

番鴨誘導多能性幹細胞株之建立與水禽小病毒感染測試⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 張家語⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：2023 年 9 月 7 日；接受日期：2023 年 11 月 2 日

摘 要

本研究目的為建立番鴨誘導多能性幹細胞 (muscovy duck induced pluripotent stem cells, mdiPSCs)，並進行水禽小病毒 (waterfowl Parvovirus) 感染測試，評估此細胞株作為疫苗生產之潛力。試驗利用慢病毒 (lentivirus) 將 LIN28, NANOG, SOX2, OCT3/4, KLF4 和 C-MYC 等轉錄因子轉染番鴨胚胎纖維母細胞 (muscovy duck embryonic fibroblasts, mdEFs)，經約 7 – 10 天後 mdEFs 逐漸由梭狀轉為圓形之上皮細胞形態，持續培養 35 – 40 天後則形成類似幹細胞群落形態。mdiPSCs 體外培養已超過 45 繼代 (380 天)，經分化多能性細胞標誌 AP 與 PAS 染色後呈現陽性反應；使用懸浮小滴培養技術培養，具有形成類胚體 (embryoid body) 能力；顯示所建立之番鴨誘導多能性幹細胞具有分化多能性與分化潛能。以聚合酶連鎖反應進行檢測，證實經水禽小病毒直接感染後之 mdiPSCs，及經病毒感染 mdiPSCs 之回收細胞液共培養的 mdiPSCs，結果均呈陽性反應，證實水禽小病毒可感染本研究建立的 mdiPSCs，並可以在其細胞內順利複製病毒顆粒，顯示本研究建立的 mdiPSCs 可作為水禽小病毒宿主細胞及具疫苗生產之潛力。

關鍵詞：番鴨、胚胎纖維母細胞、誘導多能性幹細胞、水禽小病毒。

緒 言

Takahashi and Yamanaka 於 2006 年首次發表，利用 *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* 等特定的基因轉染至小鼠胚胎纖維細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)，誘導細胞進行再程式化 (reprogramming)，產製出具有分化多能性之幹細胞；並且可以在其衍生的畸胎瘤 (teratoma) 的切片中，檢出分化為軟骨細胞、神經細胞、肌肉細胞、脂肪細胞與上皮細胞等不同胚層的細胞。這是世界第一例的誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)，因此突破性的研究成果 Yamanaka 與英國科學家 John B. Gurdon 共同獲得 2012 諾貝爾醫學獎之殊榮。迄今 iPSC 已被廣泛應用於疾病模式、藥物篩選及細胞治療等多項生物醫學研究，為幹細胞科技與再生醫學開創全新發展的領域。

家禽幹細胞的來源有二，一是自 stage X 的胚盤細胞分離獲得之胚幹細胞 (embryonic stem cell, ESC)，二是由始基生殖細胞培養而來的胚生殖幹細胞 (embryonic germ cell, EGC) (Pain *et al.*, 1996; van de Lavoie *et al.*, 2006)。Lu *et al.* (2012) 利用哺乳動物的特定的基因 (*POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, *LIN28*, *KLF4*, *C-MYC*) 轉殖到鵝鵝胚胎纖維母細胞 (quail embryonic fibroblasts, qEFs)，成功誘導胚胎纖維母細胞進行再程式化，轉變成具有類似胚幹細胞特性與功能的細胞株，並將誘導後的細胞移植到雞胚胎，也證實誘導後的細胞能在雞胚體內順利移行分化，形成嵌合體 (chimaera)。這是第一例禽類利用哺乳動物基因進行並成功產製家禽誘導多能性幹細胞的研究。

家禽是一種很好的模式生物，常被使用在發育生物學與疾病模式之研究 (Naito 2003; Farzaneh *et al.*, 2016; Farzaneh *et al.*, 2017)。另外，許多疫苗的生產也是利用家禽的胚胎或是初代培養的雞胚纖維母細胞 (primary chicken embryonic fibroblasts) 生產，但此方式確有其潛在的風險，例如無特定病原雞蛋短缺、病毒株毒性過強無法利用雞胚蛋培養。相對地，細胞培養製程技術，是目前世界上公認的疫苗發展的最新趨勢。國外疫苗廠紛紛尋找胚胎蛋之替代生物基質來進行疫苗生產。以流感疫苗生產為例，細胞培養生產流感疫苗之技術已成為最佳替代方案。因此，近年來亦有成功開發利用由鴨的胚幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平台 (Olivier *et al.*, 2010)。

目前水禽小病毒疫苗的產製是以最少疾病 (minimum disease, MD) 番鴨 (*Muscovy, Cairina moschata*) 之胚蛋進行生產。然而，番鴨產蛋有季節性，於非產蛋季節恐有胚蛋供應不足之慮。雖然可於非產蛋季節利用人工光照來

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2770 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 通訊作者，E-mail: rchen131@gmail.com

調節以持續供應疫苗生產所需之胚蛋。然而，飼養於密閉式水簾鴨舍，因不鏽鋼網狀高床致使鴨隻趾瘤症情形嚴重，進而造成動物福祉問題。本研究擬透過番鴨誘導性幹細胞研究，期望建立番鴨誘導多能性幹細胞株，並評估提供作為未來疫苗生產平台之應用，以及取代現行以胚蛋生產疫苗之可行性；另外，番鴨誘導多能性幹細胞株的建立亦可提供相關生醫研究試驗使用，並能達到減量（reduction）、取代（replacement）、精緻化（refinement）之試驗動物使用目標。

材料與方法

I. 番鴨胚胎纖維母細胞（muscovy duck embryonic fibroblasts, mdEFs）分離與培養

- i. 取入孵 9 天的番鴨胚胎，將血液與蛋黃洗淨後，然後移至另一皿中裝有 10 mL DPBS 的培養皿中將胚體的頭部與內臟去除。
- ii. 將去除頭部與內臟的胚體移至裝有 3 mL 的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液的 6 cm 無菌培養皿中，以滅菌剪刀將其細切為組織碎片。以無菌之 5 mL 注射筒將上述含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液吸入注射筒中，再予以推出。重複吸推數次將組織碎片細化之。
- iii. 將細化含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液注入 6 cm 無菌培養皿中，移入 38.5°C 的二氧化碳培養箱中培養 5 分鐘。
- iv. 將含組織碎片的 0.25% Trypsin / 0.02% EDTA 溶液移到離心管中，加入培養液（DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin / Streptomycin, Sigma-Aldrich）到 10 mL，充分混合後，將離心管直立靜置在室溫中 5 分鐘。
- v. 以 358 × g 離心 5 分鐘，移除上清液後將細胞打散後，再加入培養液到 10 mL，以相同條件再離心一次。
- vi. 將細胞數調整成 1×10^6 /mL 置於 10 cm 的培養皿中，移入 38.5°C 與含 5% CO₂ 空氣及相對溼度 100% 培養條件下之培養箱中培養。
- vii. 培養期間每 2 – 3 天更換一次培養液，當細胞長到覆蓋 70 – 80% 之培養皿表面時，立即進行繼代培養或進行冷凍，以維持細胞旺盛的分裂能力。

II. 再程式化（reprogramming）重整因子轉染產製番鴨誘導多能性幹細胞

利用市售的重整因子套組（set of lentivirus : *EF1A-driven LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*, Cat. # LV01006L, Creative Biogene, USA）進行 mdEFs 細胞再程式化。其外源重整因子基因之轉染操作流程略述如下，先將 6 個再程式化重整因子分裝（3 μ L/ 瓶）置於 -80°C 保存備用。將培養 2 – 3 代後之 mdEFs 取 6×10^5 /mL 的細胞置換到 3 公分的六孔培養盤（Thermo Fisher, Nunclon Delta for adherent cells, Cat. No. 140675）進行培養，並在細胞生長到 50 – 70% 滿後將培養液移除。同時取出已分裝之凍存的再程式化重整因子，置於 30°C 水浴槽解凍後，分別加入已備妥之 1 mL 的培養液，輕輕混合後加入到培養皿中，再加入 2 mL 的培養液，混勻以進行 mdEFs 轉染操作；隨後立即將細胞移入培養箱於 37°C 與含 5% CO₂ 條件下培養，24 小時後移除轉染操作的培養液，並將培養液換為 mTeSR™ 1 Medium (mTeSR™ 1 Complete Kit Cat. #85850, STEMCELL Technologies, USA) 進行後續之細胞誘導培養。約 30 天後再將細胞與經絲裂黴素（mitomycin C）不活化處理之小鼠胎體纖維母細胞（STO mouse embryonic fibroblast, CRL-1503, ATCC）進行共培養約 30 天，再將細胞自與 STO 共培養中分離，重新置換到經 0.1% Matrigel® 處理之 4 孔細胞培養皿進行培養。

III. 誘導多能性幹細胞的特徵檢測分析

收經過誘導後的類幹細胞群落之細胞，選用已被發表用來檢測家禽幹細胞的特徵之細胞標誌鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）抗原活性分析與過碘酸 Schiff 氏染色（periodic acid-Schiff stain, PAS）細胞染色分析，來進行細胞誘導確認。鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）抗原活性分析：將培養盤中的細胞培養液吸除，以 PBS 清洗一次，再加入 1 mL 含 4% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 分鐘，以 PBS 清洗二次後，加入 1 mL 反應試劑（alkaline phosphatase detection kit, Chemicon），於室溫下反應 15 分鐘後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

過碘酸 Schiff 氏染色（periodic acid-Schiff stain, PAS）細胞染色分析：將培養盤中的細胞培養液吸除，以 PBS 清洗一次，再加入 1 mL 含 4% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 分鐘，以 PBS 清洗二次後，加入 1 mL Periodic acid (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 5 分鐘後以 PBS 清洗二次。再加入 Schiff reagent (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 15 分鐘後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

IV. 類胚體（embryoid body, EB）形成測試

利用培養皿之上蓋製作 mTeSR™ 1 Medium 細胞懸浮培養小滴，每滴約 20 μ L。培養皿底部加入 5mL PBS 以提供濕度防止小滴蒸發。將約 2.0×10^6 個未分化之 mdiPSCs 置入單一懸浮培養小滴中，培養於 38.5 °C 與含 5% CO₂ 之空氣的培養箱中，以誘發 EB 形成。

V. 水禽小病毒的感染測試

水禽小病毒是使用水禽小病毒活毒疫苗（動物製藥第 08212 號，家畜衛生試驗所，臺灣）進行感染。操作流程如下：

- i. 將 mdiPSCs (2.0×10^5 /mL) 置於 10 cm 病毒培養皿 (Thermo Fisher, Nunclon Delta for adherent cells, Cat. No. 150464) 以 DMEM + 10% FBS 於 38.5 °C 與含 5% CO₂ 之空氣的培養箱中培養，24 小時後。再換成 DMEM + 2% FBS 繼續培養 12 小時後進行病毒接種。
- ii. 將病毒調整為 $10^{1.5} - 10^{2.5}$ TCID₅₀ / mL，取 500 μ L 輕輕滴入病毒培養皿進行病毒接種，並放置於 38.5 °C 培養箱進行培養。
- iii. 病毒接種後培養 36 – 72 小時，每天觀察細胞是否有發生細胞病變作用 (cytopathic effect, CPE) 或死亡的現象。

VI. 病毒回收

水禽病毒感染細胞後產生 80 – 90% CPE 或死亡時，即將細胞及病毒刮下收集至 15 mL 離心管，以下列步驟進行病毒的回收：

- i. 將大部分的培養液移除，僅留 2 – 3 mL 培養液在培養皿內。
- ii. 以細胞刮杓刮下細胞 / 病毒混合物後，和剩下的培養液混合均勻。
- iii. 將每個培養皿的細胞 / 病毒混合液從培養皿中吸出置於 15 mL 離心管中。於 -80°C 冷凍解凍三次後，以 805 \times g 進行離心 20 分鐘。收集上清液並分裝凍存於 -80°C 冰箱。

VII. 水禽小病毒檢測

將經水禽小病毒感染後回收的細胞及未感染之細胞，利用病毒核酸萃取商業套組 (Xpress Virus DNA/RNA Kit, Cat# K1361-4, BioVision, Inc. USA) 進行 DNA 萃取，再以聚合酶連鎖反應方式進行檢測，針對水禽小病毒檢測所設計之引子：5'-CCAAGCTACAACAACCACAT-3' (sense) 和 5'-TGAGCGAACATGCTATGGAAGG-3' (antisense)。PCR 反應條件為：94 °C，1 分鐘；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94 °C，15 秒；annealing：50°C，30 秒；extension：72 °C，30 秒，接著 72°C，5 分鐘後 (final extension)，維持在 4°C。若為陽性者，經電泳分析則可擴增 1 段長度 539 bp DNA 片段 (Zadori *et al.*, 1995.)。

結果與討論

I. 番鴨之胚纖維母細胞分離與誘導多能性幹細胞培養

mdEFs 細胞是源自番鴨孵化第 9 天的胚胎組織分離而得，取得之 mdEFs 細胞以 DMEM+10% FBS (內含 100 U/mL penicillin 及 100 g/mL streptomycin) 之培養液進行培養。自番鴨胚胎組織所分離的 mdEFs 於培養 24 小時後，即進行培養液更換，以移除未貼附的死亡細胞與懸浮的組織碎片，經過 2 – 3 次的培養液更換，即可將未貼附的死亡細胞與懸浮的組織碎片移除乾淨，如此即可得到純化的 mdEFs。之後定期每 2 天更換培養液，經過 48 小時培養後可見 mdEFs 開始增生，約 6 – 7 天時進行繼代，培養的過程中已建立初代之 mdEFs 株 (圖 1) 並凍存。

取培養第 3 代的 mdEFs 進行重整合因子轉染誘導，使用 6 孔培養盤每孔放置約 6×10^5 的細胞，再利用已構築之 iPS Lentivirus-LIN28, Lentivirus-NANOG, Lentivirus-SOX2, Lentivirus-OCT3/4, Lentivirus-KLF4 和 Lentivirus-C-MYC 再程式化重整合因子進行轉染。24 小時後移除轉染液，並將培養液換為 mTeSR1 stem cell medium。培養期間定期更換細胞培養液，並持續觀察 mdEFs 之形態變化。轉染後之初代 mdEFs 經 7 – 10 天培養時，細胞形態逐漸由梭狀轉變為圓形之上皮細胞形態；經 35 – 40 天培養才觀察到細胞開始聚集，形成幹細胞群落 (colonies) 樣態 (圖 2)。此與其他禽類同樣經由再程式化重整合因子轉染進行 iPSC 誘導之研究結果有所不同，雞胚胎纖維母細胞經再程式化重整合因子轉染後，5 – 6 天可觀察到細胞形態改變，約 9 天後細胞即開始聚集形成類幹細胞之群落形態 (Liou *et al.*, 2019)；鵝的胚胎纖維母細胞，經再程式化重整合因子轉染，約 24 小時可見細胞形態的改變，6 天後即形成類幹細胞之群落形態 (Lu *et al.*, 2012)。Fuet *et al.* (2018) 以雞與鴨的胚胎纖維母細胞利用重整合因子轉染，進行雞與鴨 iPSC 誘導之研究指出，雞與鴨分別在轉染後約 5 – 8 天與 30 – 40 天細胞會聚集形成幹細胞之群落樣態，兩者細胞形態改變的時間有顯著的差異。作者推測雖然雞與鴨同為鳥類物種 (avian

species)，但在演化過程中於 6,000 萬年前兩者在基因上已發生了分歧的改變所致。

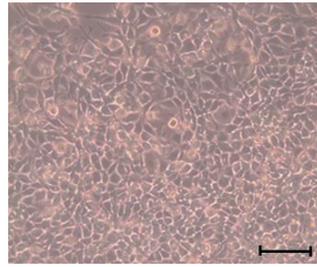


圖 1. 自孵化第 9 天番鴨胚胎分離之鴨胚纖維母細胞 (mdEFs) 的形態。

Fig. 1. The morphology of muscovy duck embryonic fibroblasts (mdEFs) collected from a 9-day-old embryo. Scale bar = 100 μ m.

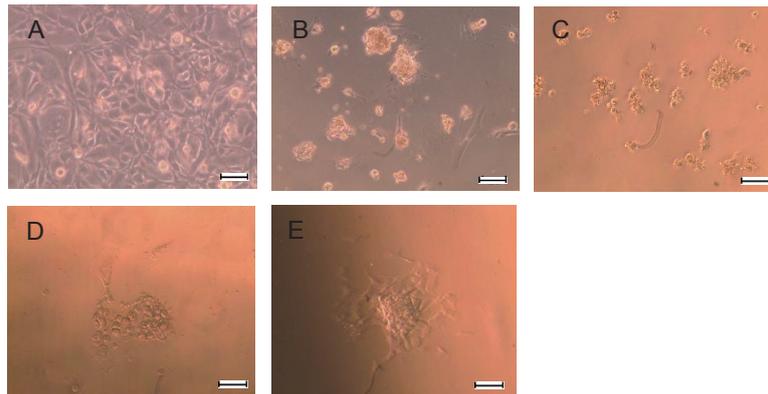


圖 2. 番鴨之胚纖維母細胞 (mdEFs) 經再程式化重整因子 (*LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* 和 *C-MYC*) 轉染後之細胞形態。A: mdEFs 再程式化重整因子轉染前; B: 轉染後第 9 天; C: 轉染後第 11 天; D: 轉染後第 32 天。E: 轉染前後第 45 天。

Fig. 2. The morphology of mdEFs infected with reprogramming factors (*LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*), A: mdEFs prior to infection, B: Day 9 post transduction, C: Day 11 post transduction, D: Day 32 post transduction. E: day 45 post transduction. Scale bar = 100 μ m

本研究經過上述細胞再程式化重整因子轉染後之 mdEFs 雖然有明顯聚集形成幹細胞之群落樣態，惟在初期的誘導培養期間，細胞雖有因再程式化重整因子的導入進行內部基因的重整而改變形態並聚集形成幹細胞之群落，但生長狀態出現增生緩慢的現象。因此，將重整後的細胞置放到經絲裂黴素 (mitomycin C) 不活化處理 STO 作為供養層細胞進行培養，重整細胞在與 STO 供養層細胞共培養的情況下增生緩慢的現象獲得改善。但是重整細胞形成群落的情形不明顯，只出現小的細胞群落，無法像一般胚幹細胞幹細胞可以形成明顯而較為緊湊聚集的細胞群落之樣態。此現象亦發生在鸚鵡 iPSC 的研究中，作者將誘導的鸚鵡 iPSC 自 STO 移除，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之培養皿，並將培養液更換成 mTeSR1 stem cell medium 成功建立鸚鵡 iPSC (Lu *et al.*, 2012)。故本實驗亦參照其操作，在誘導細胞與 STO 共培養約 1 個月後，就將重整細胞自與 STO 共培養中分離，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之 4 孔細胞培養皿。重整細胞自 STO 分離後單獨培養，其生長速率明顯改善，而且增生的細胞會相互聚集形成明顯的細胞群落 (圖 3)。

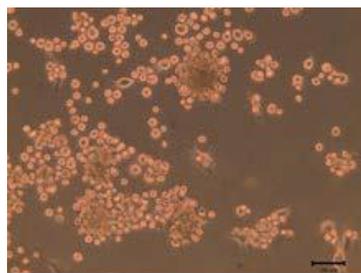


圖 3. mdiPSC 增生聚集形成明顯的細胞群落。

Fig. 3. The mdiPSC proliferated and aggregated to form distinct colonies. Scale bar = 100 μ m.

利用細胞再程式化重整合因子轉染，進行 mdiPSCs 誘導過程中，並非所有 mdEFs 均被成功轉染。因此，在誘導後的培養過程中，於初期仍可觀察到 mdEFs 的存在。惟此現象隨會著細胞繼代培養次數的增加而逐漸減少，約在細胞經過 8 個繼代後就少有發現，持續培養至 12 – 13 繼代後就再也沒有發現 mdEFs 的存在（圖 4）。此乃因 mdEFs 為已分化之細胞，無法於體外長時間的培養，故此等未被重新編程改造因子轉染之 mdEFs 存在的情形會隨著繼代培養時間的增加而減少，最後僅留下有成功被重整合的 mdiPSCs 存活。截至目前 mdiPSCs 已於體外無滋養層培養條件下，培養超過 45 繼代（380 天），並已凍存於液態氮中。冷凍保存的 mdiPSCs 解凍後再培養仍保有良好的存活率與生長效率。

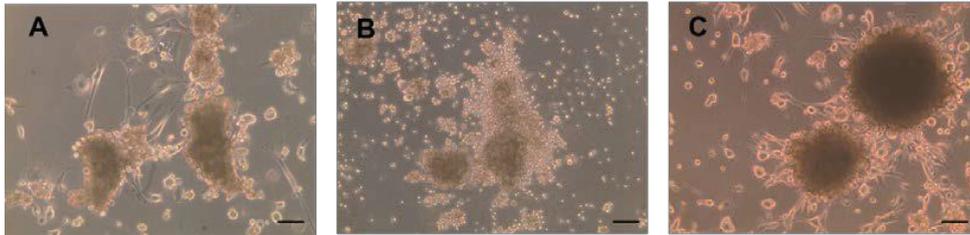


圖 4. mdiPSCs 於不同繼代培養，均呈現類幹細胞之群落形態。A：第 6 代。B：第 12 代。C：第 26 代。

Fig. 4. Colony morphology of mdiPSCs at different passages. A: Passage 6. B: Passage 12. C: Passage 26. Scale bar=100 μ m

II. 誘導多能性幹細胞關鍵標誌檢測

鴨胚生殖細胞（EGCs）之細胞質含有肝醣（glycogen）顆粒，在組織學上可利用 PAS 染劑將肝醣染色獲得證實，並被視為家禽幹細胞的特徵之一（Meyer, 1960）。而細胞中可檢出 AP 之活性表現已被用來鑑定胚幹細胞（ESCs）多能性的關鍵標誌。本研究經細胞再程式化誘導後形成類似幹細胞群落之細胞，是選用上述已被發表用來檢測鴨的 EGCs（Guan *et al.*, 2010）和 PGCs（Chen *et al.*, 2019）的分化多能性細胞標誌 PAS 和 AP 進行分化多能性測試（Jung *et al.*, 2005；van de Lavoie *et al.*, 2006；Liou *et al.*, 2012）。結果顯示經過再程式化誘導後具類似幹細胞群落形態之 mdiPSCs 經以 PAS（培養 20 繼代）與 AP（培養 25 繼代）的檢測均呈陽性反應（圖 5），顯示具有幹細胞之分化多能性。

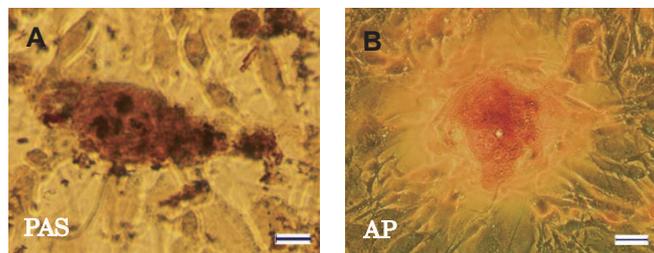


圖 5. mdiPSCs 以 periodic acid-Schiff（PAS）和 Alkaline phosphatase（AP）染色均呈陽性反應。A：PAS 染色（第 20 代）；B：AP 染色（第 25 代）。

Fig. 5. The mdiPSCs were stained positive with periodic acid-Schiff (PAS) and alkaline phosphatase (AP). A: PAS staining (Passage 20). B: AP staining (Passage 25). Scale bar = 50 μ m.

III. 類胚體形成

具有分化多能性的 ESCs 和 EGCs 除了表現特定專一性的細胞標誌外，形成 EBs 亦是 ESCs（Evans and Kaufman, 1981）和 EGCs 具有是分化多能性（pluripotent）的特徵之一。胚幹細胞衍生的 EBs 具分化形成三個胚層的能力及形成各種不同型態的細胞潛能（Doetschman *et al.*, 1985；Shen and Leder, 1992；Desbaillets *et al.*, 2000），因此 EBs 的形成是常被用於測試幹細胞株具三胚層細胞分化潛力的指標。Guan *et al.*（2010）指出鴨 EG 細胞進行懸浮培養約在第 8 天可觀察到 EBs 的形成。本研究取培養 20 繼代的 mdiPSCs 以懸浮培養進行誘發為類胚體測試。結果顯示，mdiPSCs 於懸浮培養 7 – 10 天後觀察可見細胞聚集形成圓球狀結構之類胚體（圖 6），顯示細胞具有體外分化的能力。



圖 6. 利用懸浮培養可誘發 mdiPSCs 形成類胚體。

Fig. 6. The embryoid body formation of was mdiPSCs induced by hanging-drop culture.
cale bar = 100 μ m.

IV. 小病毒感染測試

為確認建立的細胞株是否可作為水禽小病毒的宿主細胞並複製其病毒顆粒，以評估進一步提供做為疫苗生產之可行性。故使用家畜衛生試驗所生產的水禽小病毒活疫苗對 mdiPSCs 細胞進行水禽小病毒感染測試。mdiPSCs 以 DMEM + 10 % FCS 培養，待細胞生長到約 80 – 90%，將培養液換成 DMEM + 2 % FCS 繼續培養 12 小時後，再進行病毒接種。細胞經病毒接種感染後 48 – 72 小時可觀察到受感染的細胞變圓並收縮之 CPE 或死亡的現象（圖 7）。

Saleh and Khodier (2020) 以源自現場確認感染鵝小病毒 (goose parvovirus, GPV) 的鴨隻分離出 GPV 病毒，將其感染到鴨胚胎纖維母細胞，在感染後 72 小時可觀察到受感染的細胞型態變圓並縮小之 CPE 現象；到 96 – 120 小時，整個單層 (monolayer) 細胞也因小病毒的感染發生細胞剝落情形。上述的感染後發生 CPE 的時間與細胞型態的改變在本實驗亦觀察到相似情形。Zhang *et al.* (2019) 利用間接免疫螢光分析 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 法進行 GPV 在 DFEs 複製觀察指出，GPV 在感染後 24 – 48 小時可觀察到複製情形，48 小時病毒快速複製並在 96 時達到複製高峰，於 120 小時後病毒量已趨於穩定。

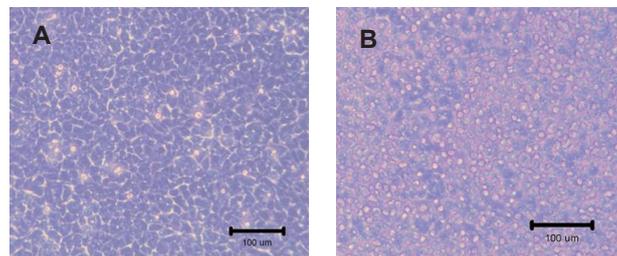


圖 7. mdiPSCs 水禽小病毒感染測試。A：細胞沒有接種水禽小病毒。B：細胞接種水禽小病毒後培養 72 小時，發生細胞病變作用 (CPE)。

Fig. 7. Morphology detection of mdiPSCs after waterfowl parvovirus infection. A: Control cells without infection. B: Cytopathic effect (CPE) exhibited at 72 hours after waterfowl parvovirus infection. Scale bar = 100 μ m.

本研究在病毒感染後約 100 – 120 小時，觀察到約 80 – 90% mdiPSCs 出現 CPE 時，即將 mdiPSCs 連同其培養液進行回收並凍存於 -80°C 。將回收細胞懸浮液以反覆 3 次的 -80°C 冷凍 / 37°C 解凍，致使細胞破裂釋放出病毒顆粒，再進行離心 ($805 \times g / 5$ 分鐘) 回收含有病毒顆粒之上清液。並以此上清液，再次進行 mdiPSCs 之細胞感染，以做為進一步確認水禽小病毒是否可於本 mdiPSCs 之細胞株進行病毒顆粒的複製增殖。

利用前述回收上清液感染後的 mdiPSCs，經 PCR 的方式進行檢測，結果均可檢出表現水禽小病毒專一特有的 539 bp 片段的陽性反應。此結果證實本研究所建立的 mdiPSCs 細胞株確實可作為水禽小病毒宿主細胞，而經水禽小病毒感染後病毒可於細胞內進行複製，且所複製的病毒顆粒亦可再次感染細胞。此外，本研究同時也可以從沒有進行水禽小病毒感染操作的對照組 mdiPSCs 細胞 PCR 檢測呈陰性反應之結果，顯示本實驗建立之 mdiPSCs 細胞株為 parvovirus free (圖 8)。

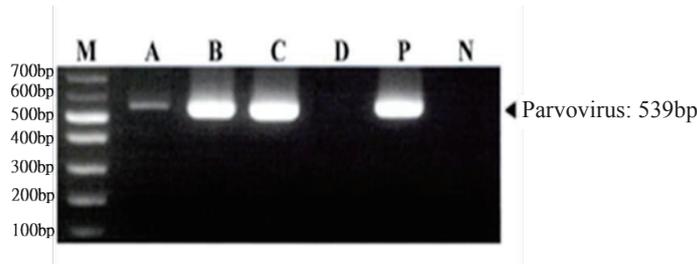


圖 8. 以聚合酶連鎖反應檢測經水禽小病毒感染的 mdiPSCs 細胞。M：100 bp DNA ladder marker。A：以水禽小病毒感染之細胞。B 和 C：以水禽小病毒感染後回收細胞上清液感染之細胞。D：沒有進行水禽小病毒感染之細胞。P：陽性對照組。N：陰性對照組。

Fig. 8. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of waterfowl parvovirus-infected mdiPSCs. M: 100 bp DNA ladder marker. A: Cells infected with waterfowl parvovirus. B and C: Cells infected with cell supernatants isolated from the waterfowl parvovirus-infected mdiPSCs. D: The mdiPSCs without infection with waterfowl parvovirus. P: Positive control. N: Negative control.

目前商用疫苗生產主要採用胚胎蛋製程與細胞培養製程二種方式，然而以胚胎蛋來生產疫苗仍是有潛在風險，如一旦爆發禽流感，合格等級蛋源的取得極可能出現不足，以致影響到疫苗生產作業。相對的，細胞培養製程技術，是目前世界上公認的疫苗發展的最近趨勢。國外疫苗廠紛紛尋找替代胚胎蛋的生物基質來進行疫苗生產。以流感疫苗生產為例，細胞培養生產流感疫苗之技術已成為最佳替代方案。Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) 和 African green monkey kidney epithelial cells (Vero) 等哺乳類細胞株已被廣泛研究並利用於製造商用的流感病毒疫苗 (Liu *et al.*, 2009; Ehrlich *et al.*, 2012)。然而，雖然已有開發以禽類 iPSC 用作疫苗生產 (Shittu *et al.*, 2016; Liou *et al.*, 2019) 之研究，亦有成功開發利用由鴨子的胚幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平臺 (Olivier *et al.*, 2010) 的研究結果，但可用於商業化疫苗生產的禽類 iPSC 細胞株的製程仍尚在起步階段，值得進一步研發使技術製程的進展更為成熟。

國內水禽小病毒疫苗目前是利用 MD 番鴨胚蛋進行生產。因番鴨產蛋具有季節性，於非產蛋季節可能造成胚蛋供應短缺的問題。雖然目前於番鴨非產蛋季節時，可採用人工光照調節來持續供應疫苗生產所需之胚蛋。但在飼養於密閉式水簾鴨舍，為維持飼養區的清淨及避免疾病交互感染與傳播，將番鴨飼養於不鏽鋼網狀高床上，以利清潔與減少糞便飼料等殘存於高床，惟此床面設計致使鴨隻趾痛症情形嚴重，如此造成的動物福祉問題仍需進一步克服。本研究已成功建立番鴨誘導多能性幹細胞株，且此等細胞株之細胞經水禽小病毒感染後，以聚合酶連鎖反應方式進行檢測，結果均呈陽性感染反應。證實本研究建立的番鴨誘導多能性幹細胞株可作為水禽小病毒的宿主細胞，其經水禽小病毒感染後病毒可於細胞內進行複製，且所複製產生的病毒顆粒亦可再次感染番鴨誘導多能性幹細胞。後續將利用本研究建立的番鴨誘導多能性幹細胞株供作疫苗生產的可行性測試，期望建立利用禽類 iPSCs 進行疫苗生產的平台，以取代或減少番鴨胚蛋的使用量。

參考文獻

- Chen, Y. C., S. P. Lin, Y. Y. Chang, W. P. Chang, L. Y. Wei, H. C. Liu, J. F. Huang, B. Pain, and S. C. Wu. 2019. *In vitro* culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poult. Sci.* 98:1820–1832.
- Desbaillets, I., U. Ziegler, P. Groscurth, and M. Gassmann. 2000. Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp. Physiol.* 85: 645–651.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kenter. 1985. 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.
- Ehrlich, H. J., J. Singer, G. Berezuk, S. Fritsch, G. Aichinger, M. K. Hart, E. A. Wael, D. Portsmouth, O. Kistner, and P. N. Barrett. 2012. A cell culture-derived influenza vaccine provides consistent protection against infection and reduces the duration and severity of disease in infected individuals. *Clin. Infect. Dis.* 54: 946–954.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Farzaneh, M., S. Khoshnam, and P. Mozdziaik. 2017. Concise review: avian multipotent stem cells as a novel tool for

- investigating cell-based therapies. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* doi:10.15406/jdvar.2017.05.00125.
- Farzaneh, M., S. E. Khoshnam, and M. Nokhbatolfoghahai. 2016. First scientific record of two cases of partial twinning in the chick embryo, *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Rec. Case Rep.* doi:10.1136/vetreccr-2016-000353.
- Fuet, A., G. Montillet, C. Jean, P. Aubel, C. Kress, S. R. Gervier, and B. Pain. 2018. NANOG is required for the long-term establishment of avian somatic reprogrammed Cells. *Stem Cell Rep.* 11: 1272–1286.
- Guan, W., Y. Wang, L. Hou, L. Chen, X. Li, W. Yue, and Y. Ma. 2010. Derivation and characteristics of pluripotent embryonic germ cells in duck. *Poult. Sci.* 89: 312–317.
- Jung, J. G., D. K. Kim, T. S. Park, S. D. Lee, J. M. Lim, and J. Y. Han. 2005. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells* 23: 689–698.
- Liou, J. F., J. W. Shiau, J. Tailiu, C. Tai, L. R. Chen, and M. C. Chang. 2012. Culture of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken embryonic fibroblast (cEF) cells conditioned medium and *in vivo* migration. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 2196–2203.
- Liou, J. F., W. R. Wu, L. R. Chen, and Y. L. Shiue. 2019. Establishment of an induced pluripotent cell line from Taiwan black silkie chick embryonic fibroblasts for replication-incompetent virus production. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52282-7>
- Liu, J., X. Shi, R. Schwartz, and G. Kemble. 2009. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 27: 6460–64603.
- Lu Y., D. W. Franklin, J. J. Brian, L. M. Jennifer, T. J. Erin, G. C. Amalia, B. B. Robert, and L. S. Steven. 2012. Avian induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev.* 21: 394–403.
- Meyer, D. B. 1960. Application of period acid–Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technol.* 35: 83–89.
- Naito, M. 2003. Development of avian embryo manipulation techniques and their application to germ cell manipulation. *Anim. Sci. J.* 74: 157–168. doi:10.1046/j.1344-3941.2003.00101.x.
- Olivier, S., M. Jacoby, C. Brillon, S. Bouletreau, T. Mollet, O. Nerriere, A. Angel, S. Danet, B. Souttou, F. Guehenneux, L. Gauthier, M. Berthomé, H. Vié, N. Beltraminelli, and M. Mehtali. 2010. EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2: 405–415.
- Pain, B., M. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. Etches. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339–2348.
- Resnick, J. L., L. S. Bixler, L. Z. Cheng, and P. J. Donovan. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550–551.
- Saleh, A. A. and M. H. Khodier. 2020. Preliminary studies on the virus causing outbreak of duckling short beak and dwarfism syndrome (SBDS) in Egypt. *J. Appl. Vet. Sci.* 5 (4): 55–60.
- Shen, M. M. and P. Leder. 1992. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8240–8244.
- Shittu, I., Z. Zhu, Y. Lu, J. M. Hutcheson, S. L. Stice, F. D. West, M. Donadeu, B. Dungu, A. M. Fadly, G. Zavala, N. Ferguson-Noel, and C. L. Afonso. 2016. Development, characterization and optimization of a new suspension chicken-induced pluripotent cell line for the production of Newcastle disease vaccine. *Biologicals* 44: 24–32.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
- van de Lavoie, M. C., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, and T. M. Gessaro. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441:766–769.
- Zádori, Z., R. Stefancsik, T. Rauch and J. Kisary. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck Parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Viro.* 212: 562–573.
- Zhang, J., P. Liu, Y. Wu, M. Wang, R. Jia, D. Zhu, M. Liu, Q. Yang, Y. Wu, X. Zhao, S. Zhang, Y. Liu, L. Zhang, Y. Yu, Y. You, S. Chen, and A. Cheng. 2019. Growth characteristics of the novel goose parvovirus SD15 strain *in vitro*. *BMC Vet. Res.* 15: 63–71 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1807-y>

Establishment of induced pluripotent stem cell line in muscovy duck and its waterfowl parvovirus infection test ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou ⁽²⁾ Chia-Yu Chang ⁽²⁾ Fung-Hsiang Chu ⁽²⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Sep. 7, 2023; Accepted: Nov. 2, 2023

Abstract

The purpose of this study was to establish duck induced pluripotent stem cells (md iPSCs) lines from the muscovy duck, and to evaluate their potential for vaccine production. The results showed that the morphology of muscovy duck embryonic fibroblasts (mdEFs) transformed into colony type from spindle type 7-10 days after being infected with lentivirus, which was constructed with reprogramming transcription factors of *LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*. The transformed cells have been maintained in vitro for more than 45 passages (380 days). These putative md iPSCs continuously expressed pluripotent markers of avian stem cells including AP and PAS antigens. The capability of embryoid body formation of the putative md iPSCs was excellent when induced by hanging-drop culture. These results demonstrated that the md iPSCs line established in this study were pluripotent. The specific 539 bp DNA fragment was recovered in the md iPSCs after infection with waterfowl parvovirus, and also the md iPSCs infected with the cellular content recovered from previously waterfowl parvovirus-infected md iPSCs when detected by polymerase chain reaction. These results showed that md iPSCs cell line with the potential for production of the vaccines against waterfowl parvovirus.

Key words: Muscovy duck, Embryonic fibroblasts, Induced pluripotent stem cells, Waterfowl parvovirus.

(1) Contribution No. 2770 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: rchen131@gmail.com