

## 利用微粒子細胞培養所增殖之假性 狂犬病病毒製造疫苗

劉堂輝 鍾明華 紀長文 邱資峰 詹益波

### 台灣省家畜衛生試驗所

Key Words : Pseudorabies , microcarrier cell culture

假性狂犬病病毒能於長滿 cytodex I 微粒子表面的 RK-13 細胞中增殖並產生高量的病毒。培養 3 ~ 5 天之細胞感染病毒後產生之病毒力價相似，均高達  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml。利用這些病毒所製造之不活化疫苗沒有副作用。豬與家兔經免疫後產生很高的免疫與保護效力，其中豬經兩次免疫油劑疫苗後 4 ~ 6 週之中和抗體力價平均 1 : 95 而免疫 DEAE - dextran 疫苗者為 1 : 45 ; DEAE - dextran 疫苗與油劑疫苗對家兔之 50 % 保護劑量分別為 > 1 : 18 及 1 : 11 劑量。因此利用微粒子培養細胞、繁殖病毒進而製造疫苗實為日後大量製造假性狂犬病組織疫苗的可行方法。

自從培養細胞被用來繁殖病毒製造組織培養疫苗後，細胞的需求量逐漸加大，因此大規模生產細胞的慾望也就相對的殷切。1967 年 van Wezel<sup>(6)</sup> 開發出微粒子培養細胞的方法克服了吸附依性細胞 (anchorage-dependent cells) 無法大量增殖的瓶頸。由於本省畜牧業發達疫苗的需求大，唯有以微粒子行大量生產疫苗，才能降低疫苗成本提高疫苗品質嘉惠農民。吾等以往之研究發現濃縮之病毒製備的 PR 疫苗較未濃縮者效果佳<sup>(4)</sup>，又 Liu et al<sup>(6)</sup> 利用微粒子成功培養動物細胞株並產生高力價的假性狂犬病病毒。因此利用微粒子培養細胞增殖病毒實是提高 PR 疫苗品質之可行方法。因此本實驗在於探討 PR 病毒於微粒子表面之 RK-13 細胞增殖，並以此製造

疫苗的可行性。

### 材料與方法

培養基：所有細胞均培養於胎牛血清與新生牛血清各 4 % 的 Eagle MEM (以上皆為 GIBCO 產品) 培養液中。

細胞：RK-13 細胞採來自 ATCC 而於本研究室培養 15 ~ 20 代。

病毒：假性狂犬病病毒 TNL 株是本所自台南某養豬場病豬腦組織分離得來，病毒力價為  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml。

微粒子：cytodex I (pharmacia 產品) 為粉末狀，將其懸浮於無二價陽離子的 PBS 溶液中，濃度為 2 g/l。微粒子於使用前以 MEM 洗一次後懸浮於培養細胞用的培

養基中。培養時微粒子之濃度為  $3 \text{ mg/ml}$ 。

設備：體積  $500 \text{ ml}$  的微粒子培養瓶 (Spinner flask) 3 個，每個都以磁性鐵弗龍葉片攪拌。以及含雙磁力座的攪拌機兩台 (以上均為 Bellco 產品)。培養瓶以及所有有關的玻璃器具均經 Sigmacote<sup>(R)</sup> (Sigma 公司產品) 矽化處理，以防微粒子附著於玻璃壁。

迴旋瓶培養法：將細胞培養於  $690 \text{ cm}^2$  之迴旋培養瓶中。

微粒子懸浮培養法：培養於  $690 \text{ cm}^2$  的迴旋培養瓶中之細胞供作微粒子懸浮培養之用。將  $0.9$  公克之 Cytodex I 放入培養瓶內連續攪拌使之預溫到  $37^\circ\text{C}$ ，然後加入細胞液。液微粒子數與細胞數之比為  $1:20$ ，並調整體積至  $100 \text{ ml}$ 。以  $22.5 \text{ rpm}$  的攪拌速度於  $37^\circ\text{C}$  培養 4 小時後，加入細胞培養液至總體積量為  $300 \text{ ml}$ 。然後繼續以  $60 \text{ rpm}$  攪拌培養。

細胞數計算與細胞生長分析：從迴旋瓶消化下來的細胞直接利用血球計算盤求細胞數而微粒子培養之細胞則以計算細胞核的方式求出<sup>(9)</sup>。細胞生長分析是取少量 (約  $0.1 \text{ ml}$ ) 懸浮培養液於載玻片上，以倒立顯微鏡直接觀察並分析長滿細胞之微粒子的百分比。

病毒感染：本試驗使用之病毒接種量為  $\text{MOI} = 1$ 。迴旋培養細胞以鍾等<sup>(4)</sup>之方法行之。而微粒子培養細胞則於靜置 10 分鐘後抽棄上清液，然後加入  $200 \text{ ml}$  病毒培養液 (含胎牛血清與新生牛血清各  $1\%$ )，再培養 18 小時後，約  $90\%$  之細胞出現 CPE 後，以超音波處理並經  $60 \mu$  孔徑的濾網除去微粒子，如此得到之病毒液供製備疫苗用。

病毒力價測定：依鍾等<sup>(2)</sup>方法行之。

疫苗配製：上述之兩種不同培養法之病毒液，其力價分別為  $10^{8.0}$  與  $10^{9.0} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ 。依鍾等<sup>(2)</sup>之方法以 BEI 不活化後，配製成 DEAE-Dextran 與油劑疫苗<sup>(4)</sup>，唯第二乳化劑之 PBS 則以病毒液代替之。

國外進口疫苗：來自法國的油劑疫苗。

家兔效力試驗：60 頭家兔分為 4 組，按疫苗檢定方法，分別注射上述各疫苗之  $\frac{1}{3}$ ， $\frac{1}{6}$ ，

$\frac{1}{18}$  劑量，每劑量各 5 頭 (免疫組別如表一所示)，兩週後再注射同量疫苗，再二週後以  $100 \text{ LD}_{50}$  病毒攻毒之，另有 3 頭在攻毒時分別注射  $10 \text{ LD}_{50}$ ， $1 \text{ LD}_{50}$  及  $\frac{1}{2} \text{ LD}_{50}$  病毒作對照組。

小豬安全性及抗體反應試驗：14 頭 4 週齡無抗體小豬分為 4 組。第一、二各組 4 頭，第三組 3 頭，分別注射微粒子疫苗與法國疫苗 (免疫組別如表三) 各兩次，間隔為兩週。最後一組 3 頭為對照組。所有試驗小豬在每次疫苗注射後一週內每天測量體溫觀察食慾及其他臨床症狀。並在注射前及注射後 2、6、8 週採血，測定中和抗體。

中和抗體測定：依鍾等<sup>(9)</sup>方法行之。

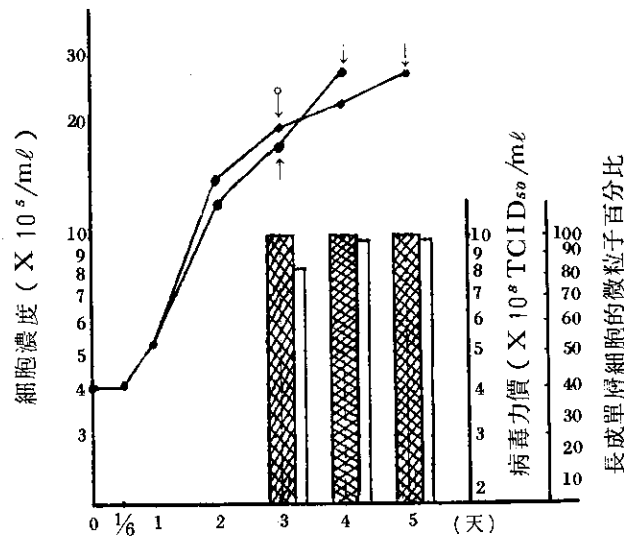
## 結 果

PR 病毒於微粒子細胞培養之繁殖：為了解 PR 病毒繁殖與微粒子培養之 RK-13 細胞生長關係，以不同培養日數之細胞接種 PR 病毒其結果如圖一所示。病毒各接種於 3、4 與 5 日齡之細胞；此時長成單層細胞的 cytodex I 之百分比各為 86, 97, 97。其病毒力價均為  $10^{9.0} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ ，但每細胞產生病毒的能力分別為 392, 256, 256  $\text{TCID}_{50}$ 。由圖二可知培養於微粒子表面之細胞與培養於迴旋瓶的細胞一樣，仍保持對病毒的感受性並引起細胞產生明顯的 CPE。

疫苗對小豬安全性及副作用試驗：各種疫苗對小豬均不會引起發燒、食慾不振與膿瘍等不良現象。

家兔效力試驗：各疫苗免疫後，以強毒攻擊結果如表一所示。由實驗 I 之資料顯示微粒子培養法製成之 DEAE dextran 疫苗  $1/18$  劑量尚有保護效力，而以迴旋培養法製成之 DEAE dextran 疫苗則無。由實驗 II 知  $1/18$  劑量之微粒子培養法製成之 DEAE dextran 疫苗可完全保護家兔而油劑疫苗 (B 與 C) 則只有部分保護。各疫苗 (順序如表一所示) 對家兔之  $50\%$  防禦劑量分別為  $1/14$ ， $1/4$ ， $>1/18$ ， $1/11$  與  $1/16$ 。

疫苗對小豬之抗體反應：14 頭無抗體之 4 週齡小豬分別注射微粒子培養法製備之 DE



圖一 RK - 13 細胞生長與 PR 病毒繁殖關係

- : 培養基更換
- : 病毒接種
- : 細胞生長曲綫；陰影柱表示病毒力價；空白柱表示形成單層細胞之微粒子百分比。



圖二 培養於 cytodex I 表面 4 天的 RK - 13 細胞 (左, 250×)  
 , 其感染 PR 病毒 18 小時後出現之細胞變性 (CPE) (右,  
 250 ×)

AE-dextran 與油劑疫苗及法國疫苗等疫苗後抗體反應如表二所示。第二次注射係在第一次免疫後兩週於採血後行之。免疫注射微粒子培養製成之 DEAE-dextran 及油劑疫苗之小

豬於第一次免疫後即出現 5 倍左右的抗體，而法國疫苗組則只有 2 倍左右的低力價而已。第二次免疫後第 4 週（即第一次免疫後 6 週時抗體力價達最高，三組分別為 64.0，98.8 與

81.3，再2週後免疫微粒子DEAE-dex-tran與油劑疫苗組之抗體力價分別漸降低至31.6與91.2，然微粒子油劑免疫組之力價仍較維持等力價的法國疫苗組為高。累計第6

與8週之抗體力價，微粒子培養法製成之DEAE-dextran、油劑及法國疫苗免疫組分別為45.0，95.0與81.3。

表一 各種疫苗之家兔效力比較試驗

| 試 驗 | 疫 苗 *          | 劑 量      |       |        | 防 禦 劑 量 ** |
|-----|----------------|----------|-------|--------|------------|
|     |                | 1 / 3    | 1 / 9 | 1 / 18 |            |
| I   | A <sub>1</sub> | 5 / 5 ** | 4 / 5 | 2 / 5  | 1 / 14     |
|     | D              | 2 / 5    | 2 / 5 | 0 / 5  | 1 / 4      |
| II  | A <sub>2</sub> | 5 / 5    | 5 / 5 | 5 / 5  | > 1 / 18   |
|     | B              | 4 / 5    | 3 / 5 | 2 / 5  | 1 / 11     |
|     | C              | 5 / 5    | 5 / 5 | 2 / 5  | 1 / 16     |

\* 試驗I與II之A疫苗為不同批號，為利用微粒子培養法所製成之DEAE dextran疫苗，而B為油劑疫苗；C為外國製油劑疫苗；D為以迴旋培養的病毒所裝配的DEAE dextran疫苗。

\*\* 分子=存活數；分母=接種數。 \*\* 50%防禦劑量。

表二 小豬對各種疫苗之免疫反應

| 疫 苗     | 仔豬免疫 |     | 第 一 次 免 疫 後 各 週 之 中 和 抗 體 價 |                        |                         |            |                         |
|---------|------|-----|-----------------------------|------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
|         | 頭 數  |     | 0                           | 2                      | 6                       | 8          | 6 ~ 8                   |
| A       | 4    | < 2 |                             | 5.3 ± 1.3 <sup>a</sup> | 64.0 ± 0.0              | 31.6 ± 1.5 | 45.0 ± 1.3              |
| B       | 4    | < 2 |                             | 4.9 ± 1.8              | 98.8 ± 1.2 <sup>d</sup> | 91.2 ± 1.2 | 95.0 ± 1.1 <sup>e</sup> |
| C       | 3    | < 2 |                             | 1.6 ± 1.6              | 81.3 ± 1.3              | 81.3 ± 1.3 | 81.3 ± 1.1              |
| Control | 3    | < 2 |                             | ND                     | ND                      | < 2        | < 2                     |

A疫苗為DEAE-dextran疫苗；B為油劑疫苗；C為外國製油劑疫苗。

A與B疫苗均由微粒子培養法製備。

a：算術平均數±標準誤差

d與e：P < 0.05與P < 0.02（與A比較）

ND：未測試

## 討 論

經過濃縮的PR病毒所製造的疫苗較未濃縮者為佳<sup>(4)</sup>，但由於濃縮過程繁複，因此提高病毒力價，實為當務之急。利用微粒子懸浮培養RK-13細胞以繁殖PR病毒，結果發現

細胞產生病毒的能力較迴旋培養法高<sup>(6)</sup>；本試驗證明利用微粒子培養所增殖之高力價PR病毒有利於高品質疫苗的生產製造。病毒的產量與細胞的品質、數目及養份供應有關。細胞的培養時間較長，細胞數目雖然較多，但病毒產量並未隨之增加，每個細胞的病毒產量反而

較低，這或許是細胞較老化（活力較差）或因細胞數目增加，對養份需求較多，因此無法提供充份的養份供病毒繁殖<sup>(6)</sup>。

利用微粒子培養法生產的病毒所製造的疫苗安全性很高，未發現有副作用。且其以 DEAE - dextran 為佐劑之疫苗較以傳統迴旋培養法生產的病毒製造成的疫苗及外國油劑疫苗對家兔之保護效力為高（表一）。另外，以用油劑為佐劑之疫苗免疫 4 週齡仔豬後產生的血清中和力價較傳統 DEAE - dextran 為佐劑之疫苗為高，且亦不遜外國疫苗（表二），由此可知利用微粒子培養法生產的疫苗，其抗原性不但沒有改變反而有很好的保護能力與刺激抗體產生的能力。同時亦提供了吾人進一步利用發酵槽更大量的增殖病毒製造假性狂犬病疫苗的可行資料。

由表一、二可知本實驗室利用微粒子培養的病毒配製的油劑與 DEAE - dextran 疫苗於家兔的保護效力試驗與仔豬中和抗體的產生結果不一致。油劑疫苗於刺激仔豬抗體產生上較 DEAE - dextran 疫苗好，而於家兔保護效力上則 DEAE - dextran 疫苗較好。其原因如何尚未可知。兔子免疫後產生抗體的情形如何，本試驗未測試，若其抗體反應如仔豬一樣，即 DEAE - dextran 疫苗較油劑疫苗產生較低的抗體力價，則是否意謂 PR 抗體的高低與保護效力不成正比。畢竟 PR 病毒感染時細胞免疫的重要性已被確定<sup>(7)</sup>。

筆者等依 Herbert<sup>(2)</sup> 法配製油劑疫苗，唯第二乳化劑的 PBS 則以病毒液代替。其於第 2 週即能刺激抗體產生，其力價雖略遜於 DEAE - dextran 疫苗而卻高於外國油劑疫苗，而且於第一次免疫後第 8 週仍維持高力價的抗體，由此可知，以此種方法配製的油劑疫苗兼具有水劑疫苗能快速刺激抗體產生達到緊急預防的效果與油劑疫苗慢慢刺激抗體產生，長期維持力價的優點。

由於油劑疫苗中抗原所佔的比例很低約 16.6%，而此種利用微粒子培養細胞的方法能產生高量濃縮的病毒，故有利油劑疫苗的製造。

## 參考文獻

1. Herbert, W.J. 1965. Multiple emulsions, a new form of mineral oil antigen adjuvant, *Lancet* ii, 771.
2. Jong, M.H., and S.S. Lai. 1979. Comparison of the micro-immunodiffusion test and micro-serum-neutralization. *J Chinese Soc Vet Sci.* 5, 67-70.
3. Jong, M.H., T.H. Liu and I.P. Chan. 1985. Development of the subunit vaccine against pseudorabies. *Exp. Report of Taiwan provincial Research Institute for Animal Health.* 21, 17-22.
4. Jong, M.H., T.H. Liu, I.P. Chan, T.F. Chiou and C.W. Tseng. 1987. Improvement of the techniques on pseudorabies inactivated vaccine production based on adjuvant selection. *Exp. Report of Taiwan provincial Research Institute for Animal Health.* 22, 81-87.
5. Karger, S. 1979. Discussion for microcarrier culture for virus vaccines. *Develop. Biol. Standard.* 42:171-172.
6. Liu, T.H., M.H. Jong, T.F. Chiou, C.W. Chi, and I.P. Chan. 1987. Technique for culturing animal cells on the surface of microcarriers. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 13(4). 277-284.
7. Skoda, R., I. Brauner, E. Sadecky, and J. Somogyiova. 1964b. Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. II. Immunization of pigs under laboratory condition. *Acta Virol.*,

- Prague 8: 123-134.
8. van Wezel, A.L. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*. 216:64-65.
  9. Microcarrier cell culture. 1981. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

**Inactivated pseudorabies vaccine produced from the virus  
grown in cell culture on microcarriers**

TANG-HUI LIU MING-HWA JONG CHANG-WEN CHI  
TZY-FENG CHIOU I-PO CHAN

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

The production of pseudorabies virus from RK-13 monolayer cells grown on the surface of cytodex I microcarriers and the potency of the vaccines prepared with such virus were investigated. The titer of the virus was  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml. The virus amount produced by cell cultures 3-5 days old were similar.

Inactivated vaccines prepared with DEAE-dextran or oil as an adjuvant induced good protection for rabbit and good immunity for pigs. The average SN titers of pigs 4-6 weeks after second vaccination with oily vaccine were 1:95, with DEAE-dextran vaccine, 1:45. For rabbit, the 50% protection dose of DEAE-dextran vaccine was over 1:18, of oily vaccine, 1:11. They were free from side effects. It is suggested that the method is a potent approach to a large scale production of concentrated inactivated pseudorabies tissue culture vaccines.