

細胞冷凍保存

冷凍保存係為冷卻與儲存細胞、組織或器官至極低溫度以維持其存活率之過程。冷凍保存目的為保存細胞，及允許其未來使用於體外或體內應用，與其解凍後細胞保留足夠凍前細胞功能。冷凍保存亦降低由細胞複製引起之基因突變或亞群風險。根據其應用，可以分裂、增殖、分化、表現基因或產生蛋白質之能力或其他特定功能特性對冷凍保存後功能進行充分評估。

本通則將適用於多種細胞、細胞治療製劑及細胞庫之冷凍保存、維護與使用之最佳操作，這些細胞庫來源各異，包括人類、動物及微生物培養物。凍存細胞提供活細胞之現成來源，可直接或間接用於診斷試驗、治療、藥品與疫苗之製造及用於生物測定法以評估治療用藥品與疫苗之效價。在某些情況下，經過冷凍保存與解凍後之細胞本身即可用於治療患者；另有一些情況，細胞需經體外增殖或其他操作以產生產品（例如：經培養擴增的細胞治療、治療性蛋白質、單株抗體或疫苗）。在所有情況下，適當之冷凍保存對保留所需細胞特性，以達促進患者治療的最終目的而言皆屬必要。

1. 冷凍保存原理

1.1. 概述

了解水的作用，以及從細胞中將其適當去除或使其不致形成冰晶

破壞細胞膜之需求，對於成功冷凍保存至關重要。當細胞在含水懸浮液中冷凍時通常會被破壞。然而，自 1940 年代，Polge 等人發現甘油之冷凍保存特性起，已發現數個化學品（通稱為冷凍保存劑（cryoprotectant agents, CPAs））。冷凍保存劑作用機制複雜且尚未充分了解，但根據普遍接受之依數作用（colligative action）理論，冷凍保存劑係藉提高細胞內外溶質濃度而抑制冰晶形成。為達此目的，所謂滲透型（或細胞內）冷凍保存劑（例如：二甲亞砜（dimethylsulfoxide, DMSO）、甘油、丙二醇及甲醇）須能輕易通過細胞膜，在對細胞無顯著毒性的情形下滲入細胞。另有一類非滲透型（或細胞外）冷凍保存劑（例如：蔗糖與海藻糖），其作用機制被認為至少在某種程度上與它們穩定細胞膜之交互作用有關。此性質亦可解釋某些高分子量化合物（例如：羥乙基澱粉與聚乙烯丙烯）之冷凍保存活性。在提到冷凍保存之理論模型時通常會聯想到依數理論，但至今對冷凍保存劑之作用尚欠完整解釋。

細胞保存有另一種形式（通常稱作玻璃化（vitrification）），係指在細胞懸浮液中加入大量滲透型冷凍保存劑（通常為數種之組合），而誘發類玻璃狀態，在此情況下細胞內外水份不易形成冰晶。將以此方式製備之細胞懸浮液極速冷卻（冷卻速率大於等於

100~1000°/min)，此時此極端黏稠度可防止滲透作用，且水分子不會結冰。該方法已廣泛應用於複雜結構之冷凍保存，包括各種人、植物及動物組織，且可幫助保存具有不同程度細胞滲透性之細胞製劑，或是於標準冷凍保存無法提供維持組織中所有類型組成細胞存活率所需要之最適條件範圍時亦適用之。

冷凍保存劑除了冷凍保存特性外，也具有其他生物活性，有些（例如：DMSO）會影響細胞膜、細胞骨架及基因表現，長時間暴露其中可能具細胞毒性。因此，在開發新冷凍保存程序時，分析人員應進行毒性試驗，評估細胞在不同冷凍保存劑暴露時間下，是否有存活率降低或功能改變的情形。

1.2. 冷凍保存操作之關鍵要素

對任何欲進行凍存之細胞檢品或治療產品，方法開發應闡明以下元素：

1.2.1. 凍前處理與鑑別

在冷凍保存前，最佳化當下細胞狀態對於冷凍保存成功與否至關重要。凍前處理方式與程度取決於將進行凍存之原始細胞收集液之狀態、細胞懸浮液組成及達成冷凍保存之特定處理步驟。凍前處理可包括亞群選擇、離體擴增、或是以活化或引發因子培養。

在早期製程開發時即應確立冷凍保存前之特性，尤其是對細胞庫，應記錄細胞狀態與最佳生長條件、歷史紀錄（可追溯至合格細胞庫或可接受來源）、特性及真偽。細胞狀態與歷史通常會記載自初代細胞或原始分離物後之操作與培養繼代之方式與次數。有限或初代細胞通常在早期繼代時即予以凍存以維持原始組織完整性，但連續細胞株在細胞群均一之前提下，可經選殖與擴增。因為冷凍時通常需要混合來自多個培養容器之細胞，一般建議以單一製備或擴增後之細胞群進行細胞庫製備。不應混合具不同繼代史之細胞，更不可混合來自不同捐贈者之細胞。此兩種情況下，分析人員均應保留詳細程序紀錄。

在製備冷凍保存之細胞培養時，細胞收集應在對數生長或快速生長期且未進入生長穩定期之前進行。在此階段收集細胞，可確保細胞存活率最高且均一。細胞之最適濃度取決於細胞類型、目的及最佳回復。用於製造細胞庫的細胞濃度通常在 $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ ，但在其他目的時則可能有所不同。在細胞收集前一天更換生長培養基會有一些幫助。另外，透過離心並重新於等張培養基懸浮至特定細胞濃度之洗滌步驟對大多數細胞懸浮液亦有助益。凍前程序不應使細胞於冷凍過程開始前即感受壓力，否則細胞在冷凍期間或解凍後之損失會高於預期。

細胞株或初代細胞之生長條件最佳化對維持細胞在培養中高存活率至關重要。通常，生長活躍且處於對數生長期的細胞具有低質核比（細胞質對細胞核體積比），此情況有利於滲透型冷凍保存劑成功凍存細胞。次優或不適當培養條件可能導致較低的細胞存活率以及對保存與回復而言較不穩定之細胞狀態。培養基應進行最佳化調整並將之用於所有實驗中，各批動物來源材料（例如：血清）與其他培養試劑均應合格（例如：參見 2010 年 WHO 指引）。一般建議在培養基中儘可能不要使用動物來源成分，特別是用於治療或作為製造基質之細胞。

根據 2010 年 WHO 指引並基於風險評估之精神，須針對主細胞庫（master cell bank, MCB）或工作細胞庫（working cell bank, WCB）進行外來病原（adventitious agents）測試。理想情況下，細胞檢品應在冷凍前進行外來病原測試。細胞中潛在微生物或病毒污染之具體測試方案取決於細胞捐贈者之來源、培養歷史及預期用途。因此應維護詳細細胞歷史，以作為適當風險評估之基礎，據以決定需補充何種測試（例如：若使用牛血清白蛋白，則有暴露於牛病毒之風險）。法規上針對特定用途產品（例如：細胞治療或疫苗製造）於細胞或細胞捐贈者測試之特定要求，係基於過往對須納入或考慮之關鍵試劑之經驗而定。細胞

治療製劑無菌性與安全性測試規定之相關指引請見先進細胞與組織治療製劑（通則0000）。

1.2.2. 試劑與容器

所有冷凍保存劑與容器等應符合相關法規指引中的規定。冷凍保存常用無菌、一次性使用、拋棄式塑料袋、凍管（cryovial）或麥管（straw）。應仔細檢查製造商規格以確保用於製造低溫容器之材料適合在儲存溫度下使用、與內容物化學相容、可滲出物與可浸出物之可能性降至最低，以及確保容器密封完整性。如果使用麥管，儲存時之主要或次級包裝對於防止保存細胞與液態氮直接接觸極為重要；凍管的選擇應根據其可提供足夠細胞庫完整性之能力而定。

細胞保存通常需要使用含有基質（通常以等張鹽水為基底之溶液）與冷凍保存劑（最常見為 DMSO，有時則為甘油）之特定溶液，有時需要蛋白質（胎牛血清、人血清或血漿、條件培養基或人白蛋白），需要依不同細胞類型決定其最佳組成。

使用之小瓶、標籤、墨水或標記類型應能承受液態氮的極低溫。

標籤上之標記應易於辨識並儘可能以條碼標記；如需要，標籤上的資訊最少應包括細胞群名稱或描述、冷凍保存日期、批號及繼代數。由於大多數冷凍標籤非常小，其他資訊可附於相關

文件中。在某些應用中，亦可能需要在單一批次內對每一小瓶依序編號，作為標籤上最基本資訊一部分，以利管控來自單一細胞庫小瓶之流向，並辨別細胞庫中可能接受不同冷凍保存條件處理之部分。

1.2.3. 冷凍保存溶液之添加

冷凍保存溶液通常為高張且非生理性，例如：一般用於細胞保存之 10% DMSO 溶液具有約 1.4 Osm/L 之容積滲透濃度，細胞置於該溶液時會迅速脫水，因為水要離開細胞以減少細胞內外滲透壓差異，而 DMSO 則緩慢滲透入細胞以重新達成平衡，如此可能使體積瞬間變化而導致細胞活性喪失。因此，通常會以逐步添加、或以漸進（例如：使用注射幫浦）或自容器側壁緩慢向下分注之方式將冷凍保存液加到細胞懸浮液中，以避免因滲透壓壓力引起之細胞損失。應開發加入或移除冷凍保存液之方法並評估其對細胞存活率與功能之影響。

以 DMSO 為例，當兩種溶液混合時，大量混合焓導致檢品溫度升高。此升溫可能高至足以對細胞造成傷害，因此通常會在混合前預冷含有 DMSO 之溶液。預冷溶液可減少因溶液混合所致之升溫、細胞所承受的滲透體積變化、及隨暴露於 DMSO 而來的細胞損失。在冷凍之前應限制細胞暴露於冷凍保存劑之時間，

且在開發方法時即應決定在不會產生有害影響下所允許之最長時間供常規使用。

1.2.4. 冷卻

一般在冷凍細胞時有兩種不同的方式：控制速率冷卻（使用可編程冷凍器）與被動式冷卻（包括使用隔熱容器）。控制速率冷凍器（controlled-rate freezers）與液態氮供應相連，根據預編程步驟，利用增加或減少進入腔室之冷氮氣流控制冷凍器腔室溫度；控制速率冷凍程序通常涉及數個步驟，每個步驟都應進行評估以符合特定細胞類型之要求。

使用控制速率冷凍可較精確的控制冷凍環境，因此對冷卻速率範圍（會影響最大存活率）窄小、或對胞外溶液形成冰晶的溫度敏感之細胞，提供了較一致（與較高）之解凍後回復率。利用放置在被冷凍細胞附近或同步經歷冷凍保存程序之模擬（對照）細胞懸浮液內之溫度探針，來監測冷凍過程並提供製程管制。如果融合潛熱的釋放延遲或控制不良，則進行冷凍保存的細胞可能受損，且可能降低解凍後存活率。

控制速率冷凍程序時可能發生中斷，通常肇因於控制速率冷凍器或冷媒之閥門故障；應準備對冷凍過程中斷之處理程序與備份計畫。

被動式冷凍係指將產品置於冷凍器（約-80°或-150°）讓其以未受控制之方式降溫。使用絕緣或專門設計的盒子以減緩檢品之冷卻速率。應對製程大部分可達成平均冷卻速率與冷凍曲線的一致性進行評估，且驗證符合目的。通常，在冷凍過程控制溫度環境可改善解凍後回復結果，但亦有特定細胞於被動冷凍後表現出與控制速率冷凍相當之解凍後回復率。

1.2.5. 低溫儲存、安全性及運輸

在冷凍過程完成後，產品從控制速率或機械冷凍器轉移到低溫儲存單元（cryogenic storage units）。一些微生物細胞培養物可適當地保存在機械冷凍器中，但仍應先經證明。將細胞製劑從冷凍裝置轉移到儲存單元時應儘可能避免檢品升溫，可使用冷臺或絕緣傳送裝置以達此目的。在外來病原測試完成前，通常會將新凍存細胞置於低溫儲存隔離單元；測試完成後，可允許外來病原陰性的細胞放行，轉移至長期低溫儲存單元。

用於維持凍存細胞的庫存系統（或儲存庫）設計時應考量存取便利性以減少樣本拿取次數，且應限制每天存取儲存庫之次數，因為暴露於較高溫度可能會損害細胞存活率，而影響長期安定性。細胞庫（例如：MCBs）或不常存取之其他細胞培養物應與 WCBs 或頻繁存取之其他細胞培養物分開儲存。頻繁存取細

胞庫/培養物可能導致溫度變化，此動作不應損及不常用之細胞庫/培養物的長期安定性與效能。此外，將細胞庫分為數份並分置於數個存放位置，以降低因特定地點出狀況所帶來之風險，亦有其價值。

在儲存凍存細胞時，分析人員應確保儲存溫度不會上升至一稱為玻璃轉換溫度（glass transition temperature）之臨界溫度。在氣相型液態氮冷凍器中長期儲存細胞株與初代細胞培養等苛求性檢品，若為非臨床檢品，此臨界溫度不高於 -130° ，至於臨床材料，則不高於 -150° （以提供足夠誤差範圍）。根據冷凍器形狀與設計以及液態氮含量之不同，液態氮冷凍器在氣相中易形成溫度梯度。儘管將凍存細胞儲存在液態氮中可延長其壽命，然而與不適用之容器或容器使用相關之危害（例如：小瓶爆炸與袋子破裂）使得液態氮氣相儲存日趨普遍。就小瓶取用而言，液態氮氣相提供了一個更為方便與安全的環境。如果適當配置液態氮冷凍器，氣相工作溫度通常可為 -150° 或更低。應驗證液態氮冷凍器，並定期檢查氣相溫度，以確保對細胞株或其他冷凍材料之溫度不高於 -130° ，或對臨床應用之材料（例如：細胞治療製劑）之溫度不高於 -150° 。

溫度監測系統應可記錄與儲存溫度歷程，以用於品質管制。儲

存單元應連接警報與設施監測系統；關鍵儲存單元應配備多級警報系統，以確保對監測與反應之備援。儲存單元應對因電源中斷與任何其他潛在故障引起之溫度失效（temperature failure）進行常規監測。如果發生設備或電源故障，應提供備用冷藏器。為使儲存庫適當運作，須有溫度與液態氮含量監測並可自動充填；此外，建議備有緊急冷卻系統（例如：空置之備用低溫儲存設備）以因應冷凍器故障情況。

只有通過細胞冷凍保存訓練之人員才能存取凍存的產品或檢品；在某些情況下，為滿足來源可追溯性之要求，需經第二人確認（verification）；受指定執行此程序的人員須接受標準作業程序（standard operating procedure, SOP）訓練。整合電腦軟體甚或條碼以進行辨識、登錄及追蹤冷凍檢品的檢品追蹤系統，對於大型檢品儲存庫特別有用，可助於快速檢索檢品，並且也可將整個儲存庫暴露於溫度偏移風險的時間降至最低。此外，建議將低溫儲存庫之所有變更記錄於儲存單元附近之登錄本（log book）。

產品與檢品如初代細胞、細胞株及細胞治療製劑等通常會於收集、加工、儲存及使用之場所間運送。凍存細胞通常以附有溫度監測系統之液態氮氣相運送裝置（vapor shipper）運送，以確

保此運送單元在運送過程中溫度不高於-130°（細胞株）或-150°（臨床材料）。運送容器在運送過程中會承受明顯震盪與機械應力，應定期評估功能正常與否。運送確效研究應涵蓋最壞狀況，並對關鍵材料進行溫度監測。

無論是國內或國際間運送之凍存細胞，都應遵循當地郵政、交通部及國際航空運輸協會的指引運輸。包裹亦應符合檢疫、生物安全及生物保全之其他法規要求。凍存細胞應以不影響細胞完整性的方式取出、包裝及運輸。對於大多數凍存細胞，短時間內以乾冰運送可能足已，但應對此運送過程進行確效，證明對細胞無不良影響，且應包括溫度監測；然而，某些細胞可能需要於液態氮氣相中（杜瓦瓶（Dewars））運送。可能須對運送方法預先確效以決定最佳方案，即使僅考慮一種運輸方案，亦應執行確效前風險評估。托運人應於該運送品項中檢附收到細胞時正確存放說明。

1.2.6. 解凍

使用常規方法（控制速率或被動式冷凍）或透過玻璃化（vitrification）冷凍之細胞應儘可能快速解凍，且一旦冷凍檢品從儲存中取出，解凍過程隨即開始；緩慢升溫速率導致再結晶傷害或使細胞暴露於細胞外之高濃度冷凍保存劑中，兩者任

一種都可造成細胞死亡；須針對各別細胞治療製劑與細胞株開發最適合之解凍程序（溫度、梯度及時間）。產品與細胞株通常以溫水浴槽解凍，或以珠浴（bead bath）或乾浴槽（thermoblock）解凍治療用細胞製劑。水浴槽應定期清洗，並裝入無菌水或注射用水並監測水浴溫度。許多臨床實驗室在快速解凍時會以塑料外包裝袋包住主要容器（primary container），以降低產品在主要容器完整性受損時受污染之風險。亦可選擇使用溫珠浴（通常約 37°）降低污染風險。解凍速率應儘可能快速（對大多數哺乳動物細胞：高於 1°/s）。若將浴溫提高至 42°以上以提高升溫速率時，需非常謹慎，因為高溫會破壞細胞、誘導細胞壞死或凋亡。

1.2.7. 解凍後處理與評估

因為冷凍保存液非生理性溶液，所以常需進行解凍後處理。保存在 DMSO 中之細胞，通常在解凍後會立即潤洗或稀釋，因為該冷凍保存劑對冷凍後解凍之細胞尤其有害。細胞對於擴張比收縮更為敏感，因此須小心對去除或稀釋冷凍保存劑之步驟進行最佳化，以避免因這些步驟損失細胞。

量化解凍後細胞的存活率很重要，此可藉多種方法進行，取決於細胞解凍後的需求。應根據經驗設定最低存活率限值，且丟

棄解凍後存活率低於設定限值之產品。冷凍保存過程會對細胞造成相當壓力，該壓力會改變代謝功能與膜結構等，因此，適用的解凍後測定法之開發與確效至關重要。解凍後最常針對物理完整性（例如：膜完整性）、代謝活性、機械活性（貼附或收縮）、有絲分裂活性或植入潛力進行功能評估。分析之選用很大程度取決於所需之細胞解凍後功能，其中以膜完整性最為常用。目前已經較少使用如台盼藍（trypan blue）等染劑來測量解凍後之物理完整性，因為此類染劑難以在冷凍後解凍之細胞上進行確效；螢光染劑用於決定細胞解凍後物理完整性的頻率則有日漸增加的趨勢。須依欲測量之特定細胞類型謹慎選擇與驗證存活率測定法，並依已指定稀釋液與時間之程序進行量測。嚴謹的解凍後評估方法通常包括多種細胞存活率測量，並含至少兩種獨立測定以量度解凍後存活率；例如，常用解凍後貼附與增殖評估存活率。隨著解凍後所需細胞功能的複雜性增加，對解凍後評估要求亦增加；例如，幹細胞解凍後評估可能就需要測定膜的完整性、增殖及細胞在解凍後分化成不同譜系之能力。應仔細開發並驗證解凍後分析以避免量測偏差。在冷凍期間會有一定比例的細胞進行裂解，因此測量細胞回復的方法中應包括一對細胞損失（包括已裂解細胞，以及雖完整但已死亡之細

胞)之完整評估。並應藉定期解凍與測試小瓶細胞以確保凍存細胞之安定性(亦參考ICH Q5D)。

MCBs 與 WCBs 製備後，外來病原應為常規檢驗，人或動物來源細胞株衍生之生技產品病毒安全性評估(通則 0000)與病毒學試驗方法(通則 4056)提供了額外測試指引。對於分枝桿菌污染，標準無菌試驗可能無法將之分離，亦可考慮對某些細胞基質進行檢測。應取具代表性小瓶進行污染測試(細菌、真菌、黴漿菌及病毒)。已有許多完善方法可用於檢測細胞培養物中之黴漿菌(黴漿菌試驗法(通則 7009))。

批次紀錄應詳盡，包括細胞歷史以及從接收到放行至細胞庫或產品供使用之所有活動。紀錄應涵蓋冷凍保存過程的詳細資訊，包括程序、使用設備(附帶特有識別碼)及冷凍概況紙本紀錄。

應定時監測凍存細胞存活率以確定冷凍過程與儲存條件之有效性。細胞株各個批次文件中之資訊須可追溯至原始來源，且應根據適當品質管理系統維護並更新所有文件。

2. 人類細胞治療製劑之凍存

細胞保存方法係用於確保多種人類細胞產品於持有、儲存及運輸階段期間之產品安定性(附加資訊參見先進細胞與組織治療製劑(通則 0000))。細胞可以液態懸浮液形式保存數日，但細胞

產品必會隨時間推移而發生質與量的變化。雖然保存在冷凍狀態下也會影響細胞產品，但在長期保存之後，仍能保留相當（且較可預估）比例的特定產品特性。

不管是何種細胞產品，是否要使用冷凍保存主要取決於細胞來源收集及產品製造步驟與最終產品投予時間間相連之程度。許多患者專一性自體與異體產品皆未經冷凍保存，從起始細胞來源到最終配方都保存在液態懸浮液中，在相對短的時間內以新鮮產品放行。然而，許多臨床應用需要凍存細胞來源、中間產物或最終產品。在這些例子中，冷凍保存有助於製造期間工作流程之最佳化、完成批次放行測試、維護與管理產品庫存、將產品運輸至臨床場所、或得以配合患者之醫療或手術方案投予產品。例如，將臍帶血凍存且保存於公用血庫中，待後續運輸至臨床移植中心暫存，等到將要輸注到患者體內前方予以解凍。

開發用於臨床細胞治療的冷凍保存過程須考慮對產品、患者及治療整體可行性的影響。對於細胞產品，製造商須確保冷凍保存與解凍所導致之細胞損失合理可預測，且須確保投予患者之最終產品將符合細胞數量、存活率及功能性特性等規格。

對患者而言，冷凍保存可能會影響最終產品效用與安全性，例如，冷凍保存劑 DMSO 與通常可預期且具劑量依存性之消化道、心血

管及神經毒性（通常歸因於組織胺釋放）風險相關，因此應估算或測量最終產品中之 DMSO 殘留量。ICH 將 DMSO 歸類為醫藥產品第 3 級（風險相對較低）的溶劑或賦形劑，一般認為每日劑量不超過 50 mg 為可接受（參見 ICH Q3C）。凍存的細胞產品除非於解凍後經過潤洗，通常含該劑量 10~20 倍之 DMSO；若投予多份凍存產品（於自體周邊血液幹細胞移植常見），則可能會暴露於更高劑量之 DMSO。於實際臨床細胞治療時，通常將 DMSO 每日限量設為 1g/kg 接收者體重。故亦應考慮防止 DMSO 毒性之程序，臨床上常見的作法是預先投予患者二苯安明（diphenhydramine）或其他抗組織胺藥以預防 DMSO 毒性，亦可考慮手動（離心）或自動化方法等產品洗滌方式，但須進行確效以確保適當洗滌後回復率與細胞功能。

凍存之細胞治療製劑的使用可能需要臨床單位接收、儲存及解凍，並對此凍存產品進行其他最終製備步驟。在進行可行性評估時需要考慮此單位執行上述任務的能力，包括專業人員、訓練、設備及設施等。

如果計劃冷凍保存作為製程的一部分，開發團隊須考慮冷凍保存對細胞數量與特性的影響，且應有可靠之細胞計數、以及細胞存活率與功能評估之方法。在開發過程中所執行之測定與分析，通

常較製程中與最終產品規定之試驗為多，此作法乃是為了評估產品任一操作之效果。由於某些細胞可能較其他細胞更容易受到凍融損傷，因此這些研究應包括對產品中重要細胞亞群選擇性損失之評估。

如前言所述，有幾個關鍵過程會影響冷凍保存程序之結果。以下是針對細胞治療問題之簡要討論。

2.1. 凍前處理

如果細胞收集時含有血漿，則檢品應以抗凝血劑進行適當處理以防止凝結；此外，某些細胞在離心時易凝集或聚集，且某些細胞產品中可能會有一或多個亞群出現過度的破壞或損失。從貼附或非貼附培養中收集之細胞可能含有大量死細胞或破碎細胞；因此，離心與潤洗步驟應針對產品之細胞內容物、懸浮體積、懸浮基質及容器等進行最佳化，且於這些操作前、後適當評估細胞產品。凍前處理（通則 0 0 0 0）不應在冷凍過程開始前即造成細胞壓力（例如：細胞中早期凋亡標誌蛋白或溫度衝擊反應的表現上升），否則細胞損失將高於預期。

2.2. 試劑與容器

應儘可能使用臨床級試劑與容器。通常使用經驗證符合特定之冷凍保存程序與後續的保存條件之無菌、一次性使用、拋棄式塑料

袋或凍管。細胞治療製劑之冷凍保存培養基通常由含有一或數種冷凍保存劑的等張食鹽水溶液所組成，一般含最終濃度為 5~10%之細胞內冷凍保存劑 DMSO，另含有或不含細胞外冷凍保存劑（例如：羥乙基澱粉）。培養基中常加入人類來源蛋白質添加物（例如：人類血清白蛋白、血清或血漿），但因它們可能需要多方驗證，因此應儘可能避免使用，並評估使用替代物的可能性；有時亦會使用例如：動物來源肝素、檸檬酸鹽為主之抗凝血劑及 DNase 等添加物。許多細胞處理中心會配方專用冷凍保存培養基，但有越來越多細胞治療製造商使用市售冷凍培養基（通常含有 5~10% DMSO 與其他專有成分），以消除變異性並避免因自行配方而產生之額外驗證的需求。

2.3. 冷凍保存液添加與冷卻

冷凍前應評估加入或去除冷凍保存液之程序，以確保由於此步驟所導致之細胞損失可降至最低。冷凍保存液通常以逐步添加或漸進（例如：使用注射幫浦）方式加至細胞懸浮液中，以防止由於滲透壓壓力而造成細胞損失；通常會對冷凍保存培養基進行預冷，並使用保冷包、冷凍被毯或低溫工作檯將細胞懸浮液及混合物保持於低溫狀態，以防止在添加 DMSO 過程中與熱相關之細胞傷害。一旦加入了冷凍保存培養基，通常會將細胞懸浮液移置已經

預冷之控制速率冷凍器的腔室中。在冷凍過程中，會產生一份冷凍腔室與產品隨時間變化之溫度紀錄或冷凍曲線，可將之納入生產紀錄中。產品溫度可透過置於產品袋外表面，或於模擬袋或小瓶內同步進行冷凍之可類比產品內之探針記錄下來。

2.4. 儲存與運輸

凍存的細胞治療製劑通常在 -150° 或更低溫度下儲存與運輸。主管機關僅針對細胞治療製劑之同種異體捐贈者有篩選與測試傳染性疾病證據之要求，對自體捐贈（autologous donations）則無此限。然而，許多細胞處理中心亦對自體捐贈者（autologous donors）進行測試，將由已知具傳染性疾病之自體捐贈者所得產品，與其他產品隔離儲存。過去曾有在同一液態氮儲存槽中之細胞產品發生 B 型肝炎交叉污染之報導，使得目前普遍使用氣相液態氮，並使用外包裝袋加強產品密封性之儲存方式。氣相液態氮儲存可能會有垂直溫度梯度之考量，儲存槽頂部之產品可能會較存放在底部的產品溫度為高。應監測溫度梯度，並將垂直溫度梯度降至最低，例如，藉由使用金屬熱分流器。若使用外包裝袋，則在隨後之解凍過程可能會降低檢品升溫速率，故應驗證外包裝之使用，並將其視為整體冷凍保存過程確效之一部分。

凍存細胞治療製劑之運輸通常係透過使用乾式裝置（dry shippers）

完成，其含有吸收性材料可以充填液態氮，適當充填情況下可以維持氣相溫度長達 2 週；使用數據紀錄儀記錄運送期間溫度歷程。該運輸容器與程序須先經過確效，方能將臨床使用之細胞治療製劑以此容器進行運送。

2.5. 升溫（解凍）

儘管於輸注前在病床側進行細胞治療製劑解凍於臨床實務上已相當普遍，但現在公認由受過訓練人員在有管制之實驗室環境中操作為解凍之首選方法，一來程序可更標準化，在工作人員面臨容器故障須採取反應時，也能有較高程度之掌控，因為此時可能需要較無菌之環境中搶救產品。產品解凍通常是透過將產品浸入 37° 水浴中完成，使用外包裝袋，使在主容器失效的情況下，產品損失與污染的風險可降至最低。解凍過程中可以輕揉袋子以降低袋子上溫度梯度並加速解凍。在大部分產品已經解凍，但其中仍有一些冰存在時，即可將產品從水浴中取出。

2.6. 解凍後處理

DMSO 對懸浮液中之細胞具有毒性，在輸注或進一步處理之前，可透過稀釋或潤洗細胞懸浮液以降低毒性。因為經過凍存的緣故，解凍細胞對從高張溶液轉移至等張溶液所致之體積膨脹更為敏感，因此稀釋液、洗滌液及稀釋或潤洗方法皆須仔細設計並確效。

使用常規離心機或自動化設備進行細胞潤洗會對細胞造成額外之機械應力，因此在臨床上採用特定方法之前，必須以適當方法評估細胞損失。

2.7. 品質管制操作

臨床細胞治療製劑之冷凍保存、儲存及解凍之品質管理必須納入人體細胞組織優良操作規範（Good Tissue Practices, GTP）與藥品優良製造規範（Good Manufacturing Practices, GMP）通用品質系統元素，包括人員資格、設施管制、文件管制、設備與材料管制、標籤管制及使用經確效之標準操作程序。臨床冷凍保存所特有之品質管制措施通常包括評估與文件化所有產品冷凍曲線、留樣管段（tubing segment）及小瓶，以進行後續測試、以及定期監測解凍後產品之品質。GTP 要求且適用於所有人類細胞與組織治療產品之實務包括：採用確保準確與完整之標籤與紀錄、確保將正確產品施用於患者、且可追溯細胞產品從採集到輸注之措施。這些要求在實務上意涵係指必須設計用於凍存產品之標籤與紀錄（包括庫存系統），以防止產品鑑別（identification of product）錯誤。對進出凍存儲存槽之產品需執行常規性鑑別確認，例如，由兩個人根據紀錄檢查產品標籤。若需要對產品鑑別執行其他確認，則可以在解凍整個產品之前，對連接至產品袋上留樣管段之

內容物進行解凍與測試。ISBT 128 為一套國際公認之血液與細胞治療製劑標示系統，對從捐贈者來源到投予之產品皆使用一致之產品命名法與條碼。

3. 造血幹細胞

造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 對冷凍反應之研究始於 1950 年代，且凍存 HSCs 在過去 30 年來已廣泛用於臨床。臨床應用中最常用於凍存 HSCs 的方法乃使用 10% DMSO 與冷卻速率設定為 $1^{\circ}/\text{min}$ 之控制速率冷凍器。另一個較不常見的方法則是在 -80° 機械冷凍器中對 HSC 產品進行被動式冷凍，並使用 5% DMSO 加上 6% 羥乙基澱粉溶液。細胞通常以 $30\sim 50\times 10^6$ cells/ml 的密度進行冷凍。超過 20% (v/v) 之細胞比容 (cytocrits) 已證明會降低細胞回復率。檢品解凍後評估包括有核細胞、活 CD34⁺細胞、造血群落形成單位 (hematopoietic colony-forming units) 之計數及隨後之從相應凍前數值計算回復率。

臨床用之凍存 HSCs 可以從骨髓、驅動周邊血液或臍帶血液 (umbilical cord blood, UCB) 中獲得，每種來源都有獨特之保存要求。例如，周邊血液前驅細胞產品含大量細胞，可以較高細胞濃度冷凍數袋。UCB 保存步驟可能包括使用注射幫浦引入冷凍保存液，使滲透壓壓力減至最低。UCB 通常於解凍後使用特定溶液

稀釋或去除 DMSO，使細胞之滲透壓壓力減至最低。

4. 間質幹細胞

自 1990 年代中期以來，間質幹細胞(mesenchymal stem cells, MSC)臨床用途之相關研究迅速發展。可靠、安全及高效之冷凍保存與儲存方法至關重要，對製成多種劑量產品，用於治療為數甚多之不同臨床適應症患者之同種異體現成 MSC 產品尤甚。

由於傳統上 MSCs 係於含有胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)之培養物中製備，這些細胞之冷凍保存培養基中通常會加入 FBS。

最近，正在開發於冷凍保存前培養擴增時所使用之 γ 射線輻照之 FBS 的替代物，且已成功冷凍保存在含有 5~10% DMSO 與其他不含牛來源蛋白質成分的培養基中之細胞。儘管目前對解凍後細胞處理之方法尚未趨一致，於一些程序中均納入細胞稀釋或潤洗以降低 DMSO 影響。新興 MSCs 臨床應用可能需要重複投予細胞產品，此作法必須注意冷凍保存培養基成分之潛在免疫原性（例如：FBS 或其他蛋白質）。

MSCs 解凍後評估通常包括使用膜完整性染劑(membrane-integrity dyes)，例如，台盼藍、表面抗原表現、以及證明細胞有能力進行多譜系分化。因為 MSCs 之作用機制可能涉及細胞的免疫調節或營養特性，因此解凍後評估亦應包括相關的細胞功能。

5. 淋巴細胞

淋巴細胞之多種臨床應用，包括用於治療癌症、病毒感染及自體免疫疾病之免疫治療。以淋巴細胞為基礎之治療可包括於體外選擇或活化之混合淋巴細胞群或淋巴細胞亞群（例如：調節性 T 細胞、自然殺手細胞及已活化 T 細胞）。與造血細胞相同，淋巴細胞通常使用 10% DMSO 溶液以 $1^{\circ}/\text{min}$ 控制冷卻速率進行凍存。淋巴細胞可能會有解凍後大量凋亡情形，此足以影響細胞臨床效能。與混合淋巴細胞群相比，高度純化之淋巴細胞群可能會產生更大規模之解凍後凋亡。抑制凋亡蛋白酶（caspase）與以細胞激素（cytokine）挽救等策略已被用於減少解凍後淋巴細胞凋亡。

6. 人類多潛能幹細胞株之保存

多潛能幹細胞（pluripotent stem cells, PSCs）係顯示具有以下能力之細胞：（1）進行自我更新與無限複製；（2）生產可代表三個胚層組織之細胞，其於免疫缺陷小鼠可產生畸胎瘤之能力，可證明係為製造所有人體細胞所必需。用於體外實驗室研究之兩種主要幹細胞類型為人類胚胎幹細胞（human embryonic stem cells, hESCs）與人類誘導性多潛能幹細胞（human induced pluripotent stem cells, hiPSCs）。hESCs 係分離與培養自捐贈者的多餘囊胚內部細胞團（此組織已發展到可形成胚胎）而得。hiPSCs 為對體細胞進行人工重

新編程（藉由使用多種方法遞送重新編程因子），以生成可表現上述 PSCs 關鍵特性之細胞。hiPSCs 可從多種體細胞類型中衍生而來，透過數種方法以確保特定重新編程因子表現。已知一系列組織衍生之體外培養物內，藏有幹細胞群（例如：皮下脂肪、骨髓、胎臍的臍帶與血液、來自胎兒神經脊之原始生殖細胞，以及神經幹細胞球體培養物等）皆顯示有一定限度之體外複製能力，但尚未建立為穩定二倍體 PSC 細胞株。這些培養物將不在本通則中所討論，以下章節將專門介紹 hESC 與 hiPSC 細胞株。

PSC 細胞株為複雜的數種組成分之細胞培養物，且可能包括各種不同細胞群，具有或高或低之分化程度或譜系趨向，但幹細胞培養關鍵特性，即必須持續自我更新。此外，細胞必須保有遭受不對稱分裂能力以產生兩種不同的子細胞：一種是與親代細胞相同的幹細胞，另一種保有較低程度的幹細胞潛能（意即可產生不同細胞譜系的能力）。

6.1. 多潛能幹細胞現行方法開發

目前，實驗室都有各自偏好之使用方法，沒有單一方法能主導常規使用，且似乎可藉由玻璃化或控制緩慢速率冷凍保存而獲得可接受程度之解凍後存活率與回復。然而，本節說明一個可達成更好細胞回復之常見方法。簡言之，此技術乃以較低濃度 DMSO

加入乙二醇 (ethylene glycol, EG) 溶液平衡後，將 hESCs 細胞群落置於由 20% DMSO、20% EG 及 0.5 mol/L 蔗糖所組成之玻璃化溶液中，接著將細胞群落裝入麥管並浸入液態氮中。另一種常見方法是將細胞群落置於 10% (v/v) DMSO 組成溶液中，且使用被動式冷凍裝置或可達到大約 $1^{\circ}/\text{min}$ 之平均冷卻速率所設計的控制速率冷凍器。

玻璃化 IPS 或 hES 檢品具有特殊儲存與運送要求。所有凍存或玻璃化的檢品必須在低於檢品玻璃化轉換溫度狀態下儲存，且對玻璃化檢品之儲存溫度相較於傳統凍存的細胞檢品更低溫(例如： -150°)。此外，在儲存或運送過程之溫度波動可能導致結晶，而造成檢品降解。由於玻璃化檢品對這些溫度波動敏感，應在液態氮溫度下且不可使用乾冰進行運送。

對 PSC 細胞株提供具可靠性與再現性保存挑戰不僅在於保存過程本身，亦關係製備、冷凍保存及回復程序。具體而言，冷凍保存前收集與操作方法可能導致大量細胞損失。處理程序應儘可能做到可再現，並使用 SOP 以加強保存結果再現性。再者，PSC 細胞株之有效保存受到方法挑戰，細胞通常為了保存目的透過該方法繼代與收集(意即將單一細胞長成之細胞群落分成更小群落，並轉移到新鮮培養瓶中進行擴增或保存基質中進行冷凍)。首先，

為了避免早期收集細胞之存活率大量損失，用於製造細胞庫的培養物實際上可能需要小批量保存長達一個工作天。其次，製備包含較小集合體的細胞群落片段（smaller pools of cell colony fragments）之 PSC 細胞庫不僅耗時費力，且還無法像分裝小瓶時將細胞製備均質化，如同使用較傳統保存細胞株方法會發生之情況；因此，PSC 細胞株小瓶間之一致性受到影響。再者，將冷凍 PSCs 作為細胞群落片段保留了已知會在細胞間形成之間隙連接（gap junction），可能導致在細胞間冰晶產生與大量存活率損失。

為了避免這當中某些問題，分析人員在冷凍保存前可使用酵素法分散細胞群落，以簡化並加速細胞之收集，使冷凍保存更均質之單細胞懸浮液。為謹慎起見，有些實驗室選擇僅在冷凍保存之前進行酵素法分散，並非用於常規培養。分析人員應儘可能使用非動物來源酵素製劑離散細胞。PSC 細胞株另一重要特徵為在細胞群落內發生非定向分化，此情況雖然常見但發生率不一，且在同一培養中諸多群落間可能有很大差異。具有高比例分化細胞之群落應予以丟棄，因為分化細胞是 PSC 培養中不良成分，且可能影響群落內未分化細胞特性。

6.2. 多潛能幹細胞株保存之考量點

分析人員應在保存 PSC 細胞株時考量許多重要因素，包含闡明凍存種原（cryopreserved stocks）之製備、收集、庫存建立及測試等各方面。

6.2.1. 評估與收集

分析人員應規律地觀察培養之細胞。表現出大量分化細胞之培養應予以丟棄，各研究員或細胞庫機構應具有品質管制程序以定期評估培養分化情況，且發展出在一個培養中可接受分化限值。冷凍保存劑平衡檢品後，應立即收集細胞將損失減至最低。

6.2.2. 細胞庫製程

傳統細胞庫建立程序需要先發展 MCB 與 WCB。MCB 中細胞應以較早繼代數（P10~P20）保存，以便在最少繼代數下對細胞進行實驗與細胞株研發工作。第一個 WCB 之建立應以最少繼代數達到所需細胞數量。為了提高一致性，根據需要後續可從 MCB 相同之繼代數替換 WCBs。

6.2.3. 存活率

解凍後 PSCs 之存活率與功能的決定很複雜，且經常使用錯誤方法。解凍後評估最常見方法為使用膜完整性染劑。為了衡量存活率，將具有完整膜之細胞比例與沒有完整膜細胞比例進行比較；另一種相當常見的方法為定量 PSC 群落形成，計算接種

到培養盤中群落總數，然後在一定培養時間後再次計數，此方法亦可評估細胞其他功能特性（例如：貼附與增殖能力）。

註：諸如細胞收集與冷凍保存等程序可能會誘導細胞凋亡。早期（細胞表面上磷脂醯絲胺酸）或晚期（膜聯蛋白 VI）之凋亡標記物染色可提供有關冷凍與解凍後細胞培養之總體健康狀況洞察力（insights）。

6.2.4. 均質性

如前所述，透過玻璃化保存細胞群落片段會加劇小瓶或麥管之細胞間缺乏均質性。當建立較大 PSCs 細胞庫時，分析人員應依充填順序從細胞庫取出前、中及後段位置之小瓶，測試其存活率、生長速率及關鍵指標（參見 6.2.3. 存活率）。

6.2.5. 幹細胞特性

為了檢查 PSC 細胞株在保存期間中未失去任何幹細胞特性，分析人員應檢查一系列關鍵幹細胞相關標誌之表現。一項廣泛的研究分析了 59 個 hESC 細胞株與 94 個基因組，並解開 5 種與幹細胞相關的分子，這些分子 mRNA 在 hESCs 中表現具一致性。這些基因現已納入專門設計用於研究幹細胞群之商用微流體基因晶片中。如果證明 PSCs 保留其多潛能性為至關重要，則可進行多項鑑別試驗，包括免疫缺陷小鼠中畸胎瘤形成、三

層類胚狀體形成及定向分化，以證明該培養物可產生人體所有細胞所需三個胚層組織中每一種代表。

6.2.6. 基因安定性

在 iPSC 與 hESC 兩細胞株中，異常核型細胞株在延長繼代與過度生長的培養中並非罕見。因此，分析人員應監測此類異常細胞培養。傳統上，是將細胞分裂中期（metaphase）細胞散布並透過 Giemsa 染色進行核型研究；非二倍體細胞發生，即使發生率非常低，也可能是問題。諸如 2009 年國際幹細胞庫計畫提出之指引文件有助於決定是否應丟棄此類培養物；然而，如陣列比較基因體雜交（array comparative genome hybridization）與單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism）陣列等新方法提供對遺傳安定性更詳細分析且可與 Giemsa 染色帶併用，使對遺傳安定性更具信心。

6.2.7. 最佳操作

除了遵循良好細胞培養規範之外，分析人員亦應注意特定指引之可利用性，其包含用於研究目的之 hESCs 採購、細胞庫建立、測試與儲存原則及最佳操作。該指引對 iPSC 與 hESC 細胞株均有用。

7. 用於生產、鑑別生物技術衍生及生物治療製劑之細胞基質

各種重組與非重組細胞均被凍存且用於人類生物製劑與生物技術衍生 (B&B) 產品之生產與鑑別。主要類別包括源自哺乳動物 (包括人類)、昆蟲 (主要為飛蛾) 細胞株, 及選定的細菌與酵母菌株。最常見用於生產人類生物技術衍生產品之微生物基質為重組大腸桿菌、嗜甲醇酵母菌 (*Pichia pastoris*) 或酵母菌 (*Saccharomyces* spp.) 等菌株。雖然用於製造 B&B 產品細胞類型之間存在高度差異, 但在冷凍保存操作中仍具有驚人之均一性, 且相同原理適用於製造用細胞、用於測試不明外來病原及產品效價之細胞。通常以二階或三階 (two- or three-tiered) 細胞庫系統來維持生產細胞株或微生物菌株。對於使用三階系統儲存庫, 第一階儲存庫可稱為研究、種子、儲備、登錄、前 MCB 或親代細胞儲存庫。前 MCB 來源可以是研究或開發實驗室, 亦可購自商業細胞庫之細胞。建議用於選殖前進行親代細胞庫鑑別。第二階 (或二階系統中的第一階) MCB 或主細胞儲備庫 (master cell stock, MCS) 是直接從該親代細胞庫中所製備, 具有最少細胞繼代數或代差。必須對 MCB 或 MCS 進行廣泛測試以確認純度、表現型、基因型、蛋白質表現或其他重要屬性。WCB 或工作細胞儲備庫 (working cell stock, WCS) 係衍生自連續培養後之 MCB 小瓶。WCB 用以製造細胞基質, 為了接種入終端生產之生物反應器、發酵槽或大量培養容器

(例如：滾瓶)，可透過重複繼代培養擴大規模。在細胞庫系統每一階，適當冷凍保存對於產品開發與製造之成功都至關重要。在某些情況下，亦可儲存最終生產細胞 (end of production cells) 作為細胞庫驗證測試一部分。

7.1. 哺乳動物與昆蟲細胞株

哺乳動物細胞株係生產複雜蛋白質分子之首選細胞基質。哺乳動物細胞具有蛋白質轉譯後醣基化 (posttranslational glycosylation) 作用所需之內在生物機制，此作用其通常對蛋白質在人體安定性與生物活性至關重要。二倍體與異倍體細胞株 (包括融合瘤細胞 (hybridomas)) 均可用於生產生物技術衍生治療。二倍體細胞株為常見疫苗基質 (例如：W1-38 與 MRC-5 (人類纖維母細胞株)、BHK-21 (倉鼠嬰腎細胞株) 及 MOCK (Madin-Darby 犬腎細胞株))。此外，非洲綠猴 Vero 細胞株 (異倍體細胞株) 已用於數種美國許可之疫苗。如今，常用異倍體細胞株包括各種重組中國倉鼠卵巢 (Chinese Hamster Ovary) 細胞株與人類胚胎腎細胞株。對於這些細胞株，冷凍保存方法已經相當標準化。然而，研究人員發現當他們使用新細胞基質時，研究不同冷凍保存劑與所用濃度之毒性極為有用。

昆蟲細胞株已證明其具有產生各種重組多肽能力。昆蟲細胞株衍

生自節食蛾 (*Spodotera frugiperda*) 與毛滴蟲 (*Trichoplusia ni*)

最為常見，所建立之細胞株分別稱為 Sf9 與 Tn5(或 High Five)。

重組蛋白生產採用重組桿狀病毒 (baculovirus) 感染進行異源基因轉移。儘管與哺乳動物細胞相比，昆蟲細胞株需要不同營養因子、較低培養溫度及較高滲透壓，但相同冷凍保存之基本要素適用於此兩類細胞。

除了「1.2. 冷凍保存操作之關鍵要素」部分章節外，對於動物細胞株基質尚應考慮以下附加要點：

7.1.1. 凍前處理

分析人員應確保細胞不受污染且仍為存活狀態。對於二倍體細胞，分析人員應使其生長至可維持二倍體且低於預期使用量之繼代數。分析人員混合所培養之細胞並進行細胞計數以確定可用於庫存之活細胞數；以相對較低速率進行短時間離心收集細胞，例如 100~200×g 離心 5~10 分鐘，且最好使用低溫離心機。

7.1.2. 冷凍保存劑與冷凍容器

選擇膜通透性之冷凍保存劑係將 DMSO 稀釋於新鮮生長培養液，使成濃度 5~10% (v/v) DMSO。對某些敏感細胞株，可以添加細胞培養所得之條件培養液以補充冷凍保存培養基。

DMSO 應為無菌且組織培養級 (純度>99%)。最合適冷凍容器

為預先滅菌之設計用於氣相液態氮中低溫儲存聚丙烯螺帽小瓶。

7.1.3. 加入冷凍保存培養基

細胞在離心後，隨即從細胞沉澱物中移除生長培養基，對許多細胞類型而言，藉由緩慢加入預冷之冷凍培養基，輕輕地重新懸浮細胞。根據活細胞計數與預定細胞密度（通常以大約 1×10^7 cells/mL 之活細胞密度生產細胞庫），立即以適當體積之冷凍保存培養基稀釋細胞懸浮液。如上述，冷凍保存培養基具有更高張性，應限制細胞暴露時間。將最終細胞懸浮液轉移至可以在其中輕輕混合細胞容器中，使在充填小瓶過程中有助於細胞庫均一性。

7.1.4. 冷卻、控制速率冷凍及儲存

小瓶可藉由手持式吸量裝置或自動裝瓶機進行手動充填。此兩種情況下，通常都會在充填過程中對小瓶進行冷藏，以降低 DMSO 在較高溫度下潛在毒性作用。應建立整個充填過程之時間限制，並將其記錄於批次紀錄中。冷凍小瓶充填完後，分析人員應立即將其轉移至控制速率冷凍器中；或者將小瓶放入設計用於控制冷卻之絕緣容器並轉移到超低溫恆定冷凍器（例如： -80° ）中。任何控制之冷凍系統均應經過適當驗證，以確保預

期冷卻速率在負荷範圍內可傳遞到所有小瓶中。當使用控制速率冷凍器時，分析人員會根據經驗決定最佳冷卻程序，但是對於大多數細胞株，通過融合熱轉變後的速率範圍為 $1\sim 5^{\circ}/\text{min}$ （低於約 -40° ，可提高速率，例如： $10^{\circ}/\text{min}$ ）。當小瓶在冷凍系統中冷凍至大約 -80° 或更低後，將它們儘可能迅速轉移到液態氮氣相儲存單元中。

7.1.5. 升溫與小瓶解凍

一般而言，以緩慢冷卻速率冷凍之細胞應儘可能迅速解凍，使細胞存活率最大化。為了確保溫度均一性，應將冷凍小瓶從液態氮氣相儲存裝置直接轉移到可攜式氣相（乾式）裝置中以運送到實驗室。如果沒有液態氮杜瓦瓶可用，有時會將冷凍小瓶裝在乾冰中，但應證明此過程之適當性，因為它可能導致有害之 pH 值變化。轉移到實驗室後，將冷凍小瓶直接放入溫水浴（例如： 37° ，確保瓶蓋未被浸入）、珠浴或乾浴槽中。註：昆蟲細胞株應在 $27\sim 30^{\circ}$ 解凍。小瓶應予以攪動有助於細胞均勻解凍。解凍後，小瓶應立即轉移到生物安全櫃中並在打開前進行消毒。通常，將生長培養基緩慢加入解凍細胞中，同時予以攪拌以稀釋 DMSO，並將融化後環境之滲透壓緩慢降低至生理程度。

7.1.6. 解凍後處理

此步驟可以不同方法來完成，但分析人員應使 DMSO 達到充分稀釋，然後將細胞恢復至正常等張生長環境。由於凍融過程會引起壓力，應減少解凍後立即操作細胞，例如，應減少吸放與離心。

7.2. 微生物菌株：大腸桿菌、酵母菌及細菌疫苗菌株

重組大腸桿菌菌株具有生產許多商業上生物技術衍生產品的追蹤紀錄，包括重組胰島素類似物、人類生長激素及副甲狀腺激素。相較於哺乳動物與昆蟲細胞，重組大腸桿菌菌株更容易生長與增加規模體積（例如：40,000 L）。然而，細菌缺乏為構建更複雜之蛋白質分子需要轉譯後修飾（例如：糖基化）之複雜的細胞機制。酵母菌為真核單細胞，可進行基因操作以產生複雜程度有限之多種重組蛋白與肽。儘管哺乳動物與微生物之細胞基質間存在演化差距，適用上述相同必要冷凍保存條件，另具有以下特點：

7.2.1. 凍前處理

應使用特定菌株生長條件，將培養物在搖瓶中增殖至對數生長期末期或靜止期前期。

7.2.2. 冷凍保存劑與冷凍容器

甘油可作為具細胞壁或細胞膜通透性之冷凍保存劑（有時亦會

使用 DMSO)，濃度通常為 5~10% (v/v)。合成甘油與不含動物成分之其他原料應一併用於商業產品註冊。

7.2.3. 加入冷凍保存培養基

由於微生物細胞具有保護與支持細胞質組成物之細胞壁，因此物理處理與滲透壓變化不會對動物細胞株產生相同的負面影響。離心後，立即將細胞沉澱物以劇烈方式重新懸浮於冷凍保存培養基（根據細胞庫所需之小瓶數與每 mL 存活之群落形成單位 (colony-forming units/ml) 進行稀釋）。此稀釋步驟基於培養物光密度之主動測量或其他細胞計數分析而定。將最終細胞懸浮液轉移到容器中，此最終容器可於充填期間混合細胞，有助於細胞庫之均一性。由於潛在毒性，儘管微生物細胞具有相對的耐受性，分析人員仍應限制微生物細胞暴露於甘油的時間。小瓶可藉由手持式吸量裝置或自動裝瓶機進行手動充填。

7.2.4. 冷卻、控制速率冷凍及儲存

同樣地，由於微生物細胞固有之耐受性，不需要像動物細胞株嚴格地控制冷卻速率。因此，選擇冷凍系統或方法對細胞庫存活率影響較小者。可將裝滿之冷凍容器簡單地轉移至大約 -80° 冰箱中隔夜，然後再轉移到氣相液態氮中。或是，不使用液態氮儲存，但可以大約 -80° 儲存微生物細胞庫。然而，若能使用

液態氮儲存，則對於長期儲存（例如：數年）而言係為首選。

若使用控制速率冷凍器，則應完全驗證以提供預期範圍內的均

勻冷卻速率（例如：1~5°/min）。

7.2.5. 升溫與容器解凍

對於微生物細胞而言，控制冷卻與升溫的速率較不具關鍵性，

但仍應儘可能使用溫水浴（例如：30~35°）迅速解凍細胞（可

以將水浴溫度調整至菌株之培養溫度）。

7.2.6. 解凍後處理

加入生長培養液以稀釋解凍後細胞使每 mL 含所需之群落形成

單位，並誘導去除細胞內甘油。細胞生而不同，本質互異。為

製造人類 B&B 產品長時間演進將各種細胞基質區分開來。對

於工業細胞培養操作者來說，冷凍保存策略組合成一套橫跨演

化路徑之共享原理與方法。