Gupta, S., Leland, F., Darlington, G., Finegold, M., DeMayo, J., Ledley, F. D., Chowdhury, J. R. & Woo, S. L. Mouse Hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:1217-21 (1991).
19. Joseph, B., Malhi, H., Bhargava, K. K., Palestro, C. J., McCuskey, R. S. & Gupta, S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* **123**:1677-85 (2002).
20. Malhi, H., Annamaneni, P., Slehria, S., Joseph, B., Bhargava, K. K., Palestro, C. J., Novikoff, P. M. & Gupta, S. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improved transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology* **36**:112-21 (2002).
21. Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**:1149-52 (1994).
22. Gupta, S., Aragona, E., Vemuru, R. P., Bhargava, K. K., Burk, R. D. & Chowdhury, J. R. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology* **14**:144-9 (1991).
23. Gagandeep, S., Rajvanshi, P., Sokhi, R. P., Slehria, S., Palestro, C. J., Bhargava, K. K. & Gupta, S. Transplanted Hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Pathol.* **191**:78-85 (2000).
24. Kobayashi, N., Ito, M., Nakamura, J., Cai, J., Gao, C., Hammel, J. M. & Fox, I. J. Hepatocytes transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* **31**:851-7 (2000).
25. Nagata, H., Ito, M., Cai, J., Edge, A. S., Platt, J. L. & Fox, I. J. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocytes xenotransplantation. *Gastroenterology* **124**:422-31 (2003).
26. Mitchell, C., Mignom, A., Guidotti, J. E., Besnard, S., Fabre, M., Duverger, N., Parlier, D., Tedgui, A., Kahn, A. & Gilgenkrantz, H. Therapeutic liver repopulation in a mouse model of hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet.* **9**:1597-602 (2000).

27. Attaran, M., Schneider, A., Grote, C., Zwiens, C., Flemming, P., Gratz, K. F., Jochheim, A., Bahr, M. J., Manns, M. P. & Ott, M. Regional and transient ischemia/reperfusion injury in the liver improves therapeutic efficiency of allogeneic intraportal hepatocyte transplantation in low-density lipoprotein receptor deficient Watanabe rabbits. *J Hepatol.* **41**:837-44 (2004).
28. Yoshida, Y., Tokusashi, Y., Lee, G. H. & Ogawa, K. Intrahepatic transplantation of normal Hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology* **111**: 1654-60 (1996).
29. Malhi, H., Irani, A. N., Volenberg, I., Schilsky, M. L. & Gupta, S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* **122**:438-47 (2002).
30. De Vree, J. M. L., Ottenhoff, R., Bosma, P.J., Smith, A. J., Aten, J. & Oude Elferink, R. P. Correction of liver disease by hepatocytes transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **119**:1720-30 (2000).
31. Qian, S., Demetris, A. J., Murase, N., Rao, A. S., Fung, J. J. & Starzl, T. E. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* **19**:916-24 (1994).
32. Strom, S. C., Chowdhury, J. R. & Fox, I. J. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis.* **19**:39-48 (1999).
33. Bumgardner, G. L. & Orosz, C. G. Unusual patterns of Alloimmunity evoked by allogeneic liver parenchyma cells. *Immunol Rev.* **174**:260-79 (2000).
34. Bumgardner, G. L., Li, J., Prologo, J. D., Heining, M. & Orosz, C. G. Patterns of immune responses evoked by allogeneic hepatocytes. Evidence for independent co-dominant roles for CD4+ and CD8+ T-cell responses in acute rejection. *Transplantation* **68**:555-562 (1999).
35. Wu, Y. M., Joseph, B. & Gupta, S. Immunosuppression using the mTOR inhibition mechanism affects replacement of the rat liver with transplanted cells. *Hepatology* **44**: 410-419 (2006).
36. Starzl, T. E. The "privileged" liver and hepatic tolerogenicity. *Liver Transpl* **7**:918-20 (2001).
37. Reddy, B., Gupta, S., Chuzhin, Y., Kalergis, A. M., Budhai, L., Zhang, M., Droguett, G., Horwitz, M. S., Chowdhury, J. R., Nathenson, S. G. & Davidson, A. The effect of CD28/B7 blockade on alloreactive T and B cells after liver cell transplantation. *Transplantation* **71**:801-11 (2001).
38. Jamal, H. Z., Weglarz, T. C. & Sandgren, E. P. Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* **118**:390-4 (2000).
39. Cho, J. J., Joseph, B., Sappal, B. S., Giri, R. K., Wang, R., Ludlow, J. W., Furth, M. E., Susick, R. & Gupta, S. Analysis of the functional integrity of cryopreserved human liver cells including xenografting in immunodeficient mice to address suitability for clinical applications. *Liver Int* **24**: 361-70 (2004).

40. David, P., Alexandre, E., Audet, M., Chenard-Neu, M. P., Wolf, P., Jaeck, D., Azimzadeh, A. & Richert, L. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant* **10**:67-80 (2001).
41. Kunieda, T., Maruyama, M., Okitsu, T., Shibata, N., Takesue, M., Totsugawa, T., Kosaka, Y., Arata, T., Kobayashi, K., Ikeda, H., Oshita, M., Nakaji, S., Ohmoto, K., Yamamoto, S., Kurabayashi, Y., Kodama, M., Tanaka, N. & Kobayashi, N. Cryopreservation of primarily isolated porcine hepatocytes with UW solution. *Cell Transplant* **12**:607-16 (2003).
42. Fujita, R., Hui, T., Chelly, M. & Demetriou, A. A. The effect of antioxidants and a caspase inhibitor on cryopreserved rat Hepatocytes. *Cell Transplant* **14**(6):391-6 (2005).
43. Wege, H., Le, H. T., Chui, M. S., Liu, L., Wu, J., Giri, R., Malhi, H., Sappal, B. S., Kumaran, V., Gupta, S. & Zern, M. A. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal Hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* **124**:432-44 (2003).
44. Cai, J., Ito, M., Nagata, H., Westerman, K. A., Lafleur, D., Chowdhury, J. R., Leboulch, P. & Fox, I. J. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology* **36**:386-94 (2002).
45. Zalzman, M., Gupta, S., Giri, R. K., Berkovich, I., Sappal, B. S., Karnieli, O., Zern, M. A., Fleischer, N. & Efrat, S. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:7253-8 (2003).
46. Mai, G., Huy, N. T., Morel, P., Mei, J., Andres, A., Bosco, D., Baertschiger, R., Toso, C., Berney, T., Majno, P., Mentha, G., Trono, D. & Buhler, L. H. Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes. *Xenotransplantation* **12**:457-64 (2005).
47. van de Kerkhove, M. P., Hoekstra, R., Chamuleau, R. A. & van Gulik, T. M. Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg.* **240**:216-30 (2004).
48. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. & Goff, J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**:1168-70 (1999).
49. Allen, K. J., Cheah, D. M., Lee, X. L., Pettigrew-Buck, N. E., Vadolas, J., Mercer, J. F., Ioannou, P. A. & Williamson, R. The potential of bone marrow stem cells to correct liver dysfunction in a mouse model of Wilson's disease. *Cell Transplant* **13**:765-73 (2004).
50. Vassilopoulos, G., Wang, P. R. & Russell, D. W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**:901-4 (2003).
51. Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M. & Sharkis, S. J. Hematopoietic stem cells

- convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* **6**(6):532-9 (2004).
52. Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L. & Kneteman, N. M. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**:927-33 (2001).
 53. Mahieu-Caputo, D., Allain, J. E., Branger, J., Coulomb, A., Delgado, J. P., Andreoletti, M., Mainot, S., Frydman, R., Leboulch, P., DiSanto, J. P., Capron, F. & Weber, A. Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther.* **15**: 1219-28 (2004).
 54. Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q. L., Crooks, G. M. & Nolte, J. A. Albumin-expressing hepatocytes-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* **101**:4201-8 (2003).
 55. Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H. & Niitsu, Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**:756-63 (2005).
 56. Almeida-Porada, G., Porada, C. D., Chamberlain, J., Torabi, A. & Zanjani, E. D. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* **104**:2582-90 (2004).
 57. Bilir, B. M., Guenette, D., Ostrowska, A., et al. Percutaneous hepatocytes transplantation (PHT) in liver failure. *Hepatology* **26**:494 (1997).
 58. Soriano, H., Wood, R., Kang, D., Ozaki, C., Finegold, M., Bishoff, F., et al. Hepatocellular transplantation in children with fulminant liver failure. *Hepatology* **26**(4):239A (1997).
 59. Mitry, R. R., Dhawan, A., Hughes, R. D., Bansal, S., Lehec, S., Terry, C., Heaton, N. D., Karani, J. B., Mieli-Vergani, G. & Rela, M. One liver, three recipients: Segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* **77**:1614-6 (2004).
 60. Dhawan, A., Mitry, R. R., Hughes, R. D., Lehec, S., Terry, C., Bansal, S., Arya, R., Wade, J. J., Verma, A., Heaton, N. D., Rela, M. & Mieli-Vergani, G. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* **78**:1812-4 (2004).
 61. Baccarani, U., Adani, G. L., Sanna, A., Avellini, C., Sainz-Barriga, M., Lorenzin, D., Montanaro, D., Gasparini, D., Risaliti, A., Donini, A. & Bresadola, F. Portal vein thrombosis after intraportal hepatocytes transplantation in a liver transplant recipient. *Transpl Int.* **18**:750-4 (2005).
 62. Guettier, C., Sebah, M., Buard, J., Feneux, D., Ortin-Serrano, M., Gigou, M., Tricottet, V., Reynes, M., Samuel, D. & Feray, C. Male cell microchimerism in normal and diseased female livers from fetal life to adulthood. *Hepatology* **42**(1):35-43 (2005).
 63. Wang, L. J., Chen, Y. M., George, D., Smets, F., Sokal, E. M., Bremer, E. G. & Soriano, H. E.

Engraftment assessment in human and mouse liver tissue after sex-mismatched liver cell transplantation by real-time quantitative PCR for Y chromosome sequences. *Liver Transpl* **8**: 822-828 (2002).

64. Mas, V. R., Maluf, D. G., Thompson, M., Ferreira-Gonzalez, A. & Fisher, R. A. Engraftment measurement in human liver tissue after liver cell transplantation by short tandem repeats analysis. *Cell Transplant*.**13**:231-6 (2004).

第三章

糖尿病之細胞治療-胰島細胞移植

Cell Therapy for Diabetes-Islet Transplantation

楊卿堯 田郁文 李伯皇

臺灣大學醫學院 外科

一、前言

胰島細胞移植在過去 30 年來一直被研究用來作為嚴重性第一型糖尿病人的治療方法之一：只是在 1999 年以前，因為胰島分離的技術不成熟，分離的胰島純度及數量皆不足，免疫抑制藥物的高胰島細胞毒性等等困難，使得接受胰島細胞移植的第一型糖尿病患第一年的免用胰島素的比率只有 8.2 %¹。一直到 2000 年，加拿大 Edmonton, Alberta 大學在新英格蘭醫學期刊 (NEJM) 發表了七位接受胰島細胞移植的病患，平均第一年移植後追蹤免用胰島素的比率為 100 %，才使胰島細胞移植又重新受到重視²。在亞洲，日本、韓國及中國也各有數例成功完成移植的案例³。目前胰島細胞移植這項新醫療技術，可以說在細胞治療或細胞移植領域內，進展最為快速且實際上已運用在臨床治療的一部份。在本章節中，我們將從胰島細胞移植的歷史、臨床現況及未來發展，一一為大家說明。

二、胰島細胞移植的歷史 (Figure 1)

在胰島素被發現前 30 年-西元 1893 年，英國外科醫師 Dr. Watson-Williams 報告，曾嘗試使用羊的胰臟碎片 (minced pieces) 移植到一位因糖尿病酮酸血症幾乎垂死的 15 歲男童皮下，雖然短暫性的改善糖尿 (glucosuria)，但異種移植註定因排斥問題，很快就失敗了，小男童也於移植後 3 天內死亡⁴。但這卻是臨床上最早有紀錄用部分胰臟碎片嘗試治療人類的糖尿病。

其實到 1922 年，Dr. Banting 和 Dr. Best 等人，才發表胰島素的發現及應用在臨床治療高血糖症上⁵。一直到 1966 年，Dr. Kelly 和 Dr. Lillehei 在明尼蘇達大學完成了首例的胰臟移植手術⁶，最初的結果，因為有很高的手術併發症及死亡率，因此，利用胰臟內分泌細胞 (胰島) 來移植的想法，引起很多人的興趣。在 1972 年由華盛頓大學的 Dr. Paul E. Lacy 發表了利用大鼠胰島分離及移植治療糖尿病大鼠之動物模式⁷。1977 年由 Dr. Najarian 等人發表 7 例的人類胰島異體移植，但結果相當不好，只有少數病患在短期內能減少部份的胰島素使用

量⁸。主要因為當時的胰島分離及純化技術還很初期，所得的組織，充其量只能說是胰臟的 fragments。因而導致移植的胰島組織堵塞肝門脈血管及種種併發症。因此胰島分離及純化的技術改良，以提高所得胰島的產量及純度是當時迫切需要改善的問題。

到了 1986 年，Dr. Ricordi 發明了自動化的方式分離胰島細胞，使得胰島分離的產量大量提高⁹；到 1990 年匹茲堡（Pittsburgh University）大學，發表了 9 例異體胰島移植（islet allotransplantation），成功的達到長期免用胰島素 Insulin Independence 的系列報告（serious report）；其中有一部份成功的原因，在於他們改用非類固醇（non-steroid）類的免疫抑制劑（Fk506）^{10,11}；由於這一系列異體胰島移植成功的報告，掀起一股異體胰島移植臨床試驗的熱潮，包括米蘭、邁阿密、加拿大 Edmonton、St. Louis 和 Minneapolis 等地大學醫院紛紛投入臨床試驗或研究，只可惜這一波熱潮，到 1999 年逐漸降溫到低點¹²。

因為從現在的經驗知道，當時（1）不夠充分的免疫抑制治療，無法有效的抑制急性、慢性異體移植後排斥的問題。（2）第一型糖尿病患自體免疫（autoimmune）的再發。（3）不足量的胰島移植。（4）胰島移植後低存活等問題，使得這 10 年（1990-1999）的胰島移植結果不理想。大約只有 1/3 的胰島移植物在一年後還有功能。而一年的免用胰島素比率也只有 10% 不到；而且推估有超過 50% 的胰島細胞在移植後兩個月內死亡。雖然如此，胰島分離的技術，在這十年間，也有很大的進步，包括：1993 年 Dr. Robertson 等人發明了利用血球分離機（COBE 2991）及連續性差異梯度（continuous gradient）來大量純化胰島¹³，1997 年 Dr. Linetsky 等人將 Roche 藥廠研發低內毒素的消化酵素（liberase）運用在胰島分離的製程中¹⁴，及其他胰島分離純化技術的改良，使得各胰島細胞分離移植中心能夠得到更大量、更純但組織總體積更少的胰島細胞。

過去近 30 年技術的改良及經驗也部份奠定了加拿大 Alberta 大學，2000 年在 NEJM 發表運用 Edmonton protocol 異體胰島移植治療第一型糖尿病患的佳績²，至此也引發世界各大醫學中心胰島移植的大規模臨床試驗與運用的另一波熱潮。目前，胰島細胞異體移植、自體移植及異種移植研究，以及 β -cell 或 islet-like tissue 的代替物（replacement）的幹細胞研究，已成為細胞治療或再生醫學研究最為熱門的生命科學，而且是目前最接近臨床運用的一門新醫療技術。

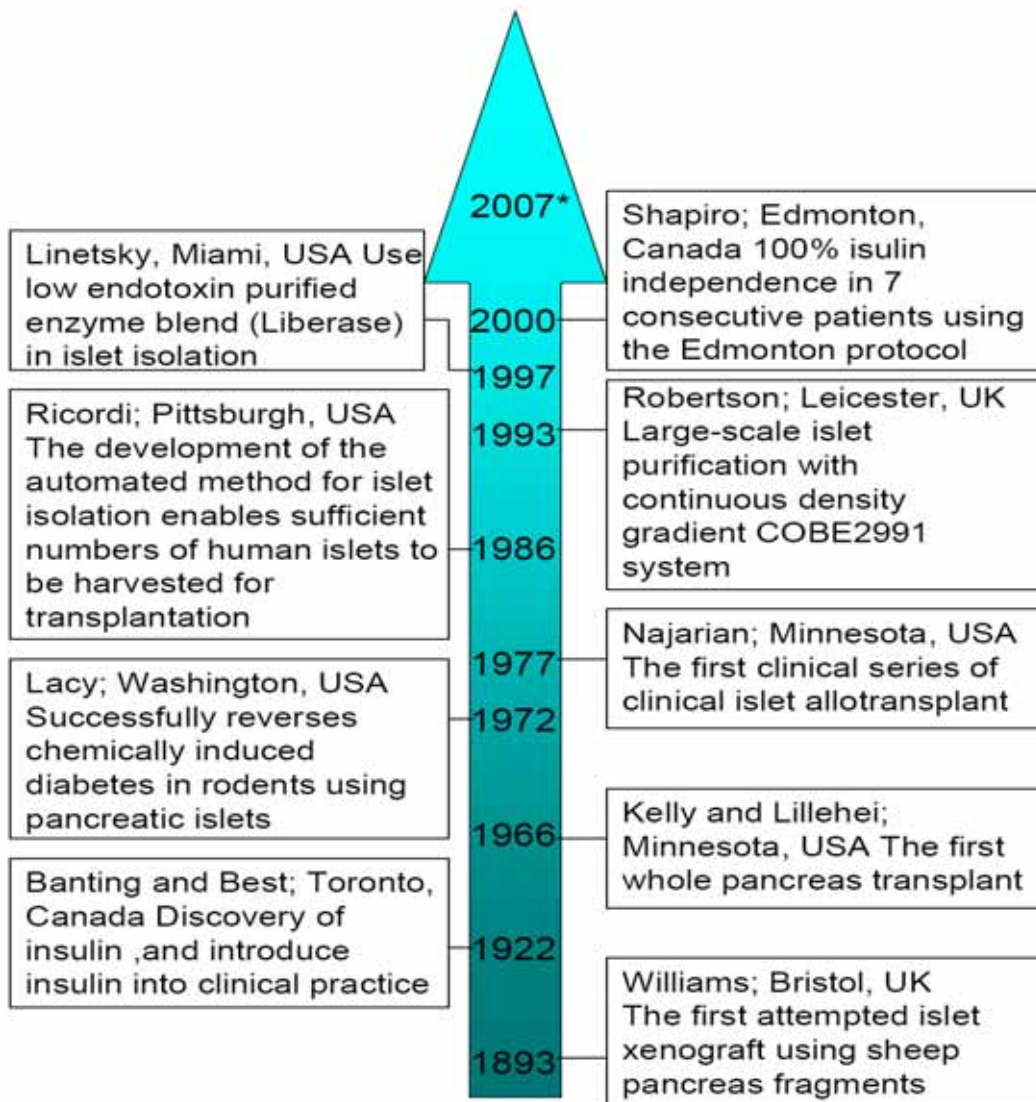


Figure 1. Landmarks in the history of pancreatic islet transplantation. There're still many other important inventions or improving methods in the field of islet isolation and transplantation. * Since Dec. 2005, National Taiwan University Hospital launched human islet isolation and transplantation program (HIITP) focused on clinical service and research on islet transplantation. In 2007, islet isolation procedure were validated with two human pancreatic islet isolation by human islet isolation team supervised by program leader, professor Po-Huang Lee, Department of Surgery, National Taiwan University Hospital.

三、胰島細胞的解剖組織學

胰臟器官主要有兩大功能，一、為外分泌功能，主要是胰臟組織內的外分泌系統來完成這一部分工作。胰液內含消化酵素等，由外分泌腺細胞（*acinar cell*）分泌至外分泌腺小管，管壁由 *ductal cell* 組成，最後經分枝胰管匯入主胰管，排入十二指腸，胰液就能和腸道內的食物混合後，發揮酵素消化食物的功能。外分泌腺組織約佔整個胰臟組織的 98% ~ 99%。二、為內分泌功能，主要由胰臟內分布的蘭氏小島（*islet of Langerhans*），也就是胰島組成，胰島是由 α 、 β 、 δ 及 PP-細胞等所組成，胰臟內每個胰島的大小不一，成人胰島大小分布在 50-250 μm 左右，大概一個成人胰臟內估計約有一百萬顆胰島，但所有胰島加起來總體積只有佔胰臟器官體積的 1-2% 左右而已（*Figure 2*）。而血糖的控制之一是由胰島 β -cell 內，分泌的胰島素（*insulin*）所完成，這些內分泌細胞所分泌的酵素，如 *glucagon* 來自 α -cell，*Insulin* 來自 β -cell，*somatostatin* 來自 δ (*delta*) cell。*Pancreatic polypeptide* 來自 PP-cell，分泌後即經由基底膜細胞間質等排入胰島內的微血管中，進入全身血液循環發揮功能，並沒有像外分泌腺系統有導管系統¹⁵。由上可知，每一顆胰島周圍都靠著細胞間質和結締組織如 *collagen*，纖維細胞等，和圍繞在周圍的外分泌腺細胞（*acinar cell*）和部分的外分泌腺的導管分枝相黏連，因此胰島分離（*islet isolation*）主要的目的就是透過各種方法，將胰島和外分泌腺相黏的組織分開，但又能保留胰島的完整結構，最後再利用純化技術，將內、外分泌腺儘可能的分離開，而得到純化的胰島集合而成的移植產物。

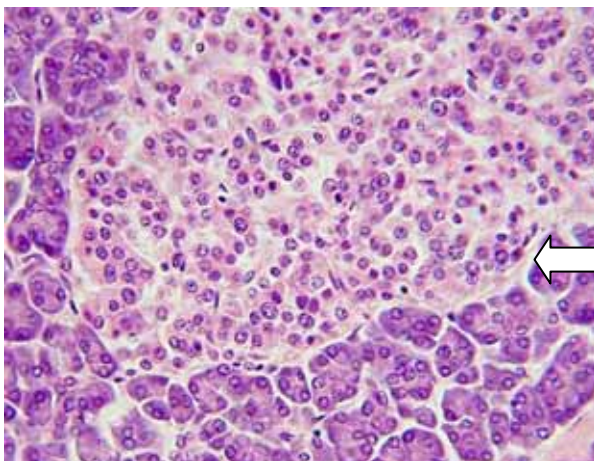


Figure 2. Histology of the islets of Langerhans (open arrow).

The surrounding dark purple cells are acinar cells (exocrine cells).

四、胰島細胞分離，純化及移植簡介

如何獲得高純度、型態完整、活性高、品質良好但總組織體積少之胰島產物，是各胰島細胞分離及移植中心追求的目標之一，胰島細胞的分離及純化技術，基本原理包括：(1) 運用消化酵素灌流至胰管，利用酵素分解內分泌胰島和外分泌腺細胞間的組織黏連基質 (2) 併用物理分離方式，使胰臟在 Ricordichamber 內振盪，利用 shear force & strain 拉開胰島及外分泌腺細胞的黏連處 (3) 利用 Euroficoll 或其他介質之不同密度梯度及 COBE 2991 (血球分離機) 將胰島和外分泌腺組織分離及純化出來，最後將收集到純化的胰島組織作品管鑑定，符合移植要求的 release criteria 後再準備移植至病患前之處理步驟¹⁶。最後，將品質合格的純化胰島收集至特殊設計之輸液袋，連接至放射科醫師利用經皮穿肝置入主門脈之導管；利用重力將胰島植入，胰島再漂流至肝門脈系統之細小分枝內，最後使其在接受者 (recipient) 之肝臟內 grafting 並再次發揮胰島之功能 (Figure 3)。雖然胰島分離及純化技術，原理看似簡單，但其中的訣竅卻是各胰島分離及移植中心之技術秘訣。

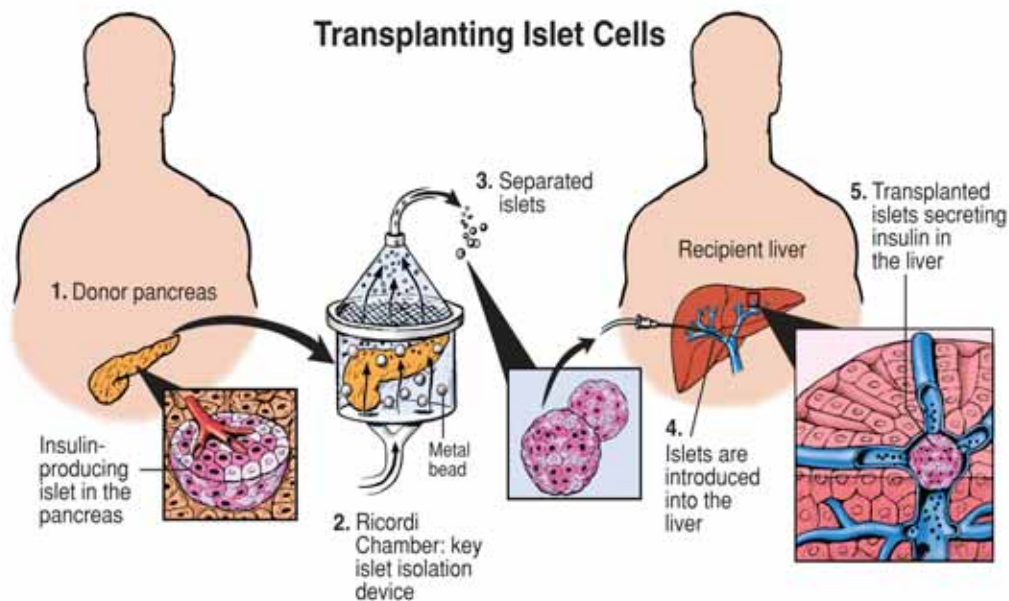


Figure 3. Islet isolation and transplantation.

五、胰島移植現況

目前臨床胰島移植可分為異體移植和自體移植，各有不同的運用範圍和考量。

1. 什麼樣的胰島產物，才是合格而能異體移植給病患呢？

分離純化後的胰島產物，需至少符合下列 (1) - (6) 條件 (release criteria)，才能異體移植給 recipient：

- (1) 胰島產量 (islet yield)：至少需要 4000 IEQ (胰島當量) /Kg (接受者體重)
- (2) 胰島產物純度 (purity)：至少大於 30 %
- (3) 胰島細胞活性 (viability)：至少需大於 70 % 的平均細胞存活比率
- (4) 總移植組織體積需小於 10 ml
- (5) Pyrogenicity：移植組織之培養液，平均內毒素含量需小於 5 EU/Kg (接受者)
- (6) Sterility：無菌測試，包括 Gram stain，需氧 (aerobic) 及厭氧菌 (anaerobic) 培養及黴菌培養等測試皆需為陰性反應。

其它包括胰島形態需儘量完整，葡萄糖刺激測試 (因檢驗方法不同，各中心的 index 不同) 需達一定標準。符合上述至少 6 點 release criteria，才可視為合格之胰島產物 (islet product)，也才能進一步移植至異體接受者¹⁷。

但自體胰島移植之規範不同於異體胰島移植，主要因自體胰島移植，不需使用免疫抑制劑，這類病人身體內並沒有像第一型糖尿病患有自體免疫疾病，攻擊胰島細胞的抗體。因此，移植後胰島存活率明顯高於異體移植，而且，胰島來源是來自於病患本人。因此，自體胰島分離出的產物，需要符合的條件，為前述的 (3) (4) (5) (6) 項。

2. 胰島移植之適應症

目前異體胰島移植 (allograft) 主要運用在 type I 糖尿病患，進行單獨胰島移植 (islet alone)；腎移植後再接受胰島移植 (islet after kidney transplantation) 或胰島腎同時移植 (islet simultaneous with kidney transplantation)¹⁸。自體胰島移植則可運用在病患有下列疾病，需大量切除胰臟之情況：(1) 嚴重之慢性胰臟炎；(2) 胰臟良性腫瘤 (3) 胰臟創傷 (4) 其它非惡性原因，但需大量切除胰臟者。

3. 第一型糖尿病患接受異體胰島移植之 criteria (recipient criteria)¹⁹

病患須符合下列 (1)，(2)，(3) 項

- (1) 年齡在 18 至 65 歲
- (2) 經診斷為第一型糖尿病患至少 5 年

(3) 有下列糖尿病嚴重併發症其中之一項

反覆發作低血糖昏厥 (reduced awareness of hypoglycemia)

Metabolic lability / instability (即使嚴格胰島素治療，仍難以控制適當血糖值，血糖高低變化很大)

進行性嚴重的糖尿病併發症

4. 贈者 (Donor) 器官之 inclusion criteria^{19,20} :

胰島細胞分離是使用捐贈者的胰臟來做分離的來源，捐贈者器官符合下列的 criteria :

- (1) 多器官捐贈者。
- (2) 年齡在 20-65 歲。
- (3) 沒有 HBV、HCV 帶原，HIV-I、HIV-II 和 HTLV-III 陰性，無其他傳染病。
- (4) 腦死是由於頭部創傷，顱內出血，中風，原發性腦瘤等造成。
- (5) Cold ischemic time 在 12 小時內。

5. 全世界胰島分離及移植醫學中心的分佈與現況

目前全世界胰島細胞分離及移植中心，大部份集中在北美洲，從 1999 年至 2006 年根據 Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 的資料顯示，至少有 45 個 Islet Center 在北美洲，其中以加拿大 Alberta University 移植數目最多，其次是美國的 Miami 和 Minneapolis.²⁰；在歐洲也有不少胰島移植中心，移植數目較多的如義大利、瑞士、法國和瑞典等國，在亞洲以日本和韓國移植例數較多，中國目前僅有個位數胰島移植經驗²¹，在東南亞至 2007 年 10 月為止，並未有移植案例報告，在臺灣目前臺大醫院已成立細胞治療中心，正積極發展此項新醫療技術。總計，從 1999 年至 2007 年全世界至少有超過 50 個胰島移植中心，以胰島移植治療至少 600 位以上的病患。

6. 目前異體單獨胰島移植 (islet alone allotransplantation) 治療第一型糖尿病病患的臨床成績

在介紹胰島移植臨床成績前，需對幾個名詞做個定義^{19,22}

- (1) Insulin independence: 所謂胰島素免用 (insulin independence) 是指移植後病患不用注射胰島素，也能得到適當的血糖控制；所謂適當的血糖控制需包括下列三項：
 - 糖化血糖值 (HbA_{1c}) 小於 6.5%
 - 在任一週內，至少有 3 次或以上，隔夜空腹血糖值小於 140 mg/dl
 - 每週至少 4 次或以上，飯後 2 小時血糖值需小於 180 mg/dl

- (2) Partial graft function：部分移植之胰島有功能是指血中 C-peptide 值至少大於等於 0.3 ng/ml，但仍需注射胰島素控制血糖或血糖控制不理想 (inadequate glycemic control)
- (3) Complete graft loss: 移植之胰島完全喪失功能是指病患接受 2 次 stimulation test，且結果顯示測不到血中 C-peptide (<0.1 nmol/l) 或病患空腹血糖值大於 270 mg/dl (15 mmol/l)，且無法測得血中 C-peptide 值。但目前這些定義，在各醫學中心並非完全一致，略有不同，需視各臨床試驗的詳細計畫書而定。

在 2000 年 Dr. Shapiro 發表 Edmonton protocol 以前，異體胰島移植成績相當令人沮喪，據統計，從 1990 年到 1998 年世界各醫學中心共有 267 位第一型糖尿病病患接受異體胰島移植，一年後胰島素免用率 (insulin independence rate) 只有約 8%¹。在西元 2000 年時 Dr. Shapiro 在 NEJM 發表了運用 Edmonton protocol 異體胰島移植，能達到初期七位病患全部達到 insulin independence 的佳績，也因此鼓舞了全世界各醫學中心大量投入人類胰島分離及移植的臨床試驗。所謂 Edmonton protocol 最重要的兩點關鍵 (key points) 在於：(1) 移植足夠量的胰島，從至少兩位胰臟捐贈者分離所得；每位糖尿病患約至少共植入 11000 IEQ/Kg 的胰島 (2) 運用較低胰島毒性，非類固醇 (non-steroid)，較 potent 的免疫抑制劑 (sirolimus, low-dose tacrolimus) 及 anti-IL2 receptor antibody (daclizumab)。另外，此 group 也併用了多種前述改良後的胰島分離技術，獲得品質較佳、數量較多的胰島產物來作為移植之用²。

從 1999 年至 2004 年 11 月加拿大亞伯達大學 (University of Alberta) 運用 Edmonton protocol 異體移植胰島 (islet alone) 治療 65 名第一型糖尿病患，病患平均年齡約 42.9 歲，平均糖尿病史 27.1 年，移植前病患平均每天需注射 45 U 的胰島素；每次 procedure 病患平均接受約 5783 IEQ/Kg 的胰島移植，所有病患需接受 2 次或以上之胰島移植，平均每次移植入之組織體積約 4.4 ml。同一病患第一次移植和第二次移植相隔平均約 2.5 個月，第二次和第三次移植平均相隔 1.8 個月。128 次的移植 procedures 中，124 次利用經皮穿肝輸注胰島產物入主門脈，4 次則利用迷你剖腹術，直接輸注入主門脈。病患平均 (median) 住院天數只有 2 天。有 47 位病患完成此移植試驗及追蹤治療程序，術後平均追蹤 35.5 個月，第一個月 insulin independence rate 約 94 %，術後第一年約有 75 %，第二年 40 %，第三年 20 %，第五年 7.5 % 的 insulin independence rate。雖然，以 insulin independence rate 來看，此項新醫療技術還有很大的改善空間；但若以其他的指標，如以血中 C-peptide 的存在，來評估 graft survival rate，五年的 graft survival rate 則可達到 82 %，就算無法達到 insulin independence 只要 graft 有 partial function 的病患，胰島素每日注射量也可平均少於移植前劑量的一半左右，血糖也較容易控制，病患也不再具有 hypoglycemia unawareness，且 HbA_{1c} 及其他代謝指標，如 hypoglycemic score (HYPO score) 及 lability index (LI) 也有明顯的改善²²。

在 2006 年 9 月 NEJM 也刊出了，全世界 9 個胰島移植中心參與利用 Edmonton protocol

異體移植胰島治療 36 位第一型糖尿病患之二年追蹤結果，每位病患都接受至少共 10000 IEQ/Kg 的總胰島產物移植。第一年 insulin independence rate 約 55 %；第二年約 24 %，但 C-peptide (+) 即 graft survival rate 在第二年仍有約 70 % 左右。從此 international trial 的結果，可見 Edmonton protocol 可以在其他醫學中心 reproducible，但整體的治療結果仍需克服很多的困難，才能獲得更好的成績¹⁹。

7. 自體胰島移植 (islet autotransplantation) 治療病患的臨床成績

自體胰島移植治療胰島素不足的病患主要是運用在：(1) 嚴重的慢性胰臟炎病患 (2) 胰臟創傷 (3) 良性或低度惡性胰臟腫瘤患者 (4) 因上述或其他疾病需大量切除胰臟者，將患者自己的胰島細胞分離後，再移植入病患自己的肝門靜脈系統中。在自體移植的臨床報告中，以 University of Minnesota 最早，數目也最多。在 1995 年的報告裡，48 位病患 2 年以上的胰島素免用率為 34%，但若在移植大於 300000 顆 Islets 的病人，則 2 年以上的胰島素免用率可高達 74%²³；另外有 5 位病患甚至有長達追蹤至第 13 年的胰島素免用率²⁴。University of Cincinnati 也在 2005 年報告了 46 例自體移植治療嚴重慢性胰臟炎，切除胰臟致胰島素缺乏之病患，平均追蹤至 18 個月，有 40% 病患維持胰島素免用的狀況²⁵；韓國在 2005 年也報告了 10 例女性病患，9 例因良性胰臟腫瘤，1 例因創傷，需局部或大部份 (50% -100%) 切除胰臟，接受了自體胰島移植。結果顯示，這些有接受自體胰島移植的病患，其血糖及代謝評估指標都明顯優於未接受自體移植之對照組患者 (n=23 人)²⁶。由此可見，若能謹慎運用自體胰島移植於上述患者，將對他們的代謝及健康有很大的幫助。

六、未來胰島細胞移植的發展方向

未來的發展方向即是要解決目前面臨的種種問題，包括：

- (1) 胰臟器官摘取技術，灌流保存液配方之改良
- (2) 胰島分離及技術的改良²⁷
- (3) 研發增加胰島移植後 engraftment 的方法
- (4) 研發低毒性、更有效之免疫抑制藥物²⁸
- (5) 研發降低胰島細胞凋亡之方法
- (6) 促進胰島細胞再生 (regeneration)²⁹
- (7) 免疫耐受性 (immune tolerance) 方法研發²¹
- (8) 擴展胰島來源：包括 living donor 的使用³⁰, stem cells³¹, islet xenotransplantation³² 及 bioartificial organ³³ 的研發等
- (9) 併用其他治療方式：如 gene therapy 之研發³⁴

七、結語

胰島移植目前仍屬於快速發展中的新醫療技術，也是轉譯醫學研究（從實驗室研發到臨床治療）在細胞治療領域進步最快的項目之一，相信在逐一克服困難後，將逐漸擴展它能治療病患的適應症及範圍，以及提高治療的成績³⁵。

誌謝

作者感謝下列計畫經費補助胰島移植之相關研究及發表：衛生署轉譯醫學研究計畫（DOH95-TD-B111-TM003 OH96-TD-I-111-TM002）；臺大醫院創新型研究計畫（NTUH-95A22）；臺大醫院-工研院 95 年度及 96 年度學研合作計畫；臺大醫院慶祥細胞治療中心基金；財團法人臺北市林坤地仁濟文教基金會。

註：本章部分內容曾發表在：臺灣醫學會第九十九屆總會 2006 臺灣醫學週臺灣聯合醫學會學術演講會；Formosan Journal of Medicine 2007; 11(1), 42-46；臺灣外科醫學會 96 年 3 月第 106 期會訊。

八、參考文獻及推薦讀物

1. Brendel, M., Hering, B., Schulz, A. & Bretzel, R. International Islet Transplant Registry report. *Giessen, Germany:University of Giessen*,1-20 (1999).
2. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* **343**:230-238 (2000).
3. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Paty, B. W., et al. Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* **79**:1304-1307 (2005).
4. Williams, P. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *Br Med J.* **2**: 1303-1304 (1894).
5. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *Can Med Assoc J.* **12**:141 (1922).
6. Kelly, W. D., Lillehei, R. G., Merkel, F. K., et al. Allograft transplantation of pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* **61**:827-837 (1967).
7. Ballinger, W. & Lacy, P. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* **72**: 175-186 (1972).
8. Najarian, J. S., Sutherland, D. E., Matas, A. J., et al. Human islet transplantation: a preliminary

- report. *Transplant Proc.* **9**:233-236 (1997).
9. Ricordi, C., Lacy, P. E., Finke, E. H., et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* **37**:413-420 (1988).
 10. Tzakis, A., Ricordi, C., Alejandro, R., Zeng, Y., Fung, J., Todo, S., Demetris, A., Mintz, D. & Starzl, T. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet* **336**:402-405 (1990).
 11. Ricordi, C., Tzakis, A. G., Carroll, P. B., Zeng, Y. J., Rilo, H. L., Alejandro, R., Shapiro, A., Fung, J. J., Demetris, A. J., Mintz, D. H., et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* **53**:407-414 (1992).
 12. Hering, B. & Ricordi, C. Islet transplantation in type 1 diabetes: results, research priorities and reasons for optimism. *Graft* **2**:12-27 (1999).
 13. Robertson, G. S., Chadwick, D. R., Contractor, H., et al. The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets. *Acta Diabetol.* **30**:93-98 (1993).
 14. Linetsky, E., Bottino, R., Lehmann, R., Alejandro, R., Inverardi, L. & Ricordi, C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend,liberase. *Diabetes* **46**:1120-1123 (1997).
 15. Juan, L., Gould, V. E. & Bloodworth, J. M. B. (eds). *Bloodworth's endocrine pathology 3rd Ed*, Lippincott Williams & Wilkins. 519-555 (1997).
 16. Lakey, J. R., Burridge, P. W. & Shapiro, A. M. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int.* **16**:613-632 (2003).
 17. Pileggi, A., Ricordi, C., Kenyon, N. S., et al. Twenty years of clinical islet transplantation at the diabetes research institute--University of Miami. In *Clinical Transplants 2004*. Los Angeles, UCLA Immunogenetics Center, 177-204 (2005).
 18. Balamurugan, A. N., Bottino, R., Giannoukakis, N., et al. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. *Pancreas.* **32**:231-243 (2006).
 19. Shapiro, A. M., Ricordi, C., Hering, B., et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* **255**:1318-1330 (2006).
 20. *Annual Report of Collaborative Islet Transplant Registry(CITR)*. Aug 10 (2007).
 21. Merani, S. & Shapiro, A. M. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clinical Science* **110**:611-625 (2006).
 22. Ryan, E. A., Paty, B. W., Senior, P. A., et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* **54**:2060-2069 (2005).
 23. Wahoff, D. C., Papalois, B. E., Najarian, J. S., Kendall, D. M., Farney, A. C., Leone, J. P., Jessurun, J., Dunn, D. L., Robertson, R. P. & Sutherland, D. E. Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Ann Surg.* **222**(4):562-579 (1995).
 24. Robertson, R. P., Lanz, K. J., Sutherland, D. E. & Kendall, D. M. Prevention of diabetes for up to

- 13 years by autoislet transplantation after pancreatectomy for chronic pancreatitis. *Diabetes* **50**:47-50 (2001).
25. Ahmad, S. A., Lowy, A. M., Wray, C. J., D'Alessio, D., Choe, K. A., James, L. E., Gelrud, A., Matthews, J. B. & Rilo, H. L. Factors associated with insulin and narcotic independence after islet autotransplantation in patients with severe chronic pancreatitis. *J Am Coll Surg.* **201**:680-687(2005).
26. Lee, B. W., Jee, J. H., Heo, J. S., Choi, S. H., Jang, K. T., Noh, J. H., Jeong, I. K., Oh, S. H., Ahn Y. R., Chae, H. Y., Min, Y. K., Chung, J. H., Lee, M. K., Lee, M. S. & Kim, K. W. The favorable outcome of human islet transplantation in Korea: experiences of 10 autologous transplantations. *Transplantation* **79**:1568-1574 (2005).
27. Gaglia, J. L., Shapiro, A. M. & Weir, G. C. Islet transplantation: progress and challenge. *Archives of Medical Research* **36**:273-280 (2005).
28. Ricordi, C. & Strom, T. B. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol.* **4**:259-268 (2004).
29. Rood. P. P., Bottino, R., Balamurugan, A. N., et al. Facilitating physiologic self-regeneration: a step beyond islet cell replacement. *Pharmaceutical Research* **23**:227-242 (2006).
30. Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., et al. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* **365**:1642-1644 (2005).
31. Meier, J. J., Bhushan, A. & Butler, P. The potential for stem cell therapy in diabetes. *Pediatric Research* **59**:65-73 (2006).
32. Rood, P. P. & Cooper, D. K. Islet xenotransplantation: are we really ready for clinical trials? *Am J Transplant* **6**:1269-1274 (2006).
33. Kizilel, S., Garfinkel, M. & Opara, E. The bioartificial pancreas: progress and challenges. *Diabetes Technol Ther.* **7**:968-985 (2005).
34. Giannoukakis, N. & Trucco, M. Gene therapy for type 1 diabetes. *Am J Ther.* **12**:512-528 (2005).
35. Yang, C.Y., Tien, Y. W. & Lee, P. H. Islet Cells Transplantation. *Formosan J Med.* **11**:42-46 (2007).

第四章

幹細胞在腦神經再生醫學的應用

The Applications of Stem Cells in the Neural Regeneration

陳旭照^{1,2} 錢宗良¹

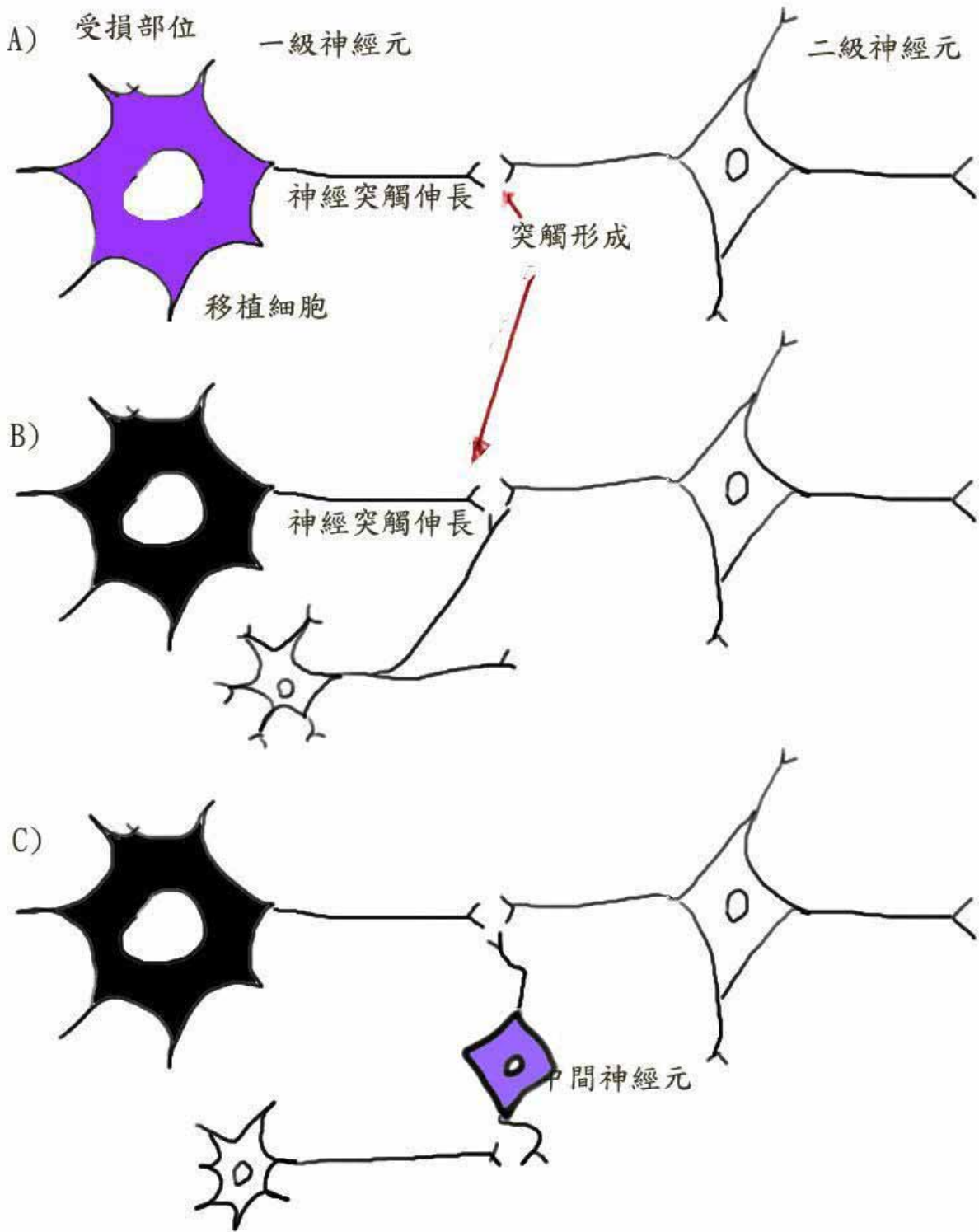
¹臺灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學研究所 ²馬偕醫院神經外科

一、前言

現代的醫學對於許多中樞神經系統的疾病仍然缺乏很好的治療方式，在過去，我們治療的重心在於如何去補充因疾病引起缺乏的物質，以求減緩損害，即所謂的支持補充療法 (supportive treatment)，如帕金森氏症 (Parkinson's disease) 病患給予多巴胺 (dopamine) 藥物；或者去尋找保護神經的藥物治療 (neuroprotection therapy)，如腦梗塞病患給予 FK506 藥物以降低梗塞面積，而其中最著名的莫過於類固醇在急性脊髓損傷的使用。甚至進一步將利用基因療法視為藥物帶入人體，以治療缺少的蛋白質。但對於腦神經疾病的根本解決之道，仍在於是否能讓受損的神經細胞與迴路再生 (neuroregeneration)，於是開啟了各式各樣的細胞移植研究，期待能取代受損的神經細胞，像是活化原本存在的成體神經幹細胞，強化自我修復的機制，以彌補損失的細胞及重建神經迴路。

二、細胞治療原理

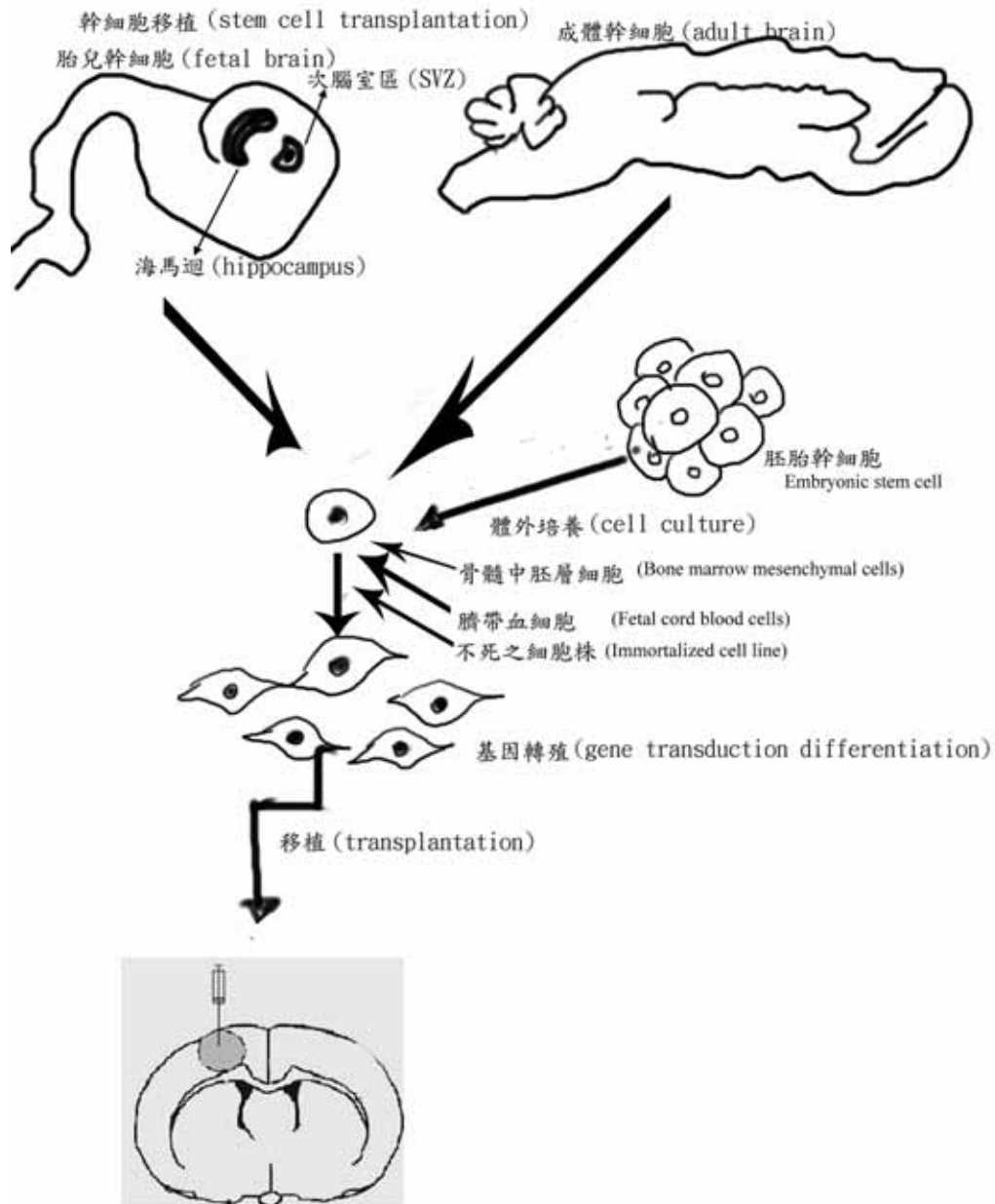
所謂神經幹細胞約略描述是指，源自一群發育中的神經系統或能產生神經特性的幹細胞，而這些細胞具有不斷分裂繁殖與分化的能力。細胞治療提供了神經再生一個新方法，在原理上有兩種治療方法：一是支持性治療，藉由新的細胞釋放某種蛋白質，解救瀕臨死亡危險的腦細胞，例如腦梗塞邊緣的缺血細胞；二是再生治療，所加入的新細胞，能取代受損的神經細胞，或分泌的生長因子，能活化自體的神經幹細胞；最終目的是重建並形成有功能的神經路徑 (圖一)。除了希望移植的細胞能在腦部生長分化為神經細胞外，並經由基因轉殖技術，將控制他們生長與分化的因子，轉殖至欲移殖的細胞株，使其大量製造生長因子，以提高神經再生療效。此等經過基因轉殖的細胞移植，成為治療腦神經疾病的新方法¹。研究的重心在於；第一、有哪些細胞可作為移植的選擇？第二、有哪些生長因子能強化此細胞治療的效果？在瞭解神經幹細胞的臨床運用潛能之前，需藉由體外的細胞研究，認識控制他們生長分化的環境因素。例如神經幹細胞在高濃度的第二纖維母細胞生長因子 (FGF-2) 與表皮細胞生長因子 (EGF) 培養下，會大量分裂與生長²。此等研究可作為尋找輔助治療的依據。



圖一、(A) 移植細胞取代受傷細胞重建神經迴路。(B) 保護受傷神經周圍的腦細胞免於死亡，使其能長出軸突，與次神經元形成突觸。(C) 移植細胞形成中間神經元，重建神經迴路。(黑色：受損細胞；紫色：移植細胞)

三、外源性細胞的移植

早期許多學者嘗試各種來源的細胞，自體的或外來的；神經或非神經；胚體、胎兒或成體幹細胞；臍帶血或骨髓基質細胞，而其中以胚胎、胎兒、與臍帶血含有最豐富的幹細胞來源（圖二）。

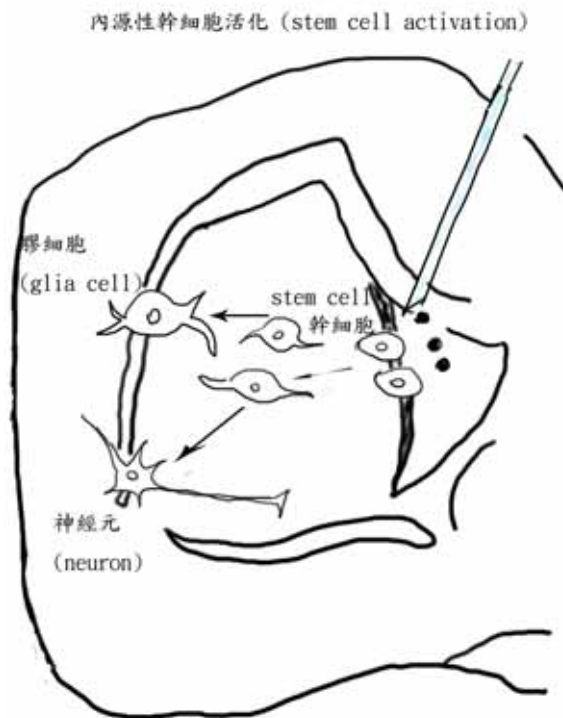


圖二、外源性幹細胞移植：多種的細胞可做選擇，亦可在體外培養、分化，或進行基因轉殖後再移植。

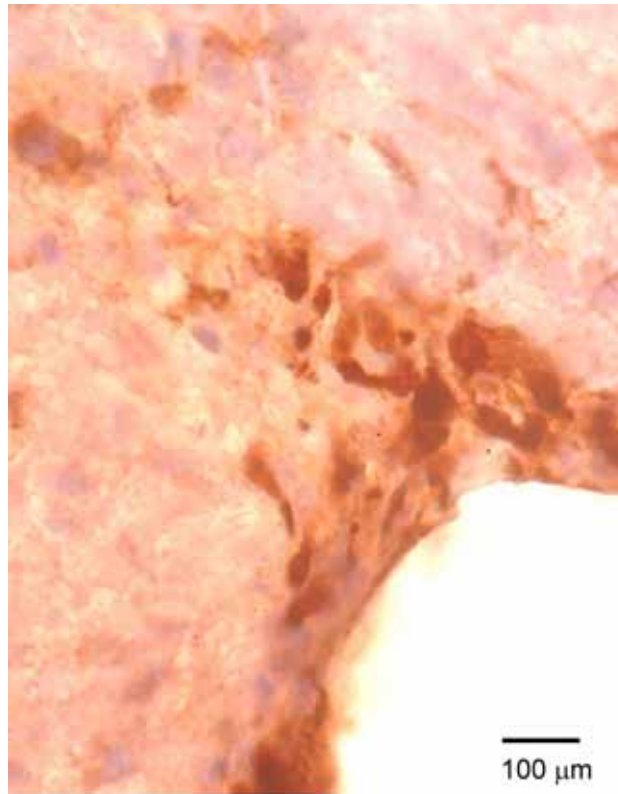
1. 具有分化成神經及神經膠細胞能力的不死細胞株 (immortalized cell line)：例如 MHP36 細胞株，這種細胞的優點是方便於體外操作，可做基因轉植，使細胞存活率提升並遷移至需要的地方，雖然無法在人體運用，在動物實驗提供了很好的研究模式，缺點則是有致癌的可能性³。
2. 胚胎幹細胞株 (embryonic stem cells)：胚胎幹細胞具有多重的分化潛力，能分化為各個胚層的細胞⁴。胚胎幹細胞具有較成人幹細胞強的分裂能力，而且可在培養皿中長期培養。目前多數研究將胚胎幹細胞於體外誘導為我們所需的目標細胞，如神經幹細胞在移植運用於各種神經疾病。但在帕金森氏症的動物模式中，發現將低劑量未分化的胚胎幹細胞移植至大腦紋狀區，這些細胞在腦周圍生長因子調控下，能分化為分泌多巴胺 (dopamine) 的神經元⁵，再移植運用於各種神經疾病。但動物實驗顯示，胚胎幹細胞仍有致畸胎可能性，運用於人體治療須先克服此點。
3. 臍帶血細胞 (umbilical cord blood cells)：臍帶血可以輕易於出生時取得並冷凍保存開啟了成年後自體移植的可能性，因富含造血幹細胞，在許多血液病常用以作為骨髓移植的替代來源。除了造血幹細胞外，臍帶血也存有間質幹細胞，及血管內皮幹細胞。實驗顯示將純化的臍帶血細胞打入中風的大鼠尾靜脈，可改善神經缺損，免疫染色證實其可分化為神經細胞 (neuN or GFAP positive)，將來或許可用於腦中風的細胞治療來源⁶。
4. 胎兒神經幹細胞 (fetus neural stem cells)：此為帕金森氏症的治療方法之一，利用取自流產胎兒黑質區 (substantia nigra) 的腦細胞，移植入帕金森氏症的患者腦中，這些細胞不但能存活，能分泌多巴明並改善病患的症狀。但是，進行一次移植，平均需要六個特定週數流產胎兒的腦⁷，而且由於胎兒腦細胞取得不易，其中衍伸出許多的倫理問題，而限制了它在臨床的運用。
5. 成人神經幹細胞 (adult neural stem cells)：在哺乳類的大腦下腦室區與海馬體仍存在一些神經幹細胞，當腦部受傷後會刺激他的活化。由於這些細胞已經部份分化，經體外培養一段期間後即會死亡，故無法進行較長期的培養；然而，成人神經幹細胞在組織中的數量很少，不易取得足夠的數量，其所在位置亦不如骨髓細胞般方便取得，須進行腦手術，過程有一定的風險，使其不易作為進行研究或移植的材料。
6. 骨髓間葉幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells)：間葉幹細胞可作為神經移植治療的體幹細胞來源，他的好處是可做自體移植，免除免疫排斥與倫理問題，取得亦較成體神經幹細胞容易。間葉幹細胞有許多來源，如臍帶血、羊水，以及最常使用的骨髓。骨髓中除了有造血幹細胞，尚可分離出少量屬於中胚層の間葉幹細胞，能分化為結締組織、血管，等中胚層產物。雖然某些研究顯示，移植至腦部的骨髓間質細胞能表現神經細胞特有的標記 (如 NeuN)，而認為其能在特定些條件下分化為神經細胞，但是否能分化成屬於外胚層來源的神經細胞仍有爭議⁸。無論此爭議結果如何，至少由骨髓間質細胞分化後的小神經膠及血管內皮細胞，製造的生長因子，能強化內源性神經細胞的活化、增加血管新生並解救處於危險邊緣的腦細胞，進而促進整體神經功能恢復⁹。有許多研究顯示，在腦傷的情況下，骨髓間葉幹細胞，能自骨髓游離進入血液，穿越腦血障礙，遷移至受損的腦部，因此移植治療用的骨髓間葉幹細胞，只要注射至受創老鼠的周邊靜脈即可，不需繁雜的腦部植入手術。

四、內源性神經細胞的增生與遷移 (Endogenous Neural Stem Cell Activation)

人類的次腦室區 (subventricular zone) 及海馬迴的次顆粒核區 (subgranular zone of hippocampus) 有成體神經幹細胞存在，這些細胞會在腦損傷後大量增生分化，如何增加這些內源性的神經細胞的數量及存活率，使其能移行至所需的受損區，並形成新的神經迴路，成為重要的研究方向¹⁰ (圖三)。在老鼠的動物實驗中，藉由 BrdU (bromodeoxyuridine) 腹腔注射標定新分裂細胞及新生神經細胞特殊標記 (如 Doublecortin) 的染色，發現第二纖維母細胞生長因子 (FGF-2)、表皮細胞生長因子 (EGF)、神經生長因子 (NGF)、神經膠細胞衍生神經滋養因子 (GDNF)、第一類胰島素生長因子 (IGF-1)、腦衍生神經滋養因子 (BDNF)、第一貝塔轉化生長因子 (TGF- β 1)、血管表皮生長因子 (VEGF) 等蛋白，能增強神經新生過程¹¹⁻¹⁷ (enhance neurogenesis)，研究顯示不同的腦損傷於不同的動物品種會有不同的結果。還有哪些因子能增加這些內源性細胞數目¹⁸，以及如何將這些蛋白穩定的帶入腦部，漸成為熱門的研究題材。不死細胞株是一個常用的研究媒介，藉由將基因轉殖的不死細胞株植入腦部，使其穩定的製造外生性的生長因子，並再經由特殊染色與顯微鏡下的形態分析，來了解這些蛋白對神經新生是否有助益 (圖四)。



圖三、內源性神經幹細胞的活化：神經損害會引導下腦室區的成體神經幹細胞增生，遷徙至受傷處，許多生長因子可強化此過程。



圖四、腦溢血小鼠，在 DBA 成色下，可見許多 BrdU (+) 的新生細胞由下腦室區遷徙出來

五、其他輔助治療

動物實驗認為紅血球生成素 (erythropoietin) 能藉由改善血管新生而具有細胞保護與神經新生作用¹⁹；非類固醇消炎藥 (如 Indomethacin) 藉由抑制發炎反應，能強化神經新生的效果²⁰；顆粒性白血球群落刺激因子 (G-CSF) 具有將骨髓中幹細胞活化遷徙至受傷腦部的作用²¹，若充分利用舊藥新用，可簡化人體試驗過程與保障安全性，將來或許可將這些藥物合併使用，以雞尾酒療法方式，促進神經復原並減少副作用。

六、細胞移植在神經系統疾病的使用

1. 帕金森氏症

帕金森氏症是漸行性神經退化性疾病，主因是大腦黑質區分泌多巴胺神經細胞退化，由於這些神經細胞有良好的可塑性與代償能力，當這些細胞損失大於 75% 時才會有症狀產生，有許多藥物如多巴胺增效劑被用來補充因細胞退化所減少的神經遞質多巴胺，但這些藥物在使用久了後常變得無效，並且有令人難以忍受的運動協調上的併發症，影響生活品質。由於帕金森氏症只影響單一細胞 (分泌多巴胺神經細胞)，

並且有很好的動物模式，使他成為研究細胞移植治療的好題材。由於胎兒神經細胞移植在帕金森氏症動物實驗累積了許多證據，近二十年來，全世界已有超過三百人接受胎兒神經細胞移植。其中不乏於接受移植多年後症狀仍有持續的改善，證實細胞移植為治療神經退化疾病的有效方法。但由於胎兒腦細胞取得不易，品質於安全無法控制，尋找其他的細胞來源成了目前研究的題材，胚胎幹細胞成了最好的替代性方案，有許多研究將胚胎幹細胞於體外培養引導為分泌多巴胺的細胞，再植入帕金森氏症動物腦中，得到不錯的療效。然而問題在於，體外培養分化的時間越長，移植後這些細胞越容易死亡，時間越短卻又越容易形成畸胎瘤。既使取胎兒腹側中腦分泌多巴胺的神經先驅細胞，於體外短期培養，再移植入大腦，將來這些細胞的死亡率，仍較新鮮取得的胎兒細胞來得高；提高存活率的方法是細胞培養過程中使用抗氧化藥物，減少細胞的死亡。培養的細胞中若包含原本與中腦即存在的其他神經細胞與神經膠細胞，可提高移植後多巴胺的神經細胞分化的正確率與存活率。膠細胞衍生神經滋養因子能改善神經纖維的生長發育，此生長因子的轉殖神經幹細胞，某些研究證實有不錯的療效。然而大部分的方法仍須長期的觀察，來驗證他們的療效與副作用。

2. 腦梗塞

腦梗塞的成因是腦血管阻塞，由於影響的區域不一與受損細胞的多樣性，並不容易以單一的細胞治療來補充減損的神經或重建迴路。然而若受損的位置在大腦紋狀區等特定位置，仍可進行細胞治療。目前嘗試的方法不外體外細胞移植與內源性神經幹細胞的活化，移植的細胞種類包括胚胎幹細胞、胎兒神經先驅細胞、臍帶血細胞、骨髓基質幹細胞等。大部分的研究宣稱能改善神經功能與減少中風面積。許多生長因子被認為有活化下腦室區的神經幹細胞功能，累積更多的證據，將來或許能進行臨床的試用。

七、結語

神經幹細胞在神經再生的角色，仍有廣泛尚待研究的空間。兩個重要的方向在於內源性神經幹細胞的活化，以及外源性的幹細胞移植。我們所追求的目標並不只是細胞的存活與增生，重要的是這些細胞必須能形成新的或重建神經迴路，而達到整體神經功能進步的結果。對於細胞移植治療需面對的問題有一、倫理考量；二、免疫排斥的避免；三、植入細胞形成畸胎瘤的可能。而每一種細胞都有其特殊的潛能與風險。因此合併使用多種的生長因子以作為輔助療法，可提升整體的治療效果，已成為目前研究的新趨勢。

八、參考文獻

1. Garbuzova-Davis, S., Willing, A. E. & Saporta, S. Novel cell therapy approaches for brain repair. *Prog Brain Res.* **57**:207-22 (2006).
2. Tureyen, K., Vemuganti, R. & Bowen, K. K. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic

- neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurg.* **57** (6):1254-63 (2005).
3. Lee, H. J., Kim, K. S. & Kim, E. J. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells* **25**:1204-12 (2007).
 4. Buhnemann, C., Scholz, A. & Bernreithen, C. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* **129**:3238-48 (2006).
 5. Brederlau, A., Correia, A. S. & Anisimov, S. V. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* **24**:1433-40 (2006).
 6. Chen, J., Sanberg, P. R. & Li, Y. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* **32**:2682-8 (2001).
 7. Nikkhab, G., Bentlage, C. & Cunningham, M. G. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci.* **14**:3449-61 (1994).
 8. Kurozumi, K., Nakamura, K. & Tamiya, T. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther.* **9**:189-97 (2004).
 9. Silva, G. V., Litovsky, S., Assad, J. A. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* **18**(111): 150-6 (2005).
 10. Okano, H., Sakaguchi, M. & Ohki, K. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem.* **102**:1459-65 (2007).
 11. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* **36**:1021-34 (2002).
 12. Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. & Gage, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.* **17**:5820-9 (1997).
 13. Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X. O., Logvinova, A. & Greenberg, D. A. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest.* **111**:1843-51 (2003).
 14. Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J. & Luskin, M. B. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci.* **21**:6706-17 (2001).
 15. Dempsey, R. J., Sailor, K. A., Bowen, K. K., Tureyen, K. & Vemuganti, R. Stroke-induced

- progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem.* **87**:586–97 (2003).
16. Zhang, R., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Lu, M., Lapointe, M. & Chopp, M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol.* **50**:602-11 (2001).
 17. Sasaki, T., Kitagawa, K., Sugiura, S., Omura-Matsuoka, E., Tanaka, S., Yagita, Y., Okano, H., Matsumoto, M. & Hori, M. Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res.* **72**:461–71 (2003).
 18. Romanko, M. J., Rola, R., Fike, J. R., et al. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol.* **74**:77–99 (2004).
 19. Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert T. & Chopp, M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* **22** (9):1011-7 (2005).
 20. Hoehn, B. D., Palmer, T. D. & Steinberg, G. K. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* **36** (12):2718-24 (2005).
 21. Solaroglu, I., Cahill, J. & Jadhav, V. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke* **37**:1123-8 (2006).

第五章

再生醫學於骨科疾病之應用

Regenerative Medicine Application for Orthopaedics Disease

劉華昌¹ 張至宏² 張志豪¹ 王文志³ 李裕滄⁴

¹臺大醫院骨科 ²亞東外科 ³恩主公醫院骨科 ⁴敏盛醫院骨科

一、前言

再生醫學 (regenerative medicine) 是最近發展出來的新科技學問，在醫學工程領域上逐漸扮演重要的角色。所謂“再生”指的是：以新的組織來取代失去的或是受損的器官或是身體的某一部份；可以是透過增進身體本身的痊癒能力，亦或是利用基因療法、幹細胞或是組織工程 (tissue engineering) 的方法，來達成再生的目的。而其中“組織工程”是再生醫學中的一項重要方法。而所謂“組織工程”就是：結合工程學及生命科學的原理與方法來發展出生物性的取代物，用此生物產品來達成恢復、維持或甚至增進組織功能的目的。

組織工程學最主要的有三個要素：細胞 (cell)、支架 (scaffold) 及營養因子 (medium factors)。其中細胞就像“種子”，支架像是提供種子生長的“土壤”一般，而營養因子就像“肥料、養分”。這三者缺一不可。

關節軟骨本身是一種無血管、無神經的組織，而且只包含單一細胞種類--軟骨細胞 (chondrocyte)，自我修補能力很有限。但關節軟骨卻在人體扮演一個相當重要的角色，一旦隨著老化過程退化掉，或是由於受傷造成軟骨的受損，都會造成軟骨組織的功能大受影響，且自行恢復的狀況不好，因而嚴重地影響了關節的正常功能，造成很嚴重的症狀。而目前醫學上面對這種軟骨缺損的種種治療方法，充其量都只是治標不治本，只是延緩了嚴重關節炎發生的時間，到頭來還是得走向置換人工關節的地步，以機械性的治療 (mechanical therapy) 代替了生物性的治療 (biological therapy)，並無法真正解決問題。因此軟骨組織的再生醫學，尤其是利用組織工程學的方法正在全世界蓬勃地發展，試圖解決這個令醫師十分困擾的問題。

二、軟骨組織的再生醫學

面臨老化威脅，軟骨組織的再生除了要讓受損的軟骨組織重生外，如何回復退化性(骨)關節炎 (osteoarthritis) 的關節面軟骨的耐受力也是研究的重點。目前治療法以細胞為基礎的治療 (cell-based therapy) 為主，亦即藉由植入細胞或組織工程製成的軟骨而達成，

這是由組織工程的方法，所提供一種關節軟骨的治療方法。方法之一是將自體的軟骨細胞自關節表面取出，經培養增殖後，將之移植到有軟骨缺損的骨膜帳（periosteal flap）之下生長。經動物實驗發現修補的組織有退化情形，其成效也有很大的差異。且必須取自體的軟骨細胞，其來源有限，也會造成取細胞處的一些病態。

另一種方法是將骨髓基質細胞（Bone Marrow Stromal Cell, BMSC）自骨髓中分離出來後，經過擴張數量培養之後，重新植入支架中以修補軟骨的缺損。在植入之後，骨髓基質細胞會進行在地的特定性分化（site-specific differentiation）及在表面的缺損處形成一個軟骨區域，而血管組織則在基部形成。使用骨髓基質細胞的好處是其取得較容易，只需要一根較粗的針筒，不須另一次手術，也不會造成取細胞處的病態產生。骨髓基質細胞是屬於一種中胚層幹細胞，具有自行再生及分化成數種中胚層細胞的能力。骨髓基質細胞的另一項優勢是其不會引發免疫上的排斥，這意味著不一定要使用自體的細胞，可以使用他人的細胞。講了那麼多骨髓基質細胞的好處，其實它還是有盲點存在，那就是畢竟骨髓基質細胞屬於有自行再生能力的較原始的細胞，有朝向癌症細胞發展的疑慮。

另外，若用成熟軟骨為基礎的移植也是一種方式，不過目前研究顯示這種方法無法發展出軟骨下層骨（subcondral bone），最後無法完全併入宿主原有的組織生長，結果並不令人滿意。

在軟骨組織的組織工程上，細胞及營養因子方面的研究已經比較有共識及成果。但在支架方面，其涵蓋的種類十分多，包含了天然的及合成的。有不少的研究顯示很多種支架都適合軟骨的生成，可以達到令人滿意的成果，不過大部分都還侷限於動物實驗階段。要使用於人體，能使用的種類則被嚴格的限制，必須是 FDA 等衛生主管單位通過才可使用於人體。目前支架的研究朝向小分子的，可以使用注射方式到達宿主軟骨缺損處的支架前進。這種支架的好處是手術可以使用微創手術，對於宿主的傷害可達到最小，不過仍有許多困難處有待解決，像是可注射式的支架如何能有足夠的強度、如何固定組織工程移植物於軟骨缺損處不至於亂跑…等等都是尚待解決的問題。

無論如何，軟骨的組織工程給再生醫學提供了一個正確的方向以解決這個令骨科醫師十分困擾也無助的問題。只要繼續研究，相信總有一天嚴重的退化性關節炎將會成為一種罕見疾病，甚至是一個歷史名詞。

1. 修復軟骨的新方法

關節軟骨會因損傷而導致退化性關節炎的發生。這類健康問題很值得我們去注意。因為有近 70% 的 65 歲以上老人受退化性關節炎的影響¹。關節軟骨的退化分有不同的階段，然而目前並無一套有效治療退化性關節炎及阻止其繼續惡化的方法。

軟骨和骨早期損傷時，其周圍的關節軟骨為正常或近似正常。若未經治療，關節軟骨則會進展到繼發性的退化，此時加以治療則可以延遲人工關節置換手術的時間。雖然關節軟骨為新陳代謝活躍的組織，但對於位於間質中的軟骨細胞，其代謝週期卻相當慢。因關節軟骨為一無血管的組織，所以自我修復能力相當有限，輕微傷害即有可能導致漸進式的毀壞與退化。

對於年輕患者，雖能以自體軟骨細胞植入、馬賽克鑲嵌術或骨髓刺激技術，如微骨折、

多重鑽等較佳的治療方式來取代人工關節置換，但此類的治療結果變異性很大，且技術上仍有一些局限²。自體軟骨細胞植入加上骨膜覆蓋的結果雖令人振奮，但仍無法預期所形成的軟骨是透明軟骨還是纖維軟骨³。骨髓刺激技術產生的軟骨為纖維軟骨，與透明軟骨相比，其機械特性較差，且自我修復能力有限⁴。馬賽克鑲嵌術最主要的問題在於自體組織的有效性及供區的健全性，此治療方法涉及到毀壞健康的非承載負荷組織，對於供區或是受區都有可能發生因手術而退化，且移植上去的軟骨與受區軟骨間不能密合的問題仍待解決⁵。

近年來，組織工程提供了一種新的治療方法。結合細胞、支架及生物活化因子，組裝成生物產品來取代受損部位的新組織⁶。這種結合支架的治療方法占很大優勢，因支架不具有結構支撐功能，還可讓細胞停留在受損區域，當細胞分泌自己的細胞間質後，支架能慢慢降解。下面將討論現今軟骨組織工程所採用的支架、體內外研究及臨床試驗。

2. 用於軟骨組織工程的支架材料

一種理想的支架應具有多孔性，以容許細胞移動或寄主細胞滲透。支架材料表面可接上促進細胞貼附的三肽（Arg-Gly-Asp）以加強細胞與支架材料的結合。支架必須具生物相容性，同時具有生物可降解性及能被細胞外基質取代，且其降解產物必須是低細胞毒性、低致瘤性及低腎臟毒性等，同時必須有足夠的機械特性，以支撐細胞生長及分泌細胞間質。下面討論當前軟骨所使用的生醫材料的研究及我們設計的新支架。

(a) 人工合成生物降解性高分子的支架

軟骨組織工程中經常使用聚羥基乙酸（polyglycolic acid, PGA）、聚乳酸（polylactic acid, PLA）及其共聚物聚乳酸-羥基乙酸（polylactic glycolic acid, PLGA）⁷，因為美國食品藥物管理局（FDA）核准這類材料應用於生物可降解縫線已超過 20 年。

這些材料是藉由水解聚合物骨幹中的酯鍵（-COO-）而降解。控制支架的物理特性，如纖維直徑、孔洞大小及聚合物的結晶度，皆能調控支架降解的速率，其降解速率的範圍可從高孔洞 PLA 纖維的 6~8 周，到高結晶度 PG 的 6~18 周⁸。這些支架的機械特性能被調控，其範圍為 5 kPa⁹~1 GPa¹⁰。用於軟骨組織工程，最普通的材料為非紡織的 PGA 網狀物。而 PLA 及 PLGA 海綿或泡沫塑料比 PGA 支架硬，且通常於一般有機溶劑中，他們的溶解度比 PGA 容易處理。然而，這些材料仍有些缺點，這類聚合物具有較低的細胞貼附性、組織整合性及生物相容性¹¹。在降解過程中也會誘導白細胞介素-1（interleukin-1, IL-1）等的產生。這些已證實會抑制軟骨形成及降解軟骨的細胞間質。由於軟骨細胞對環境 pH 值的變化相當敏銳，而這些材料甚至在無免疫反應的環境中，也會自然降解成酸性物質，使得局部的 pH 值降低，造成細胞毒性¹²。

普流羅尼類（pluronic）或 polaxomers 是由聚氧化乙烯和聚氧化丙烯聚合而成，其具有熱凝結特性。普流羅尼雖可成功地促進軟骨形成¹¹，但這些人工合成凝膠系統的主要缺點在於其機械特性通常相當弱，且降解速率快。

(b) 天然物合成的支架

許多天然衍生的聚合物，也可以被用來做為幫助軟骨生長的材料。主要可分成兩大類：一類為碳水化合物的聚合物，如褐藻酸鹽、洋菜膠、玻尿酸及幾丁聚醣；另一類則為蛋白質，

如膠原蛋白和纖維蛋白。

1. 膠原蛋白 (collagen): I 型膠原蛋白常被用來作為軟骨細胞及間葉幹細胞的攜帶者¹³。而 I 型膠原蛋白的許多製備過程要在酸性情況下才可溶解。膠原蛋白溶液的中和會導致一個水合的膠原膠凝體形成，當中和溶液存在細胞時，細胞可有效地被封入膠原膠凝體內。膠原蛋白為身體天然成分，具有讓細胞貼附的纖維表面及攜帶它們活性所需的生物資訊，且其降解的產物具有生理性及無毒性。這些系統在臨床應用上的主要缺點為其機械強度過弱。且，軟骨組織內的 I 型膠原蛋白並非主要成分。因此有些學者建議應用來自軟骨間質的 II 型膠原蛋白可能比 I 型好¹⁴。
2. 纖維蛋白 (fibrin): 纖維蛋白凝塊或纖維蛋白膠是由纖維蛋白原和凝血酶反應而來。其降解產物為非毒性物質。這種外生性的纖維蛋白凝塊被廣泛地應用於支架上¹⁵。然而在某些動物體內，外生性纖維蛋白可能會誘發一些免疫反應¹⁶。
3. 褐藻膠 (alginate): 源自於藻類的多醣體。當遇到帶正電的鈣離子，褐藻膠的古洛糖醛酸 (gulonic acid) 藉由離子鍵產生交聯。體外培養軟骨細胞在褐藻膠中，常利用硫酸鈣作為交聯劑，製作出可塑形的支架。在褐藻膠與軟骨細胞立體培養下，軟骨細胞能有效地分化¹⁷。但在相關的生物體內測試中，其效果並不理想¹⁸。
4. 洋菜膠 (agarose): 洋菜膠以往被廣泛地使用於細菌培養，通常加熱後成液體狀，待其冷卻後再與細胞充分混合。使用洋菜膠的細胞培養研究結果表明軟骨細胞間質能有效地被刺激生成。但洋菜膠較差的生物降解性降低了其被應用於人體的可能性。
5. 玻尿酸 (hyaluronic acid): 玻尿酸為關節軟骨間質的生理成分，能誘導胚胎幹細胞分化成軟骨細胞¹⁹。在關節軟骨修復方面，玻尿酸是一種理想的間質材料。但是，玻尿酸通常必須通過酯化或其他化學方法相互交聯成支架，而此過程會對其生物相容性造成危害。玻尿酸常被用來作為軟骨細胞及骨髓基質幹細胞的攜帶者²⁰，充滿細胞的玻尿酸支架會形成像軟骨般的組織²¹。有文獻報導經交聯後的玻尿酸降解後的產物可能會造成軟骨溶解²²。
6. 幾丁聚醣 (chitosan): Sechriest 等²³ 利用凝膠支架方式生成軟骨，其成分為交聯的硫酸軟骨素 A 及幾丁聚醣。許多體外研究證明：幾丁聚醣具有潛在價值，因其不僅可有效地活化軟骨細胞^{23,24}，也可在體外表達人類軟骨細胞外基質中的蛋白質²⁵，促進軟骨修復。此外，幾丁聚醣也可作為生長因子的攜帶者，且具極佳的生物可降解性。

(c) 三重聚合物支架

許多合成及天然支架被應用於軟骨組織工程。在組織發展階段，支架扮演細胞外基質 (ECM) 的重要角色，且支架具有生物資訊功能，例如當基質包含三肽 (Arg-Gly-Asp) 則可幫助細胞附著於支架上。所以，有三肽應比不具三肽的合成聚合物好。細胞分泌及合成細胞外基質後反過來受細胞外基質的調控，這種機制稱為動力互換。含有硫酸軟骨素的支架雖可促進糖蛋白和 II 型原蛋白的分泌，但卻抑制有絲分裂 (mitosis)²³。軟骨初期生成時，細胞外基質中高濃度的玻尿酸會促進組織工程軟骨的整合。而明膠 (gelatin) 基本上可視為變性的膠原蛋白，所以或許還保留了某些生物資訊，如 Arg-Gly-Asp 序列，假設我們以明膠、軟骨素及玻尿酸形成的三重聚合物仿軟骨細胞外基質組成 (II 型膠原蛋白、聚葡萄糖胺和玻尿酸)，以及提供必要的生物資訊讓細胞貼附，以符合軟骨組織工程的動

力互換。在本組研究中，我們使用硫酸軟骨素-玻尿酸-明膠的三重聚合物仿軟骨細胞外基質組成，作為軟骨組織工程支架。此支架的孔洞大小一致，大約為 180 μm ，且具有 75 % 的孔洞密集度。將豬的軟骨細胞注入此三重聚合物支架上，然後分別培養於培養皿或旋轉瓶 2、3、4 或 5 周。結果顯示用旋轉瓶培養，軟骨會均勻分佈在支架上，而用培養皿培養則不會。經免疫組織化學染色得知用旋轉瓶培養可使軟骨細胞的表現型維持至少 5 周及 II 型膠原蛋白的合成。這些結果顯示，明膠-硫酸軟骨素-玻尿酸三重聚合物具有作為軟骨組織工程支架的潛力²⁶。

3. 軟骨組織工程的體外試驗

軟骨組織工程體外研究最關鍵的題目為軟骨細胞增生和分化的調控，軟骨前趨細胞 (chondrocyte progenitor cells)、保留細胞和生長因子在支架內相互間的反應，機械環境，以及軟骨生長的因素。體外測試的第一步必須評估支架的品質。支架的好壞取決於其生物相容性，同時要視其是否適合軟骨細胞的生長及間質的分泌。

Freed 等²⁷發表一系列關於生物反應器內軟骨培養的研究。他們將軟骨細胞注入 PLGA 支架內，於微重力環境下置其於旋轉的生物反應器中。由於重力、離心力和拖曳力三力構成動力平衡，使得注滿細胞的支架可以維持旋浮狀態。這種構成也包含大量 II 型膠原蛋白，占總膠原蛋白的 90% 以上。與胎牛的關節軟骨相比，培養 6 周後的組織工程軟骨中聚葡萄糖胺含量為每單位濕重達 68%，而 II 型膠原蛋白則達 33%²⁷。至於機械性質（如平衡係數、液體的滲透壓、動態強度及流動勢能等等）與胺基酸葡萄糖、膠原蛋白和水的含量有關¹⁰。他們的研究提供了一套體外培養軟骨的方法。

許多體外研究都以細胞-聚合物支架-生物反應器這套系統作為發展。生物反應器能提供組織工程所需的第三個要素：生物活化因子。他能控制環境的 pH 值、溫度、壓力和供應營養，也可以提高細胞注入三維支架（立體支架與三維支架請統一名稱）時的效能，增加質傳，以及提供機械刺激²⁸。

體外研究也提供了一套測試生長因子影響的方法。軟骨的基因受許多生長因子調控，包括胰島素樣生長因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、轉化生長因子超家族成員〔如轉化生長因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)〕、骨形態發生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、纖維細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血小板源性生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 及骨源性形態發生蛋白 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)²⁹⁻³²。體外研究顯示補充這些生長因子，可以幫助組織工程軟骨的生成^{33,34}。Blunk 等³⁴將胎牛軟骨細胞注入 PGA 支架中，測試 IGF-1、白細胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、PDGF 和 TGF- β 對組織工程軟骨構成的影響。結果顯示 IGF-1、IL-4 及 TGF- β 均會增加聚葡萄糖胺及膠原蛋白的含量，PDGF 則相反³⁴。而 Gooch 等³⁵證明 BMP-2、BMP-12 和 BMP-13 也有利於組織工程軟骨的組成。實際上，在體內真實環境中，軟骨生成期間有多種生長因子於不同時間點釋放。許多研究試圖在不同時間間隔增加不同生長因子組合。Pei 等³⁶相繼添加 TGF- β 、FGF-2 及後 IGF-1 所生成的組織工程軟骨具有較佳的生化和機械特質。

4. 軟骨組織工程的體內試驗

兩種動物模型應用於軟骨組織工程方面的研究。附有軟骨細胞的支架被移植到無免疫反應的裸鼠皮下組織^{7,37,38}。這些支架會變成異位元組織而不同於真實的生理環境。可以說這些裸鼠其實是作為活的生物反應器來提供養分和生物活化因子。此方法可以使用異體細胞作為組織工程細胞來源。不過，因為這些裸鼠缺乏免疫反應，所以這樣的實驗結果將不同於一般動物體內關節受損的情況。因此，組織工程的臨床前研究，應該將這些支架直接移植到關節受損的動物體內其結果將更接近臨床的使用。

許多種動物被用來做關節軟骨損傷的研究。這些動物已有完整的基因庫資料，因此可利用 DNA 序列的專一性作為功能性基因表現型的研究。此外，這些物種無論於軟骨厚度、密度還是軟骨細胞行為，與人類軟骨有很大的差異。雖然沒有一種動物可以理想地代表人類在臨床上的情況，但是對於我們所特別需要探索的問題，每一種動物都在研究上有其優缺點。因此，動物模型在臨床前篩選，以及評估新組織工程上潛在問題，這兩方面扮演相當重要的角色。

常用的一些實驗動物面臨到一些問題。人類膝透明關節軟骨厚度大約 1.65~2.65 mm³⁹。而實驗常用成年兔在相對應的透明關節軟骨深度只有 300~400 μm。狗的軟骨厚度約為 0.6~1.3 mm，羊則是 0.4~0.5 mm。大型動物，像綿羊和山羊，關節軟骨層約為 0.7~1.5 mm 厚，馬的關節軟骨約 1.5~2.0 mm，迷你豬則為 1~2 mm。人類和兔子的關節軟骨細胞大小差不多，但是人類軟骨細胞所能維持的細胞間質功能區域範圍卻是兔細胞的 8~10 倍。人類內側股骨軟骨的總細胞體積密度占全部 1.7%，成兔為 12.2%³⁹。因此，在實驗動物身上創造出大小等同於人類所發生的軟骨缺陷，並不能類比人類真實的情況。

在人類和其他動物身上，一個細胞單位所取代的軟骨基質體積也不同。擴散和營養方面的考慮及其對軟骨產生的能力也是無法比較的。人類關節軟骨的本質結構也不同於其他實驗動物：軟骨細胞分佈形態和細胞區域關係也無法比擬。此外，機械環境也有所不同，這可能影響日後修復的關鍵因素。目前這些問題沒有最好的解決方法，但可以通過仔細設計損傷及適當修正環境來達到比較理想的方式³⁹。由於人類和其他動物存在差異及對功能和症狀的評估能力有限，使得動物實驗結果要推論到臨床案例變得很困難。所以發展可以類比人類情況的大型動物模型變得很重要。此外，為了得到清楚明白的實驗結論，系統化的實驗設置也是需要的³。一旦某一實驗方法如預期修復動物關節軟骨表面，就可以合理地執行臨床試驗。

5. 軟骨組織工程的臨床試驗研究

在軟骨組織修復方面，近年來並沒有真正商品化的組織工程治療方式。美國食品藥物管理局核准的自體軟骨細胞移植實際上是一種細胞治療，而不是組織工程，因為它並沒有用到支架材料。不過，自體軟骨細胞移植仍然有一些限制。1. 單層細胞增生分化後，軟骨細胞的表現型會消失。於是軟骨細胞傾向於分化成纖維母細胞，而失去分泌細胞間質的能力，接著合成 I 型膠原蛋白⁴¹。而已分化的軟骨細胞，只有在有限的分裂次數才能表達正常軟骨細胞的表現型⁴²。因此，所移植的軟骨細胞是否可以維持正常的表現型是備受關注

的問題。2.移植時軟骨細胞只是被注入有缺陷的軟骨部位，並用可分解的纖維蛋白膠粘合，因此，軟骨細胞與移植部位可能會接合不良。3.所移植的軟骨細胞可能無法均勻分佈。因為軟骨細胞是以懸浮液的形式注入，由於重力的影響，這些細胞可能會集中在某些區域，造成移植後軟骨的不均勻生長。有些動物實驗顯示 ACI (autologous chondrocyte implantation) 可能導致所移植的細胞與移植點的軟骨及軟骨下骨整合不良，尤其是在骨軟骨損傷的情況中特別明顯。移植部位整合不良可能會使壓迫提升，最後導致所修復組織的退化¹。

為改善這些潛在的缺點，許多研究者使用新的組織工程技術，利用含有軟骨細胞的支架來促進軟骨細胞表現型的維持，並且可使軟骨細胞比較均勻分佈。許多這方面的臨床研究已經開始進行。如日本 Ochi Mitsuo 教授使用 atelocollagen 作為支架來幫 51 例骨軟骨受損患者進行自體軟骨細胞移植，其效果良好⁴³。義大利 Insubria 大學的 Paolo Cherubino 教授應用雙層膠原蛋白膜為支架對 13 例患者進行自體軟骨細胞移植，其中 6 例膝關節受損患者完全或接近完全復原⁴⁴。

由於骨髓基質幹細胞的分裂增殖較軟骨細胞佳，因此我們目前正利用骨髓基質幹細胞於 atelocollagen 支架內進行迷你豬的組織工程大規模臨床前試驗，若成效良好我們將申請進行人體實驗⁴⁰。

三、韌帶組織工程

1. 前言

組織工程濫觴於 1980 年代晚期，哈佛大學的 Vacanti 研究團隊首先使用 PLGA 為材料來培養軟骨組織，得到初步成功的結果，聲名大噪，一時之間，組織工程的研究如雨後春筍般蓬勃發展；而韌帶組織工程也就隨後發展起來。1990 年代，學者的研究以可吸收性的物質為主，包括 PLGA、Collagen、PCL 等，但受限於合成物質的機械強度不夠，使得韌帶組織工程後續的研究進展趨緩。相對於同時一些擁有較好機械強度的合成物質，如 Gore-Tex、Dacron、Carbon fiber 等也被研究過，由於其是生物不可吸收性，縱然材料科學家們也嘗試對這些材料做一些表面處理及材料品質改善，但終究還是不堪機械的力量毀敗。正本清源，韌帶組織工程的決定因素仍是細胞、支架、化學因素及物理機械條件四大要素，以下針對這四要素敘述，當前的發展目標與成果。

2. 細胞

目前就對細胞而言，主要分為二種形式，其一為使用自原始韌帶培養出來的纖維母細胞 (fibroblast) 植入以可吸收性支架 (scaffold) 的材料上^{45,46}。其二為使用分離自人體的骨髓的間質幹細胞 (MSC)，注入支架後，於生物反應器中培養，並同時加上化學因素與機械因素 (力量，電磁場等等)⁴⁷。目前的共通想法為盡量取自體細胞，以避免排斥與疾病傳染等問題，並且要求細胞能有強烈的複製再生能力，來自自體骨髓所分離的間質幹細胞已成

為目前的主流選擇。

3. 支架

所謂支架就是所謂組織形成模版 (tissue formation template)，目前使用上仍是以 PLGA 及 Collagen 為最常見，而有些學者為求較佳的機械性質，也有採用 PCL 或 Silk fiber 者。目前較有進展者，為支架的設計如果是有 cross-link 的設計並輔以培養時提供機械力量的前驅壓力 (pre-stress)，所培養出的不管是細胞型態與後續的間質組織 (matrix) 成份都比較像真正的韌帶組織。對於韌帶組織工程而言，目前的共通原則是支架的原型最好是能像繩索狀可以互相纏繞成似韌帶纖維的結構，可以提供類韌帶的機械力量，有適當孔洞半徑容許細胞滲入著床、附著，及理想的分解速度以配合新韌帶的組織形成。

4. 化學因素

1. 目前尚無法有一真正的生物標誌 (biomaker) 可以用於標示確認培養自韌帶纖維母細胞 (fibroblast)，特別是指前十字韌帶 (ACL) 之纖維母細胞，韌帶組織細胞特性的描述如下：
 - (a) 細胞外間質組織成份包括有 collagen type I and III, elastin, fibronectin, decorin, and biglycan^{48~51}。
 - (b) Collagen type I 對 type III 的比率，每種韌帶皆有差異，皆有其特性。
 - (c) Cross-links 的型態組成與含量。
 - (d) 膠原蛋白之特殊結構如 crimp pattern 及 collagen fibril diameter。
2. 生化相關研究已發現許多生長因子及氧氣，對於間質幹細胞及原始纖維母細胞的分化、生長及形成間質組織都有貢獻，各自有不同影響^{52~63}。ascorbate-2-phosphate^{64~65} 對體外細胞生長及組織形成的維持有明顯的促進作用。而相當多的生長因子如 epidermal growth factor (EGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、insulin-like growth factor-II (IGF-II)，以及 transforming growth factor- β (TGF- β) 等，對細胞分化 (differentiation)、細胞分裂生長、間質組織的分泌與形成等，都有各自不同的貢獻與影響。

5. 機械因素與生物反應器

目前的研究顯示^{66~67} 在生物反應器中培養的組織工程的生物產物 (engineered bioproducts)，必須提供適當的機械因素，而且必須仿組織本身所負擔的機械功能。以韌帶為例，提供 dynamic strain 與 torsion 的 pre-stress 機械力量，對於未來培養出來的初步組織工程化韌帶，不論在細胞型態，間質組織成份，cross-link 的排列與微結構，皆有正面的意義。目前在培養組織工程化韌帶的生物反應器設計，皆把此機械因素納入必備的條件之一，以求培養出來的組織的各項性質最接近人體的結構。

6. 結論

雖至目前為止，尚無一項組織工程化韌帶通過人體試驗，但明顯地在各方面研究皆有所進展，但是面對每年有如此多的人需要韌帶的代償（尤以前十字韌帶斷裂的傷害為著），我們當更有責任心與使命感去努力來完成接續的目標。

四、骨組織的再生醫學

用骨組織工程的原理及方法來製造骨頭的生物製品，如同製造軟骨、韌帶的生物製品一樣，也需考量細胞、支架及培養的條件。

1. 骨髓幹細胞的基本培養

每種組織有不同的生物學特性，所以體外的培養條件也有所不同。雖然培養方法很多，但基本方法卻大同小異，只要了解基本原理、方法、要領，就可明白大部分的基本培養。以人類為例子，間葉幹細胞的來源通常是骨髓基質，大多從骨髓抽取液除去紅血球和血漿，並且培養在胎牛血清的培養液中。因為造血幹細胞通常為懸浮性的細胞，所以貼附在塑膠培養皿上的細胞就是骨髓間葉幹細胞。而骨髓間葉幹細胞在繼代培養後依然能維持正常的染色體數目，只是繼代次數一多會使細胞逐漸老化進而死亡⁶⁸。

培養操作的基本要求是“無菌操作”，因為體外培養的細胞沒有抵抗感染的能力，所以必須避免污染儘可能達到無菌操作。首先，(1)操作臺消毒，目前大多利用紫外線燈滅菌。在紫外線照射期間，培養細胞的培養液勿放置在操作臺面上，避免受紫外線的影響（必要時用紙張覆蓋）。(2)洗手和著裝，因為手會接觸到無菌操作臺，所以利用 70%酒精進行清洗和消毒。(3)火焰消毒，在無菌培養操作臺培養時，例如開啟或封閉瓶口前都要先火焰燒灼後進行。

在無菌臺操作時，培養液在未使用前不宜過早開啟，如不再使用也需封閉瓶口，而培養瓶開啟後，平放可避免落菌機會，其他用於吸取的吸管也要避免混用，以免污染擴大或細胞交叉汙染。操作中不能朝著操作臺講話、咳嗽等，以防唾液中細菌或黴菌被帶到臺面而污染。

2. 骨組織的成份與骨骼合成的生理過程

人體骨組織有大量的礦化成份，所以呈現一種剛性的結構。因此骨組織可以用來支撐身體、保護軟組織、運動和維持人體外形姿勢等。其中，骨骼也由細胞間質把骨細胞包圍著，而細胞間質則由基質、無機鹽（inorganic salt）和水份組成。90%基質都是膠原蛋白，屬於有機的網狀結構，一旦有礦化作用，相對的有機質含量就會減少。細胞間質主要含有大量氫氧基磷灰石（hydroxyapatite）的礦物質鹽類，一旦鹽類被堆積在細胞間質中的基質的膠原纖維上，就會產生骨化作用（ossified），使組織變硬⁶⁹。

3. 骨骼培養的生醫材料（骨細胞組織工程使用的材料介紹）

生物材料結合了生物、醫學和材料，是橫跨不同學術的一門科學。而生物體材料是指動物、植物或微生物的組成份或代謝物，利用純化或直接加工，加入適當成分或化學修飾來製備出。骨骼系統是由骨組織、軟骨、纖維結締組織、血液和神經組織組成，即使是骨骼的堅硬成份間都有空隙的存在。骨骼重建有個重要的因子是年齡，20歲前骨的形成和吸收作用的很好，但形成作用大於吸收作用。20歲到40歲則是兩者速率均降低但保持一定的平衡，超過40歲後吸收作用增加，但是骨的形成卻不變而慢慢發生骨鬆症。因此在選擇理想的骨骼材料時，希望植入物可以將周圍的纖維蛋白、多核白血球聚集在一起，使纖維母細胞可以出現在附近，引導間葉幹細胞進入缺陷中，接著間葉幹細胞分化成骨母細胞（osteoblast）和軟骨母細胞（chondroblast），此時會形成血管的毛細血管進入，提供骨母細胞和軟骨母細胞所需的養分，因而形成“新生的骨細胞”⁷⁰。

應用於組織工程骨骼培養的生物材料可以分成兩大類，天然性生物材料和合成性生物材料，目前在組織工程實驗上可以用的天然性生物材料包括有幾丁聚醣（chitosan）、褐藻膠（alginate）、膠原蛋白（collagen）、明膠（gelatin）、玻尿酸（hyaluronic acid）、纖維素（cellulose）、蠶絲（silk）、珊瑚（coral）、陶瓷（ceramic）等。合成性生物材料主要又分兩大類，一是含鈣鹽類，包括有氫氧基磷灰石、三鈣磷酸鹽、碳酸鈣、硫酸鈣等，另一類是合成高分子聚合物，包括有聚乳酸、聚乙醇酸、聚甘醇酸等。對於骨組織工程上所使用的生物材料，通常要具備的特性包括有生物相容性、可降解性、機械強度夠等。近來生物材料的改進，除了採用複合材料外，另外再結合生長因子，製成適合幹細胞生長分化成骨骼細胞的支架⁷¹。

4. 骨組織細胞的分子標記

目前實驗室用來監測骨組織硬骨細胞的分子標記有 Cbfa-1, alkaline phosphatase (ALP), collage type I, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) 等。在幹細胞分化為硬骨細胞的過程中，不同時期會表現出各種不同的分子標記，既使是非常少量的細胞，利用 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 的方法，可以測得細胞的分子標記，用以記錄分化的情形⁷²。

5. 幹細胞誘導的方法

幹細胞有兩種分化的方式，一種是生物體內誘導（*in vivo*）自行分化，另一種是體外誘導（*in vitro*）利用化學藥劑及生長因子來誘導成為所需要的細胞。骨髓間質幹細胞可以被誘導成為海綿骨、硬骨、軟骨、肌腱、骨骼肌等。例如將骨髓間質幹細胞移植到有急性心肌梗塞的動物內，就可以觀察到有新生的心肌細胞產生，而且使動物重生，這是生

物體內誘導 (*in vivo*) 的方式。例如在 5-azacytidine 的誘導下，小鼠的骨髓間質幹細胞在體外可以向心肌細胞的方向分化。而在 dexamethasone、 β -glycerophosphate、ascorbic acid 與骨髓間質幹細胞同時於體外培養，可以誘導成為骨細胞，進而生成骨細胞外間質，若加入 bone morphogenetic protein (BMP) 生長因子，可以加強骨髓間質幹細胞分化為骨細胞⁷³。

6. 檢驗骨組織的方法

Alkaline phosphatase (ALP)：alkaline phosphatase 存於骨骼中，由骨細胞產生，稱為 bone-alkaline phosphatase，可以用來檢測骨骼生長方面的指標，用來評估骨組織的代謝狀況。

Calcium：鈣存於骨細胞所產生的細胞外間質中，利用 calcium assay 可以用來測試鈣的含量，知道骨組織的代謝情況。

Alizarin 染色：alizarin red 會和骨細胞產生的細胞外間質中的鈣發生反應，使原本淡咖啡色的骨組織轉變成鮮紅色，可以用作骨組織中鈣的定性檢測。

Von Kosa 染色：用以偵測鈣化的染色定性分析。測試時，當樣品呈現黑褐色就代表有鈣化的情形⁷⁴。

7. 組織工程在醫學上的應用

幹細胞的主要目的是替再生醫學找到希望，利用它可以分化成各種體細胞，加上修改基因的技術，未來有可能治癒癌症及遺傳疾病，可以讓病患獲得重生的機會。也有學者將骨髓幹細胞注入靜脈，配合血管手術治療，讓心臟衰竭的患者的心臟功能加強。但是目前為止，幹細胞無法大量製造出治療上所需要的細胞，加上幹細胞與癌細胞只有一線之隔，稍有不慎，幹細胞可能會引發出癌細胞的潛在危機。目前人體骨組織的量產，還無法完全實現，假以時日，未來人類的各種組織或器官的缺損，將可藉由人體幹細胞及組織工程來治療⁷⁵。

五、參考文獻

- 1 Gillogly, S. D., Voight, M. & Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther.* **28**:241-251 (1998).
- 2 Mitchell, N. & Shepard, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg(Am).* **58**:230-233 (1976).
- 3 Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* **10**:432-463 (2002).
- 4 Hurtig, M., Pearce, S., Warren, S., et al. Arthroscopic mosaic arthroplasty in the equine

- third carpal bone. *Vet Surg.* **30**:228-239 (2001).
- 5 Breinan, H. A., Minas, T., Hsu, H. P., et al. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg(Am)* **79**:1439-1451 (1997).
 - 6 Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotech.* **22**:80-86 (2004).
 - 7 Vacanti CA, Langer R, Schloo B, et al. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*, **88**: 753-759 (1991).
 - 8 Hooper KA, Macon ND, Kohn J. Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly (L-lactic acid) as a function of polymer degradation. *J Biomed Mater Res*, **41**: 443-454 (1998).
 - 9 Moran, J. M. & Bonassar, L. K. Fabrication and characterization of PLA/PGA composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* **4**:498 (1998).
 - 10 Daniels, A. U., Andriano, K. P., Smutz, W. P., et al. Evaluation of absorbable poly(ortho esters) for use in surgical implants. *J Appl Biomater.* **5**:51-64 (1994).
 - 11 Cao, Y., Rodriguez, A., Vacanti, M., et al. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed.* **9**:475-487 (1998).
 - 12 Gray, M. L., Pizzanelli, A. M., Grodzinsky, A. J., et al. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res.* **6**:777-792 (1988).
 - 13 Kawamura, S., Wakitani, S., Kimura, T., et al. Articular cartilage repair: rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand.* **69**:56-62 (1998).
 - 14 Nehrer, S., Breinan, H. A., Ramappa, A., et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res.* **38**:95-104 (1997).
 - 15 Fortier, L., Nixon, A., Mohammed, H., et al. Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res.* **58**:66-70 (1997).
 - 16 Haisch, A., Loch, A., David, J., et al. Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Med Biol Eng Comput* **38**:686-689 (2000).
 - 17 Diduch, D., Jordan, L., Mierisch, C., et al. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* **16**:571-577 (2000).
 - 18 Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R., et al. The influence of transforming growth factor beta1 on mesenchymal cell repair of full-thickness cartilage defects. *J Biomed Mater Res.* **52**:543-552 (2000).
 - 19 Kujawa, M. J. & Caplan, A. I. Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates

- chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures. *Dev Biol.* **114**:504-518 (1986).
- 20 Radice, M., Brun, P., Cortivo, R., et al. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res* **50**:101-109 (2000).
- 21 Solchaga, L., Dennis, J., Goldberg, V., et al. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* **17**:205-213 (1999).
- 22 Knudson, W., Casey, B., Nishida, Y., et al. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum.* **43**:1165-1174 (2000).
- 23 Sechriest, V., Miao, Y., Niyibizi, C., et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res.* **49**:534-541 (2000).
- 24 Senkoylu, A., Simsek, A., Sahin, F., et al. Interaction of cultured chondrocytes with chitosan scaffold. *J Bioact Compat Polym.* **16**:136-144 (2001).
- 25 Lahiji, A., Sohrabi, A., Hungerford, D., et al. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* **51**:586-595 (2000).
- 26 Chang, C. H., Liu, H. C., Lin, C. H., et al. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* **24**:4853-4858 (2003).
- 27 Freed, L. E., Hollander, A. P., Martin, L., et al. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res.* **240**:58-65 (1998).
- 28 Chang, C. H., Lin, C. C., Chou, C. H., et al. *Biomedical engineering applications basis and communications.* **17**(1):38-43 (2005).
- 29 Schofield, J. N. & Wolpert, L. Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res.* **191**:144-148 (1990).
- 30 Centrella, M., Rosen, V., Horowitz, M. C., et al. Transforming growth factor- β gene family members, their receptors, and bone cell function. *Endocr Rev.* **4**:211-226 (1995).
- 31 Buxton, P., Edwards, C., Archer, C. W., et al. Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *J Bone Joint Surg(Am).* **83** (1 Suppl): 23-30 (2001).
- 32 Hanada, K., Solchaga, L. A., Caplan, A., et al. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem.* **81**:284-294 (2001).
- 33 Martin, I., Vunjak-Novakovic, G., Yang, J., et al. Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res.* **253**:681-688 (1999).

- 34 Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J., et al. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* **8**:73-84 (2002).
- 35 Gooch, K. J., Blunk, T., Courter, D. L., et al. Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage. *Tissue Eng.* **8**:591-601 (2002).
- 36 Pei, M., Seidel, J., Vunjak-Novakovic, G., et al. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* **294**:149-154 (2002).
- 37 Madry, H., Padera, R., Seidel, J., et al. Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther.* **13**:1621-1630 (2002).
- 38 Puelacher, W. C., Mooney, D., Langer, R., et al. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* **15**:774-778 (1994).
- 39 Hunziker, E. B. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop* (**367** Suppl): 135-146 (1999).
- 40 Chang, C. H., Kuo, T. F., Lin, F. H., et al. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials.* **27**:1876-1888 (2006).
- 41 Benya, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**:215-224 (1982).
- 42 Brittberg, M. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop.* **326**:270-283 (1996).
- 43 Ochi, M., Uchio, Y., Tobita, M., et al. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial Organ* **25**:172-179 (2001).
- 44 Cherubino, P., Grassi, F. A., Bulgheroni, P., et al. autologous chondrocytes implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg* **11**:10-15 (2003).
- 45 Dunn, M. G., Liesch, J. B., Tiku, M. L. & Zawadsky, J. P. Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**:1363-71 (1995).
- 46 Dunn, K. J., Perez-Polo, J. R. & Wood, T. G. Rapid neurite formation in a human cortical neuronal cell line. *Int. J. Dev. Neurosci.* **14**:61-68 (1996).
- 47 Goulet, F., Germain, L., Rancourt, D., Caron, C., Normand, A. & Auger, F. A. Tendons and ligaments. See Ref. 137, pp. 633-43 (1997).
- 48 Amiel, D., Billings, E. Jr. & Akeson, W. H. Ligament structure, chemistry, and physiology. In *Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair*. Daniel, D. M., Akeson, W. H., O'Connor, J. J. (eds). New York: Raven 1990, pp. 77-91.
- 49 Lo, Y. Y., Conquer, J. A., Grinstein, S. & Cruz, T. F. Interleukin-1 beta induction of c-fos and

- collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J. Cell. Biochem.* **69**:19–29 (1998).
50. Amiel, D., Frank, C., Harwood, F., Fronck, J. & Akeson, W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J. Orthop. Res.* **1**:257–65 (1984).
 51. Arnoczky, S. P., Matyas, J. R., Buckwalter, J. A. & Amiel, D. Anatomy of the ACL. In *The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts*. Jackson, D. W. (ed.) New York: Raven 1993, pp. 5–22.
 52. Obradovic, B., Carrier, R. L., Vunjak-Novakovic, G. & Freed, L. E. Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:197–205 (1999).
 53. Carrier, R.L., Papadaki, M., Rupnick, M., Schoen, F. J., Bursac, N., et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.* **64**:580–89 (1999).
 54. Attisano, L. & Wrana, J. L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**: 1646–47 (2002).
 55. Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & Le Roith, D. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**:153–59 (1996).
 56. Clemmons, D. R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**:45–62 (1997).
 57. Deie, M., Marui, T. & Allen, C. R., Hildebrand KA, Georgescu HI, et al. The effects of age on rabbit MCL fibroblast matrix synthesis in response to TGF-beta 1 or EGF. *Mech. Ageing Dev.* **97**:121–30 (1997).
 58. Lo, I. K., Marchuk, L., Hart, D. A. & Frank, C. B. Messenger ribonucleic acid levels in disrupted human anterior cruciate ligaments. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **407**:249–580 (2003).
 59. Marui, T., Niyibizi, C., Georgescu, H. I., Cao, M., Kavalkovich, K. W., et al. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J. Orthop. Res.* **15**:18–23 (1997).
 60. Murakami, S., Takayama, S., Ikezawa, K., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J. Periodontal Res.* **34**:425–30 (1999).
 61. Sakai, T., Yasuda, K., Tohyama, H., Azuma, H., Nagumo, A., et al. Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J. Orthop. Res.* **20**: 1345–51 (2002).

62. Jin, H. J., Chen, J., Karageorgiou, V., Altman, G. H. & Kaplan, D. L. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* **25**:1039–47 (2004).
63. Scherping, S. C. Jr., Schmidt, C. C., Georgescu, H. I., Kwoh, C. K., Evans, C. H. & Woo, S. L. Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect. Tissue Res.* **36**:1–8 (1997).
64. Fermor, B., Urban, J., Murray, D., Pocock, A., Lim, E., et al. Proliferation and collagen synthesis of human ACL cells in vitro: effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension. *Cell Biol. Int.* **22**:635–40 (1998).
65. Murray, M. M., Rice, K., Wright, R. J. & Spector, M. The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. *J. Orthop. Res.* **21**:238–44 (2003).
66. Altman, G. H., Horan, R., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P., et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.* **16**: 270–72 (2001).
67. Butler, D. L., Goldstein, S. A. & Guilak, F. Functional tissue engineering: The role of biomechanics. *J. Biomech. Eng.* **122**:570–75 (2000).
68. 骨髓間葉幹細胞的研究進展和商機，李文婷。
69. 科學人(2004，7月；2002，3月，2006，8月，7月，2005，9月)。
70. 曹誼林，《組織工程學理論與實踐》，上海科學技術出版公司，2004年。
71. 鄂征編，《組織培養和分子細胞學技術》，北京出版社，2001年。
72. 王盈錦，《生物醫學材料》，合記圖書出版社，2002年。
73. 源源不絕的骨骼銀行—談硬骨組織工程，張至宏 林峰輝，「科學發展」雜誌，2002年8月，356期。
74. 巧奪天工的人類智慧—組織工程，徐善慧 陳俊宇，「科學發展」雜誌，2002年8月，356期。
75. 斐雪濤，《幹細胞生物學》，生命科學前沿叢書，2006年。

第六章

心臟幹細胞治療

Cardiac Stem Cell Therapy

陳盈憲 李啟明

臺灣大學醫學院 內科

一、前言

心肌細胞，長約 80 微米寬約為 50 微米，細胞間彼此以閥盤 (intercalated disks) 連接，平行或斜向排列。長久以來，心肌細胞被認為是最終分化的細胞，一旦受損死亡則無法再生。取而代之的是纖維化等結締組織，因而導致局部心肌收縮功能或局部電氣傳導異常，進而影響心臟整體的協調性或誘發心律不整。而當大區域心肌缺損時，心臟衰竭接踵而來，這將影響生活品質、病人心理、長期預後以及龐大的醫療支出。

而近代急性心肌梗塞的治療也是基於這樣的認知，建議早期重建阻塞血管的血流，以便將心肌壞死區域降到最小範圍。近來利用經皮冠狀動脈內血管成形術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty)、注射血栓溶解劑及冠狀動脈繞道手術以達到早期重建阻塞血管的血流的目的，同時已能大幅降低急性心肌梗塞死亡率。但心肌梗塞後造成的心衰竭依舊衍生出許多的問題。而對於末期心臟衰竭病患，除了施與雙心室節律器 (biventricular pacing) 甚至接受換心手術之外，對於修復衰竭的心臟部份並沒有特別突破性的方法。

進來鑒於幹細胞增生、培養、萃取技術的了解，使得利用幹細胞治療作為受損心肌的修護燃起曙光。進來有更多的證據支持，利用幹細胞治療心臟疾病已有實質的幫助，而非空談理論。

二、幹細胞來源

目前臨床幹細胞試驗運用許多的細胞來修補心臟，依來源可分為成人骨髓幹細胞、成人心肌幹細胞及胚胎幹細胞，以下簡介這些常用的幹細胞 (表一)：

1. 成人骨髓幹細胞 (Bone Marrow Stem Cells)

骨髓內有許多不同的細胞，包括造血幹細胞、間質幹細胞 (mesenchymal stem cells)、多分化潛力成人前驅細胞 (multipotent adult progenitor cells) 以及血管內皮前驅細胞

(endothelial progenitor cells)。因為是自體的來源，因此廣泛應用於心臟幹細胞移植上。以下介紹幾種目前研究中的緣自骨髓之幹細胞。

(a) 多分化潛力前驅細胞 (Multipotent Progenitor Cells)

最初一些學者¹認為骨髓造血幹細胞 (bone marrow-derived hematopoietic stem cells, HSCs) 是經由分化 (trans-differentiation) 行成心肌細胞及血管組織，進而達到壞死的心肌組織再生的目的。但部分的研究²⁻⁴卻認為骨髓造血幹細胞並不能直接分化成心肌細胞，而是以細胞融合 (cell fusion) 的方式與梗塞區域內的心肌細胞結合，且只有極少的比例發生細胞融合而非大範圍區域。不同的骨髓幹細胞具不同分化能力且具有不同的功能及使命，Yoon等學者⁵於2005年進一步分離出一種具有多分化潛力的骨髓幹細胞。不同於骨髓造血幹細胞主要的作用是分化成多種的血液細胞，多分化潛力的骨髓幹細胞可分化成人體中的三大胚層。若將此種骨髓幹細胞注射入梗塞的心肌組織，可透過幹細胞分化成心肌細胞，或與宿主的心肌細胞融合，也可能經由旁分泌 (paracrine) 釋放出訊息物質以改善宿主的心肌細胞存活並促進增生。但未來仍需許多後續的研究去確定骨髓幹細胞究竟是否可作為心肌移植之用。

(b) 血管內皮前驅細胞 (Endothelial Progenitor Cells)

血管內皮前驅細胞也是源於骨髓的多功細胞，但亦存在於周邊血液中。這類細胞能分化成血管內皮細胞及動員許多促進血管形成的生長因子 (proangiogenic factors)，以促成血管新生。這些細胞同時具有造血細胞的表面標記CD34⁺/CD133⁺，以及血管內皮細胞的標記-血管內皮生長因子受體-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2, KDR, Flk-1)⁶。經由體外培養^{7,8}，可得到一些帶有細胞表面標記CD14⁺/CD34⁻的細胞，這是血管內皮前驅細胞的一個子群，會促使生長因子的分泌以幫助血管新生。血管內皮前驅細胞目前臨床上應用在血管新生以治療周邊動脈阻塞性疾病⁹，至於對心臟冠狀動脈疾病則助益不大^{10,11}。

(c) 間質幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells)

間質幹細胞起源於骨髓的基質，它會在骨髓中形成骨架以利造血細胞存活，並且分泌出許多有助於造血細胞增生的物質。不同於骨髓組織，間質幹細胞主要的表面標記為CD45⁻/CD34⁻/CD133⁻^{12,13}。間質幹細胞具有分化成許多組織的能力，如骨頭、軟骨、肌肉、肌腱、韌帶與結締組織等。早期的體外及體內研究^{12,14}皆顯示，間質幹細胞可受去氧核糖核酸去甲基化劑 (DNA demethylating agent) 之誘導而分化成心肌細胞。後續在動物心肌梗塞的實驗中^{15,16}，間質幹細胞被證實會分泌一些物質以加強血管新生，並分化成心肌細胞，最終達到改善心肌收縮的效果。間質幹細胞也具備有移行至受損心肌的能力，將間質幹細胞注入心肌梗塞的老鼠尾巴靜脈內，會在心肌鄰近梗塞的區域發現其蹤跡。運用間質幹細胞進行心肌細胞的修補的最大好處是自體而非異體的來源，可以避免排斥反應。此外此種細胞的好處是它是可以在體外培養，但是通常需要較長時間的培養才可達一定數量。這些優點使得間

質幹細胞成為不錯的選擇。

2. 骨骼肌母細胞 (Skeletal Myoblasts)

骨骼肌細胞在受損後可以藉由衛星細胞 (satellite cell) 或骨骼肌母細胞 (skeletal myoblast) 與鄰近的肌纖維融合，並進一步分化成骨骼肌細胞，以達到再生的效果。衛星細胞在心肌組織中僅能分化成骨骼肌細胞，但許多動物實驗^{17,18}則指出，即使骨骼肌母細胞在心肌內只分化成骨骼肌細胞，但仍可改善左心室局部及整體的功能。因為骨骼肌可經由切片取得，而且可在體外分離及培養大量的骨骼肌母細胞；這類細胞僅能分化成多核的骨骼肌而不會分化成其他的細胞，因而有較小的致癌性；骨骼肌在缺氧的狀態下不易發生細胞凋零 (apoptosis)。這些特性都使得骨骼肌母細胞成為治療心臟疾病的幹細胞來源中不錯的選擇。然而骨骼肌母細胞對心臟功能的改善幅度不一，且有引發不整脈之疑慮，因此仍需更多研究來證實其治療之角色。

3. 成人心肌幹細胞 (Adult Cardiac Stem Cells)

過去認為心肌不具有再生的功能，直至2003年心肌幹細胞的發現扭轉了長久以來錯誤的假設。心肌幹細胞不僅可自行再生，也可以分化成許多不同種類的細胞，如心肌細胞，平滑肌細胞以及血管內皮細胞。以動物實驗為例¹⁹，將一種Lin- c-Kit+的心肌幹細胞注射進入缺氧的心臟，可成功形成新生的血管及心肌細胞，並且顯著改善心臟功能。Sca-1+的心肌幹細胞也有類似作用^{20,21}。此外，有一群會分化成心肌的幹細胞²¹被發現會表現Abcg2 transporter protein，將此類Abcg2+細胞與心肌細胞在體外一同培養，可以分化出 alpha actinin-positive 細胞。將Abcg2+ cells應用在心臟疾病治療的研究則在進行中。至於帶有iselet-1轉錄因子 (transcription factor) 的心肌幹細胞群，在心臟發育時會在outflow tract，右心室及心房等處增生形成心臟的構造²²。若在體外將isl1+細胞與間質細胞 (mesenchymal cell) 一同培養，細胞可增生並持續分泌 iselet-1卻不會分化。但若加入4-hydroxytamoxifen或和胎兒的心肌細胞一同培養，isl1+則可以分化成心肌細胞。目前仍尚未有應用isl1+在治療方面的臨床報告。雖然有這幾種心肌幹細胞的分子標記被找出，但是其中的不同點與意義仍然未有定論，也因此從體內分離心肌幹細胞、經體外培養、再轉植於心肌的治療方法，仍需更多的研究。

4. 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cells)

胚胎幹細胞的歷史可回溯到1950年代。當時為了研究畸胎瘤或畸胎癌，科學家分離出胚胎癌幹細胞 (embryonic carcinoma stem cell)，這成為日後發展胚胎幹細胞的根基。三十多年後，胚胎幹細胞被成功的分離出來^{23,24}。隨後leukemia inhibitory factor (LIF)²⁵被發現可以將胚胎幹細胞維持於不分化的狀態。若在沒有纖維母細胞 (fibroblast) 提供營養且沒有LIF的情況下，胚胎幹細胞則會開始分化。而未分化的胚胎幹細胞會表現出特有的標記，這些標

記在開始分化後很快就會消失，包括有embryonic antigen 1²⁶，轉錄因子Pou5f1²⁷及Nanog等^{28,29}。爾後，在1985年Doetschman等學者³⁰發現了其分化成心臟組織的潛力。在1998年Thomson等學者³¹成功地自人類的囊胚（blastocyst）分離出人類胚胎幹細胞（human embryonic stem cells, hESCs），也開創了幹細胞發展的新紀元。這些細胞具有源自胚胎、在特殊的環境下可以不分化地增生、能衍生形成三大胚層組織等特色，這些都符合了所有胚胎幹細胞的特點。很快地，人類胚胎幹細胞被發現可以分化成心肌細胞³²，這些心肌細胞型態上或生理功能上都類似人類胎兒的心肌細胞。然而，因為胚胎幹細胞取自人類胚胎，其衍生而來的合法性以及倫理爭議，大大侷限了臨床上的應用；其可能的致癌性；來源為異體因而可能引起免疫反應，這些都是胚胎幹細胞較大的缺點。至於其優點則為：具有穩定的染色體組型（karyotype），分化成心肌細胞後具備心肌特有的節律功能（pacemaker function）、電氣功能（electrical function）和收縮功能（contractile function）等^{33,34}。

三、幹細胞移植方式

迄今的動物試驗以及人體臨床試驗中，科學家嘗試過多種幹細胞移植方式。大略分為兩大類，其一為藉手術方式直接心肌內注射（intra-myocardial injection），再者則利用導管方式經由冠狀動脈、冠狀靜脈或周邊靜脈施行。冠狀動脈內注射（intra-coronary injection）或經心內膜注射（trans-endocardial injection）或經由靜脈注射（intravenous）³⁵則屬該類。

1. 靜脈注射（Intravenous injection）

此乃最便利之方式，但大部分植入之幹細胞隨體循環於抵達心臟前已旋即被肺臟、肝臟、脾臟或淋巴組織所破壞，因而降低其移植效果³⁶。若能提升幹細胞循環到心臟的向性，或許可以增加此方法的實用性。

2. 直接心肌內注射（Intra-myocardial injection）

於手術中直接於心肌內植入幹細胞，為最早採用的移植方式。此方法最大優勢則因其為手術中移植，可以直接將幹細胞移植到欲治療的區域。但其缺點為高度侵入性、容易誘發心律不整、只有少量的細胞可植入³⁷。

3. 經心內膜注射（Trans-endocardial injection）

利用心導管技術，將注射針頭藉導管經主動脈瓣膜逆行往左心室貼近，經心內膜直接將幹細胞移植入左心室內。藉由電氣及心肌收縮二種訊號指引來定位（electromechanical map, EMM），找出結痂心肌區域作為注射目標，可增加移植的準確度。此方法適於移植體積較大的幹細胞如骨骼肌母細胞或間質幹細胞。這些細胞若經由冠狀動脈移植，恐有冠狀動脈栓塞

的危險。

4. 冠狀動脈內注射 (Intra-coronary artery injection)

利用心導管技術配合氣球導管 (over-the-wire balloon catheter)，可將幹細胞注入冠狀動脈以灌流至欲治療的區域。此方法最吸引人的地方，就是將細胞植入心肌梗塞區域，同時避免了經體循環會被周邊組織破壞之疑慮；以及不必經由開胸手術，即可以將細胞準確的投擲至心肌梗塞區域。移植時藉由短暫氣球填充，以阻斷局部血液循環，增加幹細胞與組織作用的時間。但究竟注入多少幹細胞才足夠達成穩定且長久的移植效果一直是討論話題，目前根據研究顯示，約只有 1~2% 注入的幹細胞可以在梗塞區域偵測到³⁸。

5. 冠狀靜脈內注射 (Intra-coronary vein injection)

利用心導管技術，配合 TransAccess catheter system，以及輔以放射線透視及血管內超音波 (intravascular ultrasound) 定位，幹細胞亦可經由冠狀靜脈移植至心肌內³⁹。

四、幹細胞移植的機制

透過其研究證實，即使多數認為幹細胞移植可以用來治療心臟疾病，但其究竟透過何種機制造成來改善心臟功能仍未知。可能的機制包括細胞轉分化 (transdifferentiation)、細胞融合 (cell fusion) 以及旁分泌 (paracrine) 等。

1. 細胞轉分化 (Transdifferentiation)

細胞轉分化指初步分化的幹細胞進行細胞型態改變，使最初分化的細胞轉換成另一類的細胞型態。而早期發現¹利用基因轉植技術讓造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 表現綠色螢光蛋白，再移植入梗塞後的老鼠心肌中，造血幹細胞可轉分化為心肌細胞、內皮細胞及平滑肌細胞等。但此說法因陸續出現相反的結論，因而並未全然被大家接受。特別是利用基因分析等較不易為背景螢光干擾的方法，顯示造血幹細胞只分化為骨髓性與淋巴性細胞。但移植入的幹細胞直接轉分化成心肌細胞增加收縮力或轉分化成血管內皮造成血管新生而改善心臟缺氧仍被不少學者認為是可能的機轉。

2. 細胞融合 (Cell fusion)

少數的移植試驗⁴認為，利用基因標記的骨髓幹細胞植入心肌梗塞區域後，於梗塞心肌外圍可發現少數幹細胞與原本的心臟細胞融合，進而交換胞內物質與基因訊息。因此部分學者認為幹細胞移植可能是利用幹細胞與原本心肌細胞進行細胞融合來改善與修補心臟功能。

3. 旁分泌 (Paracrine)

因為只有少數幹細胞於移植後真正存活於心臟中，如此少量的幹細胞能否全部解釋左心收縮力的改善便一直受到質疑。因此其他可能的機制與假說便因應而生，其中最受到注意的就屬旁分泌的作用了。移植的幹細胞可能於心肌中釋放生長激素或細胞素促使血管新生、延長心肌細胞壽命或活化心肌的前趨細胞再生與分化^{40,41}。

五、幹細胞治療心臟疾病的臨床試驗

早期觀察性實驗⁴²發現，接受女性心臟移植的男性病患，約有7-10%的心臟組織可發現Y染色體。這些組織包含心肌、冠狀動脈與小血管，意味著幹細胞移動至心臟中分生成心臟組織可能性。至此燃起了幹細胞治療心臟疾病的大量研究。初期運用於人體的小規模首創研究如 Strauer BE⁴³發現自體骨髓幹細胞可以修補及因急性心肌梗塞而受損的心臟、Tse HF⁴⁴發現自體骨髓幹細胞可促進慢性缺血性心臟病患者的心臟血管新生。Stamm C⁴⁵發現自體骨髓幹細胞藉由心肌內注射可幫助心臟再生。累積前人智慧，醞釀了其後更大規模與更完善的實驗設計以測試幹細胞對心臟疾病之療效。

1. 幹細胞於急性心肌梗塞的運用

早期如 Strauer BE⁴³與 Assmus⁴⁶之幹細胞移植於急性心肌梗塞的研究著重於測試移植的安全性與粗略評估治療效果。在證實無安全之疑慮後，不少較大規模且具對照組的臨床試驗（詳見表二）便陸續進行，以下簡介其內容：

MAGIC cell trial⁴⁷

(Mycocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction With G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion)

針對急性心肌梗塞病患，MAGIC cell trial主要探討利用冠狀動脈內注射來移植以顆粒性白血球群落刺激因子 (granulocyte colony stimulation factor, G-CSF) 活化出的周邊血循環前驅細胞 (peripheral blood progenitor cells) 之可行性與效果。參與者為27位急性心肌梗塞 (ST-elevation myocardial infarction) 並接受緊急心導管與接受支架置放患者；其中10位病患接受G-CSF活化並萃取出周邊血循環前驅細胞後，再將這些周邊血循環幹細胞利用冠狀動脈內注射方式植入，另10位單純接受G-CSF而未接受幹細胞植入，最後7位則為對照組。研究顯示於6月後追蹤，接受幹細胞移植的患者其左心室射出分率 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 由原本的 $48.7 \pm 8.3\%$ 增加至 $55.1 \pm 7.4\%$ ($P=0.005$)，而對照組與單獨接受G-CSF病患

之LVEF則維持不變。但進一步分析發現接受G-CSF患者有較高比例發生血管再阻塞的副作用，引起了顆粒性白血球群落刺激因子對於增加非塗藥支架（bare-metal stent）再阻塞的討論。隨後的MAGIC-cell-DES trial發現，塗藥支架接受了顆粒性白血球群落刺激因子後沒有明顯支架再阻塞，但仍有賴的更多臨床證據來支持此推論。

TOPACRE-AMI trial^{46,48}

（Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Mycardial Infarction）

TOPCARE-AMI trial也是針對急性心肌梗塞（ST-elevation myocardial infarction）病患設計的臨床實驗。Schachinger等學者將59位急性心肌梗塞並接受緊急心導管與接受支架置放患者，利用冠狀動脈內注射技術分別施與（1）自體骨髓幹細胞（autologous bone-marrow stem cells）主要組成為造血幹細胞（hematopoietic stem cells）；以及（2）周邊血循環前驅細胞（circulating-blood-derived progenitor cells），主要為組成為內皮幹細胞（endothelial progenitor cells）。分別於4個月及12個月後追蹤，發現兩組之LVEF上並無顯著差異，但各自與移植前LVEF相比則有明顯增加；移植後4個月，利用左心室血管攝影，LVEF由 $50\pm 10\%$ 增加至 $58.3\pm 10\%$ （ $P=0.001$ ）。移植後12個月，LVEF更增加了 $9.3\pm 8.0\%$ 。此研究同時再次強調了幹細胞移植的安全性，利用Kaplan–Meier analysis，97%患者於100日內未曾發生二度心肌梗塞，或因心衰竭而重複住院等情形。這一個Phase I trial雖沒有對照組，且無法證實究竟哪一種幹細胞型態是最有療效，不過又再次奠定幹細胞移植於治療急性心肌梗塞的角色。

BOOST trial^{38,49}

（The Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration trial）

BOOST trial主要研究自體骨髓幹細胞對於急性心肌梗塞（ST-elevation myocardial infarction）患者心臟收縮力的影響。60位急性心肌梗塞並接受緊急心導管與支架置放患者，隨機分配至對照組接受最佳藥物治療，或實驗組接受經冠狀動脈植入自體骨髓幹細胞。六個月後利用核磁共振評估心臟收縮功能，發現對照組LVEF由 $51.3\pm 9.3\%$ 變為 $52.0\pm 12.4\%$ ；而實驗組則由 $50\pm 10\%$ 增加為 $56.7\pm 12.5\%$ （ $P=0.0026$ ）。但於18個月後追蹤發現兩組LVEF變化轉為無顯著差異，主要是因為於18月時，實驗組的LVEF雖然比移植前增加了5.9%，但對照組的LVEF則持續進步，比移植前增加3.1%。BOOST trial雖無法證實幹細胞移植可以持續改善左心室收縮力，但至少證明單一劑量的幹細胞治療可以加速心臟功能的恢復。

JANSSENS 2006⁵⁰

Stefan Janssens 利用隨機分配、雙盲試驗及安慰劑對照組的實驗設計，將 67 位急性心

心肌梗塞 (ST-elevation myocardial infarction) 且成功接受緊急心導管與接受支架置放患者分成兩組，兩組人皆於心肌梗塞後第一天接受骨髓幹細胞萃取。對照組共 34 名接受最佳藥物治療以及經冠狀動脈注射安慰劑，而實驗組共 33 名則接受冠狀動脈內注射自體骨髓幹細胞。4 個月後核磁共振攝影追蹤，發現兩組之 LVEF 並沒有顯著的差異；安慰劑對照組由 $46.9\pm 8.2\%$ 變為 $49.1\pm 10.7\%$ ，幹細胞移植實驗組則由 $48.5\pm 7.2\%$ 變為 $51.8\pm 8.8\%$ ($P=0.36$)。但是接受自體骨髓幹細胞移植可使心肌梗塞範圍縮小，局部收縮功能亦可獲改善。這意味著自體骨髓幹細胞移植雖未能完全增加左心收縮功能，但可影響心肌梗塞後的左心室重塑。

REPAIR-AMI trial 2006^{51,52}

(Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Mycocardial Infarction trial)

REPAIR-AMI trial 利用雙盲、安慰劑對照組與多醫學家中心合併的臨床實驗設計，主要研究冠狀動脈內注射自體骨髓幹細胞對於急性心肌梗塞 (ST-elevation myocardial infarction) 後心臟功能的影響。研究涵蓋急性心肌梗塞並接受緊急心導管與支架置放術之患者共 204 位，包括接受自體骨髓幹細胞移植者 101 位，及接受安慰劑的對照組 103 位。於 4 月後追蹤發現，接受自體骨髓幹細胞移植者其 LVEF 增加了 $5.5\pm 7.3\%$ ，而對照組則增加了 $3.0\pm 6.5\%$ ($P=0.01$)。次族群分析更發現，心肌梗塞後 LVEF 低於中數 ($LVEF < 48.9\%$) 患者於自體骨髓幹細胞移植後 LVEF 的改善則最顯著。相較於接受安慰劑的對照組，接受自體骨髓幹細胞移植者於一年後有較低的死亡率、再次心肌梗塞、因血管再狹窄而需要重複接受經皮冠狀動脈內血管成形術以及因心衰竭而重複住院比例。

2. 幹細胞於慢性缺血性心臟病的運用

當幹細胞移植對急性心肌梗塞的修補上展現初步的療效，研究矛頭很快轉向慢性缺血性心臟病的治療上。特別在小規模研究上的成功，針對慢性缺血性心臟病的研究也因應而生。

PERIN 2004⁵³

Perin 針對幹細胞移植治療慢性缺血性心臟病所設計的臨床試驗，共 20 位慢性心缺血性心臟病患者參加此研究，這些患者皆為 $LVEF < 40\%$ ，單光子電腦斷層攝影 (single photon emission tomography, SPECT) 證實有殘活的心肌細胞，且不適合接受繞道手術或經皮冠狀動脈內血管成形術。其中 11 位病患，利用導管技術以及電氣訊號指引定位，透過 NOGA Myostar 注射導管 (injection catheter) 將自體骨髓幹細胞經心內膜直接注射到標的區域內。另外 9 位病患則為對照組。追蹤一年後發現，接受自體骨髓幹細胞移植組病患，其單光子電腦斷層攝影顯示之心肌缺血區域減小；運動心電圖測試顯示運動耐受度增加。這樣的研究為末

期心衰竭病患提供治療上的一線曙光。

ERBS 2005⁵⁴

Sandra Erbs 主導的研究主要討論周邊血循環前驅細胞是否可以改善慢性缺血性心臟病，特別是慢性血管全阻塞（chronic total occlusion）的情況。利用隨即分配、雙盲及安慰劑對照組的實驗設計將 26 位患有冠狀動脈慢性血管全阻塞且已接受經皮冠狀動脈內血管成形術與支架置放的患者分成兩組。實驗組共 13 名，接受顆粒性白血球群落刺激因子（G-CSF）活化並收集周邊血循環前驅細胞，隨後接受冠狀動脈內周邊血循環前驅細胞注射，對照組共 13 名亦接受顆粒群落刺激因子（G-CSF）活化並收集周邊血循環前驅細胞，但最後只接受冠狀動脈內注射血清安慰劑。追蹤比較 3 個月後，發現接受冠狀動脈內注射周邊血循環前驅細胞患者其 coronary flow reserve（CFR）約增加 43%，而對照組則沒有變化；磁振攝影發現接受細胞移植後，陳舊性梗塞區域減少 16%，而 LVEF 增加 14%。進而推論冠狀動脈內注射周邊血循環前驅細胞可以改善微小冠狀血流進而喚醒因缺血性變化而暫時失能的心肌細胞。

TOPCARE-CHD trial⁵⁵

(Transplantation of Progenitor Cells and Recovery of LV [Left Ventricular] Function in Patients with Chronic Ischemic Heart Disease)

TOPCARE-CHD trial 乃針對慢性缺血性心臟病病患設計的臨床試驗，主要研究自體骨髓幹細胞移植是否對於陳舊心肌梗塞病患帶來好處。共 75 位慢性缺血性心臟病患者（距前次發生心肌梗塞至少三個月以上）加入此研究，其中 23 位為對照組，24 位接受周邊血循環前驅細胞（CPC），剩餘 28 位接受自體骨髓幹細胞移植。3 個月後，原屬對照組的受試者隨機分配接受周邊血循環前驅細胞或是自體骨髓幹細胞移植，而原本接收幹細胞移植者則互換移植的幹細胞種類。結果顯示，3 個月後接受自體骨髓幹細胞移植的病患，其 LVEF 增加 2.9% 遠比對照組或接受周邊血循環前驅細胞組改善程度為高，而接受周邊血循環前驅細胞之 LVEF 則下降 0.4%。即使之後交叉換組（cross-over），接受自體骨髓幹細胞移植依舊有較佳的心臟功能恢復。

另一個針對慢性缺血性心臟病病患設計的臨床試驗研究⁵⁶，比較 121 位慢性缺血性心臟病患者（平均約心肌梗塞後七年）於接受自體骨髓幹細胞移植三個月後其心房利鈉肽原（NT-ProANP）及腦利鈉肽（NT-ProBNP）的變化。接受幹細胞移植後 NT-ProANP 由移植前的 6190 ± 6407 fmol/mL 下降至 4392 ± 3770 fmol/mL（ $P=0.001$ ）；而腦利鈉肽則由移植前的 1444 ± 2603 pg/mL 下降至 1186 ± 1380 pg/mL（ $P=0.24$ ）。若獨立分析移植前腦利鈉肽 >450 pg/mL 的病患，可發現腦利鈉肽顯著的由移植前的 2137 ± 3063 pg/mL 降至 1688 ± 1509 pg/mL（ $P=0.03$ ）。而目前認為腦利鈉肽於預測心衰竭預後有指標性意義，幹細胞治療後腦利

鈉肽下降，意味著心衰竭程度的緩解與長期預後的改善。

3. 幹細胞於非缺血性心肌病的運用

對於其它種類的心肌病造成的心臟衰竭，也有許多的臨床試驗在進行。少數的動物實驗顯示⁵⁷利用胚胎幹細胞也可以改善老鼠模式的擴張型心肌病變（dilated cardiomyopathy）。人體試驗上也有MiHeart trial（Multicenter Randomized Cell Therapy Trial in Cardiopathies）針對心肌梗塞、慢性缺血性心肌病外還包含擴張型心肌病變（dilated cardiomyopathy）與查加斯氏病（Chagas' cardiomyopathy）四大部分，進行測試幹細胞移植效果評估。

六、未來課題

利用幹細胞移植來治療心臟疾病是嶄新又令人引領期盼的近代醫學進展，現今幹細胞移植仍於發展階段，嘗試用不同幹細胞型態、移植方式與移植策略。但依舊面臨許多的問題如心律不整、腫瘤新生、不穩定基因表現甚至無法預期幹細胞於移植後能否分化成我們所需要的組織。成人幹細胞數量較少，並隨年紀增加而遞減，運用上不容易分離與萃取。並需花一段時間培養出一定數量後才能運用，培養期間可能遇到基因突變或表現型改變等問題。再者研究顯示⁵⁸，成人幹細胞之再生能力與細胞著絲點（centromere）長度有關，年紀較大的病患其幹細胞著絲點較短，增生力也不若胚胎幹細胞。而人類胚胎幹細胞目前利用老鼠的纖維母細胞（mice fibroblast）來避免幹細胞的分化，但這樣的設計需擔心老鼠細胞將病原體帶入人體。因此現已著手利用人類的纖維母細胞來穩定人類胚胎幹細胞。

但如何讓注射入的幹細胞於心臟內分生成細胞間質，新生血管，甚至正確的分生成心肌細胞與正確的三度空間排列，都是需克服的難題。若無法在人體內引導幹細胞正確的分化，部分學者已於人體外，將幹細胞於人工合成的三維間質上分生為心臟組織，再考慮利用手術移植回人體作為替代方案。

長遠的安全性也是相當重要的課題，幹細胞為多功細胞，意味著各種分化的可能性。幹細胞移植入心臟後會不會分化成纖維組織，骨骼組織或甚至形成腫瘤呢？初期所帶來的好處，在更長遠的追蹤之後，會不會出現意想不到副作用呢？此外還有許多爭議不斷的問題，如最適當的幹細胞數量未定、幹細胞移植真正的作用機轉、幹細胞移植後能否長期存活、何者才是最佳的幹細胞注射方式以及研發新的移植後幹細胞追蹤方式等，仍有賴更多臨床試驗的投入。雖現有的證據仍在累積中，但現在還有誰敢拍胸保證，受損的心臟不能再生呢？

表一

幹細胞的細胞特性

幹細胞種類	細胞表面標記	優	劣
自體骨髓幹細胞		自體來源無排斥問題、多功細胞	功能未定
血管內皮前驅細胞	VEGFR-2, CD34, CD133	自體來源無排斥問題	來源有限
中胚層幹細胞	CD45-/CD34-/CD133-	自體來源無排斥問題 適合冷凍保存	功能未定，不易細胞培養
骨骼母細胞		自體來源無排斥問題，來源豐富	考量心律不整的風險
心臟幹細胞	SP, c-kit, scal-1, Isl-1, MDR-1	自體來源無排斥問題、心肌細胞表現型	數量少、需透過細胞培養技術
胚胎幹細胞		多能幹細胞具高延展性	需免疫抑制，倫理爭議，可能形成腫瘤，來源有限
胎兒心肌細胞		心肌細胞表現型	需免疫抑制，倫理爭議，細胞存活期短，來源有限
參覽 Michael S. Lee, MD, et al. Stem-Cell Transplantation in Myocardial Infarction: A Status Report. Ann Intern Med 2004;140 (9) :729-37			

表二

幹細胞治療心臟疾病之臨床試驗覽表

研究	對象	人數	合併治療	幹細胞種類	細胞數量 (/mL)	移植方法	追蹤時間	結果
TOPCARE-AMI	急性心肌梗塞	59	PCI	BM MNC CPC	213x10 ⁶ 16 x10 ⁶	冠狀動脈內注射	4月&12月	EF 與移植前相比增加, 但 BMMNC 與 CPC 兩組間無差異
Wollert et al. (BOOST trial)	急性心肌梗塞	30	PCI	BM MMC	24.6x10 ⁸	冠狀動脈內注射	6月&18月	初期 6 月 EF 增加, 但 18 月時 EF 無差異
REPAIR-AMI	急性心肌梗塞	204	PCI	BM MNC	234x10 ⁶	冠狀動脈內注射	12 月	LVEF 增加, 降低死亡率、二次心肌梗塞、與在狹窄率
Janssen et al.	急性心肌梗塞	67	PCI	BM MMC	304x10 ⁶	冠狀動脈內注射	4 月	梗塞區域減少, EF 不變
Perin et al.	缺血性心衰竭	20	無	BM MMC	25x10 ⁶	經心內膜注射	12 月	改善心臟灌流, 運動耐受度與增加 EF。降低心衰竭症狀, 心絞痛以及 ESV
TOPCARE-CHD	缺血性心衰竭	75	無	CPC BM MNC	22x10 ⁶ 205x10 ⁶	冠狀動脈內注射	3 月	只有接受 BM MNC 可使 LVEF 增加
Erbs et al.	慢性血管全阻塞	26	PCI	CPC	69x10 ⁶	冠狀動脈內注射	3 月	降低梗塞範圍, 增加 LVEF, Coronary flow reserve

CPC= circulating progenitor cells, BM MMC= bone marrow mononuclear cell

參覽 Eduard Shantsila, MD, et al. Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders J Am Coll Cardiol 2007;49:741-52

七、參考文獻

1. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. & Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705 (2001).
2. Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Virag, J. I., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A. & Field, L. J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664-668 (2004).
3. Balsam, L. B., Wagers, A. J., Christensen, J. L., Kofidis, T., Weissman, I. L. & Robbins, R. C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-673 (2004).
4. Nygren, J. M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B. K. & Jacobsen, S. E. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 10(5):494-501 (2004).
5. Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D. H., Johnson, K. L., Aikawa, R., Asahara, T. & Losordo, D. W. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 115(2):326-338 (2005).
6. Asahara, T. & Kawamoto, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287(3):C572-579 (2004).
7. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107(8):1164-1169 (2003).
8. Urbich, C. & Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 95(4):343-353 (2004).
9. Losordo, D. W. & Dimmeler, S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 109(22):2692-2697 (2004).
10. Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A. & Finkel, T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 348(7):593-600 (2003).
11. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 89(1):E1-7 (2001).
12. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. & Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 103(5):697-705 (1999).
13. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J. & Kessler, P. D. Human mesenchymal

- stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105(1):93-98 (2002).
14. Bittira, B., Kuang, J. Q., Al-Khalidi, A., Shum-Tim, D. & Chiu, R. C. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg.* 74(4):1154-1159; discussion 1159-1160 (2002).
 15. Shake, J. G., Gruber, P. J., Baumgartner, W. A., Senechal, G., Meyers, J., Redmond, J. M., Pittenger, M. F. & Martin, B. J. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 73(6):1919-1925; discussion 1926 (2002).
 16. Ma, J., Ge, J., Zhang, S., Sun, A., Shen, J., Chen, L., Wang, K. & Zou, Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 100(3):217-223 (2005).
 17. Dowell, J. D., Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Soonpaa, M. H. & Field, L. J. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res.* 58(2):336-350 (2003).
 18. Menasche, P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2(1):21-28 (2004).
 19. Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B. & Anversa, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6):763-776 (2003).
 20. Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L. & Schneider, M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12313-12318 (2003).
 21. Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D. & Garry, D. J. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 265(1):262-275 (2004).
 22. Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L. Z., Cai, C. L., Lu, M. M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X., Evans, S. & Chien, K. R. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433:647-653 (2005).
 23. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156 (1981).
 24. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7634-7638 (1981).
 25. Williams, R. J. Self-assembling surfaces. *Nature* 332:393 (1988).
 26. Solter, D. & Knowles, B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic

- antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(11):5565-5569 (1978).
27. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24(4):372-376 (2000).
 28. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5):643-655 (2003).
 29. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5):631-642 (2003).
 30. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. & Kemler, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 87:27-45 (1985).
 31. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147 (1998).
 32. Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., de la Riviere, A. B., Passier, R. & Tertoolen, L. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107(21):2733-2740 (2003).
 33. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 108(3):407-414 (2001).
 34. Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 22(10):1282-1289 (2004).
 35. Perin, E. C. & Lopez, J. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 3 Suppl 1:S110-113 (2006).
 36. Aicher, A., Brenner, W., Zuhayra, M., Badorff, C., Massoudi, S., Assmus, B., Eckey, T., Henze, E., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 107(16):2134-2139 (2003).
 37. Menasche, P., Hagege, A. A., Vilquin, J. T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., Bruneval, P., Benbunan, M., Marolleau, J. P. & Duboc, D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 41(7):1078-1083 (2003).
 38. Meyer, G. P., Wollert, K. C., Lotz, J., Steffens, J., Lippolt, P., Fichtner, S., Hecker, H., Schaefer, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. & Drexler, H. Intracoronary bone

- marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113(10):1287-1294 (2006).
39. Siminiak, T., Fiszer, D., Jerzykowska, O., Grygielska, B., Rozwadowska, N., Kalmucki, P. & Kurpisz, M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAŃ trial. *Eur Heart J.* 26(12):1188-1195 (2005).
 40. Murry, C. E., Field, L. J. & Menasche, P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 112(20):3174-3183 (2005).
 41. Misao, Y., Takemura, G., Arai, M., Sato, S., Suzuki, K., Miyata, S., Kosai, K., Minatoguchi, S., Fujiwara, T. & Fujiwara, H. Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation. *Cardiovasc Res.* 69(2):476-490 (2006).
 42. Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. & Anversa, P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 346(1):5-15 (2002).
 43. Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G. & Wernet, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106(15):1913-1918 (2002).
 44. Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L. & Lau, C. P. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361(9351):47-49 (2003).
 45. Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M. & Steinhoff, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361(9351):45-46 (2003).
 46. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24):3009-3017 (2002).
 47. Kang, H. J., Kim, H. S., Zhang, S. Y., Park, K. W., Cho, H. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Lee, S. D., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Lee, M. M. & Park, Y. B. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363(9411):751-756 (2004).
 48. Schachinger, V., Assmus, B., Britten, M. B., Honold, J., Lehmann, R., Teupe, C., Abolmaali, N. D., Vogl, T. J., Hofmann, W. K., Martin, H., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 44(8):1690-1699 (2004).
 49. Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C.,

- Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. & Drexler, H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364(9429):141-148 (2004).
50. Janssens, S., Dubois, C., Bogaert, J., Theunissen, K., Deroose, C., Desmet, W., Kalantzi, M., Herbots, L., Sinnaeve, P., Dens, J., Maertens, J., Rademakers, F., Dymarkowski, S., Gheysens, O., Van Cleemput, J., Bormans, G., Nuyts, J., Belmans, A., Mortelmans, L., Boogaerts, M. & Van de Werf, F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367(9505):113-121 (2006).
51. Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Suselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355(12):1210-1221 (2006).
52. Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Suselbeck, T., Werner, N., Haase, J., Neuzner, J., Germing, A., Mark, B., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J.* 27(23):2775-2783 (2006).
53. Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Silva, G. V., Mesquita, C. T., Belem, L., Vaughn, W. K., Rangel, F. O., Assad, J. A., Carvalho, A. C., Branco, R.V., Rossi, M. I., Dohmann, H.J. & Willerson, J. T. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 110(11 Suppl 1):II213-218 (2004).
54. Erbs, S., Linke, A., Adams, V., Lenk, K., Thiele, H., Diederich, K. W., Emmrich, F., Kluge, R., Kendziorra, K., Sabri, O., Schuler, G. & Hambrecht, R. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res.* 97(8):756-762 (2005).
55. Assmus, B., Honold, J., Schachinger, V., Britten, M. B., Fischer-Rasokat, U., Lehmann, R., Teupe, C., Pistorius, K., Martin, H., Abolmaali, N. D., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355(12):1222-1232 (2006).
56. Assmus, B., Fischer-Rasokat, U., Honold, J., Seeger, F. H., Fichtlscherer, S., Tonn, T., Seifried, E., Schachinger, V., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 100(8):1234-1241 (2007).
57. Baba, S., Heike, T., Yoshimoto, M., Umeda, K., Doi, H., Iwasa, T., Lin, X., Matsuoka, S., Komeda, M. & Nakahata, T. Flk1(+) cardiac stem/progenitor cells derived from embryonic

stem cells improve cardiac function in a dilated cardiomyopathy mouse model. *Cardiovasc Res.* (2007).

58. Francki, M. G., Berzonsky, W. A., Ohm, H. W. & Anderson, J. M. Physical location of a HSP70 gene homologue on the centromere of chromosome 1B of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 104(2-3):184-191 (2002).

第七章

再生醫學在牙科疾病之運用

Application of Regenerative Medicine in Dental Disease

陳敏慧

臺灣大學醫學院臨床牙醫研究所

一、前言

再生醫學 (regenerative medicine) 乃藉由細胞、智慧型生醫材料、生物活化分子訊息提供適當的訊息以促進生物有自癒的能力；隨著基因體資訊的發展，幹細胞 (stem cells) 的應用與生物材料的研發，帶來再生醫學極大的發展潛力。以目前的發展，幹細胞已可應用於多種組織的再生了，包括肌肉、軟骨、骨組織、肝臟、心臟、腦神經、肺臟、小腸血液細胞等，牙齒再生更開啟了器官再生的契機。而奈米生物技術 (nanobiotechnology) 的發展亦使得再生醫學有更大的突破。常見的牙科疾病包括齲齒、牙髓病變、牙根斷裂、牙周病、外傷撞擊、牙齒脫落、斷裂不整、缺牙、唾液腺功能不全 (salivary gland hypofunction)、唇顎裂 (cleft lip and cleft palate)、顳顎關節障礙 (temporomandibular joint disorder)、口腔癌 (oral cancer)、三叉神經病變 (trigeminal neuralgia) 等口腔顎顏面疾病 (oral-maxillo-facial diseases)，因此探討再生醫學在牙科疾病的應用，實則探討再生醫學在口腔顎顏面疾病的應用。

二、再生醫學在口腔顎顏面疾病運用之重要性

再生醫學期待在實驗室利用生長因子 (growth factor) 及生物材料支架 (scaffold) 促使細胞得以發展生長為組織或局部器官，以取代或輔助體內因受傷或退化而失去功能的組織或器官。雖然在體外培養細胞已進行多年了，然而針對較複雜的立體組織之培養期能達到類似人體功能的設計乃是近年來才逐漸有的發展趨勢。在此過程中需要許多不同領域的學者參與，包括醫學及生物技術學家，細胞生物學家，分子生物學家，生物材料工程學家，電腦程式設計家，顯微影像處理學家等。此外，各種有利於組織生長及培養的儀器，例如生物反應器等設備的研發皆在再生醫學中扮演著極重要的角色¹。

再生醫學在口腔顎顏面疾病的應用，特別具有挑戰性及重要性，主要原因包括：

1. 口腔顎顏面具有複雜的神經分佈可提供特殊的感覺反應及控制肌肉語言、呼吸、咀嚼及情緒的進行表達。
2. 口腔顎顏面有很多的血管供應可支持高度能量的需求。

3. 口腔顎顏面具有全身最複雜的關節。

4. 口腔顎顏面具有很多獨特的器官及組織：包括唾液腺、舌頭、牙齒及牙周組織。

此外，任何這些組織的重建必需符合美觀的需求，而且由於臉面是表現個人形象最重要的部位，因此，口腔顎顏面組織器官著實是很重要的部位。因此，再生醫學在口腔顎顏面疾病的應用特別具有意義及其重要性²。

三、再生醫學的研究方向

再生醫學乃藉由細胞、智慧型生醫材料、生物活化分子訊息提供適當的訊息以促進生物組織或器官有再生的能力，因此再生醫學結合奈米技術與幹細胞組織再生可括三大方面的研究與應用：(一) **細胞**：包括自體移植 (autograft) / 異體移植 (allograft)，已分化細胞 / 幹細胞 (stem cells) 由局部或全身性注入幹細胞，探討內在幹細胞機制加以活化、控制、全然應用。(二) **智慧型生醫材料**：將生物訊息分子結合在生醫材料上以模擬細胞外基質 (extracellular matrix)，塗佈高分子以促進細胞貼附或控制生長因子以促進組織再生^{3,4}。(三) **生物活化分子訊息**：以奈米技術 (nanotechnology) 探討再生過程的分子作用機轉，發展可適時釋放蛋白質，胜肽 (peptide)，與基因的類似生物訊息之系列裝置，利用最高劑量與釋放機制作成無侵犯性傳輸系統，以探討組織再生。

四、幹細胞的特性與應用

自從 1998 年人體複效性幹細胞 (stem cells) 首度成功地被分離並培養出細胞系 (cell lines)，即引發醫界極大的振奮，其發展帶來醫界治療疾病與預防醫學的新契機，值得更進一步的研究，而其可能引起的道德議題也廣受爭論。

1 全效性及複效性細胞

當精子與卵結合之後，即形成一個具有發育為完整有機體潛力的細胞，此受精卵稱為「全效性的」(totipotent)，在受精之初的一小時，受精卵可分裂為兩個一致的全效性細胞，也就是說，如果將兩個細胞其中任何一個放在子宮內，他們皆有發育成為一個胎兒的能力，事實上，雙胞胎的形成，也就是當兩個全效性細胞彼此分開之後各自形成一個基因一致的獨立個體，而當受精卵在受精之後四天，細胞也經過數次分裂過程之後，這些全效性細胞即開始特化 (specialized)，細胞聚集形成一個中空的囊胚 (blastocyst)，此囊胚的外層細胞群可繼續形成胎盤及胎兒在子宮內發育所需的各種支持性組織，而囊胚的內層細胞最後會形成人體各種組織，雖然內層細胞可以形成人體內各種不同類型的細胞，但是由於這些內層細胞無法形成胎盤或在子宮發育所需的支持組織，所以這些內層細胞並不能形成一個有機體，我們稱這些內層細胞為「複效性的」(pluripotent)——也就是他們可以形成多種類型的細胞但是並非胎兒發育所需要的所有細胞類型。由於其效能並非完全的，他們不是全效性的也非胚胎本身，事實上，如果將一個內層細胞放在子宮內，它並無法形成一個胎兒。

幹細胞乃是具有無限分裂能力，可產生特化細胞的功能，前面所述的囊胚內層細胞即為

複效性幹細胞，這些複效性細胞可進一步特化為多效性幹細胞 (multipotent stem cells) 這些多效性細胞，可再形成具特別功用的細胞，例如血球幹細胞可產生紅血球、白血球及血小板，而皮膚幹細胞則可形成各種類型的皮膚細胞，這些更特化的幹細胞稱為“多效性的”(multipotent)。

多效性幹細胞乃存在於小孩及成人體內，也扮演極重要的角色。以血球幹細胞為例，血球幹細胞存在骨髓腔內，也有少量存在於血液循環中，藉著血球幹細胞我們的血球細胞才能不斷地更新，血球幹細胞對於維持生命是相當重要的。

如前所述，多效性幹細胞可在某些成人組織中發現，事實上，這些幹細胞可補充我們體內逐漸被破壞喪失的細胞，例如前面所提到的血球幹細胞 (hematopoietic stem cells)，多效性幹細胞尚未在所有類型的成人組織都完全被發現，但是在這方面的研究仍不斷在增加中。例如，幹細胞曾被認為不存在於成人神經系統中，但是，目前已有報告顯示神經幹細胞可由大鼠及老鼠的神經系統中成功地被分離出來，而人體的神經幹細胞也已自胎兒組織中被分離出來。此外，一種可能類似神經幹細胞的細胞也已由癲癇患者接受手術移除的腦部組織中被分離出來了。

至於成體幹細胞 (adult stem cells) 是否具有與複效性幹細胞相同的潛力？至今仍少有證據指出在哺乳類中的多效性細胞如血球幹細胞可以改變其變化過程而產生皮膚細胞、肝細胞或任何血球類型以外的細胞。然而，學者由動物實驗中已逐漸對此觀點產生疑問。在動物實驗中，已證實有些成體幹細胞以往被認為是只能專一發育為一種特化細胞，事實上是可發育成他種特化細胞的。例如，在老鼠的研究指出，將神經幹細胞置於骨髓腔裏面，可以產生一些不同類型的血球細胞，此外，以大鼠進行的實驗已證實，在骨髓中的幹細胞可以產生肝細胞，這些令人興奮的發現指出，即使在幹細胞已開始特化的情況下，在某些特殊環境中，幹細胞比原先所想像的更具變通性。

2 多效性幹細胞

在多效性幹細胞的研究指出，這些成體幹細胞具有極大的潛力可以用來進行研究及發展細胞療法⁵。例如，以成體幹細胞進行移植有許多優點，如果能自患者身上分離幹細胞導引其分離及特化，再移植回患者體內，這些細胞應該不會引發排斥作用，再者，以成體幹細胞進行細胞療法必然可減少甚或避免利用取自人體胚胎或胎兒組織的複效性幹細胞所可能造成的道德爭議。

雖然如此，成體幹細胞的應用，在實際上卻有許多的限制。首先，並非體內所有的組織皆已被分離出成體幹細胞。再者，成體幹細胞的存在量極為有限，不易被分離及純化，而且其數量會隨著年齡而遞減。任何試圖以患者自體的幹細胞來進行治療的方法皆需要將幹細胞自患者體內分離出來，進行培養到足夠的量才能進行治療。對於某些緊急的病症，可能沒有太多的時間可以培養足夠的細胞來進行治療。而在某些由於基因缺陷所造成的病症中，基因的問題仍可能存在於患者的幹細胞中，取自這些患者的細胞亦可能不適用於進行移植作用。有證據顯示，取自成體的幹細胞可能沒有像年輕細胞所具有的增殖力，而且成體幹細胞因為歷經日常生活中各種因素的影響，包括日光照射，毒性物質影響及 DNA 一再複製可能產生誤差的種種影響，皆可能使 DNA 有更多不正常的現象，這些潛伏性的缺點皆會限制成體幹細

胞的被應用。

為了確定許多體內特化細胞及組織的來源，以發展新的治療法，針對成體幹細胞發展潛力的研究以及相較於複效性幹細胞的探討是很重要的。幹細胞可針對多數重症提供新的療法，並可被導引分化為特定細胞，促進組織及器官的再生⁶。因此，積極致力於各種相關的研究是必要的。科學家需要找出這些細胞的最佳來源，一旦被認定之後，即可藉以發展新的細胞療法 (cell therapy)，幹細胞系的發展，包括複效性及多效性幹細胞，可運用於促進組織及器官的再生，為發展再生醫學的重要細胞來源。

(a) 骨髓間葉幹細胞

在骨髓中至少有兩種幹細胞一是血球幹細胞，另一是非血球性幹細胞，這些細胞被稱為間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 這些間葉幹細胞已被證實具有分化為骨母細胞 (osteoblasts)、脂肪細胞 (adipocytes)、軟骨細胞 (chondrocytes)、肌肉細胞 (myocytes) 及神經元 (neurons) 等。因此，這些細胞已被認為具有極大潛能可針對疾病進行基因治療法的利器在過去的研究中已發現至少有兩種不同形態的間葉幹細胞；其一是錐型較大的細胞，另一是極小的快速再生細胞。

在典型的細胞治療法中，利用分化細胞進行移植，在臨床及技術上的問題乃在於養殖及擴大這些分化細胞所面臨的問題，再者，在體外分化的細胞經過多次培養以增加他們的數量時，這些細胞會失去他們的顯型⁷⁻¹⁰。在成體中，一種多效性幹細胞可用以維持結締組織包括骨骼、軟骨、肌肉、韌帶及其他組織。這些多效性幹細胞可分化為各種幹細胞系，也就是造骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌細胞，而被統稱為「間葉幹細胞」(MSCs)^{10,11}。

間葉幹細胞 (MSCs) 已成功地自許多種動物包括人體¹²，大鼠^{13,14}、老鼠¹⁵、狗¹⁶、兔子^{17,18}，由於他們多方分化的潛力，間葉幹細胞在細胞治療上佔很重要的地位，而細胞治療主要靠分離出來細胞的移植而修復組織的缺損，由關節軟骨 (articular cartilage) 在受傷害並未穿過軟骨下的骨組織的情形下就不會產生修復的現象，我們可以看出骨髓成份對於關節軟骨修復的重要性^{19,20}，無效的修復乃是由於軟骨自身的修復力不夠加上骨髓的軟骨生成細胞無法達到預期修復的部位。相反地，如果關節軟骨的傷害延伸過軟骨下層硬骨 (subchondral bone)，則修復過程可確保間葉幹細胞可由骨髓轉移到受傷處而進行軟骨分化作用，然而，由動物及人體切片分析，可顯示事實上，組織修復合成的主要是纖維化軟骨 (fibrocartilage) 而不是真正的關節軟骨²¹。

骨髓所得的細胞及骨膜前置細胞都與骨折的修復有關²²，骨折的修復藉著內軟骨骨化作用 (endochondral ossification) 及骨疝的形成需要局部細胞由骨髓間隙移入骨折間縫中，這些細胞分化為軟骨細胞而最終分化為增生軟骨細胞 (hypertrophic chondrocytes) 如果在骨折處有足夠的機械穩定度，將有血管滲入的現象而新形成的軟骨會有內軟骨骨化的作用。這過程會使骨折處有骨化的形成。

為了改進骨與軟骨的修復，各種不同的生物移植法包括利用前置細胞的移植皆已曾被發展。例如，骨軟骨前置細胞已被利用來進行移植，整個骨髓曾被用來治療骨缺損^{23,24}，而軟骨周膜及骨膜曾被用來治療軟骨缺損^{25,26} 製備及分離含有前置細胞的大量培養的骨髓及軟骨周圍細胞都曾用來移植在軟骨缺損部位²⁷⁻²⁹ 而骨髓細胞則被用來移植在骨缺損區¹⁶。再者，

許多研究皆指出生物作用因素如骨形成蛋白質可引導在動物模型中骨區及其他區形成骨，而且，許多研究皆涉及到利用生物作用因素來促進軟骨缺損的修復^{23,30}，雖然這些移植皆曾被報告出來可以促進骨及軟骨的修復，仍有許多有待研究的地方，特別是在軟骨修復方面，有待發展一個臨床上可以應用的治療法。這些治療的基本策略乃是利用間葉幹細胞在移植體之內發生或是對於移植的生物活化因素所產生的軟骨分化作用。然而對於這些細胞的分化及軟骨再生（chondrogenesis）作用，目前的所知仍極少。成功的體外軟骨再生曾鳥類及胚胎哺乳類細胞及細胞系成功地達成，而更多有價值的訊息曾自這些研究被得著³¹⁻³³，然而，直到最近，仍無體外的系統可以促使間葉幹細胞形成軟骨而可用來直接研究分化過程，學者曾提出一個培養系統可以促進兔子的骨髓所得的前置細胞在體外有軟骨分化現象。Johnstone 等人¹⁷也已發現加入組織生長激素（TGF-beta）可促進骨髓所得前置細胞分化為軟骨細胞，人體的間葉幹細胞曾被分離並與非生骨性的人體造纖維細胞混合結果發現在這樣故意將 25-50% 非間葉前置細胞混入之後，並不會造成間葉幹細胞的骨髓骨生成量的明顯影響³⁴，此結果亦使得將來利用間葉幹細胞在臨床應用的可行性提高，因為在移植 100% 的間葉幹細胞必然可能來自體內的結締組織及滲入其他循環系統的一些細胞，這些可能會稀釋原本人體間葉幹細胞的濃度。

間葉幹細胞具有不斷繁殖而不會失去其多效性的能力¹⁰，有兩個不同的策略可以用來達到間葉幹細胞組織修復的作用，第一種方法是利用間葉幹細胞尚未在分化的階段大量培養，在局部特殊環境之下，間葉幹細胞將再分化成適當的細胞系並負擔組織再生（tissue regeneration）的過程。另一種方法是將大量培養的幹細胞可直接在體內導引分化為特定細胞系再進行移植而促進治癒過程。不論要採用何種策略，間葉幹細胞的複製及分化對於規律的充分瞭解是必要的。

近年來，學者對於利用取自骨髓的間葉幹細胞以進行組織的修復有著濃厚的興趣，主要是由於此間葉幹細胞廣泛地存在，很容易取得，而且在進行細胞培養時可大量繁殖。間葉幹細胞可提供修復骨骼肌肉組織所需的細胞來源。建立生物體外模式以研究這些前置細胞（progenitor cells）的分化機制是很必要的。目前申請者的研究已發展出以體外模式使用間葉幹細胞可以成功地具有軟骨再生作用以建立一個可靠而可重覆得著的細胞培養模式。乃是利用人體骨髓幹細胞，將之分層離心後，可取得具有吸附性的細胞，再將此細胞以 trypsin 取下。利用 TGF 及 dexamethasone 使之分化軟骨細胞。利用 Alcian blue 將軟骨特有的多醣蛋白體（proteoglycans）染色法可定量軟骨分化，而特定的 oligonucleotide primers 可用以在 RT-PCR 作用中分辨膠原纖維第一類型、第二類型及第十類型的 mRNAs。

（b） 下顎骨骨髓幹細胞之獨特性與應用性

就胚胎發育的根源而言，口腔顎顏面組織中所含的幹細胞有其特殊性而值得加以利用。由胚胎發育的過程來看，口腔顎顏面是最早發育的部位，其中有許多極具潛力的幹細胞，就連下顎骨的骨髓幹細胞（bone marrow stem cells）的來源也是來自神經脊（neural crest），與其他四肢長骨的骨髓幹細胞來源不同，更具分化潛力，也可導引分化為骨、軟骨、血管、神經細胞。口腔內的每個牙齒皆是一個器官，源自胚胎時期上皮細胞（epithelial cells）與間葉組織（mesenchymal tissue）之互動作用。下顎骨（mandible）的骨髓幹細胞的來源也是

來自神經脊，與其他四肢長骨的骨髓幹細胞來源不同，更具分化潛力，下顎骨骨髓幹細胞具有比一般長骨的骨髓幹細胞更大的潛力，因此利用下顎骨骨髓幹細胞可治療牙周病，促進骨再生，此外亦可導引為軟骨及骨組織。

(1) 利用下顎骨骨髓幹細胞進行下顎骨及顳顎關節重建

口腔顎顏面 (oral-maxillo-facial) 對於一個人的外觀有很大的影響，許多口腔癌患者在接受手術治療後如前所述下顎骨骨髓幹細胞具有相當特殊的潛力，因此學者致力於利用下顎骨骨髓幹細胞放在支架上進行下顎骨的再生，利用雙重細胞導引方式培養，幹細胞分別導引軟骨及骨細胞，則可建立顳顎關節再生 (temporomandibular joint regeneration) 治療顳顎關節受損之患者，同時也可利用幹細胞與生醫材料 (biomaterials) 支架作用下顎骨之重建。研究也指出，癌症之發生可能與癌症幹細胞 (cancer stem cells) 有關。若能找到癌症幹細胞並針對其進行治療將對口腔癌 (oral cancer) 之治療有更大的突破。

(2) 利用下顎骨骨髓幹細胞進行唾液腺再生與神經再生

許多患者因罹患口腔癌接受放射線治療而造成唾液腺功能不全，目前學者積極研究唾液腺再生 (salivary gland regeneration) 之方法，學者正探討利用骨髓幹細胞轉分化 (transdifferentiation) 為唾液腺細胞之可行性。利用下顎骨骨髓幹細胞將來亦可能有助於治療唾液腺功能不全之患者或因口腔癌接受放射治療而唾液腺功能受損者。此外，若能導引下顎骨骨髓幹細胞分化為神經細胞亦可能針對三叉神經病之患者給予治療。

五、利用牙齒幹細胞進行牙齒再生

1 牙齒再生的重要性

牙齒對於個人健康與生活品質具有極大的影響力；因牙周疾病、齲齒、外傷或基因缺陷造成的牙齒缺失，會帶來咀嚼、發音等生理狀態或外型困擾。據調查顯示：一般成人口腔內具有某些牙齒修復體存在者約佔 85%；小於 17 歲者，有缺了一顆或更多顆牙的情形者約佔 7%；而年齡大於 50 歲者，平均缺牙數為 12 顆。目前缺牙患者，一般是接受牙橋或植體 (implant) 治療；儘管牙齒植體 (dental implant) 的材料與相關技術日新月異，若是能發展出生物性的牙齒以取代缺損的牙齒，由患者自身的組織在適當部位長出一個自然牙，應是最完美的取代方式，亦將是臨床治療的新突破。數十年來，學者一直試圖以組織工程方式製造出生物性的牙齒，包括在體內以不同的位置使牙齒生長，或是在體外以牙胚 (tooth bud) 培育牙齒的生長等研究。雖然這種以組織工程方式製造牙齒在多年來一直像是難以實現的夢，然而，由於針對牙齒的發育已有更深的瞭解，加上幹細胞組織再生的發展，使得我們實現牙齒再生 (tooth regeneration) 的夢想得以更接近。近年來陸續有許多牙齒再生的相關研究³⁵⁻⁴⁰。

牙齒遠比一般所見更為複雜，因為牙齒本身乃是一個完整的器官，牙齒的胚胎發育過程及發育的原則與身體許多其他的器官都類似，乃是經由外胚層 (ectoderm) 的胚胎上皮細胞

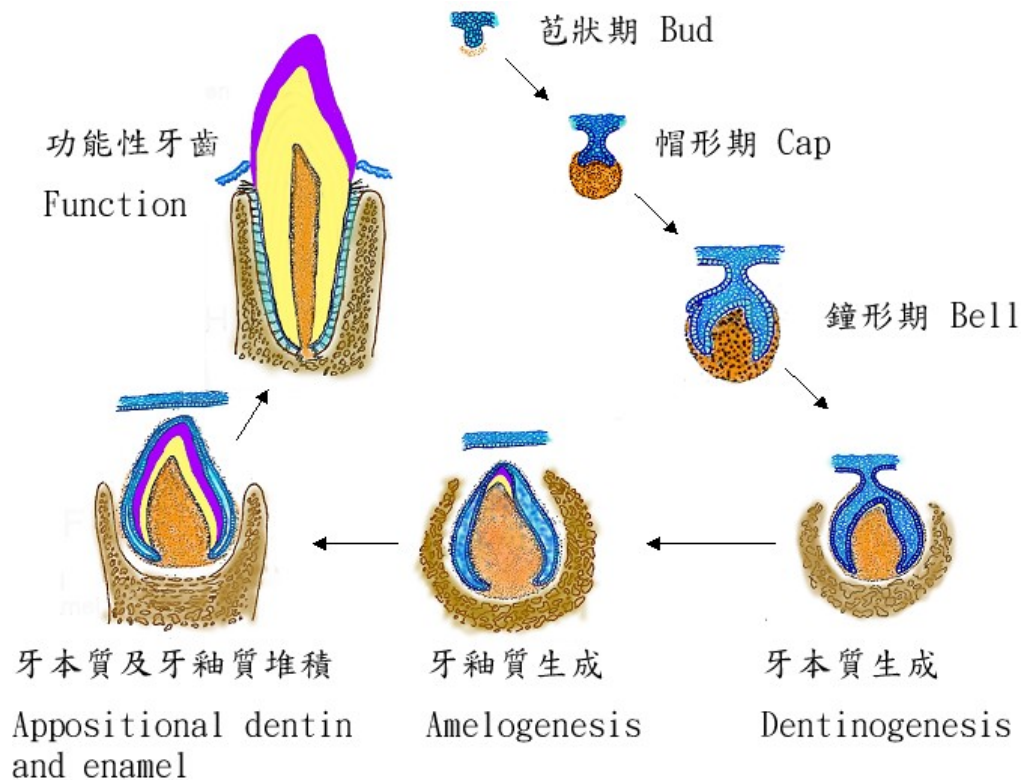
(embryo epithelium) 與中胚層 (mesoderm) 的間葉細胞的交互作用而開始，因此進行牙齒再生的研究，除了解決缺牙的問題之外，其實有另一層更重要的關鍵意義：那就是引領器官再生 (organ regeneration) 跨越新的一步。因為科學家皆已認知，自然界生命成長的過程有其一致性與共通性，而“遵循自然原則”就是最明智的方法，一切有關再生醫學的研究，其實就是在探討自然界生命成長的過程，加以模擬其生長所需之條件，才可能成功；因此，一旦牙齒再生能夠成功即表示其他器官的再生有機會成功。如果組織工程研究者可以製造新的牙齒，則將可躍進而製造更大的器官，而導引醫學治療到再生醫學的新世紀。再者，牙齒的數量多且較易取得，並且不致於立即造成危害生命的情形，因此讓科學家有更多探討與研究的空間，這也是為何牙齒再生成為科學家極感興趣的研究重點，而牙齒再生的相關研究，近年來也有許多的突破與進展。

2 由牙齒發育探討牙齒再生

在卵子受精後第六週，人類胚胎比一英寸還小且幾乎無法辨識形態，但是在其細胞之間已經開始有了對話，同時導引牙齒的形成，此種訊息傳導 (signal transduction) 足以說明為何牙齒及其他器官無法在實驗室的培養皿中完整地生長。事實上，科學家可能永遠無法以人為方式建立相同的情況，然而，我們若愈瞭解這些初期發育的過程，我們將會有更多的機會提供建立器官的重要因子以促進牙齒再生，進而讓自然界完成其他部份。

大部份器官 (例如羽毛器官、毛髮器官、哺乳動物之腺體器官、唾液腺器官、脾臟等) 是藉二種不同的胚胎細胞，包括上皮細胞及間葉細胞相互作用而形成，當然牙齒也不例外，在胚胎時期，口腔上皮細胞 (此將形成口腔的上皮) 會首先釋出訊息給間葉細胞 (此細胞會形成顎骨及軟組織) 導引他們開始形成牙齒，當間葉細胞接到指引的訊息，間葉細胞會傳出訊息回給上皮細胞，這樣來回的交互作用在胚胎牙齒發育過程一直持續進行。最初，未來將形成牙齒的組織只不過是增厚的胚胎上皮細胞而已，接著此上皮組織開始穿到下層的間葉組織而逐漸有不同時期的表現，包括所謂苞狀期 (bud stage)、帽狀期 (cap stage)、鐘形期 (bell stage) (圖一) 等。其外層即形成牙釉質 (enamel) 而內層的間葉組織則形成牙本質 (dentin) 及牙髓 (pulp)，牙骨質 (cementum) 及牙周組織 (periodontal tissue)。一般嬰兒在出生 6~8 週會開始長出牙齒，即使在牙齒開始形成之前，它的形狀即會由其所在位置而決定，有些來自上皮細胞導引牙齒再生的訊息亦同樣會對顎骨的間葉組織的形成基因有導引的作用，已知的有 homeobox 基因群，這些 homeobox 基因乃在胎胚發育期參與決定各種器官的形態與位置，在發育中的人類顎骨不同的 homeobox 基因會在不同部位被啟動，導引不同的牙胚分別變成白齒、小白齒、犬齒及前牙等，例如其中一個 homeobox 基因稱為 Barx1 會被間葉細胞啟動或表現在白齒所會生長的後牙區，在動物實驗中，若在一般會長前牙的部位將間葉細胞故意表現 Barx1 則牙齒即長成白齒的形狀，由於能預測或控制牙齒形態的能力是製造組織再生牙齒的關鍵，科學家即可利用類似 Barx1 這種基因的活性，在實驗室中作初步培養製造牙齒，可當作預測未來牙齒形態的標記。換句話說，我們必須提供正確的訊息，在適當的時候，導引牙齒再生。在牙齒發育過程中所需的各種生長因子及訊息傳導因子皆已陸續被發現，而更有意義的是大部分這些訊息傳導因子 (signal transduction factors) 除了在牙齒發育過程一直扮演重要角色之外，也同時對於其他器官有著極重要的導引作用；瞭解牙齒發育

的訊息傳導因子，也可使我們明白天生顎顏面生長缺損造成牙齒發育不全的因素，進而可以預防治療此缺陷。帽形期含有牙釉質器官（enamel organ）上皮細胞及牙本質間葉細胞，將此二者分離之後若再放在一起，於體外分開培養即可形成牙齒雛型；利用骨髓幹細胞來源作為間葉細胞與牙釉質器官的上皮細胞一起作用亦可發現具有形成牙齒成份的傾向，由此更確認在牙齒再生的可行性。有關牙齒生長時形態決定基因陸續被發現，加上幹細胞以分子技術啟動及利用的方式亦增加牙齒再生的可行性。



圖一：牙齒發育過程

2002年哈佛 Forsyth group Young 等人⁴¹在與人同樣有二列牙齒的豬身上進行牙齒再生的研究，主要取自6個月尚未萌出的牙胚，為了得到混合的牙釉質上皮細胞(enamel epithelial cells)及牙髓間葉細胞(pulp mesenchymal cells)，豬的牙齒乃切成小碎片再用酵素分解；混合的細胞，則置入牙齒形狀的生物可解性材料(biodegradable materials)支架中再將此支架連細胞植入老鼠的腹部繫膜(omentum)處，繫膜在小腸週圍，該處是脂肪組織含有大量血管，此步驟很重要，因為生長發育牙齒組織需要有足夠的血管以提供養分及氧氣供他生長。最初，支架提供細胞支持，之後，支架會裂解而被新的組織所取代，當植入經20—30週後，在原始支架所在的位置，可發現有像牙齒一樣結構的小牙齒形成，可見其形態及組織就像自然成熟的牙冠，他們也包含正常牙的組織而顯示牙釉質、牙本質、牙髓及牙根可在支

架上再生，似乎細胞可知其該有的位置而形成牙釉質與牙齒組織。另一可能的解釋乃是這些排列的細胞只是“剛好”有利於牙齒發育，因此，哈佛 Forsyth group 則以另一個實驗測試，以由老鼠白齒分離的口腔上皮細胞（oral epithelial cells）及間葉細胞進行實驗，這一次細胞在培養皿上生長 6 天再種回老鼠身上，經 12 週後，取出長出的組織檢視，再次可見小牙齒內結構包含牙釉質、牙本質及牙髓組織皆形成在原先的支架中，打破了“無人知道成體顎骨是否可提供訊息供牙齒形成”的疑慮。這些新的結果乃是極令人鼓舞的，因為此證實了細胞可以認識自己且可有牙根的形成，再者細胞再增生之後細胞也不會受影響，也證實了在哺乳動物牙齒再生的可行性，而使在人體進行牙齒再生更有成功的機會。同時，此團隊探討在此實驗中的新牙齒組織，可能不只是由於分散的牙齒細胞會辨識，相反的，在第三白齒的牙胚可能含有隱藏的牙齒幹細胞而可形成新的組織，如果這是事實，這表示新的牙齒幹細胞可能就存在牙齒中而可促進牙齒的再生。

英國劍橋的 Shape 等人⁴²則由胚胎牙齒發育的自然過程去複製牙齒，此方式需要徹底瞭解控制牙齒初期形成的主要原則，以及扮演胚胎口腔上皮及間葉細胞的細胞來源。此團隊主要以老鼠細胞進行實驗，以幹細胞及正常細胞，自胚胎及成體來源以探測不同細胞產生牙齒的可行性。在大部份的情況，此研究群將間葉細胞以離心管聚集成團，此細胞團再置於上皮之下培養數天，而在此組織內的基因活性乃被加以測定以確定牙齒的早期發育，其次，這些牙齒前期細胞乃植入動物體內含血管滋潤的部位，如老鼠的腎臟長約 26 天，在這些過程中，只有在上皮是來自胚胎的來源以及在間葉細胞含有一些幹細胞才会有牙齒的形成，如果由骨髓取得的幹細胞取代口腔間葉細胞，移植的細胞會形成正確的牙齒結構；所以，似乎胚胎間葉細胞可由成人幹細胞所取代而形成新牙；很可惜，許多年來研究顯示，胚胎的上皮細胞含有特殊的訊息，可促牙齒再生在出生後即告消失。Shape group 仍試圖由成人體內找到可取代胚胎上皮細胞的來源，無論如何，由成人幹細胞與胚胎口腔上皮細胞結合所可得到牙齒的結果是很令人興奮的；更有意義的是這些牙齒也與正常老鼠牙齒的大小一致，他們乃是被新骨及結締組織所包圍，且顯示初期牙根形成的現象。第二步乃是要看這些組織在口內亦可形成牙齒，在胚胎的顎骨，軟組織，牙齒及骨頭並未受外界力如咬合力及說話干擾，而在成人顎骨則是很硬而忙碌的地方。無人知道此成人顎骨是否可提供牙齒形成所需的訊息或在胚胎所能給予的環境，為了查證此點，Shape group 由胚胎老鼠取下牙胚再移植入成體老鼠口內，3 週之後，牙齒即在無牙區長出來，有正確的方向及大小並附著在牙槽骨中，且有軟結締組織在其間。顯然，成體口腔可提供牙齒發育的良好環境，這是達到牙齒再生的先決條件之一。

3 牙齒再生的展望

目前臺大研究團隊自迷你豬取得牙胚細胞，經培養後再植入原迷你豬的牙槽骨中，已成功地長出與迷你豬的牙齒一樣大小的牙齒。利用支架亦能再生具有牙本質、牙髓、牙骨質與牙周膜等如同像牙根一樣的結構⁴³。接下來的研究將針對牙胚細胞的特性有更多的鑑定，並且探討牙齒再生過程不同階段中，與周圍牙槽骨組織所發生的各種訊息傳導機制。

相較於其他器官組織工程，牙齒再生的研究在很短的時間內即已得到相當多的進展，整體而言最大的挑戰乃是要找到簡單而快速可控制牙齒發育的方法，另一目標是預測及控制牙

齒的形狀及大小。牙齒再生仍有待更多的研究，包括幾個方向：

- (1) 分離牙胚中牙釉質器官上皮細胞及間葉組織中所含的成體幹細胞並鑑定其特性。
- (2) 找出在牙齒發育階段後期所含的幹細胞。
- (3) 探討成體幹細胞如何對於外界機械作用力及感應化學物質的訊息，而成為具牙齒再生力的細胞。
- (4) 分離並利用成人骨髓幹細胞及牙髓幹細胞中具牙齒再生力之幹細胞。
- (5) 模擬上皮細胞與間葉細胞在牙齒發育中的交互作用，以促進牙齒再生機制。
- (6) 探討適合牙胚細胞生長的生物性支架設計
- (7) 探討牙齒再生過程不同階段中，與周圍牙槽骨組織所發生的各種訊息傳導機制。

4 其它牙齒幹細胞的可能應用性

此外，在牙齒所發現的各種幹細胞，皆有相當大的潛力，目前在牙齒已陸續發現各種不同的幹細胞，包括：乳牙牙髓幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED))⁴⁴，恆牙牙髓幹細胞 (pulp stem cells)⁴⁵，未完全發育牙根尖幹細胞 (stem cells from apical papilla (SCAP))⁴⁶，牙周幹細胞 (periodontal stem cells)⁴⁷ 等。乳牙牙髓幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)) 存在於乳牙牙髓具有相當大的潛力，可被引導分化為骨，軟骨，神經等，在相關的骨再生、神經再生皆有可能應用，因此，目前已有乳牙銀行的產生，以保留脫落的乳牙，可分離乳牙牙髓幹細胞⁴⁴ 作為將來可能的應用，以補足未留下臍帶血的遺憾。在恆牙的牙髓中亦可找到幹細胞並已證實具有轉分化為牙本質母細胞 (odontoblasts)，促進牙本質再生 (dentinogenesis) 的作用，可被應用於治療齲齒，以及作為覆髓 (capping) 細胞治療。研究發現在牙根發育的 2/3 之根尖，具有相當特別的牙根尖幹細胞 (stem cells from apical papilla)，可促進牙根發育、牙本質及牙周的形成，因此可應用於治療牙斷裂或根尖發育不全⁴⁸，如合併牙周幹細胞 (periodontal stem cells) 亦可能治療因車禍撞擊的牙根重植之修護。學者發現利用氫氧磷灰石 (hydroxyapatite) 作用牙根中間管狀，放置牙根尖幹細胞，周圍放置牙周幹細胞植入豬的口內，可形成具牙周膜之牙根，甚至可利用此牙根在其上製造牙冠，不失為缺牙患者的福音。牙周幹細胞可應用於促進牙周之再生，可用於治療牙周病，將來可針對拔下的埋伏智齒的牙周可加以利用。

六、結語

再生醫學利用幹細胞在口腔顎顏面疾病的治療上有相當大的潛力與應用價值，許多的應用仍在研究階段，有待學者更多的努力，以期早日應用於臨床。相信再生醫學所帶來治療方式的革新及效果將是令人興奮而可預期的，其運用將可造福更多的人群。

七、参考文献

1. Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. & Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods Online* **4**:227-230 (2007).
2. Robey, P. G. & Bianco, P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *JADA* **137**:961 (2006).
3. Sitterling, M., Buijs, J., Minuth, W. W., Hammer, C. & Burmester, G. R. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* **15**:451-456 (1994).
4. Sitterling, M., Buijs, J., Rotter, N., Teitzel, D., Minuth, W. W. & Burmester, G. R. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* **17**:237-242 (1996).
5. Baksh, D., Song, L. & Tuan, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **8**(3):301-316 (2004).
6. Tuan, R. S. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, Genevieve Boland and Richard Tuli. *Arthritis Res Ther.* **5**:32-45 (2003).
7. Benayahu, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **71B**:60-62 (1982).
8. Bonaventure, J., Kadhom, N., Cohen-Solal, L., Ng, K. H., Bourguignon, J., Lasselin, C. & Friesinger, P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp. Cell Res.* **212**:97-104 (1994).
9. Bruder, S. P. & Caplan, A. I. Osteogenic cell lineage analysis is facilitated by organ cultures of embryonic chick periosteum. *Dev. Biol.* **141**:319-329 (1990).
10. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**: 641-650 (1991).
11. Silbermann, M., Reddi, A. H., Hand, A. R., Leapman, R., von der Mark, K. & Franzen, A. Chondroid bone arise from Mesenchymal Stem Cells in organ culture of mandibular condyles. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **7**:59-79 (1987).
12. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. & Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**: 81-88 (1992).
13. Dennis, J. E. & Caplan, A. I. Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: effects of pretreatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implant* **19**:106-115 (1993).
14. Dennis, J. E., Haynesworth, S. E., Young, R. G. & Caplan, A. I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously:

- effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* **1**:23-32 (1992).
15. Dennis, J. E. & Caplan, A. I. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-sKb-tsA58 transgenic mouse. *J Cell Physiol* **167**:523-538 (1996).
 16. Kadiyala, S., Jaiswal, N. & Bruder, S. P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissus Eng.* **3**:173-185 (1997).
 17. Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exper. Cell Res.* **238**: 265-272 (1998).
 18. Wakitani, S., Kimura, T., Hirooka, A., Ochi, T., Yoneda, M., Yasui, N., Owaki, H., Ono, K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg [BR]* **71**:74-80 (1989).
 19. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C. & Hunziker, E. B. Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods of facilitation repair. In *Articular cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy, Bristol-Mayers/Zimmer Orthopaedic Symposium*. Ewing, J. W. (ed), New York, Raven Press, 1990, pp19-56.
 20. Hunziker, E. B. & Rosenberg, L. C. Repair of partial thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J. Bone and Joint Surg.* **78-A**:721-733 (1996).
 21. Shapiro, F., Koide, S. & Glimcher, M. J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone and Joint Surg.* **75-A**:532-553 (1993).
 22. O'Driscoll, S. W. & Salter, T. B. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion: An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop.* **208**:131-140 (1986).
 23. Paley, D., Young, M. C., Wiley, A. M., Fornasier, V. L. & Jackson, R. W. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects: An experimental study in rabbits. *Clin. Orthop.* **208**: 300-312 (1986).
 24. Wentz, J. R., Lane, J. M., Burstein, A. H., Justin, R., Klein, R. & Tomin, E. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J. Orthop. Res.* **14**:85-93 (1998).
 25. Coutts, R. D., Woo, S. L., Amiel, D., von Schroder, H. P. & Kwan, M. K. Rib perichondrial autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clin. Orthop.* **275**: 263-273 (1992).
 26. Kreder, H. J., Moran, M., Keeley, F. W. & Salter, R. B. Biologic resurfacing of a major joint

- defect with cryopreserved allogeneic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin. Orthop.* **300**:288-296 (1994).
27. Chu, C. R., Douchis, J. S., Yoshioka, M., Sah, R. L., Coutts, R. D. & Amiel, D. Osteochondral repair using perichondrial cells: A 1-year study in rabbits. *Clin. Orthop.* **340**:220-229 (1997).
 28. Grande, D. A., Southerland, B. S. & Manji, R. Repair of articular defects using mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **1**:345-352 (1995).
 29. Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. & Goldberg, V. M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. bone and Joint Surg.* **76-A**:579-592 (1994).
 30. Otsuka, Y., Mizuta, H., Takagi, K., Iyama, K., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Suzuki, F. & Hiraki, Y. Requirement of fibroblast growth factor signalling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Devel. Growth and Diff.* **39**:143-156 (1997).
 31. Denker, A. E., Nicoll, S. B. & Tuan, R. S. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* **59**:25-34 (1995).
 32. Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. & Aubin, J. E. Continuously growing bipotential and monopotent myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotent RCJ 3.1 clonal cell line. *Devel. Biol.* **142**: 313-318 (1990).
 33. Zimmermann, B. & Cristea, R. P. Dexamethasone induces chondrogenesis in organoid culture of cell mixtures from mouse embryos. *Anat. And Embryol.* **187**:67-73 (1993).
 34. Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Arm, D. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Development. Dynamics* **19**:50-62.45 (2000). Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* **97**(25):13625-13630 (2000).
 35. Rahaman, M. N. & Mao, J. J. Stem Cell-Based Composite Tissue Constructs for Regenerative Medicine. *Biotechnology and Bioengineering* **91**(3):261-284 (2005).
 36. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R. R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology* **21**(4):157-161 (2003).
 37. Mooney, D. J., Powell, C., Piana, J. & Rutherford, B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* **12**(6):865-8 (1996).
 38. Nakashima, M. & Akamine, A. The Application of Tissue Engineering to Regeneration of pulp and Dentin in Endodontics. *J Endodont* **31**(10):311-318 (2005).

39. Nör, J. E. Tooth Regeneration in Operative Dentistry. *Operative Dentistry* **31**(6):633-642 (2006).
40. Young, C. S., Terada, S., Vacanti, J. P., Honda, M., Bartlett, J. D. & Yelick, P. C. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* **81**(10):695-700 (2002).
41. Young, C. S., Abukawa, H., Asrican, R., Ravens, M., Troulis, M., Kaban, L. B., Vacanti, J. & Yelick, P. C. Tissue-Engineered Hybrid Tooth and Bone. *Tissue Engineering* **11**(9/10):1599-1610 (2005).
42. Ohazama, A., Modino, S. A. C., Miletich, I. & Sharpe, P.T. Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth. *J Dent Res.* **83**(7):518-522 (2004).
43. Kuo, T. F., Huang, A. T., Chang, H. H., Lin, F. H., Chen, S. T., Chen, R. S., Chou, C. H., Lin, H. C., Chiang, H. & Chen, M. H. Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2007) (accepted).
44. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. & Shi, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS.* **100**(10):5807–5812 (2003).
45. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS.* **97**(25):13625-13630 (2000).
46. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C. Y., Wang, S. & Shi, S. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE* **1**(1): e79 (2006).
47. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**:149–55 (2004).
48. Banchs, F. & Trope, M. Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? *Endodont* **30**(4):196-200 (2004).

第八章

再生醫學在角膜疾病之運用

Regenerative Medicine in the Treatment of Corneal Diseases

王一中¹ 葉龍坤² 蔡瑞芳³

¹臺大醫院眼科部 ²長庚紀念醫院眼科部 ³臺北醫學大學醫學研究所

一、前言

過去幾個世紀的發明如抗生素、疫苗或抗體的發現等，深深改變人類生命及健康，然而近幾年來醫學的發展遠超越了過去幾個世紀的成果，其中最重要的突破如複製羊桃莉的誕生、胚胎幹細胞培養、基因圖譜的解碼定序、基因治療及幹細胞的研究等。這些發展帶給了人類前所未有革命性變革，人類的不良基因，將可以被置換改良，人類的器官也將可以複製或替換甚至可以產生複製人，整個人類傳統架構將被改變，有好處，也有其壞處。但這些將不再是科幻電影裏的虛構情節，而是即將成為事實。再生醫學是以自體或異體幹細胞為來源，用於治療、修補、或再生體內受傷之細胞或組織，也是另一個新興學門。由於很多重要的新技術發展出來及老年族群的逐漸增加，再生醫學勢必為二十一世紀醫療工程的主流，本章節將再生醫學在角膜疾病之應用扼要闡釋以提供未來發展的初貌。

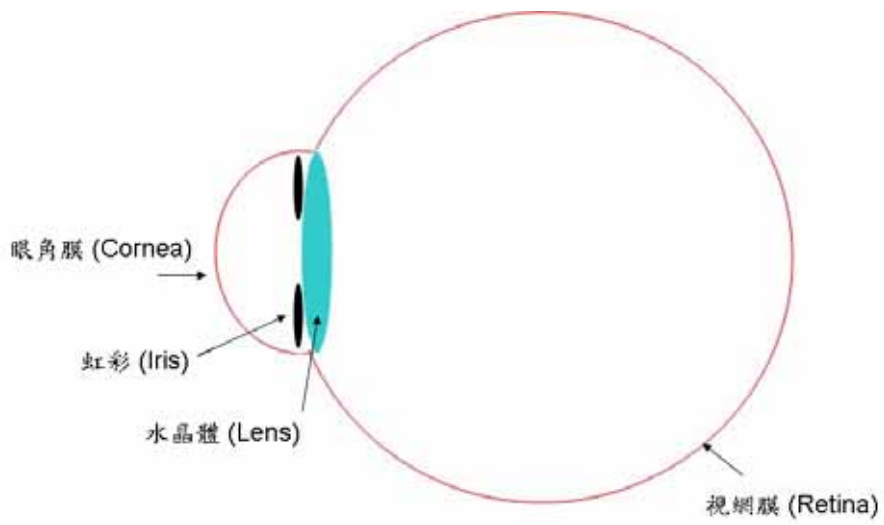
二、眼角膜結構

1. 基本觀念

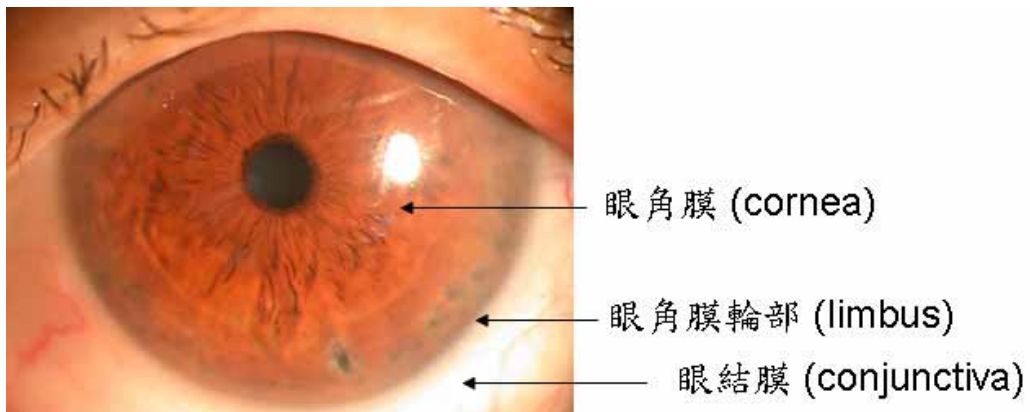
眼睛的構造好比一部照相機（圖一），角膜就像是相機的鏡頭，虹膜像是光圈，視網膜、視神經就像底片，要有正常的眼睛結構，才会有好的視覺品質。正常的角膜就像玻璃一樣的透明清澈（圖二），除了讓光線容易通過進入眼睛，它還具有強大的聚焦功能，使影像能夠會聚在視網膜上。角膜由上皮細胞層（epithelium）、包曼氏層（Bowman membrane）、基質層（stroma）、德斯密氏膜（Descemet's membrane）和內皮細胞層（endothelium）所組成（圖三）。

角膜上皮層約有五至六層細胞所構成，若上皮細胞層損傷後，可以由輪部（limbus）幹細胞增生分化而再生更新，但是包曼氏層（Bowman membrane）受損後不能再生，基質層佔角膜厚度約 9/10 由膠原纖維規則排列及基質細胞所構成，當受損後由癒痕組織修復。德斯密氏膜損傷後，可以由內皮細胞分泌再生，然而單層的內皮細胞層在正常生理情

況下不能再生且細胞密度隨年齡增長而減少。

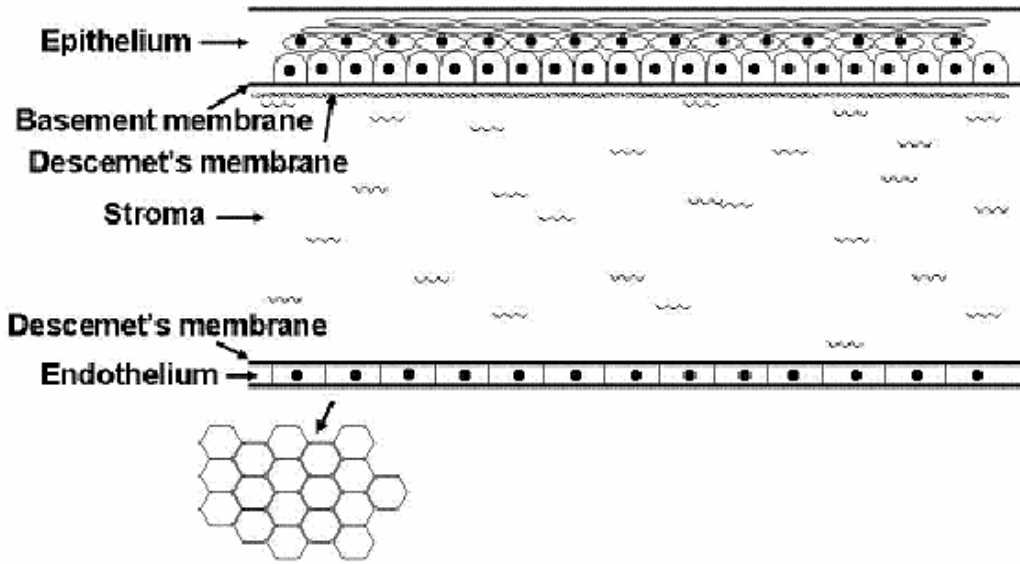


圖一、眼睛縱切面結構圖

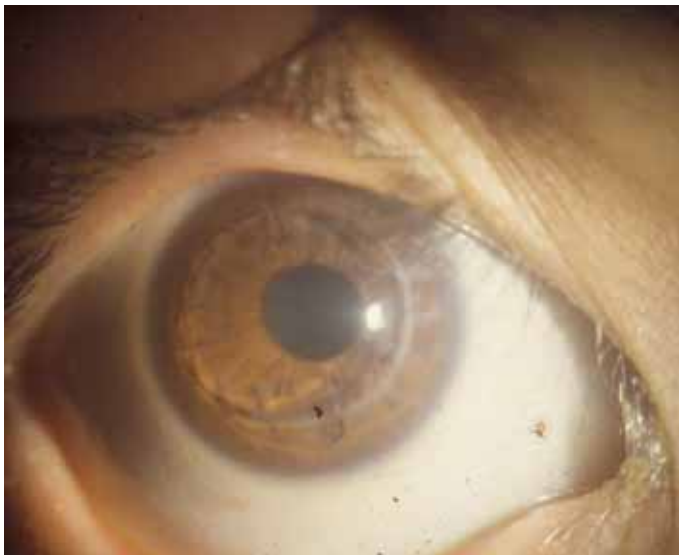


圖二、外眼部

角膜組織



圖三、角膜組織



圖四、角膜移植

角膜透明度取決於角膜上皮細胞層完整、角膜基質內之膠原纖維排列整齊、內皮細胞的功能正常來維持基質內水份含量平衡和角膜沒有新生血管。當角膜因為先天的異常、後天的外傷、化學性灼傷、角膜潰瘍感染、或其他的病變如角膜白斑、角膜斑翳、圓錐角膜、青光眼或人工水晶體手術後引起之水泡性角膜症、角膜失養症等而變得混濁時，眼科醫師運用精細手術技巧，以捐贈者之眼角膜更換受損或功能不良的角膜組織，達到增進及恢復視力之目的，這就是傳統所稱的角膜移植手術（圖四）。然而角膜移植手術須要有捐贈來源，來源有限且必須等候，曠日廢時，因此以幹細胞研究應用的再生醫學成為另一重要的研究方向。

2. 幹細胞

一般而言，幹細胞為同源細胞（cell lineage）的源頭具有自我更生（self-renewal）及多元性分化（multipotent）能力的細胞，並可分化成不同種類的組織和器官。他們的分裂可以是對稱性的，以擴充本身的數目；也可以是非對稱性的，一方面自我更新，一方面繁衍成較具分化性的後代¹。當受精卵發育成囊胚（blastocyst）時，我們可以在內細胞群（inner cell mass）中發現全效幹細胞（totipotent SC，也就是胚胎幹細胞）的存在。當胚胎產生囊胚（gastrulation）時，胚胎幹細胞會發育成外胚層細胞、中胚層細胞及內胚層細胞。而這些細胞之後會各自發育成熟為具有特異性的各組織及器官成人幹細胞。它們也將負擔起後續之組織器官的修補工作²。幹細胞之運用，最大的挑戰就是如何使培養的細胞形成有功能性的組織。早期研究試著用各種生長激素與特殊的營養成份來迫使這些細胞形成有功能性的組織，後來才發現這些細胞之所以不分化，主要是因為它們被培養在如地獄般的環境之中，它們連存活都很難了，更遑論分化了。故只要能將細胞培養在適當環境之中，它們就會自行分化成有功能的組織。現今研究的目標是希望能利用源於成人組織中的幹細胞完成自體移植（autologous graft），進而尋找一種穩定且通用性及普遍性高的幹細胞來作為捐贈細胞（donor cells）的選擇²。同時也要避免全能分化（totipotency）的細胞分化成不希望看到的結果，如：腦中出現肌肉細胞、變形成癌細胞（teratocarcinomas）、或在器官中出現「同源器官」（心臟中出現神經管）²。實行自體移植也許較適合於因外傷造成的組織缺損，而不適合應用於基因性疾病。因為幹細胞中也已包藏了造成缺損的因子²。

3. 成人幹細胞

胚胎幹細胞在胚胎初期，可發展具有特異性的各組織及器官成人幹細胞，他們不只形成各種器官和織，也將負擔起後續之組織器官的修補工作為成人幹細胞。而成人幹細胞可以更進一步往分化成特定功能的細胞方向走。成人幹細胞主要分為：特定組織幹細胞（tissue-specific stem cell）。如：眼睛輪部幹細胞、造血幹細胞、神經幹細胞、肝臟幹細胞、骨骼肌幹細胞、皮膚幹細胞等。另一類為非特定組織幹細胞（non tissue-specific stem cell）。成人幹細胞有以下的特質：（1）可塑性（plasticity）（2）漫遊性（traveling）（3）可逆性（reversible）（4）變異性（flexible）（5）漸減永生性（graded propensity）

以往的觀念認為只有胚胎幹細胞才有複效性 (pluripotent)³ 及可塑性的特質，而成人幹細胞的分化及再生能力是有限的，且侷限於少數細胞才有，如：肝臟細胞的再生、放射治療後的血球幹細胞再生、肌肉衛星細胞 (satellite cells) 受傷後的修補以及使眼角膜表皮細胞不斷更新的角膜輪部 (limbus) 幹細胞等。幹細胞在生物體內，可反覆分裂，但也可處於相對靜止的狀態，如人類角膜內皮細胞和人類腦部的幹細胞。然而，目前研究顯示骨髓幹細胞不只能再生血球細胞，更能提供肌肉、腦、心臟血管等細胞新生⁵⁻¹²。當健康鼠的骨髓幹細胞打入被放射線照射之鼠體中，鼠體內的肝臟、肌肉、心臟及神經細胞皆呈現健康鼠的基因型 (genotype)。因此成人幹細胞在所謂幹細胞的高速公路 (stem cell highway) 中循環移動著，何時下交流道？何時回到原來細胞的形態？何時變為分化的細胞，全取決於返回訊息 (homing signals)¹³ 及生長因子 (growth factors)。而幹細胞的功能變異和再塑造是受周遭環境如細胞外部基質 (extracellular matrix) 的影響¹⁴。而上述的趨動因子會因目標器官、組織受傷程度及幹細胞本身而有所不同。而且幹細胞是可以朝相反方向分化的¹⁵。成人幹細胞在某種特定的微觀環境 (microenvironment) 下，具有可強化恢復 (recruitable) 且有漸減性 (decreasing) 特質，而非全有全無的閾值。轉型時要有沈寂基因 (silent gene) 被表現。當此細胞移入器官中，其形態上跟原器官細胞是無法區分的，功能也隨之改變，例如：心臟細胞應有的同步收縮功能，神經細胞應有的訊息傳遞功能。

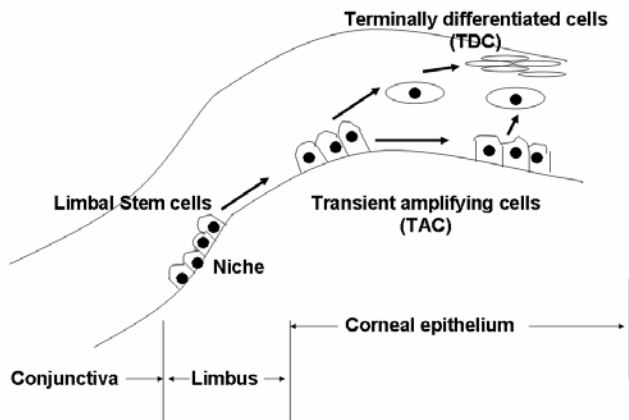
成人幹細胞背負著持續維持體內的恆定、修補損害的重大責任。目前研究的瓶頸在於雖然有成人幹細胞存在的證據，然而無幹細胞標記 (marker) 來確定其存在。且幹細胞的分化特性如何保持，且保持在何種階段？尚未完全清楚。如何喚醒驅動基因，促使細胞間的分化轉變，也是一項重要的議題。

4. 幹細胞在眼角膜之運用

A. 角膜幹細胞 (corneal epithelial stem cells)

角膜幹細胞位於角膜輪部組織 (limbus) 其位置有一定且很特別的微觀環境 (microenvironment) 或稱利基 (niche)，當此微觀環境不存在或被破壞時，角膜幹細胞的存在將面臨威脅。幹細胞分裂時，若有適當的微觀環境，則二個子細胞中的一個可以維持幹細胞的地位及特性，另一個子細胞則變成源祖細胞 (progenitor cell) 或暫時增殖細胞 (transient amplified cells, TAC) 這些細胞能自行更生數代，然後再變成分化的角膜上皮細胞 (terminal differentiated cells, TDC)，若環境不適當，則沒有幹細胞被保存，且均變成源祖細胞或暫時增殖細胞，再分化為分化細胞，故微觀環境對幹細胞的體外培養及擴展相當重要。

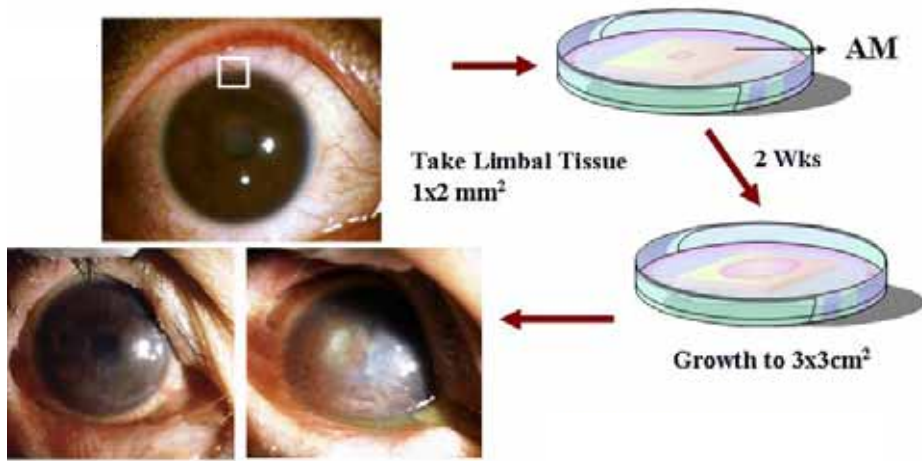
角膜輪部幹細胞與上皮細胞



圖五、角膜輪部幹細胞與上皮組織

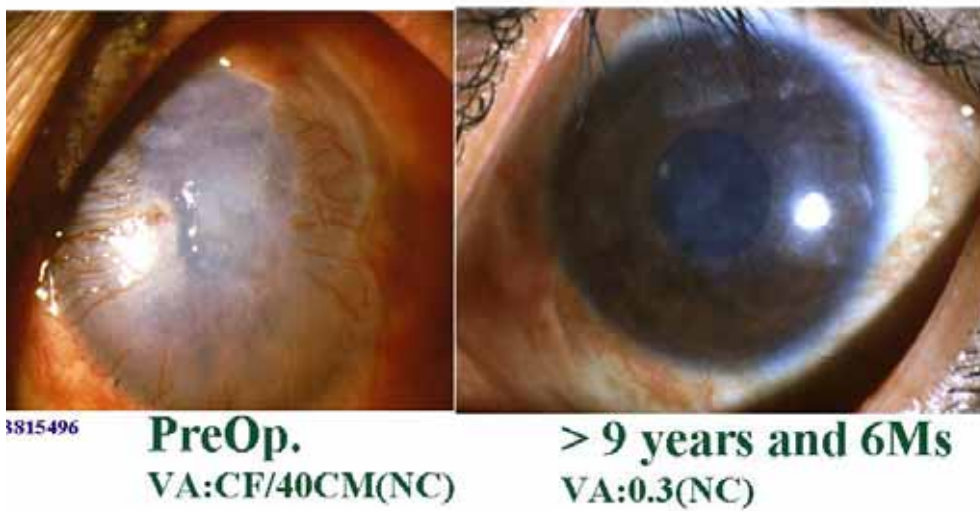
成人幹細胞的體外培養擴展再移植入體內以達到組織重建的治療目的，在目前，臨床上，可實際應用的例子除了造血細胞外，就算是角膜緣（或輪部）幹細胞（limbal stem cells）。研究顯示成功利用體外角膜幹細胞培養，獲得成人的角膜緣幹細胞（adult limbal stem cells），並用於角膜受化學灼傷時的再生重建¹⁶。將這些培養出來的角膜細胞移植到角膜緣幹細胞缺損的角膜上，則可再生出透明的角膜層。2000年蔡瑞芳教授研究出以角膜緣（輪部）幹細胞體外擴展及移植應用於受傷的眼表層重建（*ex vivo* limbal stem cell expansion for ocular surface reconstruction）（圖五），利用羊膜做為角膜緣（或輪部）幹細胞培養的基質，羊膜具有促進生長，減少結疤反應，及含數種的生長因子或細胞素（cytokines）等優點。角膜緣（或輪部）幹細胞的來源，可從病患的好的一眼之上輪部區（若病人只有單眼病變）或從捐贈角膜的輪部區取得幹細胞。將含幹細胞的角膜緣或輪部組織約1毫米×2毫米（mm）的大小，放在經過特殊處理的羊膜上培養。經2~3星期，將可培養成長約1~1.5公分（cm）直徑大小的細胞，經分析顯示，含有大量的幹細胞或源祖細胞在所培養的細胞群中。再將其移植到受傷的角膜表層。約一個月的光景，將使原已混濁的角膜恢復透明及視力¹⁶。若自體移植則病人成功率為100%，已追蹤有十年以上，若異體移植者，則成功率為60%，且需長期服用抗排斥的藥物。

病例一



病例二

st c



圖六、角膜緣（輪部）幹細胞體外擴展及移植應用

B. 角膜基質層細胞 (corneal stromal keratocyte)

2005 年 Funderburgh 等人發現一部分之角膜基質層細胞具有很多成人幹細胞具有的 ABCG2 之標記並且具有多元性分化能力，可見角膜基質層細胞應該有幹細胞之存在¹⁷。另外由 Winstin Kao et al. 發現把具有綠螢光 (GFP) 之骨髓幹細胞注射進入需要骨髓移植的小鼠在角膜基質層細胞會出現綠螢光細胞且表現 keratocan 蛋白也顯示出骨髓幹細胞有可能分化成角膜基質層細胞 (unpublished data)。

C. 角膜內皮細胞 (corneal endothelium)

傳統上，角膜內皮細胞被認定無法進行複製及更新¹⁸⁻²³，然而 Joyce 在 2004 年發現內皮細胞之分裂與年紀有關，而且內皮細胞密度也分布不均 (Daus et al., 1984; Amann et al, 2003)^{24,25} 且終端酶的活性在內皮細胞外圍近輪部區域較高 (Whikehart et al., 2005)²⁶，內皮細胞外圍近輪部區域 BrdU 的活性會因受傷而增加 (Whikehart et al., 2005)²⁶，Joyce et al 在 2002 年也發現 TGF- β 2 可使角膜內皮細胞保持不分裂增生之狀態。種種跡象顯示角膜內皮細胞 (corneal endothelium) 之幹細胞是存在的，所以近幾年來朝向內皮細胞幹細胞之研究也越來越多，如何培養出具有功能且維持有分裂能力之角膜內皮細胞是一項重要方向。

D. 其他眼表層重建之發展

自體口腔黏膜上皮細胞 (autologous oral mucosal epithelium) 的培養與在不同載體上之擴展後進行的眼表層重建也是一項重要進展。2004 Nishida 等人成功的以自體口腔黏膜上皮細胞培養在可溫度感應分離之薄膜上形成上皮細胞層來進行眼表層重建手術²⁷。雖然對於口腔黏膜上皮細胞是否具有幹細胞以及其與角膜幹細胞之相關性還不清楚，但最大的優點在於免除異體移植所引發之排斥反應。除此之外，對於胚胎幹細胞和骨髓幹細胞也被拿來研究作體外培養擴展 (以不同之載體或不同之培養條件及配方) 形成細胞層 (sheets) 再移植入體內以達到組織重建的治療目的。

三、結語

醫學的進化，帶來了文明，增進人類的健康及壽命。然而也帶來了莫大的隱憂，胚胎幹細胞及細胞核轉殖所帶來的前所未見的魔力或神奇能力，可能顛覆過去傳統的倫理制度，是將來的醫療主流之一，除了商品化、臨床化外，最大的問題是品質的控管及基因突變，如治療性細胞株培植 (therapeutic cloning) 在遺傳基因及發育上面臨以下問題：(1) 細胞於體外分裂擴充並分化時發生基因突變，(2) 重大的染色體異常，無法藉由生物體自發性的篩選機制淘汰，以致不正常的細胞生長，而有癌細胞或其他疾病發生的可能。此外，如何將培植的各種不同組織 (角膜上皮細胞、基質細胞、內皮細胞)，再整合成一具功能性的角膜器官，是另一挑戰。

四、参考文献

1. Kooy, D. & Weiss, S. Why stem cells? *Science* **287**:1439-1441 (2000).
2. Snyder, E. Y. & Vescovi, A. L. The possibilities/perplexities of stem cells. *Nature Biotechnology* **18**:827-828 (2000).
3. Dewey, M. J., Martin, D. W. Jr., Martin, G. R. & Mintz, B. Mosaic Mice with Teratocarcinoma-Derived Mutant Cells Deficient in Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5564-5568 (1977).
4. Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**:829-841 (2001).
5. Ferrari, G., Cusella-De, A. G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**:1528-1530 (1998).
6. Bittner, R. E. C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A. & Wachtler, F. *Anat. Embryol.* **199**:391-396 (1999).
7. Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. & Blau, H. M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**:1775-1779 (2000).
8. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. & Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* **6**:1229-1234 (2000).
9. Mezey, E., Chandross, K., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**:1672-1674 (2000).
10. Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, N. C. & Vescovi, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**:534-537(1999).
11. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. & Mulligan, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**:390-394 (1999).
12. Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. & Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* **107**:1395-1402 (2001).
13. Butcher, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**:1033-1036 (1991).
14. Hay, E. D. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay, E. D. (ed.), New York: Plenum Press, pp.

419~462, 1991.

15. Blau, H. M. Differentiation requires continuous active control. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 1213-1230 (1992).
16. Tsai, R. J. F., Chen, J. K. & Li, L. M. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *The New England Journal of Medicine.* **343**:86-93 (2000).
17. Du, Y., Funderburgh, M. L., Mann, M. M., SundarRaj, N. & Funderburgh, J. L. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* **23**:1266-1275 (2005).
18. Joyce, N. C., Harris, D. L., Mello, D. M. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**:2152-9 (2002).
19. Blake, D. A., Yu, H., Young, D. L. & Caldwell, D. R. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **38**:1119-29 (1997).
20. Wilson, S. E., Weng, J., Blair, S., He, Y. G. & Lloyd, S. Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high-proliferative capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **36**:32-40 (1995).
21. Wilson, S. E., Lloyd, S. A., He, Y. G. & McCash, C.S. Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **34**:2112-23 (1993).
22. Engelmann, K., Bohnke, M. & Friedl, P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **29**:1656-62 (1988).
23. Baum, J. L., Niedra, R., Davis, C. & Yue, B. Y. Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol.* **97**:1136-40 (1979).
24. Daus, W., Volcker, H. E., Meysen, H. & Bundschuh, W. Vital staining of the corneal endothelium—increased possibilities of diagnosis. *Fortschr Ophthalmol.* **86**:259-64 (1989).
25. Amann, J., Holley, G. P., Lee, S. B. & Edelhauser, H. F. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol.* **135**:584-90 (2003).
26. Paull, A. C. & Whikehart, D. R. Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human corneal endothelial cells. *Mol Vis.* **11**:328-34 (2005).
27. Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Asachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T. & Tano, Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England Journal of Medicine.* **351**:1187-96 (2004).

第九章

再生醫學在皮膚疾病之運用

Regenerative medicine in skin diseases

林頌然^{1,2} 詹智傑^{1,2} 許致榮²

¹臺灣大學醫學 工程研究所 ²臺灣大學醫學院皮膚科暨臺大醫院皮膚部

一、前言

皮膚是人體最大的器官，一方面作為身體內部與外界環境的阻隔，一方面也是身體與外界環境接觸最重要的媒介。完整的皮膚是維持體內恆定不可或缺的要素。在某些情形下，例如外傷、燒燙傷或慢性潰瘍，都會造成皮膚缺損，不僅對於身體恆定性維持會造成不良影響，也容易引起皮膚甚至全身性的感染。此外，皮膚的顏色及毛髮，雖然對人體健康並無直接影響，但有些疾病造成膚色的脫失或毛囊的破壞，但對於美觀、社交及心理，會造成極大的影響。皮膚缺損，除身體自行修復缺損的能力外，目前組織工程學已經發展出多種與皮膚再生相關的材料，可供作皮膚缺損時修復的橋樑。而對於色素及毛髮的缺失，也發展出各式的再生療法。本章節主要介紹目前再生醫學在皮膚缺損、色素脫失及毛囊再生的進展。

二、皮膚結構與生理功能

1. 皮膚構造

皮膚主要分成三層，由外至內分別是：表皮、真皮及皮下組織。另外尚有數種皮膚附屬器 (skin appendage)

- **表皮層 (epidermis)**: 表皮層的主要構成細胞是角質細胞 (keratinocyte) 及具有分裂能力的基底細胞 (basal cell)。位於表皮真皮交界處的基底細胞經由不斷分裂增殖，成為角質細胞後，層層往皮膚上方堆疊推出，最後形成扁平的細胞並脫去細胞核，而成為皮膚的最外層—富含角質蛋白的角化細胞 (corneocyte)，最後逐漸脫落。如此過程不斷進行，一般來說，大約四週的時間，人體的皮膚角質細胞會整個換過一輪。此外，黑色素細胞 (melanocyte) 則位於表皮的基底層，其製造的黑色素 (melanin) 位於細胞內的黑色素小體 (melanosome) 內，黑色素細胞將製造出的黑色素小體透過與鄰近角質細胞的接觸，將黑色素小體送入角質細胞內。黑色素小體在角質細胞內的數量及分佈的情形，會影響人的膚色。此外，若黑色素細胞無法將製造出的黑色素小體送入鄰近的角質細胞時，也會造成

皮膚變淡。

- **真皮層 (dermis)**：真皮層介於表皮及皮下組織中間，裡面富含著具有支持能力的細胞間質及纖維。真皮層裡有許多的微血管和神經分佈，可以提供表皮層營養，而真皮層裡面含量豐富的彈力蛋白及膠原纖維，則是提供支撐皮膚的重要成分。
- **皮下組織 (subcutaneous tissue)**：皮下組織是由大量的脂肪細胞聚集而成，內含許多較大的血管，供應整層皮膚的營養。
- **皮膚的附屬器官 (skin appendages)**：皮膚的附屬器官包括由外胚層或表皮，向下發育而成的外胚層器官 (ectodermal organ)，例如毛囊 (hair follicle)、汗腺及指甲。

2. 皮膚的生理功能

皮膚的三層分別有不同的功能。最外層的表皮層，首要的功能就是隔絕外界的環境，包括陽光、微生物、外力等刺激，都在表皮這一層被擋了下來。此外，表皮的最重要功能，就是防止水分散失，以維持體內恆定環境。人體內許多的作用及反應必須在水溶液的環境中進行，例如養分交換、內分泌激素的運輸等等，人體之所以能保持高含水量，必須要感謝防止水分散失的表皮，特別是最上層的角質層。而黑色素則可以吸收外光線，保護皮膚，減少紫外光的傷害。

真皮層裡豐富的膠原蛋白及彈性蛋白，對於皮膚收到外力扭曲壓迫時，具有回復原狀的能力。除了支撐表皮，下接皮下組織外，真皮層裡面的纖維母細胞 (fibroblast) 是皮膚受傷時重要的修復細胞。而真皮層內豐富的微血管分佈，可以在皮膚受到傷害時，適時地帶來發炎細胞。這些血管也會經由擴張或收縮，來達到調解體溫的功能。

皮下組織裡厚厚的脂肪細胞，旁邊常圍著纖維隔板 (fibrous septum) 而形成一區區的脂肪小球，這樣的結構具有很好的緩衝功能，而且保溫的能力特佳。

3. 皮膚受傷及其反應

人體皮膚佔了相當大的表面積，與環境接觸的機會非常的多，自然容易因為各種不同的刺激或傷害而受傷。皮膚受傷後，缺損的修復能力與受傷的深度及面積有關。

- **受傷的深度：**

一般來說，如果受傷只侷限於表皮層，靠著基底層細胞不斷的分裂上推，終究會回復到原始的面貌，通常是不會留下疤痕的。如果傷害到真皮層，在修復的過程中，會因為纖維母細胞修復傷口所帶來的膠原蛋白堆積，無法像正常真皮分佈，而形成疤痕組織。如果受傷的程度深及皮下組織，由於內含整層皮膚的營養血管，當血管供應出了問題，會造成整層皮膚壞死，形成焦痂 (eschar)，完全失去障壁皮膚的功能。

- **受傷的面積：**

前面提及不同深度的皮膚受傷，影響的程度各有不同。不過如果受傷僅僅侷限在很小的範圍內（如切割傷），不管是淺層傷或深層傷，通常都可以靠鄰近血管供應養分與發炎細胞，很快地癒合。然而，如果是大面積的受傷所造成的皮膚缺損，常常比深度影響來的大。舉例來說，大面積的燒燙傷，不管是造成淺層皮膚缺損或是深層皮膚缺損，都容易因為皮膚失去保水功能，而散失水分，加上大量組織液溢出使得電解質不平衡，影響體內恆定系統。此時如果沒有及時給予補充水分、電解質及必要的養分，並及時修正皮膚缺損所帶來的問題，患者便容易有生命的危險^{1,2}。

三、再生醫學在皮膚疾病治療之現況

1. 組織工程與人造皮膚

當皮膚受傷時，原本所具有的保護功能消失了，影響所及可以是全身的。因此在皮膚受傷後，特別是遇到大範圍的燒燙傷個案時，及時重建一個具有保護能力的皮膚變得非常重要。這樣的觀念在很久以前就已經建立，因此過去數十年裡面，已經有許多醫師及科學家嘗試以各種不同的動物皮膚，當作人體大面積皮膚缺損時的替代物。這些動物的皮膚，同樣具有表皮真皮的分化，也具有保護及隔絕的功能，只不過當它們被用在人體皮膚缺損的部位時，常常因為生物相容性（biocompatibility）不符，而引起人體更強烈的免疫反應，還沒來得及幫忙皮膚建立一個修復的堡壘，就已經又帶出了一個戰場了。

為了解決這個困境，許多醫師及生物科學家們嘗試著往人造組織或器官（artificial tissue or organ）去發展。在70年代，表皮細胞成功地在體外培養^{3,4}。自此以後，就開始了以活細胞為基礎，借助於組織工程學（tissue engineering）的技術，逐漸發展出具有潛力的人造皮膚（artificial skin）⁵⁻⁸。

所謂的組織工程，簡單地說，就是透過生物技術，把某些細胞經過處理及培養，在適當的環境下，形成一個具有功能的組織或器官。在形成了有功能的組織之後，可移入個體內需要的位置，去「幫忙」或「取代」原有組織或器官的功能。

組織工程的設計原理，主要由三個部分構成，分別是：細胞（cell）、細胞支架（scaffold）、生長因子（growth factor）。細胞在合適的支架結構物上，透過生長因子的調控，逐漸發展出具有功能性的組織或器官，成為一個有用的組織替代品。

2. 皮膚組織工程與再生醫學

組織工程與再生醫學是息息相關的。再生醫學在觀念上，應用較為廣泛，包括了組織工程、基因療法、生醫材料等等。在皮膚再生醫學這個領域裡，利用組織工程所研發出來的人造皮膚，便是目前用來治療皮膚缺損時，最有發展潛力的一門學問。

前面提到，利用組織工程的技術，可以在體外做出組織替代物。在皮膚醫學的領域，最有名的，莫過於是「人造皮膚」的發展。有鑑於大面積皮膚缺損的病患（燒燙傷、靜

脈鬱積性下肢潰瘍、糖尿病足慢性潰瘍等)，常需要及時的皮膚障壁以避免進一步的水分散失跟電解質失調，人工皮膚便提供了相當好的橋樑。目前最有名的人造皮膚，就是已經通過美國食品藥物管理局（FDA, Food and Drug Administration）核可上市，可用於皮膚缺損患者身上的組織工程人造皮：Apligraf⁹。

Apligraf 是一個具有雙層結構的人造皮膚，由表皮跟真皮構成。製作的方法是將人類真皮的纖維母細胞，培養在牛的膠原蛋白基質（collagen matrix）中，逐漸長成類似人類真皮層的構造後，加上由人類新生兒的包皮所取下的角質細胞，長在此人工真皮層上變成表皮，形成一個雙層結構。這樣的雙層結構很類似人類的表皮真皮構造，當 Apligraf 被放在皮膚缺損的傷口上時，可暫時取代原本皮膚的功能，並且提供一個好的支架供傷口旁邊的組織長入。類似這樣的人造皮膚，最需要克服的就是生物相容性及排斥的問題。選用新生兒包皮的角質細胞便是因為它具有抗原性較低，不易引起使用者排斥的優點。

目前除了 Apligraf 之外，已經有許多不同但類似的產品研發出來，這些產品有的只有表皮成分，有的則只含有真皮部分，有的則是兩層都有，製作的方式也都是透過組織工程所做出來的生醫材料（表一），有了這些產品，不但可以加速傷口癒合的速度，減少皮膚缺損所引起的併發症，最重要的是可以大大減輕患者的不適與住院的時間，用較少的成本達到較好的醫療品質，這也是為什麼世界各國，特別是先進國家把組織工程及再生醫學的技術放在重點研發的原因。

表一、組織工程人造皮膚

商品名稱	國家	成分	適應症
Apligraf	美國	表皮：人類新生兒包皮角質細胞 真皮：牛膠原蛋白基質與人類真皮纖維母細胞	糖尿病足潰瘍 鬱積性靜脈潰瘍
AutoDerm	比利時	表皮：人類角質細胞	多層燒傷 慢性潰瘍
BioSeed-S	德國	表皮：人類角質細胞 真皮：纖維蛋白（fibrin adhesive）	多層燒傷 慢性潰瘍
Dermagraft	英國 美國	表皮：polygalactin 真皮：人類真皮纖維母細胞	糖尿病足潰瘍 鬱積性靜脈潰瘍 水泡裂解症
Epibase	法國	表皮：人類角質細胞	多層燒傷 慢性潰瘍
Epicel	美國	表皮：人類角質細胞	全層缺損傷口
OrCel	美國	表皮：人類角質細胞	多層皮膚移植捐獻

		真皮：牛膠原蛋白基質與人類真皮纖維母細胞	處 水泡裂解症
TransCyte	英國 美國	真皮：豬膠原蛋白基質與人類真皮纖維母細胞	多層或全層燒傷
Vivoderm	美國	表皮：人類角質細胞 真皮：玻尿酸基質	多層燒傷 慢性潰瘍

3. 色素脫失之光線與細胞治療

白斑 (vitiligo) 是一種後天的色素脫失疾病，病理學上為表皮之功能性黑色素細胞消失 (圖一)。分類上包括局部型、節狀型、臉部肢端型及廣泛型 (尋常型) 白斑。節狀型常侷限於身體的一側，形成一帶狀的色素脫失，較易發生在未成年小孩，特別是在臉部。廣泛型白斑，一般推測是跟自體免疫有關，可能是有自體抗體，造成黑色素細胞的破壞，而導致色素脫失。



圖一、尋常型白斑：病人之雙手有對稱性分佈因色素脫失造成的白色斑塊。手部的病灶經常造成病人社交及工作上的心理壓力。

在白斑的治療上，除了局部擦或口服藥物之外，目前對於黑色素再生，主要以特殊

的光照治療 (phototherapy)¹⁰，包括長波紫外光配合光敏感藥劑治療 (psoralen-UVA，PUVA)、窄波紫外光治療 (narrow-band UVB)、或低能量雷射 (low energy laser)¹¹。這些治療的療效，主要透過局部免疫調節、促進黑色素細胞移動或成熟，進而使成熟之黑色素細胞漸漸重新長回白斑的病灶處。

PUVA 及窄波紫外光之色素恢復，常由毛囊處開始，色素漸漸以毛囊為中心，向外擴散。過去的研究顯示，因為人類毛囊中有黑色素細胞的前趨細胞，位於毛囊外根鞘 (outer root sheath) 之基底層，此前趨細胞並未有黑色素之表現。經過光線的刺激，逐漸成熟並移行出毛囊，進入周圍的皮膚。近來發現小鼠或人的毛囊膨脹區域 (bulge) 中，存在有黑色素幹細胞，但尚未有直接證據證實顯示光線治療是經由刺激黑色素幹細胞之增生與分化而達到療效。

光線治療中，每週需要到醫院治療 2-3 次，整個治療期間常需要半年至兩年的時間。因此發展有效又安全性高的可攜性光源，或家用型光源，可以減少病人往返醫院的時間，將是色素再生治療的一個突破。低能量氦氖雷射已被證實對於白斑之色素再生具有療效，但價格昂貴。其重量及體積上的限制，不適合家用。發光二極體 (light emitting diode, LED)，具有省電、體積小、光源穩定及價格相對便宜的優點，可能是可以取代此種雷射的新一代治療用光源。不過目前對於利用發光二極體當成光源來進行色素再生治療，尚無較正式或完整的研究報告。

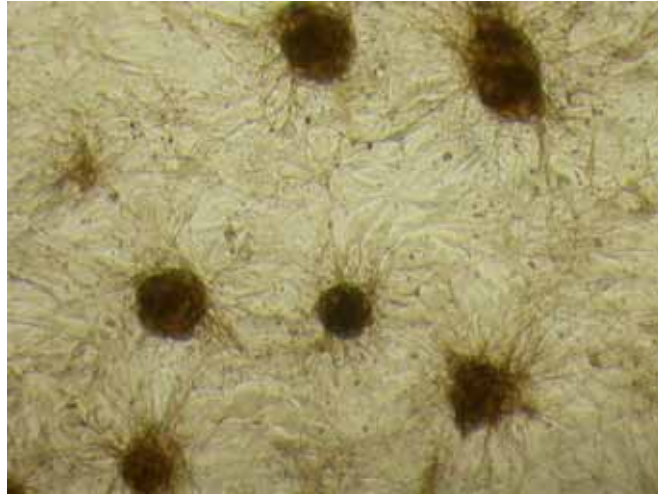
以光線治療進行色素再生，常有色素未完全恢復或局部效果不佳的情形，特別是體口周圍及肢端的病灶。此外，如果病灶處的毛髮也變白色，色素也不易從毛囊再生，此時可以考慮細胞療法。目前較常使用的方式為自體黑色素細胞移植 (autologous melanocyte transplantation)¹²。其方法為，在病人之正常皮膚處，取一小塊皮膚，在體外進行黑色素細胞培養。體外培養，可以增加黑色素細胞量，以治療較大的白斑病灶。待黑色素細胞生長至一定細胞量時，將黑色素細胞自培養皿中取下，置於培養基中形成黑色素細胞懸浮液 (melanocyte suspension)。在病灶處，以雷射磨皮的方式，將表皮移除，再將黑色素細胞懸浮液滴在病灶處。之後在病灶處蓋上不易與皮膚黏著之矽質紗布，其上再以濕潤之一般紗布覆蓋並以不透水之材料包覆。病灶處的表皮通常在一週左右即可長成，此時可以將紗布移除，但通常仍無明顯著色。明顯的色素恢復，多在三到四週後開始出現。剛剛再生的膚色，常會較黑。通常之後幾個月間，顏色漸漸與相鄰的膚色接近。但有的病人最後再生的膚色，與周圍的皮膚仍有差異。

自體黑色素細胞移植雖已在臨床上使用多年，但多以臨床試驗方式進行，尚未有量產之細胞治療。因為量產細胞治療製劑，目前受到較嚴格之法令規範，細胞治療的門檻提高，所需之成本相對較高。需要以量產方式，才能減低成本，符合經濟效益。目前工業技術研究院與筆者在臺大醫院進行之自體黑色素細胞治療第一期臨床試驗，其安全性及病人之忍受性評估，即將完成。我們希望能夠在最短時間內，完成接續的第二及第三臨床試驗，以利此黑色素細胞治療方式，早日量產，運用在臨床治療上。

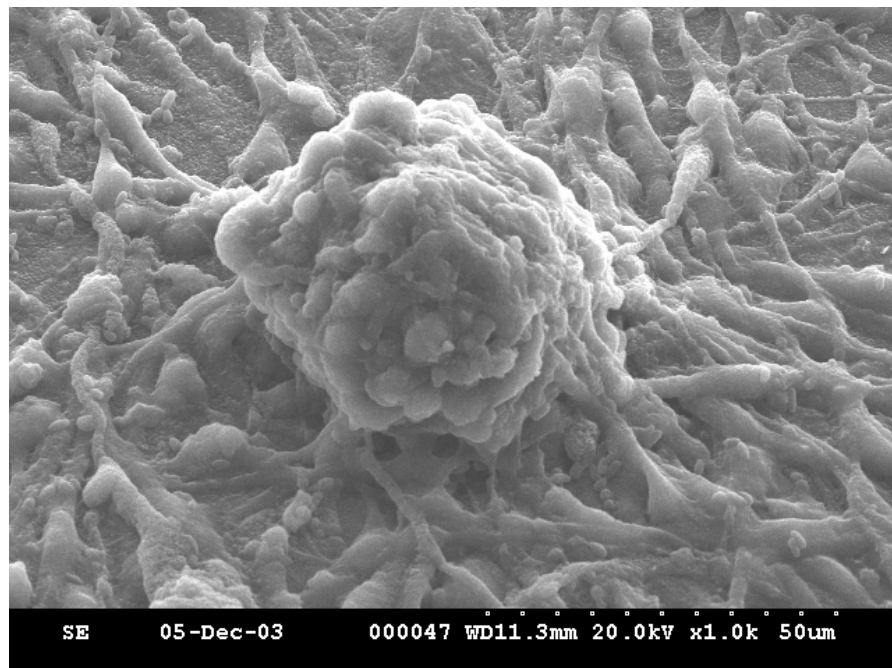
以黑色素細胞懸浮液作為移植的方式，在臨床上也有缺點需要改進，包括移植時不易均勻撥灑細胞，特別是在皮膚凹凸不平處的病灶，因此常有色素不均的情形。此外，色素再生的成功率也變異大，黑色素在移植時是否與病灶處之皮膚能有效貼附與生長，在臨床上也無法判定。為改善以上之缺點，並簡單化移植的過程，筆者嘗試發展“黑色素細胞貼片 melanocyte patch”來改善以上所述黑色素細胞移植時會遇到的缺點¹³。這個概念是先將黑色素細胞直接培養在生醫高分子薄膜上，待黑色素細胞生長到一定程度，再取出細胞貼片，以上下反置的方式來移植。不過因為黑色素細胞在高分子材料上的生長狀況，以前沒有人做過研究，因此我們首先研究各種高分子材料對於黑色素細胞生長及分化的影響。我們發現黑色素細胞在幾丁聚醣薄膜上的生長良好，並可以維持原有的分化狀態。一般而言，黑色素細胞在體外培養時，會以單層的方式生長（圖二）。但我們意外發現一種黑色素細胞在二維的高分子材料幾丁聚醣（chitosan）上出現三度空間多細胞球（multicellular spheroids）的新生長方式（圖三）¹³。我們也探討了這種多細胞球形成的條件，與使用的培養材質及細胞密度有關。當細胞密度較高且黑色素細胞與基材的黏著性減低時，有利黑色素細胞自我聚集成立體的多細胞球。



圖二、單層生長之人類黑色素細胞：在一般的培養環境中，黑色素細胞為單層狀生長，細胞型態很像神經細胞（phase contrast, x100）。



圖三、幾丁聚醣薄膜為基材之黑色素細胞貼片：幾丁聚醣薄膜為透明狀，可以直接觀測到細胞生長的情形。在幾丁聚醣薄膜上，黑色素細胞在足夠的密度之下，可以自我聚集成立體多細胞球。其直徑約在 100 到 250 μm (phase contrast, x40)。



圖四、黑色素細胞球之掃描式電子顯微鏡影像：照片中顯示黑色素細胞球為一緻密之立體球狀結構，細胞與細胞之間緊密接觸堆疊。

我們進一步發現，我們發現黑色素細胞球 (melanocyte spheroids)，在嚴苛的環境，即缺乏外加的生長因子及血清的環境中，其存活較一般單層生長 (monolayered) 的黑色素細胞好¹⁴。一般而言，黑色素細胞在缺乏生長因子及血清的環境中，會快速死亡。

一般進行黑色素細胞移植時，在病灶處沒有外加生長因子。此外細胞在懸浮狀態太久，也可能減低細胞的存活率。因此如何克服移植時黑色素細胞的死亡，對於移植的成功率有極大的重要性。這意味著在移植中，以幾丁聚醣為基材的黑色素細胞貼片，可能會有較好的存活率。我們在動物實驗中發現，幾丁聚醣薄膜與皮膚傷口的貼附緊密，因此可以確保細胞與病灶處的皮膚緊貼，而且具有保濕效果。另外幾丁聚醣薄膜具有透明性，容易觀察細胞移植後的傷口變化。其抗菌性，可能可以減少移植過程中的感染率。我們希望將來能以臨床試驗的方式，來評估以幾丁聚醣為基材的黑色素細胞貼片是否真的可以改善黑色素細胞移植的成功率與方便性。

4. 毛囊再生（Hair Follicle Regeneration）之研究現況

體毛與頭髮，在人類的社交中，扮演一個重要的非言語溝通的角色。特別是頭髮的缺失，會對人的心裡與社交造成壓力。很多疾病會造成禿髮，若毛囊尚未消失，可以藥物治療的方式；但若毛囊已經消失，藥物治療就無法達到目的。

毛囊的發育過程相當複雜，有來自表皮及真皮的不同訊號，在適當的時間出現，進而造成表皮及真皮的交互作用。在胚胎發育中，真皮部位真皮乳頭細胞（dermal papilla）聚集成團，團狀真皮乳頭細胞與表皮的複雜作用中，逐漸誘導表皮向真皮生長並分化成複雜的毛囊構造。若真皮乳頭細胞無法聚集成團，即無法漸誘導表皮分化成毛囊。在過了胚胎時期，毛囊會有週期性的生長，分別是退化期、休止期及生長期。

毛囊缺失或禿髮時，目前治療的方式主要以移植自體毛囊（hair transplantation）為主¹⁵。目前應用最廣的是在治療雄性禿（androgenetic alopecia）。其方法為以外科手術的方式，取下一帶有頭髮的皮膚。在雄性禿的病人，通常在後腦杓取下一條帶狀的皮膚，再將皮膚中的頭髮分株。取皮處會留下疤痕，因此通常取皮處需要有較濃密的頭髮，以遮蓋取皮後的疤痕。另一方面在禿髮處以尖刀在適當的距離及密度製造皮膚開口，再像插秧一樣將分株後的毛囊，一一植入。此移植方法，算是利用手術方法造成毛囊的重新分佈，並無新的毛囊產生。所以，在禿髮嚴重的病人，可能無足夠的健康毛囊存留可供移植，此方法就不適合，目前只能以戴假髮的方式來改善外觀。

利用毛囊再生來治療人類毛囊缺失，一直是很多研究者的夢想¹⁶。過去一直以來的觀念是，哺乳類動物在後天毛囊缺損後，即無法自行再生新的毛囊。此觀念，一直到最近才被打破¹⁷。美國賓州大學學者 Cotsarelis 團隊的研究顯示，以小鼠為模型，在皮膚造成一個大傷口，只要傷口夠大，在復原過程中傷口來不及收縮而收口時，傷口的中心會重演毛囊胚胎發育的過程，新生出毛囊¹⁷。雖然實際應用在人體，仍有一段距離。但此研究也提供一新的平臺，以研究後天如何調控毛囊新生。因為如果可以釐清相關的分子機轉，將來有機會在人體皮膚製造出一個環境，讓皮膚自行重演毛囊發育的過程，達成毛囊新生的效果。

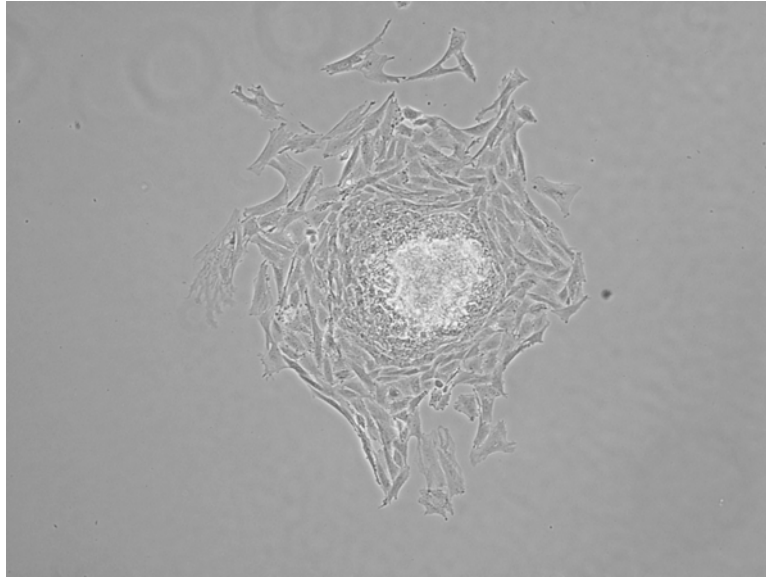
除此之外，以組織工程的方法進行毛囊再生，主要著重在毛囊真皮乳頭細胞的研究。

過去研究顯示，利用顯微解剖所得的真皮乳頭適當地移植到表皮下方，可以誘導表皮再生毛囊¹⁸。因此，要重演此胚胎發育過程，可以利用移植真皮乳頭細胞來達成。後來學者也成功在體外培養增殖毛囊真皮乳頭細胞^{19,20}。而培養增殖過後的真皮乳頭細胞，移植回表皮下方，又可成功誘導毛囊新生²¹。因此適當的體外培養仍可以保留真皮乳頭細胞的毛囊誘導能力。而培養過的真皮乳頭細胞，再經過適當的移植，確實可以再生新的毛囊。

體外培養時，一般是在解剖顯微鏡下直接手工剝離，或以酵素及離心處理²²，將整個真皮乳頭構造自毛囊底部分離出來，然後以整個真皮乳頭進行培養（圖五）。梨形的真皮乳頭會漸漸崩解，真皮乳頭細胞慢慢向外長出（圖六）。真皮乳頭細胞的生長緩慢，數代之後，即不再生長，因此不易大量培養。真皮乳頭的生長特性相當特殊，在一開始培養時，細胞有聚集的傾向^{19,20,23}，但經過數代培養後，此種特性會消失。而此時，真皮乳頭細胞就會失去毛囊誘導的功能。體內及動物實驗顯示，真皮乳頭細胞需在聚集成細胞團的情況下，才有毛囊誘導的功能。



圖五、以酵素分離出的真皮乳頭：剛分離出來的真皮乳頭略呈梨形的構造（phase contrast, x100）。



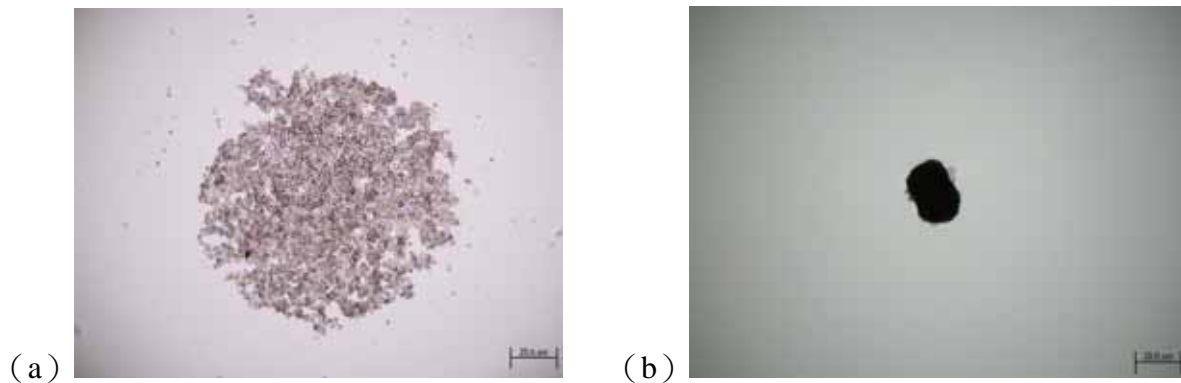
圖六、培養中的真皮乳頭細胞：培養數天後，真皮乳頭細胞漸漸向外長出成平攤狀細胞(phase contrast, x100)。

為大量培養真皮乳頭細胞，以達毛囊再生的效果，一方面除了在細胞數目快速增加之外，另一方面需使細胞保有毛囊誘導的能力。此外，移植時最好能以多細胞團或細胞密度極高的懸浮液來移植，這樣才能確保移植後真皮乳頭細胞能夠維持細胞團的構造，以誘導表皮生長成新的毛囊。目前研究發現，再加入適當的生長因子時，毛囊細胞不僅生長較快，也可以連續增殖數十代²⁴。因此可以較少的原始培養細胞數，以較快的速度大量培養真皮乳頭細胞。培養過的細胞，再經過處理，將細胞聚集成多細胞球，此時可以再誘導毛囊新生。

過去為使真皮乳頭細胞聚集後移植，有學者嘗試用塑膠軟刮刀，將單層細胞聚集成團，不過此方法不適合大量移植使用。目前製造真皮乳頭細胞多細胞球(multicellular spheroids)的方式，多以懸浮培養(floating culture)或懸掛水滴培養(hanging drop method)^{24,25}，強迫細胞聚集成團(圖七)。治療禿髮，常需要數千個新生的毛囊，才能達到需要的美觀效果。因此，效率變的很重要。如果這些方法可以自動化，對於細胞培養成細胞團以利移植，將可大大提高效率。此外，真皮乳頭細胞移植的方式，也是研究的重點。如何快速地把真皮乳頭細胞準確地移植到表皮與真皮的交界，並確保毛囊再生的效率，是決定是否可以廣泛應用到臨床治療的另外一個重點。除了大量新生毛囊之外，控制新生毛髮的粗細與毛髮的方向，對於美觀影響也很大。毛髮的粗細與毛髮的方向要自然，美觀效果才好。但目前對於新生毛髮的粗細及方向的研究尚少。

目前已有生技公司投入毛囊再生的研究。以 Intercytex 公司為例，此公司以經利用人類自體的毛囊進行真皮乳頭細胞培養，並命名為 TrichoCyte。第一期人體試驗已經於 2005 年完成，共試驗在 7 位志願受試者。每位受試者接受 100 處細胞注射，其中有 5

人在注射處有毛髮增加的現象。在 2006 年 9 月，Intercytex 公司開始進行第二期人體試驗，每位受試者會接受 1000 處細胞注射。預期最近會有第二期人體試驗的結果。至於以毛囊新生的方式治療，是否可以取代傳統的植髮手術，將取決於是否可以達到預期的美觀效果、長期的安全性、方便性、及最終的價格。



圖六、以 hanging drop method 培養真皮乳頭細胞：(a) 四小時後，細胞初步開始聚集 (b) 三天後，細胞聚集成緻密的細胞球 (bars, 20 μ m)。

四、參考文獻

1. Burke, J. F., Bondoc, C. C. & Quinby, W. C. Primary burn excision and immediate grafting: a method shortening illness. *The Journal of trauma* **14**:389-395 (1974).
2. Gray, D.T., et al. Early surgical excision versus conventional therapy in patients with 20 to 40 percent burns. A comparative study. *American journal of surgery* **144**:76-80 (1982).
3. Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**:5665-5668 (1979).
4. Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**:331-343 (1975).
5. Pham, C., Greenwood, J., Cleland, H., Woodruff, P. & Maddern, G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review. *Burns* **33**(8):946-957 (2007).
6. Hansbrough, J. F. & Franco, E. S. Skin replacements. *Clinics in Plastic Surgery* **25**:407-423 (1998).
7. Yannas, I. V. & Burke, J. F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of Biomedical Materials Research* **14**:65-81 (1980).
8. Yannas, I. V., Burke, J. F., Gordon, P. L., Huang, C. & Rubenstein, R. H. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *Journal of Biomedical Materials Research*

- 14:107-132 (1980).
9. Eaglstein, W. H. & Falanga, V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clinical Therapeutics* **19**:894-905 (1997).
 10. Njoo, M. D., Westerhof, W., Bos, J. D. & Bossuyt, P. M. The development of guidelines for the treatment of vitiligo. Clinical Epidemiology Unit of the Istituto Dermopatico dell'Immacolata-Istituto di Recupero e Cura a Carattere Scientifico (IDI-IRCCS) and the Archives of Dermatology. *Archives of Dermatology* **135**:1514-1521 (1999).
 11. Yu, H. S., Wu, C. S., Yu, C. L., Kao, Y. H. & Chiou, M. H. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *The Journal of Investigative Dermatology* **120**:56-64 (2003).
 12. Njoo, M. D., Westerhof, W., Bos, J. D. & Bossuyt, P. M. A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. *Archives of Dermatology* **134**:1543-1549 (1998).
 13. Lin, S. J., Jee, S. H., Hsiao, W. C., Lee, S. J. & Young, T. H. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. *Biomaterials* **26**:1413-1422 (2005).
 14. Lin, S. J., *et al.* Enhanced cell survival of melanocyte spheroids in serum starvation condition. *Biomaterials* **27**:1462-1469 (2006).
 15. Orentreich, N. Autografts in alopecias and other selected dermatological conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **83**:463-479 (1959).
 16. Stenn, K. S. & Cotsarelis, G. Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* **16**:493-497 (2005).
 17. Ito, M., *et al.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**:316-320 (2007).
 18. Oliver, R. F. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **18**:43-51 (1967).
 19. Jahoda, C. & Oliver, R. F. The growth of vibrissa dermal papilla cells in vitro. *The British Journal of Dermatology* **105**:623-627 (1981).
 20. Messenger, A. G. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *The British Journal of Dermatology* **110**:685-689 (1984).
 21. Jahoda, C. A., Horne, K. A. & Oliver, R. F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* **311**:560-562 (1984).
 22. Li, Y., Li, G. Q., Lin, C. M. & Cai, X. N. One-step collagenase I treatment: an efficient way for isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. *Journal of Dermatological Science* **37**:58-60 (2005).
 23. Jahoda, C. A. & Oliver, R. F. Vibrissa dermal papilla cell aggregative behaviour in vivo and in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **79**:211-224 (1984).

24. Osada, A., Iwabuchi, T., Kishimoto, J., Hamazaki, T. S. & Okochi, H. Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. *Tissue Engineering* **13**:975-982 (2007).
25. Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. & Nielsen, L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering* **83**:173-180 (2003).

第十章

神經退化性疾病的細胞替代療法

Cell Replacement Therapy in Neurodegenerative Diseases

李旺祚

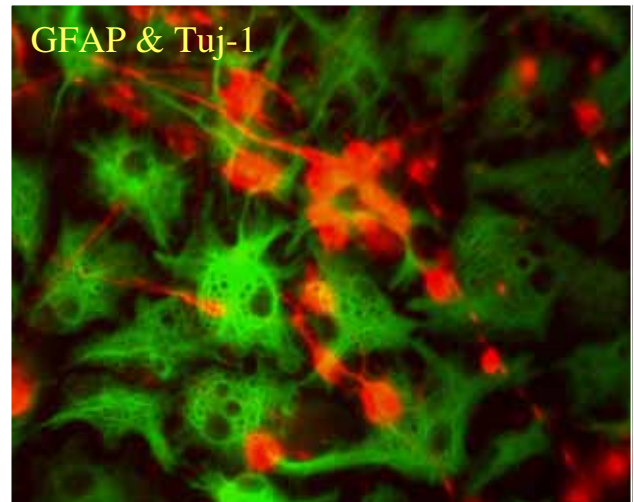
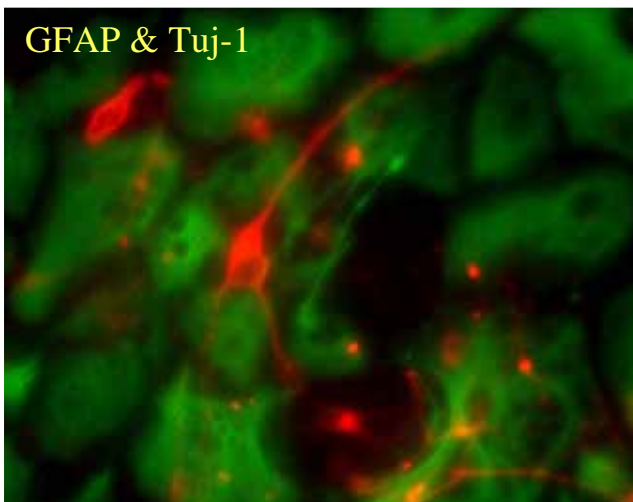
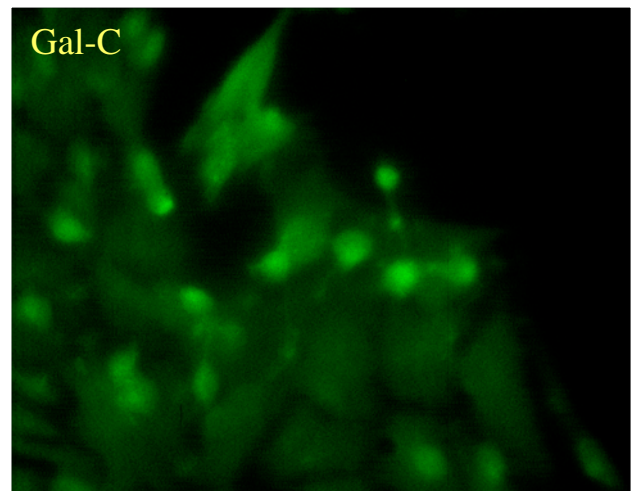
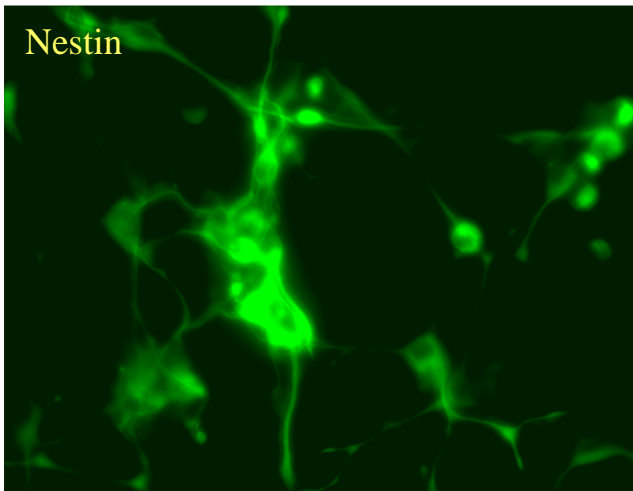
臺大醫院 小兒部

一、前言

雖然細胞替代療法已廣泛運用於各種疾病的研究中^{1,2}，但對於腦與脊髓病變的治療格外具有挑戰性。由於神經系統的複雜性，具有許多不同的神經細胞，神經細胞間又有許多複雜的連結，如何整合使不同的神經細胞間適當的互動，執行正常的神經功能是一大挑戰。

二、神經細胞與神經幹細胞

神經系統包括許多不同的細胞：有不同功能的神經元，如運動神經元（motor neurons）和多巴胺神經元（dopaminergic neurons）等，也有許多神經膠原細胞（neuroglial cells），包括星狀細胞（astrocytes），寡樹突細胞（oligodendrocytes），和微神經膠細胞（microglia）等。神經元具有一個細胞體及許多神經突起，透過樹突（dendrites）細胞體可接受各種訊息，經由整合訊息後，再把訊息透過軸突（axons）傳遞出去，因而神經元主要負責訊息的接收、整合與傳遞的工作。而神經膠原細胞則負責支持與保護神經元，並提供營養給這些細胞。其中星狀細胞主要負責神經系統的營養與支持，並與微血管形成血腦屏障（blood-brain barrier）。寡樹突細胞則主要是形成中樞神經系統內的髓鞘，產生神經在傳導上的絕緣體。一個寡樹突細胞可同時形成多條神經軸突的髓鞘。微神經膠細胞為中樞神經系統內的巨噬細胞，主要功能為吞噬壞死或不正常之神經細胞，因此對神經的修復也十分重要。無論神經元或神經膠原細胞都是由神經幹細胞（neural stem cells）分化而來（圖一）。所謂的神經幹細胞，是指具有分化為各種神經細胞的能力，並能進行自我更新，且能分裂增殖的細胞（圖二）¹。根據研究顯示，神經幹細胞主要存在於腦室壁周邊的組織，而神經前驅細胞（neural progenitor cells）則分佈於腦室壁周邊及海馬迴（hippocampus）；許多膠原前驅細胞（glial progenitor cells）則也分佈於腦室壁周邊和腦白質。另外，從脊髓中也能分離出神經幹細胞。這些細胞皆具有極佳的神經再生能力，可用於神經的修復¹。



圖一、神經幹細胞（左上）可分化成各種神經細胞，包括各式各樣的神經元（左下，紅色），也有許多神經膠原細胞（neuroglial cells），包括星狀細胞（astrocytes）（左下，綠色），寡樹突細胞（oligodendrocytes）（右上），和微神經膠細胞（microglia）等。



圖二、神經幹細胞具有分化為各種神經細胞的能力，並能進行自我更新，且能分裂增殖的細胞。

三、細胞療法的細胞來源

幹細胞依其來源可分為胚胎幹細胞 (embryonic stem cells) 及成體幹細胞兩種。胚胎幹細胞來自於囊胚的內層細胞團，是一種複效性幹細胞 (pluripotent stem cells)；而成體幹細胞則是由成體各種器官或組織裡所分離出來的幹細胞。在不同的成體幹細胞中，造血幹細胞 (hematopoietic stem cells) 以及間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 一直是研究的熱門題目，尤其間質幹細胞的相關研究與臨床應用，在近年來吸引了許多的注意。而這兩種幹細胞皆可由骨髓、臍帶血、或成人週邊血液中分離出來。

除了神經幹細胞具有分化為各種神經細胞的能力，近年的研究發現，上述的許多幹細胞也都可在體外的培養中透過誘導分化為各種神經細胞，並且已經在神經疾病動物模式的實驗

中證明具有明顯療效。

四、神經退化性疾病的細胞療法

以下簡單舉幾種重要的神經退化性疾病介紹幹細胞治療在這些疾病的研究現況。

1. 阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 的細胞治療

阿茲海默症也曾被稱為世紀之症，在這越來越傾向老年化的世界中，發生率也是愈來愈高。在 65 歲以上的年齡層占約 5%。這種神經退化性疾病，有著特殊的臨床和病理學上的特徵。第一次被提出是在西元 1901 年，由 Alois Alzheimer 醫師提出。他追蹤一位逐漸失智的 51 歲女病人，記憶力日漸減退，產生妄想和人格異常的現象，在五年後死亡是幾乎是近於完全癡呆的情況。但她在其他神經學檢查、反射和步態上，卻是近乎正常的。在死後的解剖發現大腦皮質中，在銀染下可見到許多神經纖維束 (neurofibril)，也以此區別阿茲海默症與一般的老年失智症。

阿茲海默症對認知功能的影響各式各樣，但最常影響到的仍是短期記憶的喪失。這代表病人對於新的資訊無法整合進入腦中，但病人的長期記憶常是正常的。但隨著疾病的進行，病人的認知功能仍會日益退步，且注意力缺失、焦慮和情緒障礙也會慢慢出現。除此之外，憂鬱、恐慌、睡眠障礙、偏執或妄想也常常出現，而造成照顧上的困難。

在神經病理學上，最主要的發現還是堆積在神經細胞的外部的乙型—澱粉樣蛋白斑 (beta amyloid plaque)，和堆積在神經細胞體中的神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles)。在功能上主要的發現則是乙醯膽鹼系統 (cholinergic system) 的退化，一般也認為這就是阿茲海默病人認知和功能退化的主因。乙醯膽鹼系統主要是在前腦的基底部向額葉投射，分成六群細胞，其中幾群和記憶、學習功能相關。也因此這些細胞受破壞的老鼠身上，也會出現嚴重的失憶現象。許多阿茲海默症的動物模式，也是用藥物或毒素破壞前腦基部的功能，來產生與人類阿茲海默症類似的症狀。

目前用以治療阿茲海默症的藥物主要都屬於乙醯膽鹼分解酶抑制劑 (cholinesterase inhibitors)，包括 tacrine、donepezil、rivastigmine、galantamine。這些藥物可延緩疾病的進展，並改善認知和情緒的問題。但乙醯膽鹼與交感神經系統息息相關，因此，這些藥物的副作用也不少。其他藥物包括抗氧化劑、單胺氧化酶抑制劑 (monoamine oxidase inhibitor)、抗發炎藥物、雌激素或銀杏等都有相關的研究，但目前並不具有確定的療效。其他尚在發展中的藥物還有褪黑激素 (melatonin)、NMDA 阻斷劑 (如 memantine)、神經成長因子 (nerve growth factor) 治療等。不過目前除了乙醯膽鹼分解酶抑制劑，其他藥物並沒有確定的療效。

至於細胞移植方面，目前並沒有足夠的證據證明對阿茲海默症的病人有幫助³⁻⁵。但在動物實驗中可發現，若將胚胎細胞植入乙醯膽鹼細胞受損的鼠腦中，八週後去測定動物的行為，

可看到受損鼠的認知功能明顯改善⁵。目前詳細的作用機制並不清楚，大致的推測是我們所植入的胚胎細胞，能經由某種作用再分化並重建鼠腦中已受損的部份。最近的研究也顯示，移植神經幹細胞於阿茲海默症實驗動物的大腦，可增加大腦中乙醯膽鹼性神經元的數目，而明顯改善這些實驗鼠的認知功能與記憶力³⁻⁶。不過，這離臨床上的使用仍有一段距離。首先是幹細胞的來源問題，還有組織製備的方式和所需的細胞量至今仍是問題。如何讓輸入的幹細胞長期存活，也仍然困難重重。這些都亟待所有研究者的努力。最近國內的研究，利用顆粒性白血球群落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)，活化骨髓內的內源性造血幹細胞，可改善阿茲海默症實驗鼠的認知與記憶功能⁷。這種刺激內源性造血幹細胞產生的策略，沒有傳統幹細胞製備的問題，也許是未來可嘗試的新方向。

2. 巴金森氏症 (Parkinson disease) 的細胞治療

巴金森氏症是由詹姆士·巴金森醫師於西元 1817 年所提出。這主要是一個影響中樞神經系統的疾病，主要會造成動作方面的困難。常見的症狀包含震顫 (tremor)、僵直 (rigidity)、動作緩慢 (bradykinesia)、姿勢或步態不穩。目前的一些藥物及非藥物治療的方式都只能延緩疾病的進程，和提供症狀的緩解，而不能阻斷神經的退化。

巴金森氏症在六十五歲以上的老年人中，發生率大概是百分之一。在所有神經退化性疾病之中，也僅次於阿茲海默症，為第二常見者。絕大部分是散發的病例，只有少部分與遺傳相關。其它續發性的原因包括感染、藥物 (抗精神病藥物，如 haloperidol)、慢性中毒或腦中風等。

在神經病理學中，巴金森氏症會出現細胞內的包含體 (inclusion body)，稱為 Lewy bodies。在黑質緻密部 (substantia nigra pars compacta) 的多巴胺神經元也會消失。當巴金森氏症的第一個症狀出現時，黑質緻密部的多巴胺神經元已經被破壞了 80%。

巴金森氏症的藥物治療，主要仍是以症狀緩解為主，包括多巴胺製劑及抗乙醯膽素劑等。左多巴 (levodopa) 是目前藥物治療的主流。但在長期使用下，可能會產生一些副作用，如療效減退、無法預測的運動功能波動、異動症 (dyskinesia) 等。其餘的藥物包括乙醯膽鹼拮抗劑、多巴胺促動劑和兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyl transferase, COMT) 抑制劑等都有人使用於治療巴金森氏症。

由於藥物治療產生的副作用，使科學家開始思考非藥物的治療；細胞移植和基因治療都是正在研究的方向。在基因治療方面，有許多基因都能增加多巴胺的製造，如酪胺酸水解酶 (tyrosine hydroxylase)、芳香族胺基酸脫羧基酶 (aromatic L-amino acid decarboxylase)、和 guanosine triphosphate cyclohydrolase I。目前最可行的方式是使用腺病毒 (adenovirus) 或慢病毒 (lentivirus) 為載體，最近在靈長類動物的研究顯示，利用神經膠細胞衍生神經滋養因子 (glial cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF) 基因來做基因治療，能恢復黑質中多巴胺細胞的活性，可以有效地保護神經元，及促進帕金森症的痊癒。不過目前在第二階

段的臨床試驗中，接受此治療的病人並不能達到理想的結果。也因此細胞療法成了另一個最有希望“治癒”巴金森氏症病人的治療方式⁸⁻¹⁰。它是置入能產生多巴胺的細胞去取代已凋亡的部份。一開始的臨床試驗都是取用胎兒的中胚層細胞來植入，除了倫理上的問題外，使用此種方式並不能達到一個穩定的結果。幹細胞的移植則是目前研究的主流，主要利用各式各樣的幹細胞培養分化成可分泌多巴胺的神經元後，再置入紋狀體（striatum）之中。不過目前主要的問題在於所植入的細胞存活率過低，大概90%都會死亡，因此效果不彰，且長期的安全性不明。因此細胞療法在目前離上市使用仍有一段距離。

在日益老年化的世界中，巴金森氏症的病人越來越增加中。目前的藥物治療僅能改善疾病造成的症狀，卻不能阻止疾病的進行。在非藥物治療方面，巴金森氏症疫苗對於一些家族性巴金森氏症的患者，提供了一絲希望。最有發展潛力的治療方式還是細胞移植，一方面是要找出既合乎倫理，又能有效取得幹細胞的方式，另一方面則要能提高植入細胞的存活率。相信在不久的將來，我們能有方法治癒這種神經退化性疾病。

3. 幹細胞移植在亨丁頓舞蹈症（Huntington's disease）所扮演的角色

亨丁頓舞蹈症（Huntington's disease）是一種體染色體顯性遺傳的疾病，肇因於第四對染色體內的亨丁頓舞蹈症基因（IT-15）其去氧核糖核酸基質之CAG三核苷酸重複序列過度擴張，此段CAG轉錄的胺基酸是多麩胺酸（polyglutamine），過多的多麩胺酸會產生細胞毒性，進而導致腦部神經細胞退化或死亡。亨丁頓舞蹈症主要是由於大腦紋狀體中的尾狀核（caudate nucleus）退化，導致相關的神經傳導出問題，進而影響患者行動，疾病進展到後期整個大腦和小腦都會呈現明顯萎縮。然而詳細造成神經退化的致病機轉不明。

此病的遺傳模式具有極高的前發現象（anticipation），也就是「下一代患者總是比上一代患者較早發並且較嚴重」，若異常基因來自於父親，此「前發現象」會更明顯。CAG的重複次數與發病年齡有關，亨丁頓舞蹈症依發病年齡可分成成人型（發病年齡約在30至50歲之間）與少年型，少年型患者在二十歲以前就會發病，其體內CAG重複序列的擴張次數更多。

此病發生初期以運動方面的症狀為主，但每個患者的病徵差異很大。主要的運動症狀為四肢、軀幹或臉部會出現不自主且不規律的動作，看起來就像是在跳舞一樣，情況嚴重的話會影響到走路及平衡，導致病人動作極度不協調並易跌倒。語言失調或吞嚥功能變差也是常見的現象。另外，患者會出現智力減退與認知功能減退，並出現各種精神症狀如憂慮、易怒或人格行為改變。少年型患者發病初期較常以精神症狀尤其是憂鬱症表現，接著才出現肌肉失張或僵硬等動作異常。一般而言，患者多在發病後10至30年死亡，末期最常導致患者死亡的原因為感染、跌倒或其他併發症。亨丁頓舞蹈症的自然病程和預後隨人而異，而且程度上有相當大的不同，少年型患者的存活通常較短。在臨床病理的研究顯示，發病年齡愈小其腦部退化就愈嚴重，而且少年型患者的病程較成年或典型患者更為嚴重。

目前亨丁頓舞蹈症無法被治癒，藥物治療只能減緩情緒或動作的症狀，並不能終止腦部的退化。近年來，科學家嘗試在老鼠等動物實驗進行神經幹細胞移植，目前已能夠藉由靜脈注射使進入老鼠體內的神經幹細胞有效到達大腦的紋狀體病變處，進行分化，並長久生存¹¹⁻¹⁷。也有人將經過特殊處理的人類胎兒神經幹細胞直接注射入大鼠的紋狀體病變處，證實大鼠不但在行為運動功能方面有進步，組織切片也證實移植的細胞可以在病變處分化生存^{13,14}。然而，移植的細胞如何在亨丁頓症的動物體內發揮功效，進而使其行為功能進步的機轉目前依舊不明。

臨床上，醫學家們也曾嘗試藉由手術直接將人類胎兒的神經幹細胞移植入亨丁頓舞蹈症病人腦內^{15,16,18-21}，然而這部份臨床試驗的結果仍好壞參半，其中牽涉到幾個重要的因素：例如胎兒細胞能否長期存活、是否能順利分化成神經細胞發揮功效並產生臨床進步、甚至移植排斥問題都需要考慮。另外其他嚴重副作用如硬腦膜下出血、移植細胞不正常增生而形成腫瘤、人類胎兒細胞的來源問題、與移植人類胎兒細胞所牽涉的道德問題等，也需要考慮。早期少數的人體臨床試驗顯示了幹細胞移植的安全性。最近在歐美也陸續進行了較大規模的臨床試驗，結果令人振奮²¹。最近，科學家發現成人的腦中也有許多神經幹細胞，因此有人設想若能利用這些自己腦中所存在的幹細胞進行自體移植¹⁴，便可以解決一些使用人類胎兒幹細胞移植所造成的問題，如排斥問題、細胞來源與道德的爭議等。然而，目前對於成人腦神經幹細胞的了解仍屬混沌狀態，故這部份仍侷限在構想階段，需要將來更多人的努力，期待有朝一日，亨丁頓舞蹈症的治療能有突破性的發展，以造福這些打從出生就註定其將來命運的患者。

4. 血液幹細胞移植在腎上腺腦白質失養症 (adrenoleukodystrophy) 所扮演的角色

細胞療法也在退化性腦白質病變的治療上扮演重要的角色²²。最廣為人知的退化性腦白質病變即為腎上腺腦白質失養症。腎上腺腦白質失養症是一種罕見的性聯遺傳過氧化小體疾病，盛行率約兩萬分之一至五萬分之一，其缺陷基因為位於 X 染色體上的 ABCD1 基因，約九成患者的基因缺陷是由遺傳而來，其餘則是新發生的突變所致。發病者大都為男性，每次受孕，均有一半機會遺傳此病。攜帶 ABCD1 缺陷基因的女性絕大多數無症狀，然而也有少數 ABCD1 基因缺陷的女性成年之後會有神經系統的症狀。

ABCD1 的基因缺陷會使得細胞內的過氧小體 (peroxisome) 無法正常代謝超長鏈脂肪酸 (very long-chain fatty acids)，而導致超長鏈脂肪酸異常沈積於腎上腺及腦白質，因此在病人成長過程中，逐漸出現神經及腎上腺的症狀。腎上腺腦白質失養症的臨床表現非常多樣，從輕型的腎上腺機能不足至嚴重的兒童大腦型白質脫髓鞘病變都有可能，發病年齡也不盡相同。而典型兒童大腦型腎上腺腦白質失養症的患兒則多半在幾年內，進展成為植物人，

平均發病年齡為 7 歲，其症狀表現包括功課退步、記憶減退、語言理解能力下降、個性改變不等、進而語言能力喪失、行動自主能力喪失等。

腎上腺腦白質失養症患者典型的腦部磁振造影變化為兩側顳—枕區之白質脫髓鞘現象，而血清中的超長鏈脂肪酸濃度也會明顯升高，對這些患者與其家族其他成員進行血清超長鏈脂肪酸與基因檢測是非常有幫助的，常常可以藉此找出尚未有臨床症狀的患者或帶原者，進而提供產前遺傳諮詢。電影「羅倫佐油」曾經感動千萬觀眾，而羅倫佐油 (Lorenzo's Oil) 也是目前最普遍被採用的飲食治療法，早期飲食治療或許在早期可預防或延緩疾病症狀的發生。然而證據顯示羅倫佐油對腦部超長鏈脂肪酸之堆積的改善效果有限，無法治療已經產生的神經病變，對成年患者也不具療效。因此造血幹細胞的移植是目前根治的唯一希望²²⁻²⁶。如前所述，造血幹細胞的來源主要包括骨髓與臍帶血，若不進行移植，患者多在發病後二到五年內死亡。然而移植成功率只有約六成左右，另有二至三成的機率在手術後會出現排斥現象，甚至死亡。大部分的移植患者死亡是由於疾病本身進展所致。造血幹細胞的移植只對早期尚未出現嚴重神經症狀的病人有幫助，對於已有明顯神經症狀的晚期病患，造血幹細胞的移植成效可能不大。因此，一般會對有症狀的腎上腺腦白質失養症患者進行魏氏智力測驗與腦部核磁共振病變嚴重度 (Loes score) 的評估，若智力測驗大於八十分且 Loes score 小於九分的患者才會建議進行造血幹細胞的移植。

雖然目前對於造血幹細胞的移植終止疾病進展的詳細機轉並不清楚，但若長期追蹤移植成功的腎上腺腦白質失養症病童，其腦部的脫髓鞘現象大多會有明顯改善，有一半以上的病患血清超長鏈脂肪酸會下降甚至恢復正常，臨床的神經學症狀也會停止惡化²⁴。一般腎上腺腦白質失養症的病童在被正確診斷時通常都已經有明顯的神經症狀，因此多半已不適合採用移植治療。然而對這些病童的兄弟進行血清超長鏈脂肪酸檢測，則可早期發現無臨床症狀的病童，這些血中超長鏈脂肪酸明顯升高的孩童只有約四成會在兒童期發病，其餘六成並不會在兒童期發病。若這些無症狀孩童的腦部核磁共振並無脫髓鞘現象，造血幹細胞的移植的壞處多過好處，因此並不適合在此時進行造血幹細胞的移植。目前認為腦部已有脫髓鞘現象但尚無臨床神經症狀的病童是最適合進行移植且預後最佳的一群。未來，提高警覺以早期診斷無臨床症狀的腎上腺腦白質失養症患者，並及早進行造血幹細胞移植，將是改善目前造血幹細胞移植成功率的重要因素之一。

5. 幹細胞移植在異染性白質退化症所扮演的角色

除了腎上腺腦白質失養症，異染性白質退化症 (metachromatic leukodystrophy) 也是很重要的退化性腦白質病變。異染性白質退化症是一種罕見的體染色體隱性遺傳疾病，發生率約十二萬分之一，其基因缺陷位於染色體 22q13.31，此基因所轉譯的蛋白質是一種酵素 Arylsulfatase A (簡稱 ASA)，異染性白質退化症是因為基因缺陷導致 ASA 酵素缺乏，所導致神經退化性疾病。父母若各帶有一個缺陷基因，則子女有四分之一的機率得病，二分之一的機率成為帶有缺陷基因的帶原者，男女得病機率相同。

ASA 酵素位於細胞的溶酶體 (lysosome) 內，是酵素 cerebroside sulfatase 的兩大組成份之一，另一部分為 sphingolipid activator protein (SAP-1)。若 ASA 酵素缺乏，將無法分解 sulfatide 成 cerebroside，而導致 sulfatide 堆積在中樞神經與週邊神經系統，引起神經去髓鞘化，而出現神經退化性症狀。因基因變異位置不同，會使得 ASA 酵素殘餘活性不同，造成發病時間不同，因此臨床上可分成三型：(1) 嬰兒晚期型 (late infantile form)：此型最常見，通常在六個月至兩歲發病，出現進行性的運動行為與精神障礙、痙攣及失明，發病數年後死亡。(2) 青少年型 (juvenile form)：似嬰兒晚期型，但通常在四至十二歲發病，疾病進展較前者緩慢，病程較長。(3) 成人型 (adult form)：自青少年至老年期皆有可能發病，通常以精神症狀為主。患者在發病前可能表現的沒有活力，剛開始可能出現肌肉與張力失調，走路不穩，語言障礙或成績退步，接下來數年會相繼出現痙攣、四肢癱瘓、癡呆、與週邊神經病變等。實驗室檢查常可見腦脊髓液中的蛋白質量增加，周邊神經傳導速度嚴重變慢，腦部核磁共振檢查為可見腦白質去髓鞘化與萎縮現象，確定診斷則必須依靠測定患者體內白血球、血清或皮膚纖維母細胞的 ASA 酵素活性分析。

異染性白質退化症目前無有效治療方法。從一九八零年代以來，就陸續有醫生以骨髓移植方式治療異染性白質退化症病患，雖然有些個案報告顯示骨髓幹細胞移植可以減緩甚至終止某些嬰兒晚期或青少年型異染性白質退化症患者神經症狀的退化，血中 ASA 酵素濃度也有輕微上升，腦部核磁共振病變也停止惡化，暗示移植的幹細胞可以通過血腦屏障進入中樞神經並發揮功用，但其詳細的機轉仍不明。而且骨髓移植對嚴重酵素缺乏或已出現嚴重神經症狀的異染性白質退化症患者並無臨床效益。

由於造血幹細胞的移植仍是目前唯一認為可以預防或減緩溶酶體儲積症 (包括異染性白質退化症) 病人神經退化的方法，為了改善造血幹細胞的移植成效，醫學界近年結合基因治療方法，試圖將經過修飾的 ASA 基因藉由造血幹細胞移植入異染性白質退化症動物體內²⁷⁻³²。經過改造的 ASA 基因會過度表現並製造 ASA 酵素，科學家們再藉由各種病毒載體將此基因轉殖入造血幹細胞，然後將幹細胞移植入 ASA 基因剔除鼠 (ASA knockout mice) 等動物體內，起初的動物試驗顯示移植的幹細胞主要在肝或腎等器官發揮功效，卻較難通過血腦屏障進入大腦，因此對神經退化的症狀改善有限。然而，最近某些動物試驗顯示移植的幹細胞經過處理大部份分化成巨噬細胞與微神經膠細胞，會通過血腦屏障進入大腦，而且這些細胞在已被傷害的病變處會更顯著聚集，因此帶有目標基因的幹細胞可以更有效率的在病變處大量製造 ASA 酵素，使試驗動物神經退化症狀顯著改善。也有學者以胚胎幹細胞為來源進行基因轉殖²⁷，證實在動物體內也可以顯著提高幹細胞到達大腦的效率並過度表現。然而目前這些以幹細胞移植為基礎的基因治療試驗仍侷限於動物試驗，若要進行臨床應用尚有許多困難必須克服，需要未來更多的努力與突破。

6. 運動元疾病的再生治療

除了腦白質病變，運動神經元疾病的治療也是一大挑戰。運動神經元 (motor neurons) 分成上下運動神經元兩類 (upper and lower motor neurons)，上運動神經元位在大腦，下運動神經元則位在腦幹及脊髓。運動神經元疾病是一種進行性的上運動神經元及下運動神經元的退化性疾病。如果上運動神經元有問題，症狀為肢體無力，深部肌腱反射增強，但初期肌肉不會明顯的萎縮。如果下運動神經元有問題，症狀也是肢體無力，但深部肌腱反射減弱，同時會有明顯的肌肉萎縮。臨床上如病變侵犯到下運動神經元而沒有上運動神經元的症狀，稱為漸進性脊髓肌肉萎縮症 (progressive spinal muscular atrophy)，病人主要臨床表現是四肢及軀幹肌肉萎縮、肌無力及肌束顫動 (fasciculations) 的表現。第二種類型則以延髓症狀為主，稱為漸進延髓無力症 (progressive bulbar palsy)，臨床上可觀查到舌頭萎縮，舌的邊緣會有鋸齒般的凹痕，舌頭會肌束顫動，上顎無力及咽喉部運動不靈活，病患以吞嚥、咀嚼困難來表現。第三種則是肌萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis)，以侵犯四肢、軀幹及延髓的上下運動元為主要表現。因為大部份成人的運動神經元疾病都屬於這類，所以肌萎縮性側索硬化症也成了成人運動神經元疾病的代稱。一般而言這種疾病由症狀發生至死亡大約是 3 年。存活的年限和受侵犯的部位有相關，如果一開始便侵犯吞嚥及呼吸功能的患者，因為容易產生吸入性肺炎，其預後自然要比只侵犯上下肢的病人預後來得差。

臨床流行病學調查顯示，肌萎縮性側索硬化症疾病的發生率大約是每十萬人口中每年約有 2 個新病例產生，盛行率大約是每十萬人口中有 6 個，男性罹患此病的機會大約是女性的 1.5 倍。病人平均發病年齡約 55 歲。另外發現其中 5-10% 的病人有家族遺傳傾向。肌萎縮性脊髓側索硬化症是一種無法治癒的神經退化性疾病，也就是俗稱的漸凍人症。

肌萎縮側索硬化症由於臨床治療难度大，是目前神經肌肉疾病研究的重點課題之一。也因此運動神經元疾病是幹細胞療法早期的發展重點之一。雖然早期以人類胚胎幹細胞移植治療運動神經元疾病的實驗鼠的確看到實驗鼠部份功能上的進步，然而並沒有伴隨成功的運動神經元的分化現象。無論如何這珍貴的經驗也提示了我們，必須以形態上已分化的幹細胞移植來治療運動神經元疾病，而非希望在移植多功能胚胎幹細胞後會出現我們所期待的運動神經元分化。幸運的，基於我們對於運動神經元發育的了解，現在科學家已較容易把胚胎幹細胞成功的誘導分化成運動神經元。儘管如此，幹細胞療法中運動神經元移植的置放位置仍是臨床上很大的挑戰。因為運動神經元疾病如肌萎縮性脊髓側索硬化症，會影響中樞神經系統中許多不同的部位，由於由胚胎幹細胞誘導分化而來的運動神經元細胞並無法移轉，在臨床實務上須移植至哪些位置是一大考驗。此外，如何建立不同神經細胞間的相互溝通連繫也是有待釐清的一部分。在最近的人體實驗，注射間質幹細胞於肌萎縮性脊髓側索硬化症患者的胸椎部位，長期追蹤四年後顯示有部份個案在肺功能功能惡化上有減緩現象³³。這代表間質幹細胞在肌萎縮性脊髓側索硬化症的細胞移植治療上可能是一不錯的選擇。

五、結語

雖然神經幹細胞移植對治療神經退化性疾病提供了寬廣而誘人的前景，但是在將細胞治療廣泛運用於臨床治療之前，還有許多問題需要解決。首先是幹細胞的來源問題，雖然許多種幹細胞在體外培養中都可以被誘導分化成神經元，但是分化成為特定神經細胞的比例並不高。使用幹細胞，除了倫理上的問題外，幹細胞的製備方式，所需的劑量至今也仍是問題，要完全排除感染也有困難。另一方面，細胞治療對神經退化性疾病的長期療效也有待觀察，人體試驗中所輸入的幹細胞，也仍然無法長期存活。此外，幹細胞的移植，是否有形成腫瘤的可能，也有待更進一步的探討。

雖然困難重重，這些困難並沒有阻礙科學家對幹細胞移植的研究，幹細胞的移植也是目前最有希望可以治癒此種疾病的方式。如何篩選合適的細胞，調整幹細胞的分化程度等，都是未來探索幹細胞移植用於臨床治療的重要方向。

六、參考文獻

1. Muller, F. J., Snyder, E. Y. & Loring, J. F. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci.* **7**:75-84 (2006).
2. Pluchino, S., Zanotti, L., Deleidi, M. & Martino, G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* **48**:211-19 (2005).
3. Oliveira, A.A. Jr. & Hodges, H.M. Alzheimer's disease and neural transplantation as prospective cell therapy. *Curr Alzheimer Res.* **2**:79-95 (2005).
4. Korecka, J.A., Verhaagen, J. & Hol, E.M. Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Regen Med.* **2**:425-46 (2007).
5. Wang, Q., Matsumoto, Y., Shindo, T., Miyake, K., Shindo, A., Kawanishi, M., Kawai, N., Tamiya, T. & Nagao, S. Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Med Invest.* **53**:61-9 (2006).
6. Goldman, S.A. Disease targets and strategies for the therapeutic modulation of endogenous neural stem and progenitor cells. *Clin Pharmacol Ther.* **82**:453-60 (2007).
7. Tsai, K.J., Tsai, Y.C. & Shen C.K. G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *J Exp Med.* **204**: 1273 -80 (2007).
8. Geraerts, M., Krylyshkina, O., Debyser, Z. & Baekelandt, V. Concise review: therapeutic strategies for Parkinson disease based on the modulation of adult neurogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **25**:263-70 (2007).
9. Singh, N., Pillay, V. & Choonara, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* **81**:29-44 (2007).
10. Takahashi, J. Stem cell therapy for Parkinson's disease. *Exp Rev Neurotherapeut.* **7**:667-75

(2007).

11. Dunnett, S. B. & Rosser, A. E. Stem cell transplantation for Huntington's disease. *Exp Neurol*. **203**:279-92 (2007).
12. Johann, V., Schiefer, J., Sass, C., Mey, J., Brook, G., Krüttgen, A., Schlangen, C., Bernreuther, C., Schachner, M., Dihné, M. & Kosinski, C. M. Time of transplantation and cell preparation determine neural stem cell survival in a mouse model of Huntington's disease. *Exp Brain Res*. **177**:458-70 (2007).
13. Roberts, T. J., Price, J., Williams, S. C. & Mado, M. Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* **139**:1187-99 (2006).
14. Galvin, K. A. & Jones, D. G. Adult human neural stem cells for autologous cell replacement therapies for neurodegenerative disorders. *NeuroRehabilitation* **21**:255-65 (2006).
15. Bachoud-Levi, A. C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Boisse, M. F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M. J., Bourdet, C., Remy, P., Cesaro, P., Hantraye, P. & Peschanski, M. Persistent benefit of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease six years after surgery. *Lancet Neurol*. **5**:303-9 (2006).
16. Furtado, S., Sossi, V., Hauser, R.A., Samii, A., Schulzer, M., Murphy, C. B., Freeman, T. B. & Stoessl, A. J. Positron emission tomography after fetal transplantation in Huntington's disease. *Ann Neurol*. **58**:331-7 (2005).
17. McBride, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E. Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N. & Kordower, J. H. Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol*. **475**:211-9 (2004).
18. Gaura, V., Bachoud-Levi, A. C., Ribeiro, M. J., Nguyen, J. P., Frouin, V., Baudic, S., Brugieres, P., Mangin, J. F., Boisse, M. F., Palfi, S., Cesaro, P., Samson, Y., Hantraye, P., Peschanski, M. & Remy, P. Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* **127**:65-72 (2004).
19. Hauser, R. A., Furtado, S., Cimino, C. R., Delgado, H., Eichler, S., Schwartz, S., Scott, D., Nauert, G.M., Soety, E., Sossi, V., Holt, D.A., Sanberg, P. R., Stoessl, A. J. & Freeman, T. B. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* **58**:687-95 (2002).
20. Rosser, A. E., Barker, R. A., Harrower, T., Watts, C., Farrington, M. Ho. A. K., Burnstein, R. M., Menon, D. K., Gillard, J. H., Pickard, J., Dunnett, S. B. & NEST-UK. Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report (ISRCTN no 36485475). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **73**:678-85 (2002).
21. Bachoud-Levi, A. C., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C.,

- Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B., Boisse, M. F., Grandmougin, T., Jeny, R., Bartolomeo, P., Dalla Barba, G., Degos, J. D., Lisovoski, F., Ergis, A. M., Pailhous, E., Cesaro, P., Hantraye, P. & Peschanski, M. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* **356**:1975-79 (2000).
22. Peters, C., Charnas, L. R., Tan, Y., Ziegler, R. S., Shapiro, E. G., DeFor, T., Grewal, S. S., Orchard, P. J., Abel, S. L., Goldman, A. I., Ramsay, N. K., Dusenbery, K. E., Loes, D. J., Lockman, L. A., Kato, S., Aubourg, P. R., Moser, H. W. & Krivit, W. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* **104**:881-8 (2004).
23. Moser, H. W. & Barker, P. B. Magnetic resonance spectroscopy: a new guide for the therapy of adrenoleukodystrophy. *Neurology* **64**:406-7 (2005).
24. Warren, D. J., Connolly, D. J., Wilkinson, I. D., Sharrard, M. J. & Griffiths, P. D. Magnetic resonance spectroscopy changes following haemopoietic stem cell transplantation in children with cerebral adrenoleukodystrophy. *Dev Med Child Neurol.* **49**:135-9 (2007).
25. Mahmood, A., Raymond, G. V., Dubey, P., Peters, C. & Moser, H. W. Survival analysis of Haematopoietic cell transplantation for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: a comparison study. *Lancet Neurol.* **6**:687-92 (2007).
26. Beam, D., Poe, M. D., Provenzale, J. M., Szabolcs, P., Martin, P. L., Prasad, V., Parikh, S., Driscoll, T., Mukundan, S., Kurtzberg, J. & Escolar, M. L. Outcomes of unrelated umbilical cord blood transplantation for X-linked adrenoleukodystrophy. *Biol Blood Marrow Transplant* **13**:665-74 (2007).
27. Klein, D., Schmandt, T., Muth-Kohne, E., Perez-Bouza, A., Segschneider, M., Gieselmann, V. & Brustle, O. Embryonic stem cell-based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy. *Gene Ther.* **13**:1686-95 (2006).
28. Biffi, A., Capotondo, A., Fasano, S., del Carro, U., Marchesini, S., Azuma, H., Malaguti, M.C., Amadio, S., Brambilla, R., Grompe, M., Bordignon, C., Quattrini, A. & Naldini, L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest.* **116**:3070-82 (2006).
29. Biffi, A., De Palma, M., Quattrini, A., Del Carro, U., Amadio, S., Visigalli, I., Sessa, M., Fasano, S., Brambilla, R., Marchesini, S., Bordignon, C. & Naldini, L. Correction of metachromatic leukodystrophy on the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* **113**:1118-29 (2004).
30. Gieselmann, V. Metachromatic leukodystrophy: recent research developments. *J Child Neurol.* **18**:591-4 (2003).
31. Matzner, U., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Coenen, R., Rothert, F., Mansson, J. E.,

- Fredman, P., D'Hooge, R., De Deyn, P. P. & Gieselmann, V. Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther.* **9**:53-63 (2002).
32. Matzner, U., Schestag, F., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., D'Hooge, R., De Deyn, P. P. & Gieselmann, V. Bone marrow stem cell gene therapy of arylsulfatase A-deficient mice, using an arylsulfatase A mutant that is hypersecreted from retrovirally transduced donor-type cells. *Hum Gene Ther.* **12**:1021-33 (2001).
33. Mazzini, L., Mareschi, K., Ferrero, I., Vassallo, E., Oliveri, G., Nasuelli, N., Oggioni, GD., Testa, L. & Fagioli, F. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci.* 2007 (in press).

第十一章

再生醫學之法令與規範

Regulations for Regenerative Medicine

王德原

行政院衛生署 藥物食品檢驗局

國立臺北科技大學 生物科技研究所

一、前言

每個人在一生中難免會經歷許多受傷、意外等狀況，嚴重者可能對身體器官組織產生不可回復的損壞。此外，當個體存在基因缺陷、體質差異等其他多種因素，亦常導致身體器官組織產生退化性病變或功能失常，幸運者在接受適當醫療照護後可順利恢復健康，然而有許多人卻受限於醫療技術的瓶頸，無法康復甚至失去生命。因此，找到可用以重建或更換病人受損器官組織之療法，自古以來即是再生醫學 (regenerative medicine)¹ 的終極目標。早自西元十六世紀義大利籍醫師 Tagliacozzi，便嘗試以患者正常手臂的皮膚肌肉，來重建其鼻部的壞死組織，此後至今近四百年時間，外科醫師因應病患需求建立解決病人重建器官組織需求的兩種模式，其一、為摘取捐贈者器官後，直接移植至患者體內以重建受損器官組織，但此種方式因異體移植引發的排斥作用，卻造成異體器官移植的極大困擾，且移植用器官來源極為有限更為問題核心。其二、外科醫師將病患需求結合化學與機械原理，以仿生工程學 (bionic engineering) 概念，設計與人體器官結構功能相仿的替代器官或組織 (prosthesis) 或替代組織^{2,3}，然而即便在機械電子科技十分發達的二十一世紀，仿生工程產品在臨床上之應用仍有其限制，通常在長期使用義肢後常會發現，其金屬或塑膠材質與人體組織相接處，因始終無法與身體組織融合，多出現組織發炎反應或纖維化構造。而仿生工程產品更因其本質上仍多為模擬人體活組織器官之機械裝置，在功能、結構或與人體組織相容性等方面，與真正人體器官差異頗大，此外，仿生工程產品亦有使用年限的問題須考慮，接受移植者往往需歷經多次外科手術更換新的替代物後，才能延續其使用價值。

相形之下，純粹以生物性基質材料與活細胞組合成之生物組織產品，在人體組織相容性、功能性與構造等方面和人體之配合度，遠非仿生工程產品所能相比，於再生醫學的應用上，更有其無可取代的獨特性^{2,3}。生物組織工程的發展，則以 1980 年代美國麻省理工學院生物系 Eugene Bell 博士的研究為代表，其利用所開發出之動物膠原蛋白純化技術以

及人體上皮細胞 (epithelial cells)、內皮細胞 (endothelial cells) 與纖維母細胞 (fibroblasts) 等多種成體細胞之體外培養技術，成功在實驗室中培養出皮膚類似物 (skin-equivalent)、人工血管、人工外耳、人工膀胱等組織工程人體器官的雛形^{4,5}，部份成果亦開始進行臨床測試，然而體外培養成體細胞在移植入人體後的存活率，以及如何有效誘導體外培養成體細胞皆能朝預設目標進行分化，仍為其中難以突破的關卡⁶。

近幾年來，世界各國在幹細胞 (stem cells) 領域的研究與生醫材料技術的不斷突破，顯示幹細胞實為再生醫學中，修補重建受損人體器官組織的最佳來源。幹細胞為一種同時具有自我更新 (self-renewal) 與分化效力 (potency) 的細胞，其中自我更新係指幹細胞可重複進行細胞分裂周期，且在細胞分裂後所生成的子代細胞中，至少有一個與母細胞相等之細胞，維持其原始特徵不進行細胞分化。幹細胞的分化效力則又可簡單區分為全能分化效力 (totipotent)、多元分化效力 (pluripotent)、多樣分化效力 (multipotent)、少樣分化效力 (oligopotent) 與單一分化效力 (unipotent) 等五種類型，totipotent 係指單一細胞即可分化成一完整個體的能力，如受精卵； pluripotent 則指具有分化成一個體所有細胞族系 (cell lineages) 能力的細胞，如 1995 至 1998 年間，美國科學家 J. A. Thomson 博士在實驗室內培養出靈長類與人體胚胎幹細胞，並成功驗證胚胎幹細胞具有 pluripotent 的特性^{7,8}； multipotent 代表具有分化成建構一或多種完整組織所需多種細胞族系的能力，如造血幹細胞即具備此種分化效力； oligopotent 則顯示具有分化成組成單一組織所需的二種或二種以上細胞族系的能力，如腦組織中的神經幹細胞等成熟器官組織內有限的成體幹細胞； unipotent 則指該細胞僅具備分化成單一細胞族系的能力，如精原細胞。幹細胞在高等多細胞生物由胚胎發育為成熟個體的過程中，扮演關鍵性的角色，即便在個體發育成熟後，目前研究業已證實成體幹細胞 (adult stem cells) 仍然普遍存在於個體多處組織與器官中，肩負以細胞更新及受傷修復等方式維持個體各個組織、器官衡定的重任，因此結合幹細胞培養與組織工程技術，將促使人體組織、器官的複製與再生，不再是遙遠的夢想，或許在不久的將來，人類器官都可以在實驗室培養，需要時再植回人體，修補缺損的器官，使量身訂制「器官」不再是遙不可及之夢想。

二、國際管理概況

將再生醫學相關技術落實於人用醫療產品後，不論是以體細胞體外培養後植入人體為主體之細胞治療產品 (cell therapeutic products)，或是移植用單純人體細胞與組織，甚至是結合生物基質、人體細胞與生長因子三者為一的組織工程醫療產品 (tissue engineered medical products, TEMPs)，在定義上皆屬於人體細胞組織產品 (human cells, tissues, and cellular and tissue-based products, HCT/Ps) 之一環，人體細胞組織產品依其細胞組織的來源不同，可再區分為自體 (autologous) 或異體 (allogeneic) 之人體細胞組織產品，以及異種移植產品 (xenogeneic)。而人體細胞組織產品因其來自人體不同部位之器官、組織

或細胞，因其在型態、生理特性與超微結構等方面之差異頗大，導致不同人體細胞組織產品之種類、功能與表現特徵特性亦各不相同，此外，若從藥品、生物藥品或醫材的角度來看，人體細胞組織產品其來源與量產規模迥異於現行藥品、生物藥品與醫材的管理模式，因此面對此等特殊狀況，迫使先進國家管理階層必須儘速發展一套新管理架構，以適時將正萌芽的此類新興生物科技產品產業導入適當的規範要求。

而為因應美、歐等國在幹細胞治療領域的研究發展迅速，美、歐各國皆已先後研究評估出其國內所需之管理機制，綜觀其管理概念，大概可歸納出二項重點，首先為考量不同人體細胞組織產品間在其類別、組成、特性、生物活性與臨床用途等方面皆有很大差異，因此依據產品風險高低採取分級分類的原則，大概已成為美國、歐洲等先進國家管理人體細胞組織產品的基本法則；再者，人體細胞組織產品的一大特徵即在於其產品原料來源含有人體細胞組織成份，甚至人體細胞組織產品即為人體器官組織之一部份或全部，因此人類傳染病及其病原體的篩檢與控管，以及處理過程中確保人體細胞組織產品未受微生物污染，更為各國在人體細胞組織產品原料、製程管制方面的重點項目。

以下分別以美國、歐盟與澳洲為例，簡要說明先進國家在再生醫學領域技術產品的管理現況。

1. 美國現行管理架構與執行概況

美國係全世界最早開始評估研究如何管理人體細胞組織產品的國家，亦為全世界最早開始正式執行管制措施的國家。因應再生醫學領域科技日新月異，亦伴隨幹細胞分離與體外培養技術的快速進步，美國在1990年代初期即有多項細胞治療與基因治療的人體試驗在知名大學醫學院或醫學中心進行，然而在90年代中期數起因實驗室操作不當導致受試者死亡事件，確也喚起美國國內消保團體的注意，要求聯邦政府必須對這些以人為實驗對象的試驗介入管理，因此美國食品藥物管理局（Food and Drug Administration, FDA）在國會要求下，開始進行研究，以評估如何將人體細胞組織類之研究與產品開發，納入FDA的管理架構中。FDA編制內負責生物科技產品檢驗管理單位，生物製劑評估研究中心（Center for Biological Evaluation and Research, CBER）便於1997年公告移植用人體組織管理草案⁹（21 CFR Part 1270, Human Tissues Intended for Transplantation），且在接受產、學、研、醫各界建議與試行一段時間後，於2001年再正式公告人體細胞組織產品管理法規¹⁰（21 CFR Part 1271, Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products），並於2005年5月25日正式實施，法規內容包含註冊列名登錄制度（registration and listing）、捐贈者合適性判定（donor eligibility）與現行人體細胞組織優良操作規範（current good tissue practice, CGTP）等三大部分，此外，CBER亦在2001年修訂21 CFR Part 600法規¹¹，正式將生物製劑類產品的定義擴大，以便將部分高風險性人體細胞組織產品納入生物藥品方式來管理。

21 CFR Part 1271法規之管轄範圍，在1997年之草案階段即以包含硬骨、韌帶、肌腱、軟骨、眼球組織、皮膚、動靜脈血管、心包膜、羊膜、腦硬膜、異體心臟瓣膜、細胞治療以及基因治療產品，而至2001年正式公告法規的範圍，更增加分離自周邊血液與臍帶血液之血液幹細胞與前趨細胞、精卵細胞以及胚胎組織，但是具有血管之器官 (vascularized organs)、經最小處理的骨髓 (minimally manipulated bone marrow)、異種組織細胞、血液製劑、人體分泌物或萃取物以及體外診斷試劑等，則排除在21 CFR Part 1271法規管轄範圍之外¹⁰。

CBER管理人體細胞組織產品之精神，在於依據美國公共衛生服務法第361與351章節定義，參照風險高低之不同，將該類產品區分為低風險性的361類產品 (PHS 361 HCT/Ps) 與高風險性的351類產品 (PHS 351 HCT/Ps)，其中低風險性產品如庫存之移植用人體組織細胞以及自體移植之周邊血液單核細胞等，須符合僅經由最小程度處理 (minimal manipulate)、為同源性使用 (homologous use)、產品不與其他藥物或醫療器材結合、自體移植或二等親內異體移植及不會在身體引發系統性作用等條件，且因此無新增之臨床安全顧慮，因此CBER依據21 CFR Part 1271法規之要求，建置註冊列名登錄制度，係CBER特別針對非屬醫療器材與生物藥品的低風險性人體細胞組織產品所創設的管理制度，此新制度透過要求機構、實驗室與保存庫透過每年向CBER更新登錄資料方式，配合FDA的CGTP查核，促使從事361類人體細胞組織產品業務的各機構與保存庫符合CGTP規範要求，進而達到確保人體細胞組織產品無散佈傳染病風險，亦無在處理過程中遭受污染的疑慮，而此種針對低風險性產品的管理，並無新增臨床風險的疑慮，因此僅對機構的設施與程序控管，未涉及產品本身的管理 (表一)¹²。而對於如細胞治療產品等高風險性人體細胞組織產品，則因其需在實驗室中進行體外培養、活化、增殖等程序，且在研發與製備過程中尚涉及自體、異體或異種細胞移植的議題，這些高風險性產品多用以治癒 (cure)、預防、(prevent) 診斷 (diagnose) 人類疾病，且通常兼具醫療技術與生物科技產品的二種性質，因此將此類351產品納入美國FDA/CBER現行生物藥品管理體系，除亦需符合CGTP規範規定以及在細胞組織捐贈者須完成特定傳染病項目的篩檢外，其製程尚需符合CGMP (current good manufacture practice) 的製造規範，且產品上市前需先經三階段臨床試驗評估其安全與效用，且亦須通過上市前生物藥品審核檢驗程序，以取得上市許可，與傳統疫苗、血液製劑等生物藥品相比，人體細胞組織物類製劑尚須依據CGTP規定，建立追溯機制，以利在發現捐贈者有散佈傳染病疑慮時，可立即通報產品接受者進行適當處置。21 CFR Part 1271法規的第二項重要規定，係為捐贈者合適性判定的細部規範，其適用於包含高低風險在內所有含有人體細胞組織成分的產品，規定這些產品的來源必須進行相關傳染病及其病原 (relative communicable disease agent and disease, RCDAD) 的篩檢，即所有人體細胞組織產品至少需進行B型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、C型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、第一與第二型人類後天免疫不全症候群病毒 (human immunodeficiency virus type 1 and type 2, HIV-1/2) 與梅毒 (*Treponema pallidum*) 的檢驗，並進行傳染性海綿狀

腦病變 (transmissible sponge-form encephalitis, TSE) 的病史審查，以避免散佈人類重大傳染病，若人體細胞組織產品屬於富含活體白血球類細胞組織，則尚需進行第一與第二型人類T細胞白血病毒 (human T cell leukemia virus type I and II, HTLV-I/II) 與巨細胞病毒 (cytomegalo virus, CMV) 二類病毒的檢驗，若為生殖組織類之人體細胞組織產品，則需加做HTLV-I/II、CMV二類病毒及衣原體 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病球菌 (*Neisseria gonorrhoea*) 的檢驗。

表一、美國現行之人體細胞組織產品管理架構¹²

人體細胞組織物	製程管制	臨床安全與效益評估	來源管制	批次放行 ²
361 HCT/Ps (Tissue Banks)	Registration & Listing CGTP	NA ¹	捐贈者合適性判定	不適用
351 HCT/Ps (Medical Devices)	CGTP QSR	IDE 510K, PMA	捐贈者合適性判定	不適用
351 HCT/Ps (Biologics)	CGTP CGMP	IND BLA	捐贈者合適性判定	免除

1. 依據FDA公告21 CFR 1271規定，純人體細胞組織 (361 HCT/Ps) 僅需由處理機構或保存庫向FDA註冊，經GTP查核後認可登錄，無須針對各純人體細胞組織進行產品管理。

2. 批次放行 (batch release) 制度為基於風險管理，對已取得上市許可生物藥品所執行之逐批審驗放行制度。

21 CFR Part 1271法規的第三項重要規定CGTP，係用以規範從事相關業務之機構，必須建立品質計畫，並對環境、設施、物料、製程、確效、貯存、標示、追蹤、記錄與運送等建立管制程序，以確保產品品質與效能。而21 CFR Part 1271法規最後內容，則賦予CBER進行機構查核的權利，且強制規定美國國內相關機構若明顯違反21 CFR Part 1271法規規定，CBER可直接處以產品回收、中止生產等強制處分，而機構負責人與品質主管將被處以最高一百萬美元之罰金與相關刑事處分。

2. 歐盟管理概況

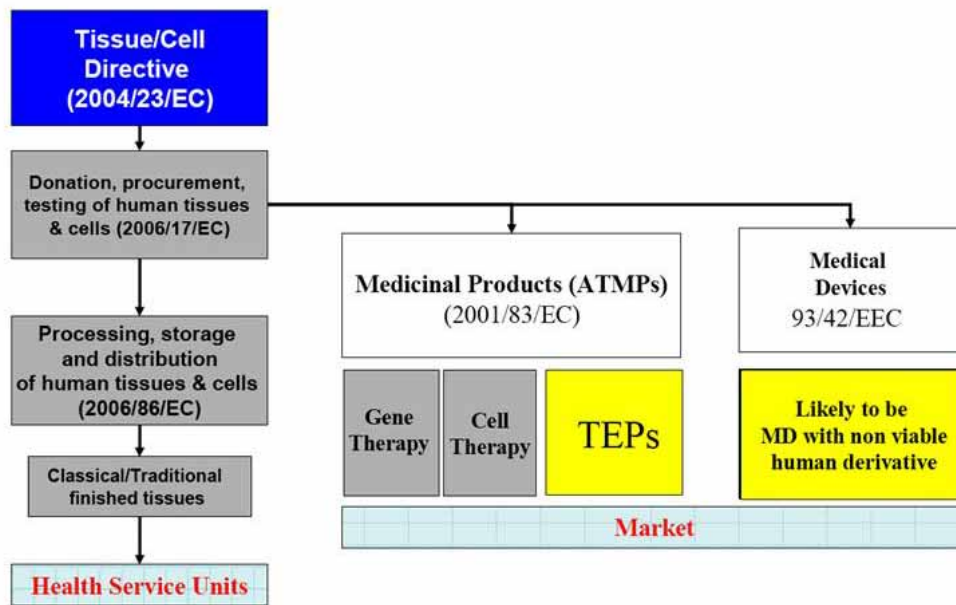
歐洲先進國家對於醫療用途人體細胞組織物的管理，歐洲議會執行委員會 (The European Parliament and of the Council) 於2004年發佈用於人體醫療用途之人體組織與細胞標準指令¹³ (Directive 2004/23/EC of The European Parliament and of The Council

on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells) , 對於機構的監督與管理機制、人體細胞與組織其捐贈、摘取、檢驗、處理、保存與配送相關之品質與最低安全性都有規定，歐盟並在 2006 年 2 月公告與捐贈、獲得、檢驗人體組織細胞有關之技術基準執行指令 (Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells)¹⁴，要求各會員國必須於 2006 年 11 月前，依據該指引完成各國國內相關立法工作。例如英國衛生部即於 2004 年公告人體組織法案 (Human Tissue Act)¹⁵，以因應人體器官組織管理需求。

歐盟人體醫療用途之人體組織與細胞標準指令¹³的主要內容，在建置人體組織細胞的捐贈、摘取、檢驗、保存、處理、貯存與運送之作業標準，其範圍涵蓋人體組織細胞，包括來自周邊血液、臍帶血液與骨髓之血液幹細胞、包含精卵之生殖細胞、胎兒組織與細胞 (fetal tissues and cells)、成體幹細胞 (adult stem cells) 以及胚胎幹細胞 (embryonic stem cells)。至於在同一次手術中用於自體移植的組織細胞、血液與血液成分物、與在捐贈者體內功能相同之移植用器官或部分器官，以及除臨床試驗外用於研究之人體細胞組織等，皆不受該指令之管轄。

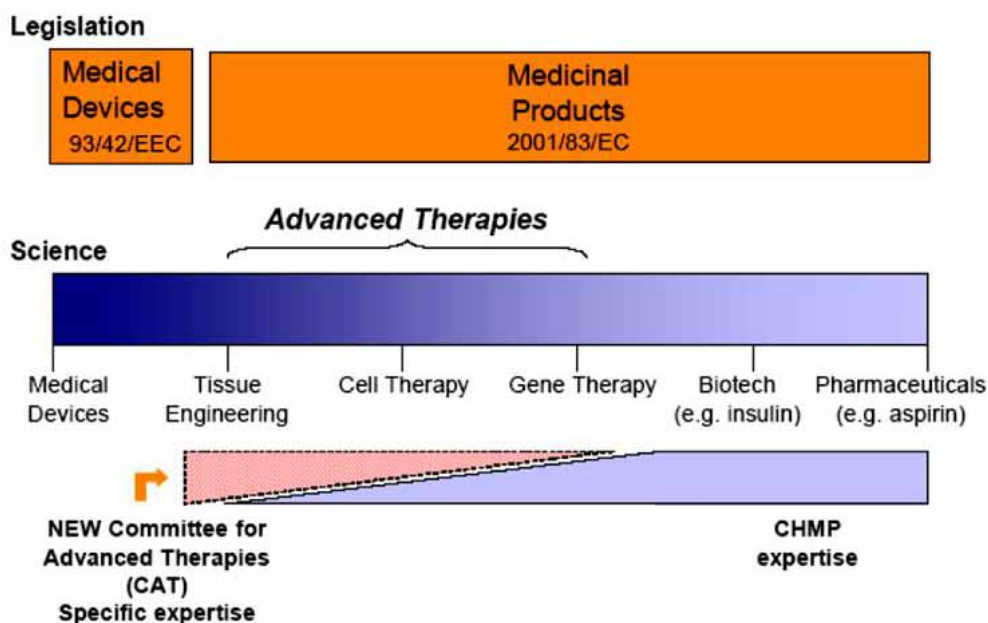
而該指令亦詳細說明捐贈者應施與篩檢之項目，對於所有人體細胞組織產品，皆須進行抗愛滋病抗體 (Anti-HIV-1 與 Anti-HIV-2)、B 型肝炎表面抗原與抗 B 型肝炎核心抗體 (HBsAg 與 Anti-HBc)、抗 C 型肝炎抗體 (Anti-HCV-Ab) 與梅毒的血清免疫學檢驗，此外，亦須針對人體細胞組織之性質，再行加做如 Rh 因子 (RhD)、組織相容性抗原 (histocompatibility antigen, HLA)、CMV、弓漿蟲病 (toxoplasma)、EB 病毒 (Epstein Barr virus, EBV)、*Trupanosoma cruzi* 等檢驗項目¹³。

歐盟指令亦賦予會員國將可對從事人體細胞組織產品相關機構進行查核的權利，但與美國 CBER/FDA 執行方式不同，歐盟國家多以授權民間發證機構 (Notified Body) 與認證組織 (Accreditation Organization) 來執行相關認證評鑑事務。



圖一、歐盟人體細胞組織產品管理架構¹⁶

然而僅以歐盟指令 Directive 2004/23/EC 的內容，仍僅限於對人體醫療用途之人體組織細胞的採集、篩檢、貯存等作業的規範，若要一體適用於所有類型的人體細胞組織產品，則對於高風險性細胞治療或組織工程等高階治療醫藥產品而言（advanced therapeutic medical products, ATMPs），仍有所不足，因此該指令除供移植用人體組織細胞作為處理規範外，對於含人體細胞組織成分的高階治療醫藥產品，該指令係作為該類產品在上游原料端的管制措施，以免人類傳染病的散佈，而這些高風險性高階治療醫藥產品仍須依其性質屬性，納入現行歐盟醫療器材或生物製劑類產品的管理途徑，以取得上市資格（圖一）¹⁶。而為因應此一需求，歐盟技術委員會預定在 2007 年底會召集科技專家成立新的委員會（Committee for Advanced Therapies, CAT），以討論介於醫療器材指令 93/42/EEC¹⁷（包含 class I、class IIA、class IIB 與 class III 四等級醫療器材產品）與醫藥產品指令 2001/83/EC¹⁸（包含一般藥品、基因工程製劑、生物藥品等）之間的細胞治療製劑、基因治療製劑以及組織工程醫藥產品等高階治療醫藥產品（圖二）¹⁶，如何修訂或增訂新的技術指令以因應未來歐盟會員國的需求，而預定之討論議題，包含了高階治療醫藥用品的涵蓋範圍、醫院排除條款、管理轉換過渡期程及結合型產品（Combination Products）管理方向。



圖二、歐盟高階治療醫藥產品管理架構¹⁶

3. 澳洲預定實施之管理架構

澳洲醫療用品管理局 TGA (Therapeutic Goods Administration)，為因應未來面對人體細胞組織產品的管理需求，在參考美國推行的分級分類管理原則後，亦於 2002 年公告 proposed rules，預定將人體細胞組織與細胞治療產品區分為三級管理¹⁹，其中 (a) 低風險之 class 1 級人體細胞組織產品係指非庫存之單純人體細胞組織，如自體移植用周邊血液單核細胞，(b) 中低風險之 class 2 級人體細胞組織產品，則為庫存之單純人體細胞組織；至於 (c) 高風險之 class 3 級人體細胞組織產品，則為非直接自捐贈者移植至患者的產品，且與非人體組織成分結合；或在患者體內產生藥理、化學或代謝效果；或已被處理至改變細胞組織原有特性；或在生產過程中，使用如單株抗體等生物性試劑參與細胞擴大 (expansion process) 或選擇 (selection process) 等程序之產品。其中 class 1 級人體細胞組織產品管理係以類似簡化之美國 361 類產品管理模式，須符合相當於 GTP 之規範標準；class 2 級人體細胞組織產品，則須符合相當於包含 GTP 標準在內之澳洲 GMP (good manufacture practice)，且保存庫通過檢查以取得 TGA 核發之許可執照；class 3 級人體細胞組織產品，除須符合相當於包含 GTP 標準在內之 GMP，其製造廠亦需取得 TGA 核發許可執照，且須提供相關產品文件以供 TGA 進行產品審核，確保品質、安全、效用無虞，以取得 TGA 核發上市許可 (表二)。

表二、澳洲預定實施之人體細胞組織產品管理架構

分級	產品特性	適用管理
Class 3	人體細胞組織產品並非直接自捐贈者移植至患者體內，且與非人體組織成分結合；或在患者體內產生藥理、化學或代謝效果；或已被處理至改變細胞組織原有特性；或在細胞增殖或選擇等生產過程中使用如單株抗體等生物性試劑之產品	須符合相當於包含GTP標準在內之GMP，製造廠需取得TGA核發許可執照，且須提供文件供TGA審核產品品質、安全、效用以取得上市許可
Class 2	不屬於class 3之人體細胞組織產品，且被庫存與保存庫中的產品	須符合相當於包含GTP標準在內之GMP，且保存庫需取得TGA核發許可執照
Class 1	不屬於class 3與class 2之人體細胞組織產品	須符合相當於GTP之規範標準

三、我國人體細胞組織產品管理架構與執行現況

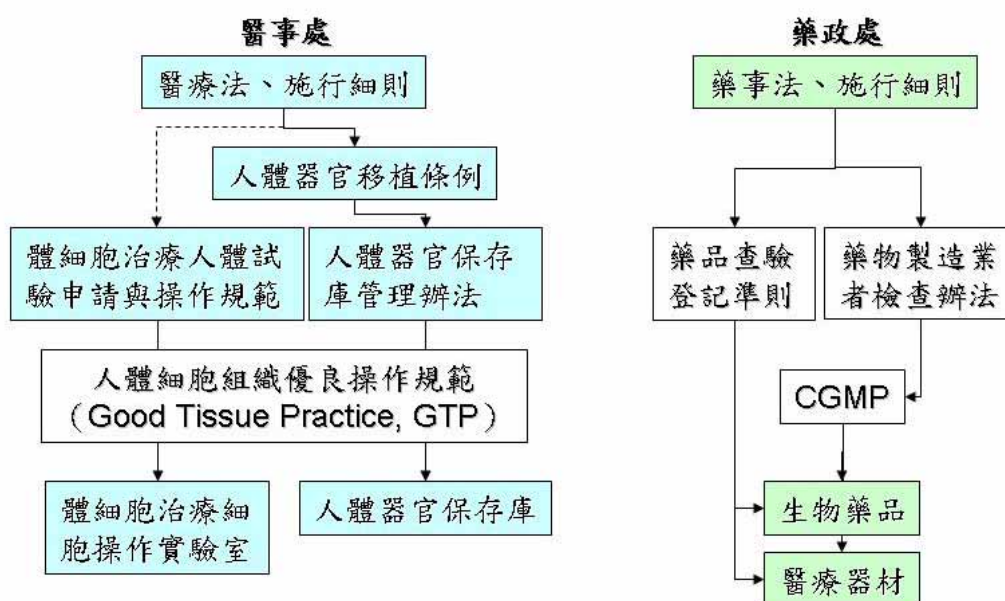
我國行政院衛生署為因應國內幹細胞與組織工程技術等再生醫學的臨床發展需求，亦順應國際新興生物科技產品管理趨勢，而為預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，於 2000 年 12 月公告人體細胞組織優良操作規範²⁰ (good tissue practice, GTP)，預定於公告二年後正式實施，以協助機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。我國之 GTP 與美國在 2005 年正式發佈實施之 21 CFR Part 1271 法案內容第三部分 CGTP 內容類似，亦適用於製造人體細胞組織產品所使用之方法、設施及管制措施，包括人體細胞組織提供者之篩檢與檢驗、人體細胞組織物之採集、處理、貯存、標示、包裝及配送等過程。

綜觀我國之人體細胞組織優良操作規範，其制定目的在於預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，並協助機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。而其範圍涵蓋骨骼、韌帶、皮膚、心瓣膜、眼角膜等人體組織、取自臍帶血或周邊血液之造血幹細胞、自體移植用之軟骨及合成基質上之上皮細胞以及精液或其他生殖組織等項目，惟生殖組織目前仍未包含在體細胞治療人體試驗之範圍，其係屬於人工生殖相關法令所管制。而我國人體細胞組織優良操作規範之例外項目，則包含使用於移植並帶有血管之人體器官、全血、血液成分血或血液衍生產品、乳汁、膠原及細胞因子等人體分泌物或抽取物、人體細胞組織物製造過程之輔助物、人類以外動物之細胞、組織或器官與體外診斷醫療器材。

我國之人體細胞組織優良操作規範內容包括總則、品質計畫、組織與人員、作業程序、設施與場所、環境管制與監控、設備、物料與試劑、製程管制、製程變更、製程確效、標示管制、貯存、收受與配送、紀錄、追蹤、怨訴檔案與附則在內共計拾捌章六十四條²⁰，其特色在於以品質管理系統為基本架構，意即規範機構必須建立品質計畫、制定作業程序並加強文件管理，以符合規範要求。此外，更以風險管理為特殊要求，規範機構必須預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，並透過建立捐贈者傳染病篩檢、細胞處理製程管制與確效、實驗室設施與設備之品質管制、細胞使用物料之品質管制、細胞無菌操作與處理程序之確效、細胞放行前檢驗項目與規格、產品標示與追蹤、對於細胞放行送後才獲得之不良檢驗結果的通報與補救程序等作業管制程序，進而協助機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。

配合我國人體細胞組織優良操作規範於 2004 年 12 月起正式實施，以及行政院衛生署醫事處（以下簡稱醫事處）為提升國內體細胞治療人體試驗案細胞處理實驗室品質需求，醫事處與行政院衛生署藥物食品檢驗局（以下簡稱藥檢局）著手共同研議，於 2005 至 2006 年辦理國內從事體細胞治療人體試驗細胞處理實驗室之輔導訪查作業，以瞭解國內細胞實驗室品質安全現況，並自 2007 年起正式對體細胞治療新醫療技術人體試驗案，規範申請機構之細胞處理實驗室需符合 GTP 規範以確保受試者安全，並可促使擬量產上市之高風險性細胞治療產品，建立未來管理機制運作模型，以作為整合國內新興高風險性人體細胞組織產品量產化上市查驗與 GMP 製程管制的管理雛型，並可加速法規管理國際化整合工作。

另一方面，為與人體細胞組織物未來國際管理趨勢接軌，醫事處亦開始評估將低風險性移植用人體器官保存業務納入適當管理機制，以妥善管理國內包含臍帶血庫在內之人體



圖三、我國現行人體細胞組織產品管理法源依據¹²

器官保存庫，並預定將人體細胞組織優良操作規範，作為人體器官保存庫之運作與品質管理依據，而為完善相關法制程序，醫事處援引人體器官移植條例²¹第14條第1項授權，已制定人體器官保存庫管理辦法(草案)²²，除提供人體細胞組織優良操作規範之母法依據(圖三)¹²，亦將在辦法正式公告後，實施人體器官保存庫之設置登記與現場查核作業，確保人體器官保存庫庫存細胞組織的品質與安全。

此外，行政院衛生署藥政處(以下簡稱藥政處)已於94年2月16日衛生署公告藥事法施行細則修正案，將施行細則第35條條文內容刪除生物藥品為依據微生物學、免疫學學理製造之血清、抗毒素、疫苗、類毒素及菌液等產品之基本定義，亦即不再對生物藥品涵蓋範圍設限，因此將細胞治療產品納入生物藥品管理模式已無適法性問題，顯示藥政處已著手建立細胞治療產品三階段GMP製程管理與上市查驗登記體系，此一程序已為高風險性、以幹細胞與組織工程技術為主體之細胞治療產品開創量產化上市的途徑，並加速其商品化過程以及建立產品管理國際化制度。

至此我國人體細胞組織產品之管理架構，業已具備類似美國、歐盟與澳洲等先進國家的管理雛型(表三)¹²，惟臺灣與前述先進國家不同處，在於目前的管理職權分散在衛生署所屬醫事處與藥政處等不同行政單位，而相關管理辦法、法規亦呈片段式分散於前述單位中，因此存在管理權責混淆不明、臨床試驗與安全評估等管制程序重複設置等隱憂，亟待更進一步系統性整合，以利醫療機構、藥商與藥物製造廠以及新興生物科技產業能一體適用，促進產業發展。

表三、我國人體細胞組織產品管理架構與現況¹²

管理類別	管理屬性	製程管制	臨床安全	管理	來源管制
體細胞治療 人體試驗	新醫療技術	GTP	計畫書	醫審會 審議	捐贈者篩檢
人體器官保存庫	純人體細胞 組織	GTP	無	保存庫設 置登記 ¹	捐贈者篩檢
含人體細胞組織 成份醫療器材	醫療器材	醫材GMP GTP?	臨床試驗	醫材分級 查驗登記	捐贈者篩檢
含人體細胞組織 成份生物藥品	生物藥品	藥品GMP GTP?	臨床試驗	生物藥品 查驗登記	捐贈者篩檢

1. 人體器官保存庫設置登記與現場查核作業預計在衛生署公告人體器官保存庫管理辦法後正式實施。

四、結語

醫療用途之人體細胞組織產品，將其捐贈者篩檢、採集、處理、儲存檢驗予配送等程序納入品質管理系統以維護產品之安全、品質與效用，並避免散佈傳染病病原，已成為各

先進國家新興醫藥管理之重要課題，而為因應緊急醫療之無國界需求，各國對於人體細胞產品的管理亦快速朝全球化調和方向前進，而臺灣在此新興生物技術醫療技術與產品管理全球化趨勢中，亦須急起直追，以免再次落於全球化整合之外。雖然我國已自 91 年底公告人體細胞組織優良操作規範，但目前仍處於起步推動階段，對於人體細胞組織產品之管理，美國、歐盟與澳洲經驗可供作國內主管單位之管理借鏡，其中將相關產品依據其風險高低，實施分層分類管理已成為全球共通化的管理趨勢，而針對人體細胞組織特性與具有感染、散佈人類傳染病之潛在威脅，替從事相關業務機構制定一套特殊品質管理規範（如 GTP 或特殊 GMP）並落實推動，亦為各先進國家主管機關的重要責任。

而在此全球化調和過程中，我國對於人體細胞組織產品的管理模式，業已朝向高低風險分類分級管理的方向演進，惟與美、澳等國不同的是，在現行衛生署管理架構下，高風險性細胞治療產品若被視為新醫療技術，則需向醫事處申請體細胞治療人體試驗之驗證療效的程序，然其若能被認定為產品，則可向藥政處申請新藥上市查驗前三階段臨床試驗，具備量產上市的可能。然而細胞治療等人體細胞組織產品，係同時具備新醫療技術與產品之雙重特性，較難以明確分割為技術或產品之分際，現行架構實足令國內生技業者與醫療體系對細胞治療產品適法性發展方向無以適從，因此將現行醫事與藥政體系管轄之人體/臨床試驗體系之整合（第一與第二階段臨床試驗）與方向重新劃分（第三階段臨床試驗），或許是未來人體細胞組織產品在國內完整法制化過程中需整合討論的重要方向，以健全國內相關管理體系，並能與國外管理制度銜接，達成醫療產業全球化目標。

五、參考文獻

1. [http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative Medicine 2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative%20Medicine%202006.pdf).
2. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**:920-926 (1993).
3. Strain, A. J. & Neuberger, J. A bioartificial liver - state of the art. *Science* **295**:1005-1009 (2002).
4. Vacanti, J. P. & Langer, R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354**:si32-34 (1999).
5. Weinberg, C. B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**:391-400 (1986).
6. Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. *Science* **295**:1009-1014 (2002).
7. Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A. & Hearn, J. P. Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line. *Proceeding the National Academy of Science* **92**:7844-7848 (1995).

8. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147 (1998).
9. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 1270 Human Tissue Intended for Transplantation, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (1997).
10. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 1271 Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-based Products, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2006).
11. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 600 Biological Products General, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2001).
12. 王德原。96 年度出階臨床試驗訓練課程：細胞治療產品與 GTP 規範。財團法人臺灣醫界聯盟基金會 (2007)。
13. Directive 2004/23/EC of The European Parliament and of The Council. On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union* **7.4**:48-58 (2004).
14. Commission Directive 2006/17/EC. Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union* **9.2**:40-52 (2006).
15. Human Tissue Act. Human Tissue Authority (2004).
16. Brown, P. Cell Therapy Liaison Meeting. Annual Meeting of International Society for Cell Therapy (2007).
17. Council Directive 93/42/EEC. Concerning Medical Devices (1993).
18. Directive 2001/83/EC. The European Parliament and of The Council. On the community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal of the European Union* **28.11**:67-128 (2001).
19. Therapeutic Goods Administration. Summary of Proposed Framework for the Regulation of Cell and Tissue Therapies (2004).
20. 衛生署，2002 年，人體細胞組織優良操作規範，衛署醫字第 0910078677 號公告。
21. 衛生署，2002 年，人體器官移植條例，總統華總（一）義字第 091001377790 號令。
22. 衛生署，2002 年，人體器官保存庫管理辦法（草案），衛署醫字第 0950209600 號公告。

作者簡歷

劉華昌

現任：

臺大醫學院骨科部教授

最高學歷：

日本東京大學臨床醫學研究所博士

經歷：

臺大醫學院外科教授

臺大醫院門診部主任

臺大醫學工程研究所首任所長

臺大醫學工程研究所教授(合聘)

E-mail : hcliu@ntuh.gov.tw

吳耀銘

現任：

臺大醫院外科部主治醫師

臺大醫學院外科部兼任助理教授

最高學歷：

臺大醫學院醫學系

經歷：

臺大醫院外科部住院醫師

美國紐約 Albert Einstein 醫學院肝臟研究中心研究員

美國匹茲堡大學肝臟移植中心臨床研究員

E-mail : wyaoming@gmail.com

李宣書

現任：

臺大生物科技研究所副教授/臺大醫院內科部主治醫師

最高學歷：

臺灣大學臨床醫學研究所博士

經歷：

臺大醫學院臨床副教授

臺灣大學生物科技研究所

E-mail : benlee@ntu.edu.tw

李伯皇

現任：

臺大醫學院外科教授

臺大醫院外科部主任

最高學歷：

臺大醫學系

臺大醫學院臨床醫學研究所博士

經歷：

美國賓州匹茲堡大學器官移植研究員

陳旭照

現任：

馬偕醫院神經外科主治醫師

最高學歷：

臺大醫學系

臺大醫學院解剖學暨細胞生物學研究所博士

班肄業

經歷：

臺大醫院外科部住院醫師

E-mail : chen.shiuiau@msa.hinet.net

錢宗良

現任：

臺大醫學院解剖學暨細胞生物學研究所教授

最高學歷：

美國哥倫比亞大學病理學博士

經歷：

日本東京大學細胞生物學暨解剖學研究所客座研究員

臺大醫學院解剖學暨細胞生物學研究所副教授

E-mail : chien@ntu.edu.tw

楊卿堯

現任：

臺大醫院外科部主治醫師（主攻胰臟外科及胰島細胞移植及治療）

最高學歷：

臺北醫學大學醫學系

臺大醫學院毒理學研究所（癌症與分子訊息傳遞實驗室）博士班肄業

經歷：

臺大醫院外科住院醫師/總醫師

臺大醫院創傷醫學部主治醫師

美國佛羅里達邁阿密大學胰島移植中心研究員/糖尿病研究院轉譯醫學研究實驗室研究員

美國佛羅里達傑克遜紀念醫院研修醫師

田郁文

現任：

臺大醫院外科部主治醫師

臺大醫學院外科副教授

最高學歷：

臺大醫學院臨床醫學研究所博士

經歷：

美國南加州大學臨床研究員

張至宏

現任：

亞東醫院外科主任

最高學歷：

臺灣大學醫學工程研究所博士

經歷：

亞東紀念醫院骨科主任

亞東紀念醫院骨科主治醫師

臺大醫院骨科部研究員

臺大醫院骨科部總醫師

臺大醫院骨科部住院醫師

E-mail : Orthocch1@so-net.net.tw

張志豪

現任：

臺大醫院骨科主治醫師

最高學歷：

臺灣大學醫學系

臺灣大學醫學工程研究所博士班肄業

經歷：

宜蘭羅東博愛醫院骨科主任

中華民國關節重建醫學會監事、秘書長

E-mail : mike920@ha.mc.ntu.edu.tw

王文志

現任：

恩主公醫院骨科主治醫師

最高學歷：

臺灣大學醫學工程研究所博士班肄業

經歷：

亞東紀念醫院外科部住院醫師

臺大醫院骨科住院醫師

臺大人工關節置換研究員

苗栗弘大醫院主治醫師

佑群骨科診所主治醫師

E-mail : chih23@pchome.com.tw

李裕滄

現任：

敏盛醫院骨科主任

最高學歷：

臺灣大學醫學工程研究所博士班肄業

經歷：

中華民國骨科專科醫師

臺大醫院骨科部主治醫師

敏盛綜合醫院骨科主任

E-mail : paxylee@ms23.hinet.net

陳盈憲

現任：

臺大醫院內科總住院醫師

臺大醫院心臟內科研究員

最高學歷：

慈濟大學醫學院醫學系

經歷：

臺大醫院內科總醫師

E-mail：indiglo314@gmail.com

李啟明

現任：

臺大醫學院內科臨床副教授/主治醫師

最高學歷：

臺灣大學臨床醫學研究所博士

經歷：

臺大醫院內科部主治醫師

美國國家衛生研究院進修

臺大醫院內科部住院醫師

E-mail：chiiminglee@ntu.edu.tw

陳敏慧

現任：

臺大醫院牙體復形美容牙科主任

臺大醫學院臨床牙醫研究所副教授

最高學歷：

紐西蘭奧克蘭大學生物醫學材料工程學博士

經歷：

臺大醫院牙科住院醫師總醫師

馬偕醫院分院牙科主任主治醫師

美國凱斯西儲大學教學醫院研究員

紐西蘭奧克蘭大學研究員

中華民國牙體復形學會理事長

E-mail：minhueychen@ntu.edu.tw

王一中

現任：

臺大醫院眼科部主治醫師/臨床副教授

最高學歷：

臺大醫學院臨床醫學研究所博士

經歷：

臺大醫院住院醫師及總醫師

美國辛辛那提大學醫學院眼科研究助理教授

E-mail：ijong@ms8.hinet.net

葉龍坤

現任：

林口長庚醫院眼科部主治醫師/臨床助理教授

最高學歷：

臺大醫學院解剖學暨細胞生物學研究所博士

班肄業

經歷：

臺北榮民總醫院住院醫師及總醫師

桃園榮民醫院主治醫師

林口長庚醫院眼科部角膜科臨床研究員

林口長庚醫院眼科部角膜科主治醫師

美國邁阿密大學 Bascom Palmer 眼科中心研究助理教授

E-mail：lkyeh@ms9.hinet.net

蔡瑞芳

現任：

蔡瑞芳眼科診所院長

臺北醫學大學研究所教授

最高學歷：

高雄醫學大學醫學系

經歷：

林口長庚醫院住院醫師及總醫師

林口長庚醫院眼科部主任兼角膜科主任

長庚大學醫學系眼科學教授

美國邁阿密大學 Bascom Palmer 眼科中心研究助理教授

E-mail：raytsai.tpei@msa.hinet.net

林頌然

現任：

臺灣大學醫學工程研究所助理教授
臺灣大學醫學院皮膚科助理教授(合聘)
臺大醫院皮膚部主治醫師

最高學歷：

臺灣大學醫學工程研究所博士

經歷：

臺灣大學醫學院皮膚科兼任助理教授
臺灣大學醫學院皮膚科兼任講師
臺大醫院皮膚部住院醫師
署立雲林醫院皮膚科兼任主治醫師
臺大醫院雲林分院皮膚科兼任主治醫師
臺灣皮膚醫學會專科醫師臺灣皮膚醫學會會員
臺灣再生醫學學會會員

E-mail：drsilin@ntu.edu.tw

詹智傑

現任：

臺大醫院雲林分院皮膚部主治醫師

最高學歷：

臺灣大學醫學系

經歷：

臺大醫院皮膚部住院醫師
臺大醫院皮膚部總醫師
臺大醫院皮膚部兼任主治醫師

E-mail：niveachan@gmail.com

許致榮

現任：

臺大醫院 皮膚部主治醫師
臺大醫院 形體美容中心主治醫師
最高學歷：中國醫藥大學醫學系畢

經歷：

臺大醫院 神經部住院醫師
臺大醫院 皮膚部住院醫師
臺大醫院 皮膚部總醫師
臺大醫院 皮膚部及形體美容中心主治醫師

日本東京國立國際醫療中心 再生醫學研究部研究員

E-mail：Derma007@hotmail.com

李旺祚

現任：

臺大醫院小兒部主治醫師

最高學歷：

臺大醫學系
臺大臨床研究所博士

經歷：

臺大醫院小兒部住院醫師
臺大醫院小兒神經科研究員
美國賓州大學費城兒童醫院研究
美國國家衛生院老化中心神經科學研究室研究

加拿大多倫多病童醫院小兒癲癇科研究

E-mai：leeped@hotmail.com

王德原

現任：

行政院衛生署藥物食品檢驗局第二組第三科科長

國立臺北科技大學生物科技研究所兼任助理教授

最高學歷：

長庚大學基礎醫學研究所博士

經歷：

行政院衛生署藥物食品檢驗局第二組代理科長

行政院衛生署藥物食品檢驗局第二組技正

行政院衛生署藥物食品檢驗局第二組技士

E-mail：dywang@nlf.gov.tw

索引

A.		beta amyloid plaque 澱粉樣蛋白斑	132
adenovirus 腺病毒	133	biocompatibility 生物相容性	117
adipocytes 脂肪細胞	94	biodegradable materials 生物可解性材料	98
aerobic 需氧	40	biomaker 生物標誌	64
agarose 洋菜膠	60	biomaterials 生醫材料	96
albumin 白蛋白	20	bionic engineering 仿生工程學	143
alginate 褐藻膠	60,66	biventricular pacing 雙心室節律器	73
alkaline phosphatase (ALP)鹼性磷酸酶	66,67	blastocyst 囊胚	76,92,108
allograft 異體移植	20,92	blood-brain barrier 血腦屏障	129
alloimmune 異體免疫	15,16	bone morphogenetic protein (BMP)	6,61,67
allotransplantation 異體胰島移植	36,40,41	骨形態發生蛋白	
Alzheimer's disease 阿茲海默症	2,132	brain derived neurotrophic factor (BDNF)	51
amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	138	腦衍生神經滋養因子	
肌萎縮性側索硬化症		BrdU 溴化去氧尿嘧啶	51,52,112
anaerobic 厭氧菌	40	bud stage 苞狀期	97
androgenetic alopecia 雄性禿	123	bulge 毛囊膨脹區域	120
anticipation 前發現象	134	C.	
Anti-HBc 抗 B 型肝炎核心抗體	148	cancellous bone 鬆質骨	9
apoptosis 細胞凋亡	75	cap stage 帽狀期	97
aromatic L-amino acid decarboxylase	133	caspase 蛋白水解酶	23
芳香族胺基酸脫羧基酶		caudate nucleus 尾狀核	134
articular cartilage 關節軟骨	94	cell 細胞	
artificial skin 人造皮膚	117	acinar 外分泌腺細胞	38
astrocytes 星狀細胞	129,130	antigen-presenting 抗原表現細胞	21
autograft 自體移植	92	basal 基底細胞	115
autoimmune 自體免疫	36	bone marrow stromal 骨髓基質細胞	58
autotransplantation 自體移植	43	donor 捐贈細胞	108
axons 軸突	129	ductal 胰管細胞	38
B.		endothelial 內皮細胞	21,144
bare-metal stent 非塗藥支架	79	epithelial 上皮細胞	95,144
basic fibroblast growth factor (bFGF)	3,64	enamel 牙釉質上皮細胞	98
鹼性纖維母細胞生長因子		oral 口腔上皮細胞	99
bell stage 鐘形期	97	islet 胰島細胞	16

Kupffer Kupffer 氏細胞	17,18	dentinogenesis 牙本質再生	100
neuroglial 神經膠原細胞	129,130	dermal papilla 真皮乳頭細胞	123
satellite 衛星細胞	75,109	dermis 真皮層	116
cell cycle 細胞週期	18	Descemet's membrane 德斯密氏膜	105
cell fusion 細胞融合	74,77	diabetes mellitus 糖尿病	2
cell line(s) 細胞系 (株)	50,92	differentiation 細胞分化	64
cell lineage 細胞 (族) 系	108,144	DNA demethylating agent	74
cell therapeutic products 細胞治療產品	144	去氧核糖核酸去甲基化劑	
cell therapy 細胞療法	35,73,82,94	donor eligibility 捐贈者合適性判定	145
cellulose 纖維素	66		
cementum 牙骨質	97	E.	
ceramic 陶瓷	66	ectoderm 外胚層	96
chitosan 幾丁聚醣	60,66,121	ectodermal organ 外胚層器官	116
chondroblast 軟骨母細胞	66	Edmonton protocol 艾德蒙頓模式	36,42,43
cholinergic system 乙醯膽鹼系統	132	ELISA 酵素免疫分析法	26
cholinesterase inhibitors	132	embryonic antigen 胚胎抗原	76
乙醯膽鹼分解酶抑制劑		enamel 牙釉質	97,98
chondrocyte(s) 軟骨細胞	57,94	encephalopathy 腦病變	25
chondrogenesis 軟骨再生	95	endothelium 內皮細胞	105
chronic total occlusion 慢性血管全阻塞	81	engraftment 嵌入	16,43
cleft lip and cleft palate 唇顎裂	91	epidermal growth factor (EGF)	3,47,51,64
CMV 巨細胞病毒	147,148	表皮細胞生長因子	
collagen 膠原蛋白	5,8,38,60,63,64,66	epidermis 表皮層	115
collagen matrix 膠原蛋白基質	118	epithelium 上皮	105
coral 珊瑚	66	eschar 焦痂	116
(corneal) limbus 角膜輪部	105,109	erythropoietin 紅血球生成素	52
corneal stromal keratocyte 角膜基質層細胞	112	extracorporeal membrane oxygenation	9
corneocyte 角質細胞	115	(ECMO) 葉克膜體外維生系統	
cytokines 細胞素	110		
current good manufacture practice (CGMP)	146	F.	
現行優良生產規範		fibrin 纖維蛋白	60
current good tissue practice (CGTP)	145-147,151	fibroblast 纖維母細胞	63,64,75,82,116,144
現行人體細胞組織優良操作規範		fibroblast growth factor (FGF)	5,47,51,61
		纖維細胞生長因子	
D.		fibrocartilage 纖維軟骨	8,94
dendrites 樹突	129	fibrous septum 纖維隔板	116
dentin 牙本質	97	floating culture 懸浮培養	125

制因子		dopaminergic 多巴胺神經元	129
levodopa 左多巴	133	motor 運動神經元	129,138
liberase 消化酵素	36	neurogenesis 神經新生	51
Lorenzo's Oil 羅倫佐油	136	niche 利基	109
lysosome 溶酶體	137		
M.			
mandible 下顎骨	95	odontoblasts 牙本質母細胞	100
matrix 間質組織	64	oligodendrocytes 寡樹突細胞	129,130
collagen 膠原蛋白基質	118	omentum 繫膜	98
extracellular (ECM) 細胞外基質	5,60,92,109	oral cancer 口腔癌	91,96
melanin 黑色素	115	oral-maxillo-facial diseases 口腔顎顏面疾病	91
melanocyte 黑色素細胞	115	orthopaedics 骨科	57
melanosome 黑色素小體	115	ossification 骨化作用	9
melatonin 褪黑激素	132	endochondral 內軟骨骨化作用	94
mesoderm 中胚層	97	osteoarthritis 退化性(骨)關節炎	2
metabolic lability 代謝不穩定	41	osteoblast 骨母細胞	66,94
metachromatic leukodystrophy 異染性白質退化症	136	osteopontin 造骨蛋白	3,66
microenvironment 微觀環境	109	outer root sheath 毛囊外根鞘	120
microglia 微神經膠細胞	129,130	P.	
mitosis 有絲分裂	60	pacemaker function 節律功能	76
monoamine oxidase inhibitor 單胺氧化酶抑制劑	132	paracrine 旁分泌	74,77,78
multicellular spheroids 多細胞球	121,125	Parkinson's disease 巴(帕)金森氏症	2,47
muscular dystrophy 肌肉營養不良症	2	peroxisome 過氧小體	135
myocardial infarction 心肌梗塞	2,78~80	phenobarbital 苯巴比妥	20
myocytes 肌肉細胞	94	phototherapy 光照治療	120
N.			
nanobiotechnology 奈米生物技術	91	plasticity 可塑性	108
nanotechnology 奈米技術	92	platelet-derived growth factor (PDGF) 血小板生長因子	3,61
nerve growth factor (NGF) 神經生長因子	51,132	pluripotent 複效性	1,92,109,131,144
neural crest 神經嵴	95	polyglutamine 多麩胺酸	134
neurofibril 神經纖維束	132	polyglycolate 聚甘醇酸	6
neurofibrillary tangles 神經纖維糾結	132	polylactate 聚乳酸	6
neuron(s) 神經元	94	polystyrene 聚苯乙烯	10
		potency 分化效力	144
		proangiogenic factors 促進血管形成生長因子	74
		progressive bulbar palsy 漸進延髓無力症	138

progressive spinal muscular atrophy	138	cardiac 心臟幹細胞	73
漸進性脊髓肌肉萎縮症		adult 成人心肌幹細胞	75
proliferation 繁殖	16,17	cord blood 臍帶血幹細胞	3
proteoglycans 多醣蛋白體	8,95	corneal epithelial 角膜幹細胞	109
pulp 牙髓	97	embryonic 胚胎幹細胞	4,50,75,131,148
pyrogenicity 熱原測試	40	embryonic carcinoma 胚胎癌幹細胞	75
R.		hematopoietic 造血幹細胞	74,77,79,93,131
regeneration 再生	43	limbal 角膜緣幹細胞	110
hair follicle 毛囊再生	123	mesenchymal 間葉幹細胞	9,73,74,94,131
neural 腦神經再生	47	bone marrow 骨髓間葉幹細胞	2,50
salivary gland 唾液腺再生	96	multipotent 多效性幹細胞	93
temporomandibular joint 顳顎關節再生	96	neural 神經幹細胞	129
regenerative medicine 再生醫學	1,57,91,105	adult 成人神經幹細胞	50
	115,143	endogenous 內源性神經幹細胞	51
repopulation 再增生	20	fetus 胎兒神經幹細胞	50
rigidity 僵直	133	periodontal 牙周幹細胞	100
RT-PCR 反轉錄聚合酶連鎖反應	26,66,95	pluripotent 複效性幹細胞	131
		pulp 恆牙牙髓幹細胞	100
S.		tissue-specific 特定組織幹細胞	108
salivary gland hypofunction 唾液腺功能不全	91	sterility 無菌測試	40
scaffold 支架	57,63,91,117	steroid 類固醇	26
sickle cell-anemia 鎌狀細胞貧血症	2	striatum 紋狀體	134
silk 蠶絲	66	stroma 基質層	105
skeletal myoblast 骨骼肌母細胞	75	subchondral bone 軟骨下層硬骨	8,9,94
skin appendage 皮膚附屬器	115,116	subcutaneous tissue 皮下組織	116
skin-equivalent 皮膚類似物	144	substantia nigra 黑質區	50
somatostatin 體抑素	38	subventricular zone 次腦室區	51
somatotropin 促進生命體生長蛋白	1	T.	
spinal injury 脊椎損傷	2	telomere 端粒	2
ST-elevation myocardial infarction	78~80	temporomandibular joint disorder	91
急性心肌梗塞		顳顎關節障礙	
Stem Cell(s) 幹細胞	6,24,43,91,92,144	tetracycline 四環素	20
adult 成體幹細胞	93,144,148	teratocarcinomas 變形成癌細胞	108
bone marrow 骨髓幹細胞	73	tissue engineering 組織工程	57,117
autologous 自體骨髓幹細胞	79	tissue formation template 組織形成模版	64
cancer 癌症幹細胞	96	The European Parliament and of	147,148

the Council 歐州議會執行委員會	
The New England Journal of Medicine (NEJM) 新英格蘭醫學期刊	35,36,42
therapeutic cloning 治療性複製	112
tolerogenicity 高免疫耐受性	21
tooth bud 牙胚	96
totipotency 全能分化	108
totipotent 全效性	1,92,144
toxoplasma 弓漿蟲病	148
transcription factor 轉錄因子	75
trans-differentiation 細胞轉分化	74,77,96
trans-endocardial injection 經心內膜注射	76
transforming growth factor- β 1 (TGF- β (1)) (第一)轉化生長因子- β	6,51,61 64,95
transplantation 移植	15,35,40
tremor 震顫	133
tyrosine hydroxylase 酪胺酸水解酶	133

U.

umbilical cord blood cell 臍帶血細胞	50
unipotent 單效性	1,144

V.

vascular endothelial growth factor receptor (VEGF) 血管表皮生長因子	51
very long-chain fatty acids 超長鏈脂肪酸	135
vitiligo 白斑	119

X.

xenogeneic 異種的	144
xenogenic hepatocytes 異種肝細胞	24
xenotransplantation 異種器官移植	43

版權頁

再生醫學

發行單位：教育部顧問室「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」幹細胞與組織工程教學資源中心

發行人：幹細胞與組織工程教學資源中心主持人 錢宗良

地址：100 臺北市中正區仁愛路一段一號六樓 幹細胞與組織工程教學資源中心

電話：02-23123456 分機 8193

傳真：02-23915292

作者：劉華昌、吳耀銘、李宣書、李伯皇、楊卿堯、田郁文、陳旭照、錢宗良、張至宏、張志豪、王文志、李裕滄、陳盈憲、李啟明、陳敏慧、王一中、葉龍坤、蔡瑞芳、林頌然、詹智傑、許致榮、李旺祚、王德原

顧問：計畫總辦公室—吳總主持人金洌教授、黃協同主持人慶璦教授、呂協同主持人紹俊副教授

教育部顧問室—張召集人文昌教授、林諮議委員榮耀教授、楊諮議委員照雄教授、宋諮議委員賢一教授、高諮議委員景輝教授、胡小姐郁芬

編審委員：臺灣大學鄭登貴教授、臺北醫學大學施子弼教授、臺灣大學醫學院何弘能教授、成功大學謝清河助理教授、中央研究院沈家寧博士、中央研究院郭紘志博士、臺北醫學大學附設醫院蔣永孝主任、國家衛生研究院邱英明主任、工業技術研究院陳婉昕研究員

總編輯：劉華昌、錢宗良

助理編輯：陳佩芬、韓善國、吳少文、曾唯嘉、林宗逸、侯珮珊

出版日期：民國 97 年 2 月