

無特定病原蠶作為生物醫材之研發 及應用

林孟均¹、詹雲貞¹、張晃猷²、盧美君^{1*}

摘要

家蠶為高蛋白生產潛能的模式生物，可用來量產特定用途的目標蛋白，作為醫療保健及生物醫材等用途。為建立符合世界衛生組織生物原料優良製作規範等相關國際法規之高規格動物原料，本場歷經 8 年研發 (98-105 年)，完成家蠶無特定病原 (specific pathogen free) 生產體系，包括種原消毒、環控飼育技術及 8 種主要病原檢測技術等，成功研發出可全齡飼育之人工飼料配方，搭配適性品系育種，健蠶率可達九成以上。此外，進一步應用蠶絲做為傷口敷料及藥物載體 (106-109 年)，經動物試驗證實，治療效果優於現行人工皮等主流產品。作為藥物載體上，對 IGF-1 的釋放速率遵循零級釋放的藥物動力反應，相較於游離型生長因子，可延長藥物活性達 2,000 倍以上，減少給藥頻率和副作用產生。超透明薄膜蠶絲敷料製程技術已取得中華民國發明專利 - 「蠶絲蛋白組合物及其製造方法」(發明第 I756896 號)，相關研究成果業已分別刊登於《Pharmaceutics》及《International Journal of Molecular Sciences》等國際期刊中。綜合上述，SPF 家蠶生產體系及蠶絲敷料作為生物醫材用途，極具市場發展潛力。

關鍵字：無特定病原、人工飼料、育種、傷口敷料、藥物載體

¹ 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

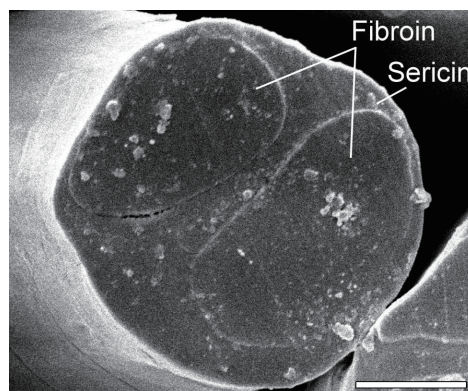
² 國立清華大學

* 通訊作者email:Lumj@mdais.gov.tw

家蠶作為生醫材料的國際發展趨勢

家蠶 (*Bombyx mori* L.) 為鱗翅目蠶蛾科 (Lepidoptera: Bombycidae) 昆蟲，自 7,500 年前即受到人類的豢養及運用 [1]，自西元 2004 年全基因體解序後，家蠶的各種研究開始蓬勃發展，其中又以基因轉殖蠶 (Transgenic silkworm) 或生物反應器 (Bioreactor) 等技術 [2]，運出家蠶為原料製造快篩試劑、蛋白疫苗及藥品等醫藥級產品最為廣泛，相較於大型動物及微生物，家蠶可精準表達目標蛋白、製程短、後代規模量大、產能高且成本低的製造平台，如：日本 Sysmex 與片倉工業開發抗血栓試劑、東麗公司 (Toray) 生產重組干擾素藥劑 (interferon, INF)，用來治療貓狗病毒及皮膚相關疾病，均以無特定病原家蠶製造相關產品，熱銷日本及歐盟各國 [3]。

蠶絲為家蠶生產之纖維性蛋白，蠶絲依其結構可大致分為絲膠蛋白 (sericin) 及絲質蛋白 (fibroin) (圖一)，其中絲質蛋白具穩定性高、機械強度及生物親和性等特性，廣泛運用在材料科學、生物醫學，甚至半導體產業 [4-6]。目前美國 FDA 已批准上市的产品包括 Surusil®、Sofsilik™、Covidien 的絲線縫合線和 Seri®、Allergan 的絲線支架，此外，以絲質蛋白開發的新興商品，包括 Ekteino Laboratories 和 Banner Pharmacaps 藥物輸送系統、AMSilk 和 Wyss Institute 公司生產的高性能複合材料、Vaxess 開發的疫苗穩定化技術和 Immuno-Biological Laboratories 開發的重組人類蛋白質生產技術 [7,8]。據統計絲質蛋白全球需求量的年複合成長率 (CAGR) 高達 6.6%，預估至 2027 年全球絲質蛋白總需求產值上看 1.4 億美元 [9]，市場規模不容小覷。



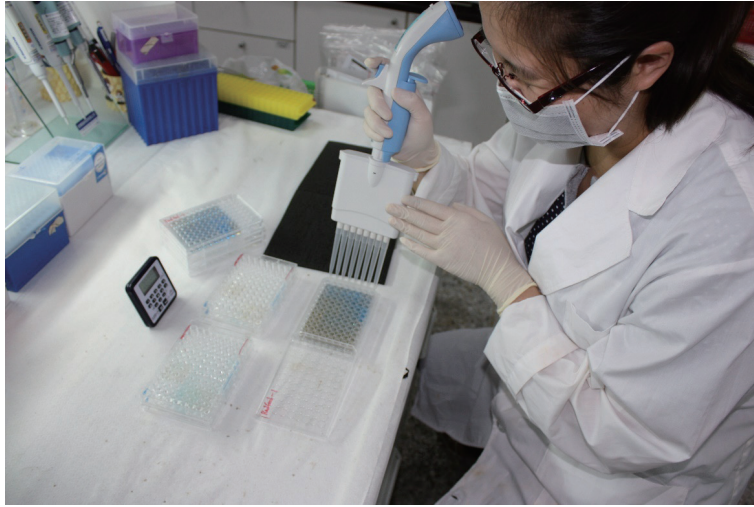
圖一、蠶絲橫截面以電子顯微鏡5,000倍放大，可分別觀察到絲質蛋白(fibroin)及絲膠蛋白(Sericin) (Scale=5 μ m)

家蠶轉型作為生醫材料的研究進展

本場自成立以來一直肩負家蠶種原保育及產業推廣的任務，為提高家蠶運用率，促進產業轉型，我們以家蠶做為生物反應器開發豬瘟及禽流感疫苗研究為開端，開啟一連串家蠶轉型作為生醫材料的研發歷程，近年來陸續完成無特定病原生產體系、臺灣專用人工飼料配方、無特定病原家蠶育種、糖尿病傷口修復敷料及藥物緩釋載體等生醫材料的開發，相關研究成果頗豐，各項研發的重點分述如下：

一、無特定病原家蠶生產體系

無特定病原 (specific pathogen free, SPF) 動物，係指不含指定致病病原的動物。根據世界衛生組織 (WHO) 生物原料優良製造規範 (Good Manufacturing Practice, GMP) 明文指出，生產或檢定生物製品，皆須採用 SPF 等級的實驗動物 [10]。SPF 家蠶俗稱無菌蠶，根據規範此等級動物需須全程飼育人工飼料，飼育於嚴密監控的環境設施密閉系統中，並具有病原定期監測系統，確保動物品質，本研究已完成上述相關體系之建立，其中包括萬級正壓飼育環控系統、生產流程及檢測技術 SOP 等。在檢測技術方面完成包括核多角體病毒 (Nuclear polyhedrosis, NPV)、質多角體病毒 (Cytoplasmic polyhedrosis, CPV)、病毒性軟化病 (Facherie virus, IFV)、濃核病 (Densovirus disease)、細菌性腸道病 (Bacterial gastroenteric disease)、白黃殭病 (White/yellow muscardine)、綠殭病 (Green muscardine) 及麴黴病 (Aspergillus disease) 等病原之病原蒐集分離保存、確認、接種、定序比對、資料庫登錄等確認步驟，建立鏡檢、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 或反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 等雙重檢測確認方式。其中又因 NPV 及 CPV 為臺灣家蠶飼育中盛行率及傳染度極高之病原，為提高監測效率，開發專用抗體及酵素連結免疫吸附分析技術 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，並確立陽性閾值 (cut-off value)，作為每齡期家蠶發病監控基準。在家蠶品質優化試驗顯示，以 ELISA 檢測並逐代淘汰帶原病卵，可有效降低蠶卵帶原率降幅達九成五以上。



圖二、利用抗原抗體免疫分析法進行病原快篩機制

二、開發人工飼料與適性育種

建立人工飼料的飼育體系，可穩定的量產高潔淨度家蠶，為家蠶多元化發展的關鍵技術。人工飼料具有無菌化、成分可控性、蠶桑分地分時生產及降低勞力密集等優勢，透過成分檢測、農藥篩檢及高溫滅菌製程，可精準掌握每批食料的成分，穩定生產之家蠶品質，並降低家蠶中毒及感病機率，達到周年量化生產及學術研究等目的。日本早於1960年首度發表家蠶人工飼料的相關研究 [11]，中國大陸近年來也因勞力成本上升、環境汙染及因應世界趨勢等因素，著手進行人工飼料的研發 [12]。人工飼料蠶體系之建立會受到品種、飼料成分、飼育方式、環境等因素所影響，為加速臺灣家蠶人工飼料系統之建立，本試驗以日本飼料原體為基礎，利用改良家蠶品系、飼料配方改良、提高家蠶清淨度及優化飼育環境為對策，經適食性選拔、雜交育種、帶原選拔淘汰、飼育 SOP 建立及配方調整等試驗，逐步建立臺灣家蠶專屬人工飼料之飼育系統，並完成高度適性品系—BmC03、Bm-J10 及 Bm-F01 等三品系之育種，其中 Bm-J10 品系家蠶，全齡飼育人工飼料，幼蟲期平均健蠶率達 90% 以上，健蛹率達 99% 以上，五齡起蠶蠶重達 1.04 公克，蛹重達 2.08 公克，繭層重達 0.53 公克，達到全齡飼料飼育、強絲種、高絲種及穩定量產等重大突破。



圖三、新開發的人工飼料配方可維持健蠶率高達九成以上



強絲種
BmC03

- 機能性醫學材料
- 高機械性工程材料



蛹大高絲量
BmJ10

- 蠶蛹類生醫材料
- 高潔淨度蠶絲量產



蟲大容易飼育
BmF01

- 幼蟲類生醫材料
- 容易飼育四交種
- 農民及教育推廣飼育優良蠶種

圖四、完成三種人工飼料適性品系育種

三、開發傷口敷料產品

根據統計全球敷料市場 2022 年達到 70.15 億美元，年複合成長率高達 4.8%，預估 2025 年總產值達 140 億美元，其中又以治療難癒合的糖尿病慢性潰瘍市場需求量最高 [13,14]。盤點市售敷料產品，缺乏具有低敏性、專一性治療及長效治療等功能之糖尿病專用敷材，此外，分析蠶絲蛋白特性顯示具有高生物相容性、共軛性及穩定性等特性 [15-17]，具有開發成糖尿病潰瘍敷材的高度潛力。有鑑於此，苗栗場與清華大學共同合作，以絲質蛋白為材料開發糖尿病傷口專用高階敷料，傳統加工處理技術侷限了蠶絲原料的效能，本研究透過優化製程，利用提純及灌注技術優化，大幅移除易致敏因子，提高了四成以上的絲質蛋白含量，提高 β 摺板 (Beta sheet) 的蛋白摺疊，提升了原料的

穩定度及透明度，開發了獨步全球的超透明蠶絲薄膜（圖五），驗證顯示此薄膜可供細胞增生，後續可運用於再生醫材的開發，極透明的特性可運用於人造器官或半導體材料的開發。相關研發已取得中華民國發明專利 - 「蠶絲蛋白組合物及其製造方法」（發明第 I756896 號）（圖六）。



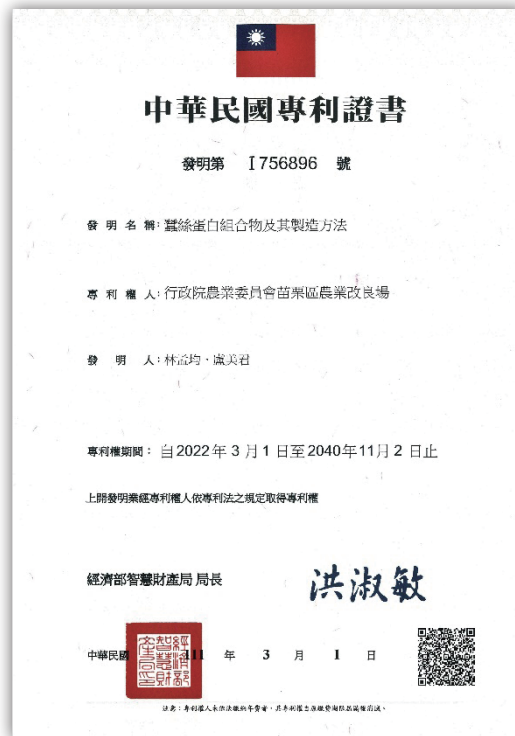
圖五、蠶絲蛋白透過新創製程可轉變成高透明度敷料

評估運用在動物糖尿病傷口的治療效果上，相較於市售常見的水膠體人工皮 (hydrocolloid)，超透明蠶絲敷料可促進糖尿病鼠傷口微血管再生及癒傷組織形成，進而加速傷口修復，整體癒合率提升 20% 以上，且無皮膚刺激性，顯示其作為敷料之無過敏性優勢，相較市場主流敷料更具有競爭力。

四、評估藥物緩釋載體效能

在藥物載體的效能評估中，以薄膜蠶絲敷料添加生物活性因子（例如類胰島素生長因子 :IGF-1），可延長 IGF-1 活性達 30 天以上，整體藥物活性提高 2,000 倍以上，經藥物動力試驗分析顯示，此薄膜藥物釋放採零級反應 (zero-order kinetic)，可減少藥物過量造成副作用及依賴性，有助於穩定體內藥物濃度恆定性。此外，探討分子機制，顯示施用薄膜蠶絲敷料乘載 IGF-1 之處理組，可顯著提高傷口組織中 IGF-1 受體 (IGF1R)

磷酸化的比率，推論由於蠶絲敷料持續遞送 IGF-1，活化了 IGF1R 下游路徑，促進細胞生成與組織修復的效果，未來發展不可限量，上述相關研究成果業已分別刊登於《Pharmaceutics》[18] 及《International Journal of Molecular Sciences》[19] 等國際期刊中。



圖六、蠶絲敷料已取得中華民國發明專利

結語

隨著國際市場及產業結構的改變，傳統的栽桑養蠶已式微，所幸隨著各領域創新技術的崛起，賦予了家蠶全新的使命，透過無特定病原體系的建立，我國已有力量產符合國際法規的材料，讓農業科技能與生物科技及醫學產業接軌。以蠶絲蛋白創新製程，延伸材料的效能，化身為傷口治療及藥物遞送的生醫材料，並進行產業化推廣應用。未來相關產品將投入市場，造福群眾，讓臺灣農業跨域生醫產業的軟實力傲視全世界。

參考文獻

1. Boregowda, M.H. Chapter 16 - Silkworm genomics: current status and limitations. In *advances in animal genomics*, Mondal, S., Singh, R.L., Eds.; Academic Press: 2021; pp. 259-280.
2. Kato, T.; Kajikawa, M.; Maenaka, K.; Park, E.Y. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, *85*, 459-470, doi:10.1007/s00253-009-2267-2.
3. Tanaka, T. Manufacturing pharmaceutical-grade interferons using silkworm- baculovirus system. *J. Biotechnol.* 2012, *s9*, doi:10.4172/2155-952x.S9-002.
4. Kwak, H.W.; Ju, J.E.; Shin, M.; Holland, C.; Lee, K.H. Sericin promotes fibroin silk I stabilization across a phase-separation. *Biomacromolecules* 2017, *18*, 2343-2349, doi:10.1021/acs.biomac.7b00549.
5. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003, *24*, 401–416.
6. Vepari, C.; Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* 2007, *32*, 991-1007, doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
7. Yucel, T.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *J. Control Release* 2014, *190*, 381-397, doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.059.
8. Zhou, Y.; Damasceno, P.F.; Somashekar, B.S.; Engel, M.; Tian, F.; Zhu, J.; Huang, R.; Johnson, K.; McIntyre, C.; Sun, K.; et al. Unusual multiscale mechanics of biomimetic nanoparticle hydrogels. *Nat. Commun.* 2018, *9*, 181, doi:10.1038/s41467-017-02579-w.
9. Reports, R. Global and United States silk fibroin (SF) market report and forecast 2022-2028. *360 Research Reports* 2022, *QYR-20991439*.
10. Organization, W.H. WHO good manufacturing practices for biological products. *WHO Technical Report Series N° 999* 2016.
11. Fukuda, T.; Higuchi, Y. Artificial food for Oak-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem.*, 1963, *27*, 99-102.

12. Dong, H.L.; Zhang, S.X.; Tao, H.; Chen, Z.H.; Li, X.; Qiu, J.F.; Cui, W.Z.; Sima, Y.H.; Cui, W.Z.; Xu, S.Q. Metabolomics differences between silkworms (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry (*Morus*) leaves or artificial diets. *Sci Rep* 2017, 7, 10972, doi:10.1038/s41598-017-11592-4.
13. Diligence, M. Worldwide wound management, forecast to 2024: Established and emerging products, technologies and markets in the Americas, Europe, Asia/Pacific and rest of world. *MedMarket Diligence* 2015, Report #S251, <http://mediligence.com/rpt/rpt-s251.htm>.
14. Chaby, G.; Senet, P.; Vaneau, M.; Martel, P.; Guillaume, J.C.; Meaume, S.; Téot, L.; Debure, C.; Domp martin, A.; Bachelet, H.; et al. Dressings for acute and chronic wounds: A systematic review. *Arch. Dermatol.* 2007, 143, 1297-1304, doi:10.1001/archderm.143.10.1297.
15. Yazawa, K.; Ishida, K.; Masunaga, H.; Hikima, T.; Numata, K. Influence of water content on the beta-sheet formation, thermal stability, water removal, and mechanical properties of silk materials. *Biomacromolecules* 2016, 17, 1057-1066, doi:10.1021/acs.biomac.5b01685.
16. Gomes, S.; Leonor, I.B.; Mano, J.F.; Reis, R.L.; Kaplan, D.L. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2012, 37, 1-17, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003.
17. Zhang, Y.Q.; Ma, Y.; Xia, Y.Y.; Shen, W.D.; Mao, J.P.; Zha, X.M.; Shirai, K.; Kiguchi, K. Synthesis of silk fibroin-insulin bioconjugates and their characterization and activities in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2006, 79, 275–283, doi:10.1002/jbm.b.30539.
18. Lin, M.-J.; Lu, M.-C.; Chan, Y.-C.; Huang, Y.-F.; Chang, H.-Y. An insulin-like growth factor-1 conjugated *Bombyx mori* silk fibroin film for diabetic wound healing: fabrication, physicochemical property characterization, and dosage optimization in vitro and in vivo. *Pharmaceutics* 2021, 13, doi:10.3390/pharmaceutics13091459.
19. Lin, M.-J.; Lu, M.-C.; Chang, H.-Y. Sustained release of insulin-like growth factor- 1 from *Bombyx mori* L. silk fibroin delivery for diabetic wound therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22126267.

Development and Application of Specific Pathogen Free Silkworm (*Bombyx mori* L.) As the Biomedical Materials

Meng-Jin Lin¹, Yun-Chen Chan¹, Hwan-You Chang², and Mei-Chun Lu^{1*}

Abstract

Silkworm (*Bombyx mori* L.) is a potential model organism in life science to produce the target protein for healthcare and biomedical materials. This study aimed to develop a specific pathogen free (SPF) silkworm system that follows the regulation of WHO GMP for biological products and confirms its ability to be used as a biomaterial. The production system of SPF silkworm, including germplasm disinfection, labor-saving rearing, environment control, and pathogen detection, was established in the last eight years. The artificial diet formula for the larval stages and new silkworm strains for the SPF system were also found in our study. In addition, the silk fibroin film (SF-Film) was evaluated for wound healing and drug delivery. The SF-film significantly accelerated wound healing in diabetic model animals compared with wounds treated with commercial hydrocolloid dressing. In the drug delivery study, the release rate of the SF-film delivering IGF-1 followed zero-order kinetics. The sustained release of SF-film was evidenced by a two thousand-fold increase of the IGF-1 activity in the IGF-1-loaded SF-film treatment group compared to that in the free-IGF-1 control, which could reduce the frequency of drug administration and side effects. According to the studies, the Taiwan patent- 'A composition of silk protein and the method for manufacturing the same' (Taiwan patent no. I756896) was granted and these results were published in *Pharmaceutics* and *International Journal of Molecular Sciences*, respectively. To sum up, these results indicate that SPF silkworm system and SF films have considerable potential for biomedicine and wound therapy.

Keywords : specific pathogen free (SPF), artificial diet, breeding, silk fibroin, wound dressing, drug delivery

¹ Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli, R.O.C.

² National Tsing Hua University, Hsinchu, R.O.C.

*Correspondence: Lumj@mdais.gov.tw