

懸浮培養細胞及其對假性狂犬病病毒之感受性

劉堂輝 鍾明華 邱資峰 紀長文 詹益波

台灣省家畜衛生試驗所

探討倉鼠肺細胞株 V 79-379 A 之懸浮培養與影響該細胞懸浮培養之條件。細胞以 70 rpm 攪拌培養可得到最高的細胞產量。1.0 × 10⁶ 個/ml 的細胞培養 4 天後可達到 1.3 × 10⁶ 個/ml，其細胞生長率較其他高濃度之細胞培養者為高。培養用血清濃度於 4% 時，較 8% 及 10% 更適於細胞培養。

懸浮培養之細胞於培養第 3 天或第 4 天時繼代培養可得到相似的生長結果。懸浮培養 3 天之細胞放置於 4°C，經 1~2 天不會失去活性，若此等細胞再懸浮培養其生長情形與未放置即繼代培養之細胞相同，然若放置 3 天以上則有差異。懸浮培養之 V 79 細胞可用來增殖假性狂犬病病毒，其力價可達 10^{8.6} TCID₅₀/ml。每個細胞產生病毒量較靜置或迴旋培養之細胞為高。

自從本世紀初期 Carrel⁽²⁾ 發展出培養哺乳動物細胞的方法後，由於這些細胞主要被用以培養病毒進而製造疫苗，因此大量生產細胞的慾望更為殷切，很快地大家了解到細胞如能像微生物般的懸浮培養則可滿足大量生產細胞的目的。所以初期的研究工作大部份集中在懸浮培養動物細胞方法的開發。

Owens 等人⁽³⁾ (1954) 發現哺乳動物細胞能於懸浮狀態下生長繁殖後，Capstick 等人⁽⁴⁾ 於 1962 年馴化出可懸浮培養之 BHK-21 細胞株，此後並被用來大量培養口蹄疫病毒，進而大量的製造不活化疫苗，其後有數種病毒抗原亦以此方法生產出來，包括 Rabies virus⁽⁵⁾ VEE virus⁽⁶⁾ 與 Ibaraki virus⁽⁶⁾。由此可知這種培養方法實為大量生產各種病毒抗原相當好之方法。

假性狂犬病在本省造成極大的損失，每年

需要大量（約 150 萬劑）疫苗免疫母猪預防本病發生。因此開發懸浮培養法大量生產假性狂犬病疫苗實有需要。此病毒能於大部份細胞，包括 V79-379A (hamster lung cell) 增殖。

本實驗在探討 V79-379A 細胞之懸浮培養方法以及假性狂犬病病毒於此培養中繁殖的適當條件。

材料與方法

細胞：V79-379A 細胞株購自 FLOW 公司，以一般單層培養法在本所繼代 3 代。

病毒：假性狂犬病病毒 (PRV) TNL 株是本所自台南某一養豬場，病豬腦內分離而來。繼代於 RK-13 細胞。本試驗所使用者經 V79-379A 馴化 4 代者。

懸浮培養：懸浮培養用底直徑 10 公分，

體積 1500 ml 的玻璃瓶，細胞培養量為 500 ml，以磁性鐵福龍葉片攪拌，其速度由磁力攪拌機控制，培養時均無 pH 控制及（除採樣外）無空氣之交換。

細胞用培養基：懸浮培養用之專用培養基為 Flow 公司出品之 Eagle MEM (Modified)，其含 L-glutamine，而接種病毒後使用一般培養細胞用之 Eagle MEM (GIBCO)。

細胞生長培養液為含胎牛血清 (FCS, GIBCO) 之懸浮培養液。活細胞數經 Erythrosin B 染色，二分鐘內判讀並以血球計算盤計算。

單層細胞培養及病毒之增殖：靜置培養與迴旋培養依一般方法行之。

病毒於懸浮培養之增殖：懸浮培養靜置一夜後，除棄上清液，以含 3% 胎牛血清之病毒培養液 (含 MOI = 1 PRV, 原體積 1 / 100

量) 混合並於 37 °C 感作，1 小時後再加病毒培養液至原體積之一半量後，繼續以 70 rpm 速度攪拌培養。80 % 細胞死亡時收集並將其超音波後置 -70 °C 直至測定力價。

病毒力價測定：依 Jong et al.⁽⁶⁾ 法行之。

結 果

懸浮培養時攪拌速度對細胞增殖的影響：

哺乳動物細胞與細菌不同，其缺乏細胞壁，很容易受到溶液之切力 (shearing force) 而破壞⁽⁴⁾，若培養時溶液攪拌速度不夠則細胞無法充份得到氧氣，因此懸浮培養細胞時之攪拌速度與細胞增殖關係需要加以探討，以 40 rpm, 50 rpm, 60 rpm, 70 rpm 與 80 rpm 等各攪拌速度懸浮培養 V79 細胞，進而比較細胞增殖情形，結果如圖 1。40 rpm 與

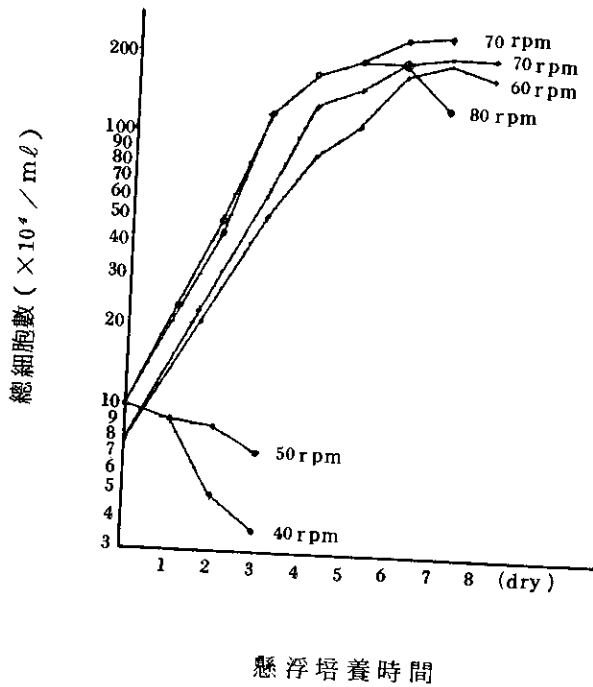


圖 1 攪拌速度對細胞增殖之影響

50 rpm速度所培養之細胞多呈集團狀，無法形成如於較高轉速培養時之呈單一細胞。此集團細胞經 Erythrosin B 染色後發現其細胞有死亡現象。細胞數目無法增加反而隨培養時間的增長而降低，第3天僅各為 3.6×10^6 與 7.0×10^6 個/ml，而集團中之死亡細胞却隨之增加，至第4天殆無存活細胞。40 rpm較50 rpm培養者更不利於細胞生長。

60 rpm速度攪拌培養時細胞可增殖，至第6~7天達高峰，細胞數為 $1.7 \sim 1.9 \times 10^6$ 個/ml，細胞無結團現象。70 rpm與80 rpm培養時細胞生長曲線與60 rpm者相似。70 rpm培養之細胞較60 rpm為佳，第6~8天細胞數為 $2.0 \sim 2.4 \times 10^6$ 個/ml。80 rpm與70 rpm培養初期細胞數，無明顯差異，然第5天即達高峰， 1.9×10^6 個/ml。第7天細胞下降至 1.3×10^6 個/ml。

血清對細胞增殖影響：

細胞培養時加入之血清經攪拌或充氣時，

易產生氣泡，進而影響細胞之生長，因此使用之血清愈少可減少氣泡產生。以含4%，8%與10%胎牛血清(FCS)之細胞培養液培養細胞，其結果如圖2，4%FCS培養之細胞增殖較8%FCS者快，細胞於第5天達 2.1×10^6 個/ml，而8%FCS者為 2.0×10^6 個/ml。另外，培養用血清經 56°C ，30分鐘非動化後較未動化者對細胞生長為差，以10%FCS為例 1.5×10^6 個/ml之細胞培養3天後之數目，前者為 1.3×10^6 個/ml而後者為 1.7×10^6 個/ml。

培養開始時之細胞濃度探討：

為探討不同之起始培養細胞數之細胞的生長情形，以(A) 1.0×10^5 個/ml (B) 2.5×10^5 個/ml 與(C) 5.0×10^5 個/ml 等細胞濃度加以探討，結果如圖3。細胞約3~4天達最高，A組細胞數為 $1.2 \sim 1.3 \times 10^6$ 個/ml，B組 1.4×10^6 個/ml 而C組為 $1.4 \sim 1.5 \times 10^6$

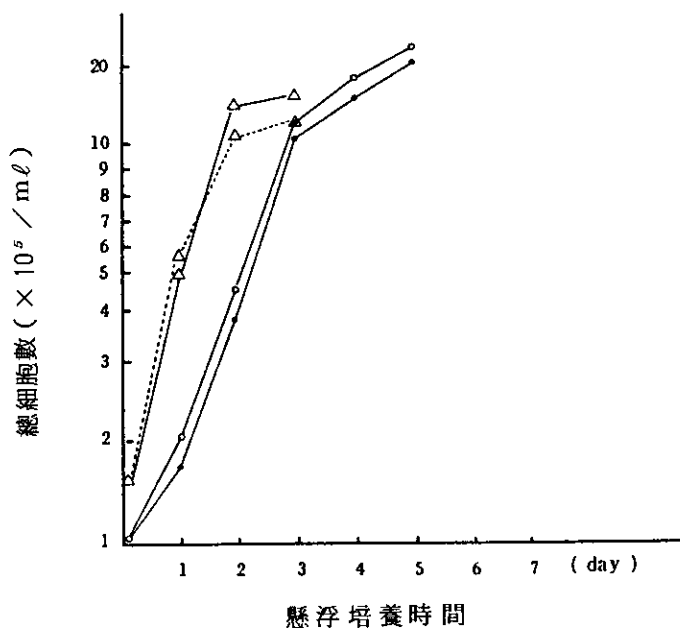


圖2 血清濃度對細胞增殖之影響

- 4%胎牛血清培養液(FCS)
- 8%FCS
- △—△ 10%FCS
- △·····△ 10%FCS經 56°C 30分鐘非動化

個/ml，細胞濃度較低者起初 24 小時之生長速度較細胞濃度高者遲緩。以細胞生長率 (Ct / Co) 而言，A 組最高為 12 ~ 13，依次為 B 組 5.6 而 C 組為 2.8 ~ 3.0。

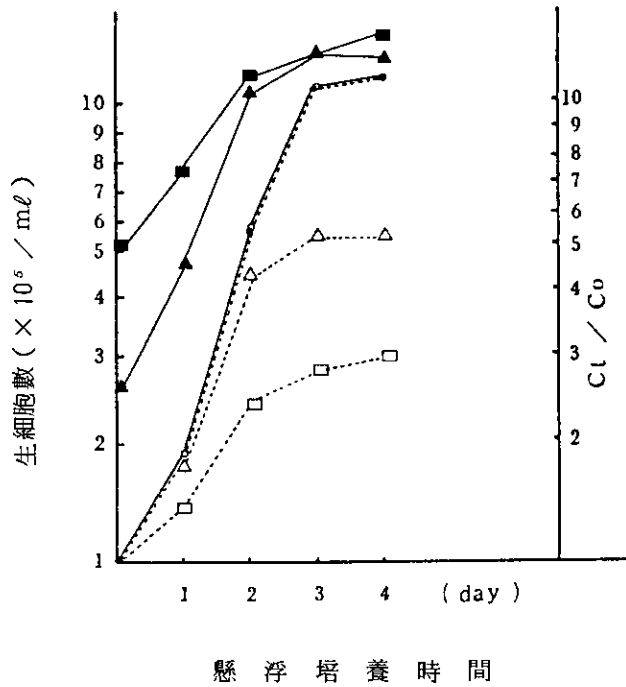


圖 3 細胞濃度與細胞之增殖關係

○——● 1.0 × 10⁵ / ml
 △——▲ 2.5 × 10⁵ / ml
 □——■ 5.0 × 10⁵ / ml
 ——— 細胞數
 - - - - - Ct / Co
 Co 培養開始之細胞濃度
 Ct 培養七天後細胞之濃度

細胞繼代培養與培養液之更換：

細胞處於高峰期時更換原體積 2 / 5 或加入等量之新鮮培養液行繼代培養發現細胞無法繼續增殖至原細胞濃度。若離心除去所有培養液然後加入同量的新鮮培養基，細胞亦無明顯的增加，如圖 4 所示離心後，若以新鮮培養基

，將其稀釋至 1.0 × 10⁵ 個/ml，再繼續培養則可達到 1.3 × 10⁶ 個/ml 與旋轉培養而來的細胞之 1.4 ~ 1.5 × 10⁶ 個/ml 相近。又細胞懸浮培養至第 3 天或第 4 天時繼代培養，其增殖相似，於培養 3 天後達 1.3 × 10⁶ 個/ml。

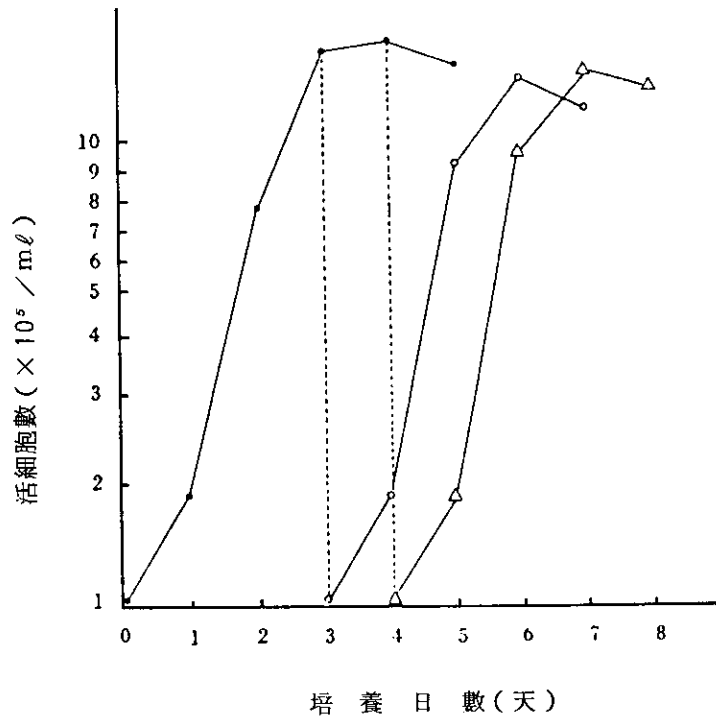


圖 4 懸浮培養繼代之細胞培養

- 從旋轉培養而來細胞之懸浮培養
- 從前者培養至第三天時繼代之細胞懸浮培養
- △——△ 從前者培養至第四天時繼代之細胞懸浮培養

4 °C 保存細胞之增殖：

由於使用大醱酵槽培養大量細胞，因此細胞於繼代或接種病毒時均需將細胞培養液除去，其中以靜置沉澱法最為簡便、安全，因此探討 4 °C 保存對細胞存活與增殖的影響實屬必要。

細胞於懸浮培養 3 天時取出細胞懸浮液分置於 4 隻離心管，其中一支離心管換新鮮培養液繼續培養，其他三支則於 4 °C 靜置 1、2、

3 天後倒棄上清液，並加入新鮮培養液繼續培養。培養 3 天時細胞增殖情形如圖 5，於 4 °C 保存 1 天者細胞數達 1.3×10^6 個/ml，保存 2 天者 1.45×10^6 個/ml 與未保存者 1.25×10^6 個/ml (參考圖 4) 相近，但保存 3 天者，則有顯著的差異，僅 9.0×10^5 個/ml。至於 4 °C 保存後細胞存活情形，如表 1。

懸浮培養 3 天之細胞較 4 天之細胞死亡與

表 1 懸浮培養之細胞保存於 4 °C 之存活情形

樣品之懸浮培養日數	4 °C 保存天數			
	0	1	2	3
3	3.2*	3.0	2.7	27
4	3.4	4.8	14	-

* 死亡數 / 存活數 × 100 %

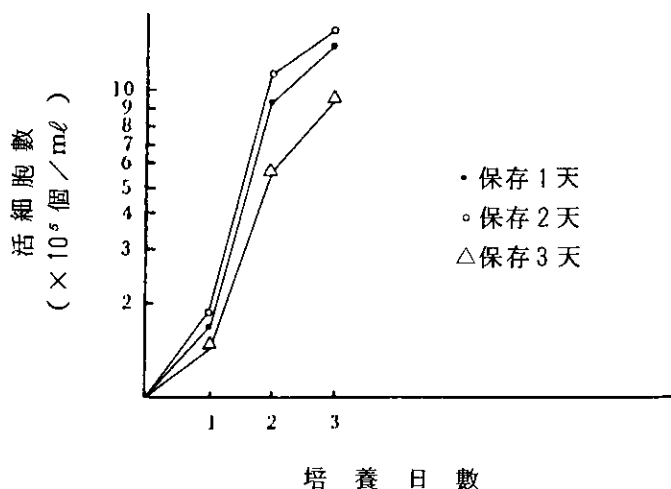


圖 5 4°C 保存後細胞增殖

存活比例相近，而且前者保存 4°C，2 天無明顯之死亡，至第 3 天死亡比例增加，然懸浮培養 4 天者第 2 天死亡比例即增加。

病毒培養液對 PR 病毒增殖影響：

為比較 PR 病毒於三種不同病毒培養液中培養其病毒產量是否不同，以含 3% FCS 之 Suspension MEM，Eagle's MEM 及前兩者各半混合之 MEM 為病毒培養液，以 1/100 之原體積 (1000 ml) 之 PR 病毒液 (MOI = 1) 先感作 13×10^8 個 V_{79} 細胞 1 小時後，各加入以上三種病毒培養液至 1/2 原體積，以 70 rpm 攪拌培養，其結果為 Eagle's MEM 組於培養 24 小時之病毒力價即達 $10^{8.6}$

TCID₅₀ / ml，其餘兩組於 48 小時 達最高，Suspension MEM 組為 $10^{8.0}$ TCID₅₀ / ml，混合之 MEM 組為 $10^{8.3}$ TCID₅₀ / ml。PR 病毒於三種不同細胞培養法之產量比較：

病毒於三種不同培養方法—靜置培養法、迴旋培養法與懸浮培養法所培養之 V_{79} 細胞繁殖之產量加以比較。病毒以 MOI = 0.6 ~ 1 感染細胞，結果如表 2，病毒力價分別為 $10^{8.6}$ 、 $10^{8.1}$ 與 $10^{8.0}$ TCID₅₀ / ml，其中以懸浮培養得到最高力價，至於每個細胞之病毒產量分別為 47、50、100 ~ 125 TCID₅₀ / ml，前兩者無明顯差異，小量懸浮培養與大量 (5000 ml 瓶) 者亦無明顯差異。

表 2 假性狂犬病病毒於三種不同培養方法增殖之 V_{79} 細胞之產量

培養法	培養基量 (ml)	總細胞數	病毒力價	每細胞病毒產量
靜置培養	20	43×10^6	$10^{8.0}$	47
旋轉培養	40	100×10^6	$10^{8.1}$	50
懸浮培養 (小)	500	1600×10^6	$10^{8.6}$	125
懸浮培養 (大)	3000	12000×10^6	$10^{8.6}$	100

討 論

組織培養之細胞已被用來培養病毒進而製造疫苗，然而單層培養之細胞無法達到大量生產病毒抗原的目的。到1962年Capstick 等人⁽¹⁾以懸浮培養法培養 BHK - 21 並增殖 FMD 病毒，此後並被利用來大量製造 FMD 疫苗，另外亦有許多懸浮培養繁殖病毒的例子，如狂犬病病毒⁽²⁾ VEE 病毒⁽³⁾，RVF 病毒⁽⁴⁾，Ibaraki 病毒⁽⁵⁾。

本試驗證明 V79-379 A 細胞株可以懸浮培養方式培養。1.0 × 10⁵ 個/ml 細胞於含 4% FCS 的懸浮培養基中以 70 rpm 速度攪拌培養 4 天細胞數可達 1.3 × 10⁶ 個/ml。細胞培養於 4% FCS 之培養基時之生長數目與含 8% FCS 之培養基相近，但較含 10% FCS 之培養基好，又血清濃度高易產生氣泡影響細胞生長，故 4% FCS 較適合細胞之生長。細胞生長受到 pH 與溶氧的影響^(6,7)。本試驗是以密閉方式培養無法控制 pH 與溶氧，若能加以控制則細胞數可能增加。

懸浮培養之細胞達高峰期時更換培養基無法再提高細胞數目，唯有先稀釋至低濃度時如 1.0 × 10⁵ 個/ml 再繼續培養則可達到細胞繼代的目的，細胞於高峰期（第三、四天）繼代培養可達到與原懸浮培養相同的生長曲線，此時之細胞數亦最高且保存於 4°C，2 天仍能維持活力與增殖力故為懸浮培養繼代之適當時間。以一般 Eagle's MEM 培養基增殖病毒其力價較以懸浮培養基培養者高，此可能因後者無二價陽離子致使病毒吸附細胞之能力差之故。以每細胞之病毒產量而言，懸浮培養法增殖之病毒量較其他兩種傳統培養法高，而且單位體積亦最大，故最適合大量增殖病毒。

參考文獻

1. Capstick, P.B, R.C. Telling, W.G. Chapman, and D.L. Stewart. Growth of a colned strain of hamster Kidney cells in suspended culture and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth dis-

- ease. Nature, Lond 195. 1163-4, 1962.
2. Carrel A: Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. J. Exp. Med. 17. 14-20. 1913.
3. Chapman, W.G. I.A. Ramshaw, and J. Crick, Inactivated rebies vaccine produced from the Flory LEP strain of virus grown in BHK-21 suspension cells, Appl. Microbiol 26, 858-62, 1973.
4. Glacken, M.W. R.J. Fleischaker and A.J. sindkey:Mammalian cell culture:engineering principles and scale-up. Trends in Biotechnology 1. 102-8, 1983.
5. Jong. M.H. and S.S. Lai: Comparison of the microimmunodiffusion test and micro-serum-mutrialization. J. Chinese Sce, Vat. Soi, 5. 67-70, 1979.
6. Klein. F.W.I. Jr. Jones, B.G. Mahlandt, and R.E. Lincoln: Growth of pathogenic virus in a large-scale tissue culture system. Appl. Microbiol 21. 265-71. 1971.
7. Owensp O. ven H. M.K. Gey. and G.O. Gey. Growth of cells in aqitated fluid medium Ann. H.Y. Acad Sei 58. 1039-55. 1954.
8. Sugimura, T.Y. Tanaka, and T. Tokui. Growth of Ibarakivirus in suspension culture of Hmlu-1 cells. Nat Inst Anim. Hith Quart 15. 174-8. 1975.
9. Tribble. H.R, H.J. Jr Hearn, and S.C. Jr. Nagle Replication of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in suspension cell cultures grow in serum-free and de-

- fined media. J. Gen. Virol. 10. 231-6. 1971.
10. Telling, R.C. and C.J. Stone. A method of automatic PH Control of a bicarbonate-CO₂ buffer system for the submerged. culture of hamster kidney cells. Biotechnol. Bioengin. 6, 147-58, 1964.

Growth of Cells in suspended culture and their susceptibility to pseudo rabies virus

T.H. Liu, M.H. Jong, T.F. Chiou, C.W. Chi, I.P. Chan.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The established hamster lung cell line, V79-379A could grow in a suspended state. The effect of changes in the conditions which control the growth of V79 cells in suspension were examined. The maximum cell yield was attained at 70rpm. The initial cell count, 1.0×10^5 /ml increased to 1.3×10^6 /ml on 4th day of culture with the higher cell growth rate (Ct/Co) than any other higher initial cell counts. Serum at a concentration of 4% was more suitable for cell culture than that at 8% and 10%. Cells in suspended state could be passaged during different state, e.g. on 3rd or 4th day, with the same growth potential. Cells from the 3rd day suspended culture, though Kept at 4°C for 2 days, did not lose their Viability and could grow as well as those passaged immediately, but It was not true for the longer cultured cells.

The suspension culture of V79 cells was proved satisfactory for propagation of pseudorabies virus. The viral titer reached a maximum of $10^{8.6}$ TCID₅₀/ml. The viral yeild per cell from the suspension culture was higher in comparison with that from the monolayer cultures either in stationary or in rolling condition.