

# 以微粒珠子培養細胞增殖 豬假性狂犬病毒

何維莊 曹素華 賴秀穗

## 摘 要

本研究係以商業產品 Cytodex 1 微粒珠子應用特殊培養瓶 ( Micro Carrier flask ) 培養 BHK - 21 及 RK - 13 細胞，並利用來增殖豬假性狂犬病毒。BHK - 21 及 RK - 13 細胞的培養，分別在培養後第 3 及第 4 天可獲得最高的細胞濃度 ( 500 ml 含  $2.0 \times 10^{10}$  及  $1.5 \times 10^{10}$  個細胞 )。

以微粒小珠培養的細胞增殖豬假性狂犬病毒與一般滾動培養方法比較，未能獲得更高的病毒力價 (  $10^{8.0-8.5}$  TCID<sub>50</sub> / ml )，但以微粒珠子培養可節省操作時間，經費及減少污染等益處。

## 緒 言

Carrel 首先成功的將哺乳動物的細胞在試管中無限期地繼代培養<sup>1</sup>。此後許多種細胞株陸續地被開發，並廣泛地用來培養病毒。多年來，許多人從事大量哺乳動物細胞的培養，特別是為了增殖大量的病毒以供製造疫苗之需。

最初，細胞被培養在密封的玻璃瓶的底部，形成單層細胞。然這種單層細胞之培養技術，細胞的生長面積受到限制，因而發展出許許多不同的方法加以克服，例如，以滾動瓶培養技術大量製造口蹄疫病毒<sup>4</sup>。又如 McCoy 等所發展的固質填滿培養系統，係利用玻璃珠或玻璃螺旋管填充於玻璃柱體內，使細胞通過並附著後，再以培養液持續地循環其間來培養細胞<sup>3</sup>，另有衆所周知的 BHK 和 Hela 細胞株以懸浮培養法，廣泛地利用來製造口蹄疫疫苗與德國麻疹抗原，但其缺點為非每一種細胞株都可以懸浮培養技術來培養。

Van Wezel 發表以微粒珠子培養哺乳動物細胞，並用以製造不活化的小兒麻疹疫苗<sup>5</sup>。微粒珠子直徑約 100  $\mu$ m，乃是由 Polystyrene、Sephadex 或 Polyacrylamide 製造出來，這

種微粒小珠提供了極大的培養面積，此外生長在珠子上的單層細胞也可視為一種懸浮培養。

不活化的豬假性狂犬病疫苗，與口蹄疫疫苗一樣，也被認為是最有效，且最安全被用來控制該疾病的疫苗，因此，大量製造豬假性狂犬病毒乃為研製疫苗的先決條件。本報告所敘述的培養技術中，乃採用本實驗室用以增殖豬假性狂犬病毒最敏感的二種株細胞，BHK-21 和 RK-13。

## 材料與方法

細胞株：本試驗所用的 BHK - 21 和 RK - 13 細胞，乃來自美國的細胞收藏中心 ( ATCC )。所使用的培養液是 Eagles' MEM，含 5% 胎牛血清。

病毒：是 1978 年，從死豬的腦分離到的豬假性狂犬病毒，曾分別在滾動瓶培養的 BHK - 21 和 RK - 13 細胞繼代增殖二次，病毒力價在 BHK - 21 細胞為  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub> / ml，在 RK - 13 細胞為  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub> / ml。

微粒珠子：本試驗所用的微粒珠子 Cytodex 1，乃 Pharmacia 公司的產品，乾燥的珠子

直徑是 60—87 $\mu$ m。

器具：500 ml 的微粒珠子培養瓶和磁力攪拌器都採用 GIBCO 公司的產品。

細胞的接種率和生產效率：先取 1 公克乾燥的 Cytodex 1 微粒珠子放在培養瓶中，經 120°C，15 分鐘濕熱滅菌之後，加入 250ml 含 5% 胎牛血清的培養液中，以極低速（50—100rpm）攪拌，再加入 250 ml 細胞懸浮液（ $2-5 \times 10^4$  個細胞/ml）置 37°C 房培養。細胞接種率的計算，乃以有細胞附著的 Cytodex 珠子與沒有細胞附著的 Cytodex 珠子之比，其數值分別在 1、2 和 3 小時培養後，抽取 0.1 ml 懸浮液鏡檢計算而得。並以所抽取的 0.1 ml 懸浮液作十段稀釋，再用 thomas' Chamber 計算，而得知每公克的珠子數。細胞接種後，分別在 24、28、72、96 和 120 小時抽取懸浮液做細胞濃度的比較，在不同時間各取 10 ml 懸浮液低速遠心沉澱，用 PBS 洗兩次後，再加 0.25% TV 消化 5 分鐘，並輕微搖盪之，待細胞脫落，除去 TV，加入等量 PBS，用 thomas' Chamber 計算細胞數，如此而得知細胞的生長率。

以微粒珠子培養的細胞增殖豬假性狂犬病毒：使用培養 72 小時，形成單層細胞的 BHK-21 和 RK-13 來增殖豬假性狂犬病毒。病毒接種前，將培養瓶靜置於無菌箱內 10 鐘，使珠子沈於底部後，小心抽取上層約 2/3 量的培養液，後接種 5 ml 的豬假性狂犬病毒（ $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml），置 37°C，60 分鐘感作培養後，再加入 1/3 量含 2% 胎牛血清的細胞培養液（

MEM），在培養後 12、18、24、36、48 和 72 小時後，各分別吸取 1ml 培養液凍結保存在 -70°C 並以微量盤滴定技術，測定病毒力價。

## 結 果

實驗結果顯示，每公克乾燥的 Cytodex 1 約有  $2-6 \times 10^6$  個微粒珠子，每個微粒小珠上的細胞數目差異甚大，不論 BHK-21 或 RK-13 每個珠子上約有 320—620 個細胞。

細胞接種率和生長率詳列於表 1 中，BHK-21 和 RK-13 細胞的附著都頗快速，接種後 1 小時，在 BHK-21 細胞的接種，已有 100% 的珠子被附著，在 RK-13 細胞，則有 90% 珠子被附著，但經 2 小時後，也達到 100% 的附著率（圖 1、2）。

經 12 到 18 小時的培養，細胞在每個微粒小珠上可長成全面性的單層細胞（圖 3、4），而 BHK-21 比 RK-13 細胞提早 24 小時達到最高的細胞濃度，經 72 小時的培養，BHK-21 的細胞濃度達  $2.0 \times 10^{10}$ ，RK-13 則在 96 小時方達到  $1.5 \times 10^{10}$ 。

用微粒珠子培養細胞所增殖的豬假性狂犬病毒，經力價測定結果，詳列於表 2。BHK-21 在接種豬假性狂犬病毒 8 小時後，即出現細胞病變，RK-13 則在 10 小時後發生，而病毒所造成的融合現象，與在一般培養的單層細胞上所形成的相似，BHK-21 和 RK-13 細胞在接種後 48 小時，即有 95% 的細胞被破

Table 1 Seeding Rate and Growth Efficiency of Cells

Hour	BHK-21	RK-13
1	100%*	90%
2	100%	100%
3	100%	100%
24	$7 \times 10^9$ **	$4 \times 10^9$
48	$1.7 \times 10^{10}$	$8 \times 10^9$
72	$2.0 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^{10}$
96	$1.8 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^{10}$
120	$1.6 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^{10}$

\* % indicates cell seeding rate (beads with cells/beads without cells)

\*\* Total number of cells in 500 ml medium.

Table 2 Multiplication of PR virus in monolayers Grown on Microcarriers

Hour	BHK - 21	RK - 13
12	$10^{5.0}$ *	$10^{4.5}$
18	$10^{7.0}$	$10^{6.5}$
24	$10^{7.5}$	$10^{7.2}$
36	$10^{8.0}$	$10^{7.5}$
48	$10^{8.5}$	$10^{8.0}$
72	$10^{8.2}$	$10^{7.5}$

\* Virus titer expressed in TCID<sub>50</sub>/ml.

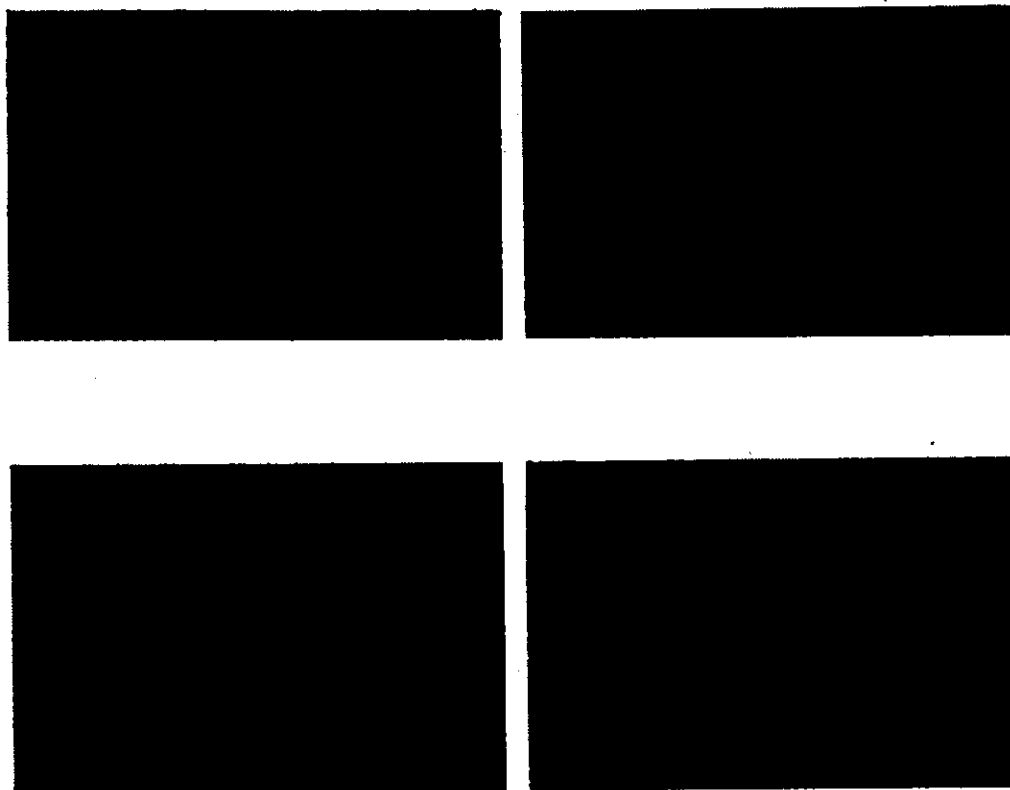


Fig. 1 & 2 Attachment of BHK-21 cell ( top ) and RK - 13 cell ( bottom ) on beads of Cytodex 1 at 3 hours after seeding the cells.

Fig. 3 & 4 Confluent monolayers of BHK - 21 ( top ) and RK - 13 ( bottom ) cells on the beads of Cytodex 1 at 24 hours after seeding the cells.

壞，並且都達到最高的病毒力價，BHK-21 是  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml，而 RK-13 是  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml。

## 討 論

由本研究顯示，利用微粒珠子培養瓶，以 Cytodex 1 微粒珠子培養 BHK-21 或 RK-13 細胞是項容易施行的技術，在培養的過程中須要特別注意培養液 pH 值的變化，可以碳酸氫鈉溶液和 CO<sub>2</sub> 氣體來控制 pH 值在一個適度的範圍內 ( pH : 6.8 - 7.2 )。

在培養後第 3 到 4 天可獲得細胞生長的最高濃度，這種細胞日齡也是用以增殖病毒的適當時期。但，不管在 BHK-21 或 RK-13 細胞，所增殖的豬假性狂犬病毒力價，並不比滾動培養技術所獲得的高，1 公克微粒珠子所製造的豬假性狂犬病毒量與 5 支滾動培養瓶 ( 直徑 10 cm、長 27 cm ) 所製造的相等，然而用微粒珠子培養，其好處可以減少操作量，及減少污染的發生。

本試驗結果顯示，用微粒珠子作為大量製造豬假性狂犬病毒的技術是可行的，但有關接種病毒的技術，則須要作進一步的研究，俾使增加病毒的產量。

## REFERENCES

1. Carrel, a, 1913. Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. J. Exp. Med. 17, 14 - 20.
2. Jong M. H. and Lai S. S. 1979 comparison of the micro-immunodiffusion test and Micro-Serum-Neutralization. J. Chinese Soc. Vet. Sci. Vol 5, No.1 67-70.
3. McCoy, T. A., Whittle, W., Conway E., 1962. A glass hekix perfusion chamber for massive growth of cells in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. ( N. Y. ) 109, 235 - 245.
4. Ubertini, B., Nardelli, L., Santero, G, et al. 1960 Process report : large scale production of foot and mouth disease virus. J. Bicchem. Microbiol, technol. Engng : 2, 327 - 335.
5. Van Wezel, A. L. 1967, Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. Nature 216 64 - 65.

# MULTIPLICATION OF PSEUDORABIES VIRUS IN CULTURE OF MICROCARRIERS

W. C. HO, S. H. TSAO and S. S. Lai

## SUMMARY

Use of microcarriers, cytodex 1, for cultivation of BHK - 21 and RK - 13 cells could be easily carried out in a microcarrier flask. The highest concentration of the cells appeared on day 3 for BHK - 21 and 4 for RK - 13 cells.

Multiplication of Pseudorabies ( PR ) virus in microcarrier system did not yield higher virus titer than the roller bottle technique. However, some advantages were found by using microcarrier system.