

計畫編號：DOH90-DC-2008

行政院衛生署疾病管制局九十年度自行研究計畫

報告名稱

黃病毒細胞量產系統之開發

Establishment of the Large-scale Cell Culture Systems for the Production
of Flaviviral Biologicals

研究 成 果 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

研究主持人：李淑英

研究人員：陳國緯、廖美惠

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

壹、 摘要	3
一、 研究目的	3
二、 研究方法	4
三、 主要發現	4
四、 結論	5
五、 建議事項	5
六、 英文摘要	6
貳、 本文	9
一、 前言	9
二、 材料與方法	13
三、 結果	22
四、 討論	24
五、 結論與建議	25
六、 參考文獻	27
七、 圖、表	32
參、 附錄	46

壹、摘要

關鍵詞：登革熱，日本腦炎，檢驗試劑，無血清培養，高細胞密度培養

一、研究目的

登革熱及日本腦炎同屬黃病毒科且以蚊子傳播的病毒性傳染病。防治之道除了清除蚊子孳生源外，研發疫苗以增加族群免疫力及發展相關檢驗方法以監控病毒傳播動態亦十分重要。

然而，不論研發疫苗或病毒檢測技術，一般均需要高效價及高純度之病毒抗原。目前此二種黃病毒主要以鼠腦繁殖病毒抗原之方式得到高濃度之病毒抗原，然而鼠腦成份複雜需要經繁複之分離程序才能取得高純度之病毒抗原。利用組織培養方式來製備病毒抗原時，所得病毒液雜質較少，因此分離程序較簡單且易控制品質。本計畫擬藉由開發高細胞密度培養系統以生產日本腦炎及登革熱病毒抗原供疫苗及檢驗試劑之開發。

病毒量產系統最常被採用的是滾動瓶(roller bottle)與微載體/生物反應器(microcarrier/ bioreactor)產程。本研究除開發上述二種產程外，亦進一步開發多層平版生物反應器(Cell Cube

bioreactor)、潮汐式生物反應器(tidal bioreactor)二種高細胞密度培養系統。本研究嘗試比較並探討各系統支持綠猴腎臟細胞(vero)生長及日本腦炎與登革熱病毒繁衍之情形。

二、研究方法

將綠猴腎臟細胞培養在滾動瓶(roller bottle)、微載體/生物反應器(microcarrier/ bioreactor)、多層平版生物反應器(cell cube)、潮汐式生物反應器(tidal bioreactor)四種不同培養系統上，等細胞長滿後接種日本腦炎或登革熱 I-IV 型病毒。培養過程中隨時追蹤 vero 細胞及病毒繁衍之動力學，並從生化工程之觀點，比較各種產程之細胞、病毒產率及其培養基之利用效率。

三、主要發現

新開發之高細胞密度培養系統如多層平版生物反應器、潮汐式生物反應器由於提供細胞附著之比表面積較大，雖可得到高密度之細胞生長，不過病毒產率並沒有隨著提高。採用微載體/生物反應器(microcarrier/ bioreactor)系統不論是細胞或病毒生成效率皆最高。

四、 結論

培養系統之選擇攸關生物製劑之品質及製造成本，且依細胞及病毒特性而異。本研究顯示基於日本腦炎及登革熱病毒在短時間內會裂解破壞細胞之特性，高細胞密度培養如多層平板及潮汐式生物反應器並無法提高病毒產率，反而造成培養時間及成本的提高。對日本腦炎及登革熱病毒而言，微載體/生物反應器(microcarrier/ bioreactor)產程仍是最適合的生產系統。

五、 建議事項

國內許多新成立的生物技術公司皆以開發細胞培養相關生物製劑為主力產品，衡諸歐美生技公司，動物細胞衍生產品佔所有生技產品八成強，可見即使在後基因體時代，動物細胞培養技術仍是不可取代的關鍵技術，故應加強追蹤此技術之未來應用及發展趨勢。近來動物細胞培養發展趨勢有三：無血清培養、高細胞密度產程、單元操作化。然實例應用時，仍應視細胞/產物特性、市場規模、法令規章而調整發展策略。

本研究報告比較四種培養系統之結果顯示：開發日本腦炎或登革熱病毒之疫苗或檢驗試劑時，採用微載體/生物反應器

(microcarrier/ bioreactor)系統具有節省勞力、生產效率高、易於擴大化、方便製程驗證等優點。

Abstract:

I. Research aim

Both dengue virus and Japanese encephalitis virus belong to the Genus Flavivirus and transmit disease via mosquito vectors. One of the prevention measure is to control mosquito through community efforts to reduce larval breeding sources. Besides, development of new or more effective vaccines to increase herd immunity and developmet of diagnostic kits for proactive surveillance systems are also very important.

To develop biologicals for vaccine or diagnostics, high titer and purity virus antigen are needed. Up to now, these antigens are mainly obtained through mouse brain propagation. However, such processes have certain drawbacks such as they are more labor-intensive and require many complicated steps to purify antigens. In contrasr, cell-culture processes require much less purification steps and guarantee more efficient quality control. This project aims at devolping high density cell culture systems for the deveopment of dengue and JE biologicals.

For the mass production of viral antigens, both roller bottle and microcarrier/ bioreactor are most commonly adopted production systems. In this project, beside the aforementioned two systems, we also develop Cell Cube bioreactor and tidal bioreactor production systems. The efficiency of

these four systems to support Vero cell growth and virus production are compared.

II. Research methods

Vero cells were cultivated on four systems: roller bottle, microcarrier/bioreactor, cell cube and tidal bioreactor.

When cells became confluent, JE virus or Dengue type I-IV virus were added. The vero cell growth and viral production kinetics were followed and the cell and virus productivity and medium utilization efficiency were compared.

III. Major findings

Although the newly developed high density cell culture systems such as Cell Cube and Tidal bioreactor have the advantages of providing high specific cell growth area (ie. Higher surface to volume ratio) and consequently can support cell growth to higher density. However, the virus productivity did not increase accordingly. The microcarrier/bioreactor offered the greatest efficiency in both cell and virus productivity among these four systems.

IV. Conclusion

The reactor choice influences the quality and production cost of biologics and depends on characteristics of cell and virus types. Our study

showed that both JEV and Dengue virus are lytic virus and cells are disrupted a couple of days after virus infection. Therefore, in high cell density cultivation systems such as Cell cube and Tidal bioreactor, virus productivity were not increased compared to microcarrier system. For the production of JE and dengue viruses, microcarrier/ bioreactor production system is still the best choice among the four systems.

V. Recommendation

Now, many newly established biotech companies in Taiwan set the development of cell-culture-derived products as their major goal. World-wide in developed countries cell-culture-derived products constitute more than 80% of all biotech products. Cell culture technology is certainly a key technology and will continue to be so even in the Genome era. Therefore, the future development and application tendency of cell culture technique should be followed very closely.

In recent years, there are three development trends in animal cell technology :serum-free cultivation、 high-cell-density process、 unit process. Each development strategy should be adjusted according to cell/product characteristics、 market size and regulatory issues.

After comparing four cultivation systems, our research result showed that for the development of JE and dengue biologicals, the microcarrier/bioreactor system offered the advantages of labor-savingness、 high efficiency、 scalability、 ease of validation.

Keyword: Dengue fever, Japanese encephalitis, Diagnostic kits, serum-free culture, high-cell-density culture

貳、 本文

一、 前言

過去數年之間由於氣候暖化，導致全球疾病型態之變化，其中尤以蚊蟲媒介之疾病如登革熱、日本腦炎、黃熱病之傳播有逐漸加溫之趨勢【1】，此外由於國際旅遊頻繁，登革熱境外移入案例時有所聞，拉起了國內的防疫警報，亦促使吾人思考如何研擬有效之綜合防治措施。

登革熱(dengue fever) 與日本腦炎病毒同屬黃病毒科(Flaviviridae) 裡 RNA 病毒黃病毒屬(Flavivirus) 中的亞屬成員。登革熱病毒亞屬包括四種登革熱病毒，依抗原性的不同分別稱為第 1、 2、 3、 4 型。登革熱與日本腦炎均是由蚊子媒介(埃及斑蚊 *Aedes aegypti* 或白線斑蚊 *Aedes albopictus*)，可在蚊子與哺乳動物間交互傳染且流行於熱帶及亞熱帶地區。依症狀可分為典型登革熱及出血性登革熱(DHF) 或登革休克症候群(DSS)，後者症狀嚴重且致命率高。登革熱 1931 年曾經大肆流行於台灣地區，爾後雖然消失一段時間，1987 年又在南台灣爆發流行且之後仍持續於南部地區爆發流行，更進而延伸至台北地區。由於登革熱在東南亞國家是一種地方性疾病，國人旅遊

經商出入頻繁，處於高危險區應加強防範。迄今尚未有登革熱疫苗可供預防接種，因此強化監測系統以迅速追蹤出感染之源頭已成為防治登革熱病毒策略中不可或缺之要角。因此除清除蚊子孳生源外，研究有關登革熱病毒之檢驗方法以密切監視登革熱病毒活動狀況已為當前國家重要防疫工作重點之一【2】。病毒之檢測，方法可大分為三類：（一）病毒分離法，（二）血清學檢驗法【3, 4, 5】，（三）PCR方法【6】。目前最常用血清學診斷法【7, 8】，血清診斷法一般需要高效價及高純度之病毒抗原。

日本腦炎雖已施行預防接種制度，然現行鼠腦製疫苗仍具有副作用大、不符合經濟效益之缺點。近來更發現高年齡層有零星感染案例發生，使得國內研發新型組織培養疫苗及發展鑑別診斷技術之呼聲響起。

不論是登革熱或日本腦炎病毒之檢驗或疫苗研發，均需要高效價及高純度之病毒抗原。目前此二黃病毒主要以鼠腦繁殖病毒抗原之方式得到高濃度之病毒抗原，然而鼠腦成份複雜需要經繁複之分離程序才能取得高純度之病毒抗原。利用組織培

養方式來製備登革熱病毒抗原，因培養機成份遠較鼠腦液單純，因此分離程序較簡單且易控制品質。

病毒生產時該採取何種量產系統最為適宜並無定論，應依技術特性、生物製劑種類及其宿主細胞之特性量身剪裁出最適培養條件【9】。動物細胞具有需吸附表面，對剪應力敏感，生長慢、對環境之變遷敏感、特殊營養及氧濃度需求...等特性，擴大化培養產程設計時需能兼顧這些特點【10】。病毒性疫苗擴大化培養時需設法支持細胞快速繁殖。其後，病毒繁殖之策略則依病毒種類及其特性而異：有些病毒為裂解性病毒，病毒感染後，會破壞細胞，如小兒麻痺病毒【11】；有些病毒為非裂解性病毒，這些病毒感染細胞後，不會破壞寄主細胞，病毒顆粒則是緩緩釋出，整個感染週期較長，感染方式亦較溫和，如疱疹、A型肝炎病毒【12, 13】等。衡諸早期培養小兒麻痺、狂犬病、黃熱病、麻疹、德國麻疹及晚近A型肝炎【14, 15】、流行性感冒【16】、水痘病毒等之細胞培養產程之研發情形，可知不論使用微載體【17】。各種固定化【18,19】及連續或灌流培養(continuous or perfusion operation) 技術【20, 21, 22】，其目

的均是為了提升細胞滯留率，增加單位體積及單位細胞之產率 (volumetric and cell specific productivity)。

本研究計畫著重在探討高細胞密度培養系統在培養 Vero 細胞與生產日本腦炎之效率。高細胞密度可經由不同的細胞固定化方式如：填充床(潮汐式生物反應器)、多層平板(CellCube 生物反應器)、懸浮基質（微載體生物反應器），使細胞滯留在反應器內，再經由培養基連續灌流使養份持續輸入及代謝廢物不斷排除，使細胞持續處於合宜的環境中，故可達高密度生長，接種病毒後病毒力價亦有提高之機會。

本計畫為因應國內生物技術界發展之現況及日本腦炎與登革熱防疫任務之需求，將藉由本計畫建立黃病毒細胞培養系統，以生產高效率之黃病毒病毒生物製劑。

二、 材料與方法

■ 細胞株及培養基

繁殖日本腦炎及登革熱病毒均使用綠猴腎臟細胞株 (Vero cells , ATCC-CCL-81)。

Vero 細胞繼代時使用 199 培養基加 5% 小牛血清。培養於 37 之 CO₂ 培養箱。以 1 : 5 之比例進行例行性繼代，約每週繼代二次，再以滾動瓶做大量培養。病毒培養用 M199 培養基加 1% 經限外過濾之 FCS。

■ 病毒

日本腦炎病毒使用北京株 Beijing strain.

第一至第四型登革熱病毒來自病媒昆蟲組，病毒於鼠腦中繼代繁殖，實驗所使用病毒則經由 C6/36 蚊子細胞株繁殖，再經 Vero 細胞株繼代而得。

■ 微載體之製備：

於 siliconized 過之血清瓶，加入適當量之 cytodex1 微載體後(微載體濃度一般使用 6g/l)，加入 PBS 浸泡使其膨脹，以 PBS 清洗三

次後，經高溫高壓滅菌15分鐘。使用前，再以含5% 小牛血清之199培養基清洗三次。

■ 細胞量產設施：

1. 滾動瓶培養

每個滾動瓶加入細胞、培養基及血清。細胞長滿後，置換培養基為病毒繁殖培養基，並接種MOI 0.1之北京株病毒，每天取樣二次測病毒力價(設施見圖1)。

2. 微載體醱酵槽培養

硬體配備：NBS製作用容積五公升之小型醱酵槽，具備pH, DO, 溫度, 攪拌速率之監控機制。醱酵槽體為玻璃雙夾層，利用夾層內循環水流控制槽內溫度，槽體之D/H為1:2。攪拌速率範圍為20 ~ 300 rp m。溶氧值及酸鹼值調控為經由四種氣體(O₂, N₂, CO₂, air)之混合以達設定值。供氣方式為 cell lift方式；具有 decanting column可滯留微載體，能做連續或灌流培養。

醱酵槽(設施見圖1)加入無菌之培養基後，加入6g/l微載體 (相當於提供 180000 cm₂ 的生長表面積)., 2-4 x 10⁵ cells/ml細胞及血清，攪拌速率60 rpm。培養期間每天取樣測細胞密度及養分代謝

情形。細胞長滿後，置換培養基為病毒繁殖培養基，並加入0.1MOI之病毒，每天取樣二次測病毒力價。

病毒生產：醱酵槽滅菌後，加入無菌之培養基後，先校正電極接著調整溶氧值及酸鹼值。當各參數達設定值時加入微載體、細胞及血清，初時設定慢速攪拌，6-8小時後提高攪拌速率。培養期間每天取樣測細胞密度及養分代謝情形。細胞長滿後，置換培養基為病毒繁殖培養基，並加入MOI比例0.1之病毒，病毒繁殖期間每天取樣二次測病毒力價。

3. 多層平板灌流培養系統(Cell Cube Perfusion System) 【13】：

硬體配備：將具備pH, DO, 溫度, 攪拌速率之監控機制，作用容積五公升之小型醱酵槽(NBS製)，作為培養基調控設施，外接Cell Cube的五十層培養器（42500 cm₂）。

醱酵槽滅菌後，加入無菌之培養基後，先校正電極接著調整溶氧值及酸鹼值(溫度=37℃，溶氧=90% 飽和空氣, pH=7.6. 作用容積：3 公升)。當各參數達設定值時加入培養基及血清，並均勻接種 2.68×10^8 cells於培養器雙面，接種後先靜置於CO₂培養箱24小時再接到NBS醱酵槽，培養期間每天取樣測養分代謝情形，當養分開始供應不足時(約124 hr時)，開始灌流，隨養分消耗情形逐日增

加灌流速率。細胞長至一定密度後，並加入MOI比例0.1之病毒，接著換以病毒繁殖培養基開始灌流，病毒繁殖期間每天取樣二次測病毒力價。

4. 填充床潮汐式生物反應器

填充床潮汐式生物反應器(體積250 mL) 由二個相通的管狀槽體組成內部充填11.5公克的 Fibara-Cel disks (相當於13800 cm₂的表面積)。每個管狀槽體各連有一個氣體通管，此二氣體通管每15秒會交替打入過濾的氣體。當氣體打入其中一槽體時，培養基就被推至另一槽。在通氣邊槽體的細胞得到氧氣供給; 另一邊的細胞則經由培養基的沖刷得到養分供給，15秒後由另一槽體通氣則對調過來(圖)。培養期間整個裝置置於 37 °C CO₂ 培養箱。

實驗開始時接種 1.76×10^8 的細胞懸浮液，接著靜置過夜，以利細胞黏附表面並生長。第二天則開始潮汐式的通氣 灌流循環。每天取樣分析養分，並由其中葡萄糖的消耗速率換算成細胞濃度。

18.7 天後將細胞生長培養基換成病毒繁殖培養基，並以 MOI=0.1的比例接種日本腦炎病毒。接種後靜置4小時(供病毒吸

附) 再開始灌流。每天取樣分析養分，並留樣冰於-80 供稍後定量病毒。每天用大型血袋回收病毒液。

■ 樣品分析 -

✓ 細胞濃度之監測：

微載體上細胞密度之測定採用 nuclear extrusion 方法【23】：取 1ml 之細胞懸浮液，將細胞離心下來後，重新懸浮於 crystal violet 試劑 (0.1%w/v crystal violet 溶於0.1 M citric acid 之中)，置於 37 一小時後，用血球計數儀於顯微鏡用細胞計數細胞核數目，或用Coulter Multisizer II 細胞計數儀計數。

✓ 病毒斑測定法(Plaque Assay)：

病毒濃度之決定採用病毒斑測定法【24】：接種 8×10^5 之 BHK 細胞於六孔穴培養皿，置於37，含 5% 二氧化碳之培養箱中培養隔夜，至細胞形成均勻之單層(monolayer)。將待測病毒作一系列稀釋後，添加100 μ l於細胞單層上，至少做三重覆。搖勻並置於 37 二氧化碳培養箱中1小時，使病毒均勻吸附於細胞上。取出並搖勻，然後添加2ml overlay 培養基。72小時後病毒會

在細胞單層上形成病毒斑，染色後觀測病毒斑形成的數目，此數目乘上稀釋倍數即為起始樣本之病毒濃度。

✓ 氧氣及二氧化碳濃度之監測：

使用血液氣體分析儀 (Blood Gas Analyzer ABL5, Radiometer, Copenhagen) 分析醱酵液酸鹼值、氧氣及二氧化碳濃度。

✓ 營養代謝之監測：

使用葡萄糖、乳糖分析儀 (Nova) 分析取樣醱酵液內葡萄糖、乳糖及氨濃度，並使用HPLC分析氨基酸代謝物。

✓ 評估免疫抗原性 - 病毒斑中和測試法定量中和抗體濃度(PRNT)

將各免疫血清系列稀釋後，加入適當濃度並毒液，置於4℃冰箱中隔夜以進行中和試驗。將中和之病毒做病毒斑測定，再依公式計算力價。

✓ 血凝集試驗：

於96孔微量滴定皿上標定編號，加入樣品及標準對照品，作二倍連續稀釋。每一格均加入50ul 0.33% RBC，混合均勻後，37恆溫箱靜置30分鐘。判讀血球凝集現象。

✓ Bradford reagent蛋白質濃度測定法：

先調配 BSA標準品 (0, 12.5, 25, 50, 100 ug/ml)。取200ul BSA取樣品及標準液各120ul，至入滅菌過乾淨微量離心管中，至少2重複。過濾足量Bradford reagent備用。分別加入Bradford reagent 1200ul，震盪混勻。於室溫靜置5-30分鐘。於波長595nm測吸光值。

✓ 電泳純度測定法：

以凝膠電泳及西方轉漬法純化追蹤各階段總蛋白質及病毒抗原變化情形，並判定疫苗純度。

✓ 酵素連結免疫反應法測定抗原

黏覆白兔抗日本腦炎病毒抗體於九十六孔微量滴定盤上，使用ELISA清洗儀（BIO-TEK EL403），清除未黏覆之抗體。之後，添加待測日本腦炎疫苗或病毒樣品，

放置於37 保溫箱中1小時。再添加Avidin-馬山葵過氧化酵素複合體，放置於37 保溫箱中作用30分鐘。清洗後，在每孔中添加100ul酵素受體，放置於室溫暗處，呈色反應，30分鐘。以ELISA吸光儀（Molecular Device, Emax）讀取OD₄₉₀及OD₆₅₀之差值。

■ 數值計算

- ✓ **比生長速率(Specific Growth Rate, μ)之計算:**

$$\mu = dx/dt \cdot x$$

μ 表達特定時間內細胞變化情形，單位為 d^{-1} ；其中 x 為細胞密度， t 為時間。

- ✓ **病毒生成速率(Virus production rate)之計算**

$$QP_v = (P_{v_2} - P_{v_1}) / (t_2 - t_1)$$

QP_v 表達於特定時間內($t_2 - t_1$)病毒生成之情形，單位為 $pfu \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ ； P_{v_1} 及 P_{v_2} 分別為 t_1 及 t_2 時間點時之病毒力價。

- ✓ **比細胞病毒生成速率(Cell specific virus production rate)之計算**

$$q_{p,x} = (QP_v / X_t) \cdot 10^6$$

$q_{p,x}$ 表達每百萬個細胞營於特定時間內(t_2-t_1) 生成病毒之情形，單位為 $\text{pfu} \cdot 10^6 \text{細胞} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；其中 Q_{Pv} 為病毒生成速率， X_t 為 t_1 及 t_2 時間點時之細胞密度取平均值。

✓ **營養消耗速率(Substrate consumption rate, Q_{si})之計算**

$$Q_{si} = (S_{i2} - S_{i1}) / (t_2 - t_1)$$

Q_{si} 表達營養份 i 於特定時間內(t_2-t_1) 消耗之情形，單位為 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；其中 S_{i1} 及 S_{i2} 分別為 t_1 及 t_2 時間時之營養濃度。

✓ **比細胞營養消耗速率(Cell specific substrate consumption rate, $q_{si,x}$)**

$$q_{si,x} = (Q_{si} / X_t) \cdot 10^6$$

$q_{si,x}$ 表達每百萬個細胞營於特定時間內(t_2-t_1) 消耗養份 i 之情形，單位為 $\text{mol} \cdot 10^6 \text{細胞} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ；其中 Q_{si} 為營養消耗速率， X_t 為 t_1 及 t_2 時間點時之細胞密度取平均值。

✓ **比營養細胞生成速率($Y_{x/s}$)**

$$Y_{x/s} = \mu / q_s$$

表達生成特定細胞數量所需之營養量，單位為 $10^6 \text{細胞} \cdot \text{mol}^{-1}$

✓ **比營養病毒生成速率($Y_{p/s}$)**

$$Y_{p/s} = q_{Pv,x} / q_{si,x}$$

表達生成特定病毒數量所需之營養量，單位為 $\text{pfu} \cdot \text{mol}^{-1}$

三、 結果

於滾動瓶設施進行日本腦炎病毒生產之結果 vero 細胞於滾動瓶上之生長細胞數最高可達 5.83×10^5 cells/ml(圖一 a.);以 MOI=0.1 接種日本腦炎病毒後病毒濃度最高可達 2.31×10^8 pfu/m(圖一 b.)。於生物反應器進行日本腦炎病毒生產之結果 vero 細胞於 cytodex 1 微載體上之生長細胞數最高可達 2.50×10^6 cells/ml(圖二 a.); b.以 MOI=0.1 接種日本腦炎病毒後病毒濃度最高可達 2.86×10^8 pfu/m(圖二 b.)。

以潮汐式生物反應器內部充填纖維碟片(fiber discs) 來培養 Vero 細胞(圖三), 接種 1.76×10^8 細胞入潮汐式反應器內。 24 小時即開始灌流新鮮培養基, 灌流速度依葡萄糖消耗速度來調整(圖四)。葡萄糖濃度設法維持在 1.5 mM 以上, 氨濃度則維持在 1.0 mM 以下 (氨對細胞的毒性濃度在 2mM)。細胞生長曲線顯示(圖五) 終細胞濃度可達 6.6×10^9 cells, 約為初接種時之 30 倍。細胞濃度可達 6.51×10^6 cells/ml, 病毒力價為 7.26×10^{11} pfu(圖六), 約為 5-公升微載體收穫量的 0.6 倍, 且相當於 7.26 瓶 400ml 的滾動瓶。相較之下(表一) 潮汐式生物反應器細胞及病毒之生產效率並不比傳統的滾動瓶及微載體培養系統為佳。

多層平板培養系統使用五十層的平板，換算成生長表面積約為50個滾動瓶(每瓶850 cm²)。將 2.68×10^8 個細胞均勻地接種於反應器雙面，於124 小時後開始灌流，灌流的速度依培養基中葡萄糖消耗情形來調整。培養過程中營養與代謝廢物之濃度變化見圖9。整個培養過程中葡萄糖濃度均維持在 1.5 mM 以上而氨濃度維持在0.7 mM以下，低於2mM之毒性濃度。圖3可見細胞生長曲線，接種總細胞數為 2.68×10^8 cells，最終細胞數為 6.6×10^9 cells細胞約增殖25倍。病毒總產量為 1.71×10^{12} pfu，約等同於5-L微載體生物反應器批式操作之收穫量或等於12.5 瓶滾動瓶之收穫量。

CellCube生產系統曾被成功用於A型肝炎疫苗之量產【25、26】，然而培養日本腦炎之例子顯示不論是細胞生長或病毒培養CellCube生產系統並沒有比傳統的滾動瓶及微載體培養系統有效率。

結果顯示以微載體進行產製細胞生長較快，單位病毒產率及營養之利用率均較高（表一）。

新開發之高細胞密度培養系統如多層平版生物反應器、潮汐式生物反應器由於提供細胞附著之比表面積較大，雖可得到高密度之細胞生長，不過病毒產率並沒有隨著提高。

培養系統之選擇攸關生物製劑之品質及製造成本，且依細胞及病毒特性而異。本研究顯示基於日本腦炎及登革熱病毒在短時間內會裂解破壞細胞之特性，高細胞密度培養如多層平板及潮汐式生物反應器並無法提高病毒產率，反而造成培養時間及成本的提高。對日本腦炎及登革熱病毒而言，微載體/生物反應器(microcarrier/ bioreactor)產程仍是最適合的生產系統。

四、 討論

病毒量產系統滾動瓶(roller bottle)培養方式，量產原理僅為培養瓶數量之增加，優點是操作簡單，缺點則為勞力密集且增加污染之機率。微載體(microcarrier)之優點為單元操作，利於產程之監測及控制，缺點則為需複雜之技術及週邊設備配合。何種系統最為適宜並無定論，應依技術特性、病毒種類及其寄主細胞之特性決定。

五、 結論與建議

本實驗室過去數年來致力於發展各類動物細胞之量產系統，以產製原型病毒性疫苗；過去曾以綠猴腎臟細胞及日本腦炎病毒為模式，陸續開發各種量產系統及其之最適化產程，如滾動瓶培養系統、微載體生物反應器及新型多層平板灌流培養系統，目前滾動瓶及微載體培養量產規模已成功擴大至 80 公升。灌流培養系統常用於遺傳重組蛋白或單元抗體之生產，此系統優點為可長期連續收穫產物且作用體積不需要很大[5]。不過本研究以多層平板灌流培養生產日本腦炎之結果顯示，細胞及病毒產率並沒有提高。在本例，灌流反而造成病毒濃度被稀釋且培養基利用率較差，形成浪費。此現象之成因有二：(1) vero 細胞為完全吸附依賴型(anchorage-dependent)故細胞生長受槽體提供表面積之限制。當細胞長至相互接觸且匯合時，細胞便停止生長，此時繼續提供養分亦無法促其繼續生長；(2) 日本腦炎病毒為裂解性病毒，感染細胞後會破壞並殺死細胞，故持續灌流對生產之之邊際效應不大。

國內許多新成立的生物技術公司皆以開發細胞培養相關生物製劑為主力產品，衡諸歐美生技公司，動物細胞衍生產品佔所有生技產品八成強，可見即使在後基因體時代，動物細胞培養技術仍是不可取代的關鍵技術，故應加強追蹤此技術之未來應用及發展趨勢。近來動物細胞培養發展趨勢有三：無血清培養、高細胞密度產程、單元操作化。然實例應用時，仍應視細胞/產物特性、市場規模、法令規章而調整發展策略。

本研究報告比較四種培養系統之結果顯示：開發日本腦炎或登革熱病毒之疫苗或檢驗試劑時，採用微載體/生物反應器 (microcarrier/ bioreactor)系統具有節省勞力、生產效率高、易於擴大化、方便製程驗證等優點。

六、 參考文獻

1. Global warming and health problems. Scientific American 2000; August:50-57.
2. Wu Y.C., Lien J.C., and Chen H.Y.(1993). Recent outbreak of dengue in Taiwan. Trop. Med. 35:201-207.
3. Palmer CJ, King SD, Cuadrado PR, Perez E, Baum M, Ager AL. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio Rapid Immunochromatographic Test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. J Clin Microbiol 1999; 37:1600-1601.
4. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Dung NM, Kneen R, Cuzzubbo A, *et al.* Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:693-698.
5. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. J Clin Microbiol 2000; 38:1053-1057.
6. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription- polymerase chain reaction in the liver and lymphoid

- organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:720-724.
7. Chow L., Hsu ST., MAC ELISA for the detection of IgM antibodies to dengue type 1 virus. *Chinese J. Microbiol. Immunol.* 1989;22:278-85.
 8. Chow L., Sun HC., Chen HY., Lin SY., Wu JS. Detection and Differentiation of Dengue-1 from Japanese Encephalitis Virus Infections by ABC MAC-ELISA. *Chinese J. Microbiol. Immunol.* 1992;25:172-180..
 9. Miller A.O.A., Menozzi F.D. and Dubois D.: Microbeads and Anchorage-Dependent Eukaryotic Cells: The Beginning of a New Era in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology.* 1989; 39: 73-95.
 10. Prokop A, Rosenberg MZ, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 39: 29-71 (1989).
 11. von Seefried A. et al.: Inactivated Poliovirus Vaccine and Test Development at Connaught Laboratories Ltd. *Reviews of Infectious Diseases.* 1984; 6:S345-S349.
 12. Junker B.H. et al.: Evaluation of a Microcarrier Process for Large-scale Cultivation of Attenuated Hepatitis A. *Cytotechnology.* 1992; 9: 173-187.

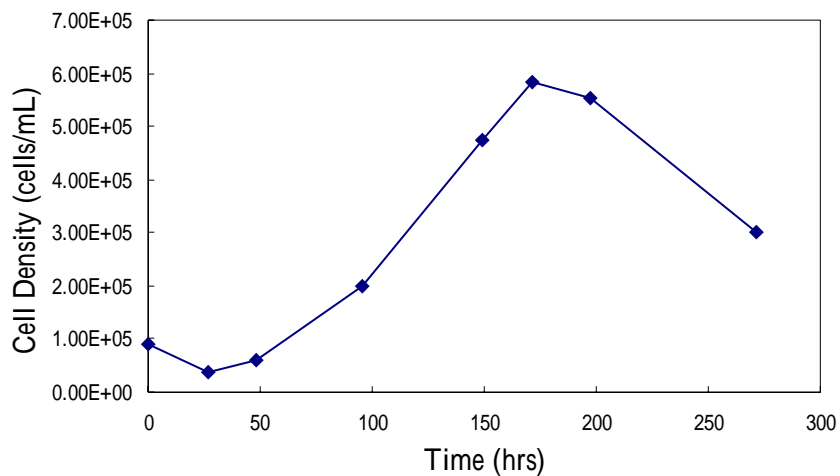
13. Aunins J.G. et al.: Reactor Development for the Hepatitis A Vaccine VAQTA_. In: Animal Cell Technology- From Vaccines to Genetic Medicine, eds: M.J.T. Carrondo, B. Griffiths and J. Moreira, p.175-184, 1997, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
14. Miller, A.O.A., F.D. Menozzi and D. Dubois, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. 39,73-95 (1989).
15. Junker B.H. et al.: Evaluation of a Microcarrier Process for Large-scale Cultivation of Attenuated Hepatitis A. Cytotechnology. 1992; 9: 173-187.
16. Aunins J.G. et al.: Reactor Development for the Hepatitis A Vaccine VAQTA_. In: Animal Cell Technology- From Vaccines to Genetic Medicine, eds: M.J.T. Carrondo, B. Griffiths and J. Moreira, p.175-184, 1997, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
17. Looby D. et al.: The Production of Influenza Virus by Immobilised MDCK Cells. In: New Developments and New Applications in Animal Cell Technology, eds: O.-W. Merten, P. Perrin and B. Griffiths p.551-554, 1998, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
18. Miller A.O.A., Menozzi F.D. and Dubois D.: Microbeads and Anchorage-Dependent Eukaryotic Cells: The Beginning of a New Era in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. 1989; 39: 73-95.

19. Robert J, Ct J and Archambault J :Surface Immobilization of Anchorage-Dependent Mammalian Cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1991; 39: 697-706.
20. Wang G, Zhang W, Freedman D, Jacklin C, Eppstein L and Kadouri A: Modified CelliGen Packed Bed Bioreactors for Hybridoma Cell Cultures. *Cytotechnology* 1992; 9: 41-49.
21. Wang G, Zhang W, Jacklin C, Eppstein L and Freedman D,: High Cell Density Perfusion Culture of Hybridoma Cells for Production of Monoclonal Antibodies in the Celligen Packed Bed Reactor. In: *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects*, eds: S. Kuminogawa et al. Vol. 5, p.463-469, 1993, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands
22. Kadouri A. et al.:Design and Performance of a Perfusion Based Packed Bed Bioreactor for the Production of Secreted Protein. In: *Animal Cell Technology- From Vaccines to Genetic Medicine*, eds: M.J.T. Carrondo, B. Griffiths and J. Moreira, p.175-184, 1997, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
23. Sanford, K.K., W.R. Earle and V.J. Evans et al, *J. Nat. Cancer Inst.* 11, 773-795 (1951)
24. Karabatsos, K. and S.M. Buckley, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 99-105 (1967)

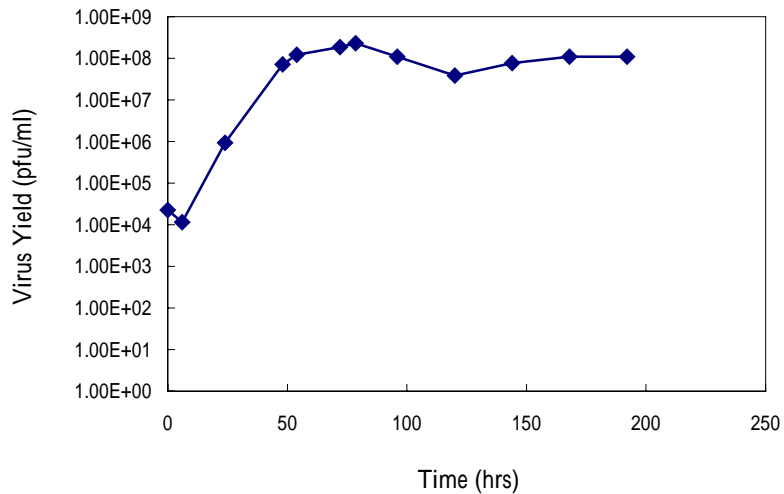
25. Junker B.H. et al.: Evaluation of a Microcarrier Process for Large-scale Cultivation of Attenuated Hepatitis A. *Cytotechnology*. 1992; 9: 173-187.
26. Aunins J.G. et al.: Reactor Development for the Hepatitis A Vaccine VAQTA_. In: *Animal Cell Technology- From Vaccines to Genetic Medicine*, eds: M.J.T. Carrondo, B. Griffiths and J. Moreira, p.175-184, 1997, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrecht, The Netherlands.
27. Griffiths, J, B, *Animal cell culture processes-batch or continuous*, J. *Biotechnol.* 22, 21-30 (1992)

七、圖、表

a. Growth Kinetic of Vero cell in Roller Bottle

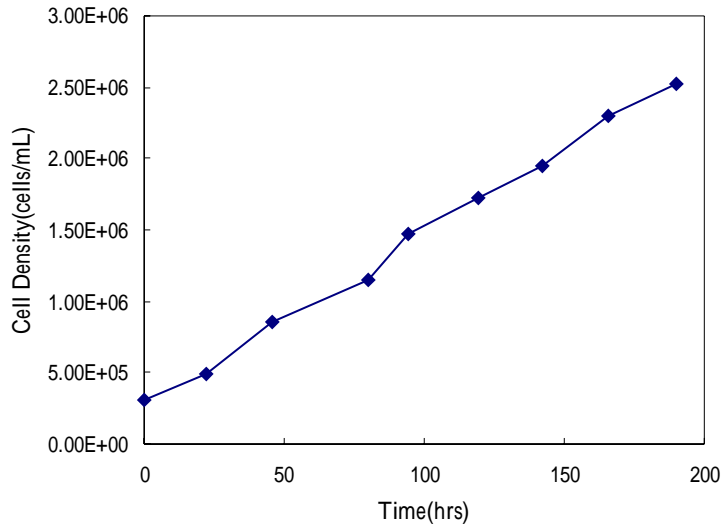


b. JEV Production Kinetics in Roller Bottle

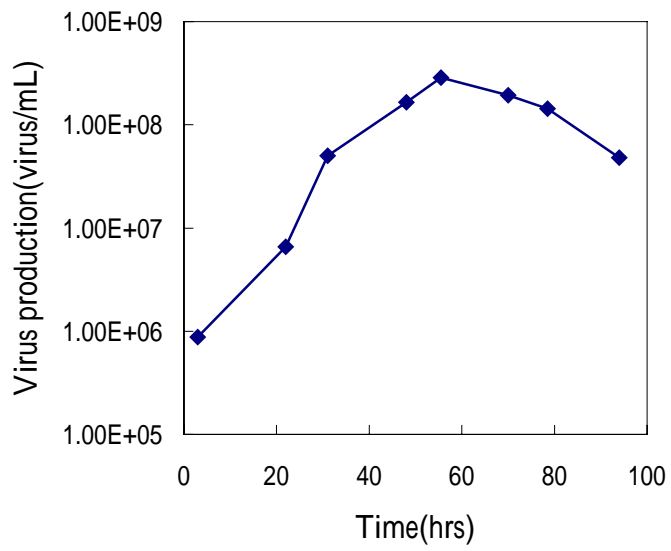


圖一、於滾動瓶設施進行日本腦炎病毒生產之結果，a. vero 細胞於滾動瓶上之生長情形；b.以MOI=0.1接種日本腦炎病毒後病毒繁殖之情形。

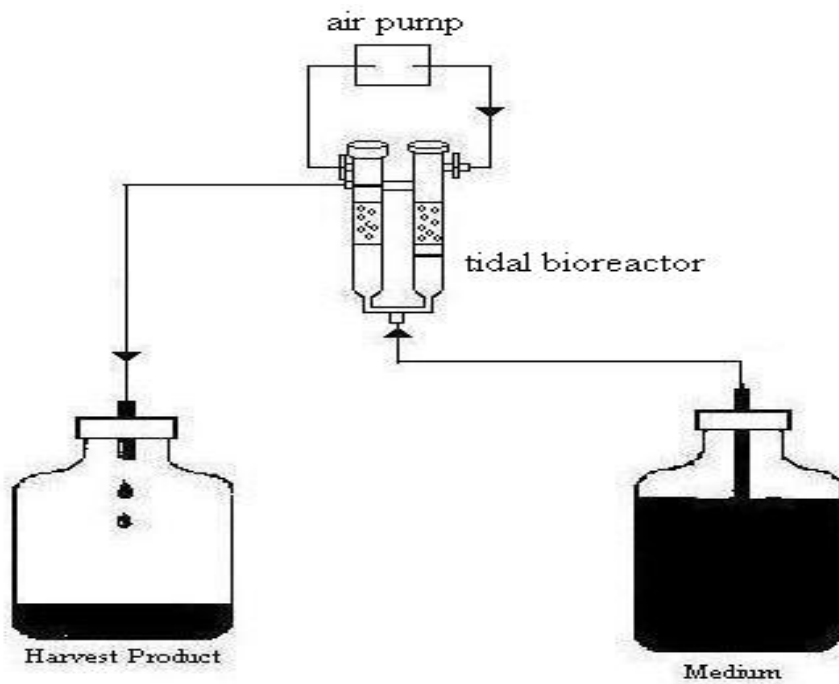
a. Vero Cell Growth Kinetics in Microcarrier Culture



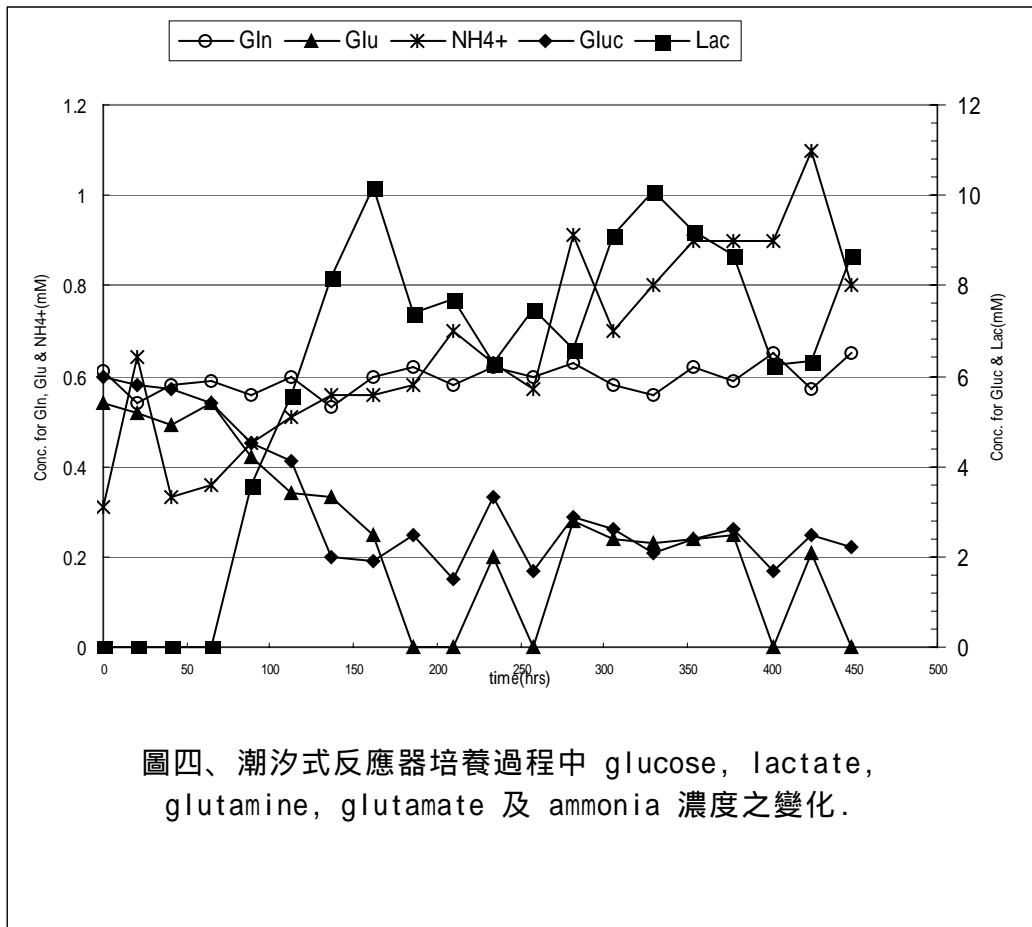
b. JE Virus Production Kinetics in Microcarrier Culture

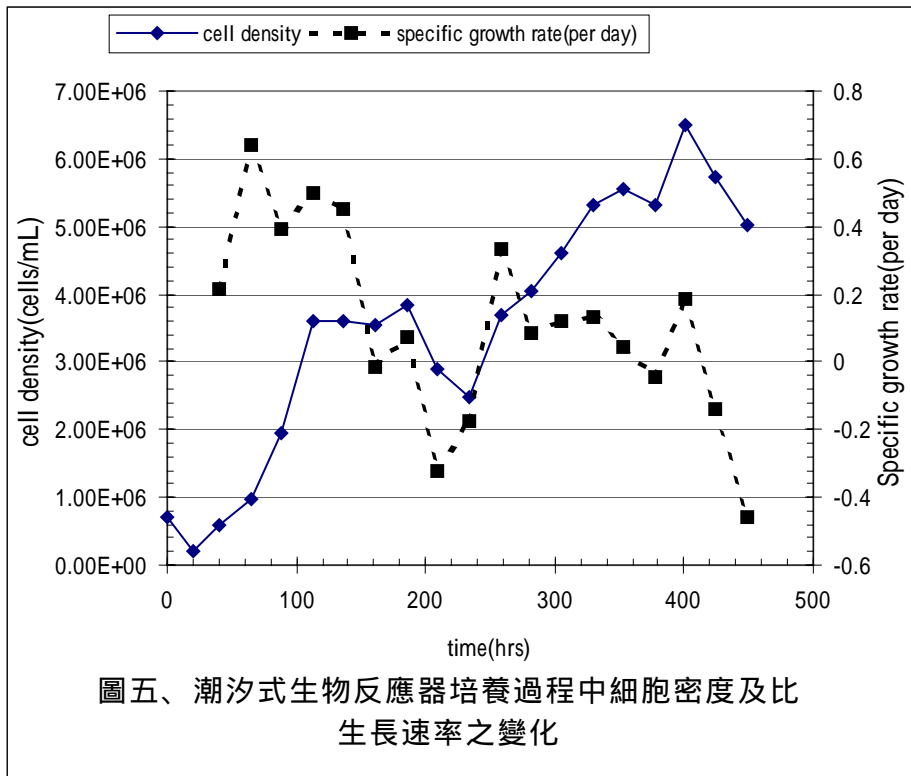


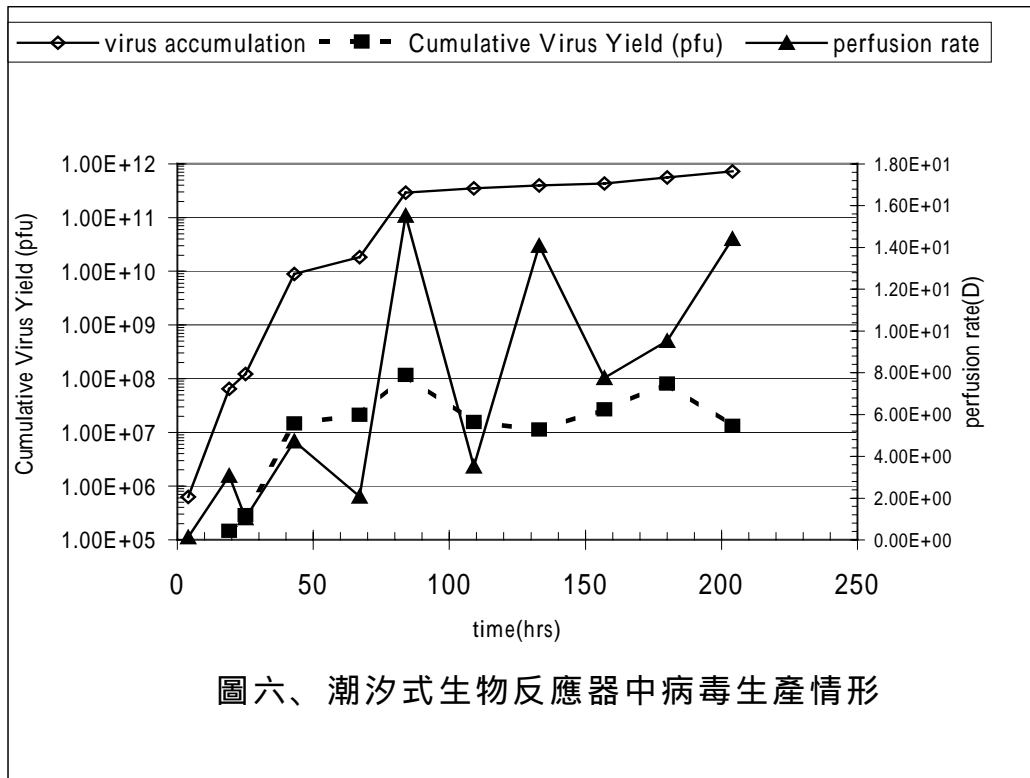
圖二、於生物反應器進行日本腦炎病毒生產之結果，a. vero
細胞於cytodex1微載體上之生長情形； b. 以MOI=0.1接
種日本腦炎病毒後病毒繁殖之情形。

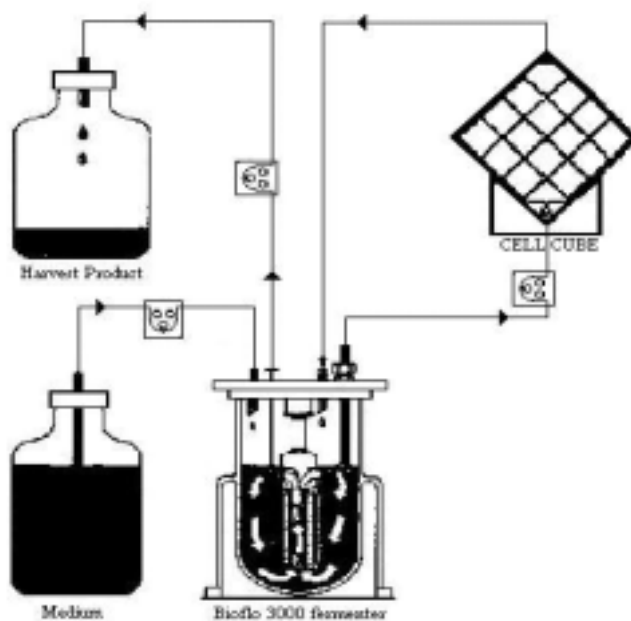
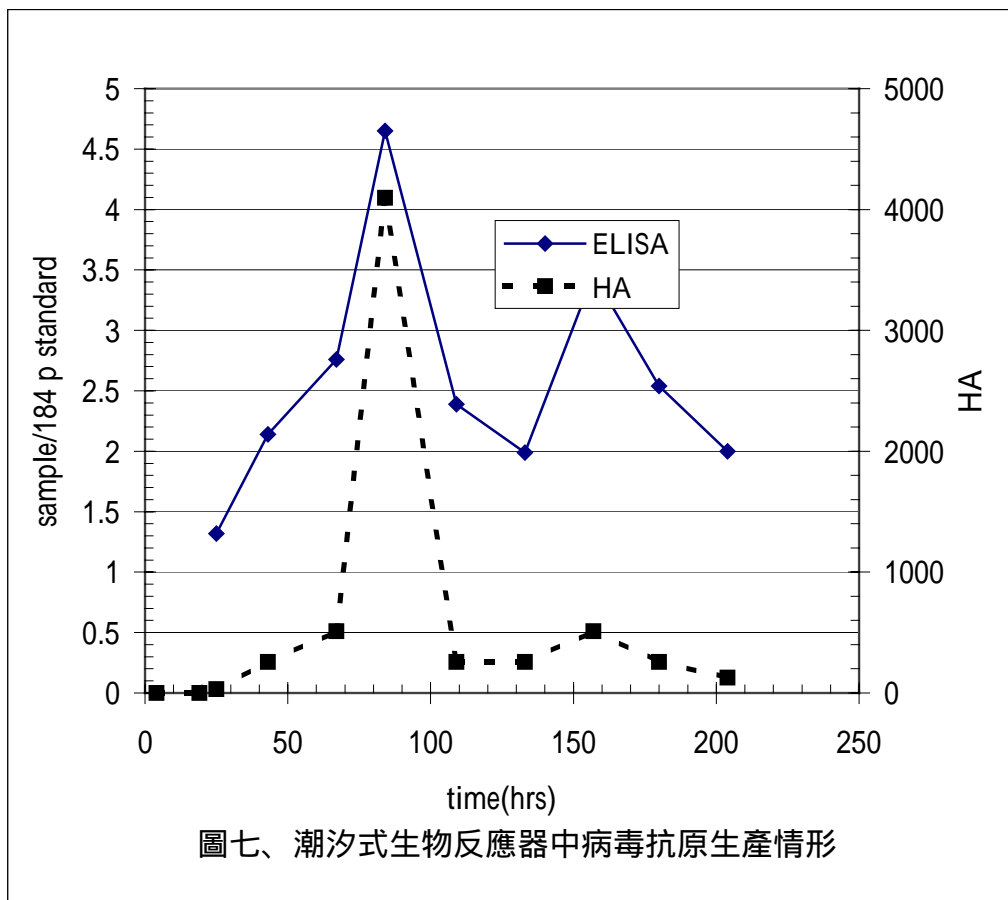


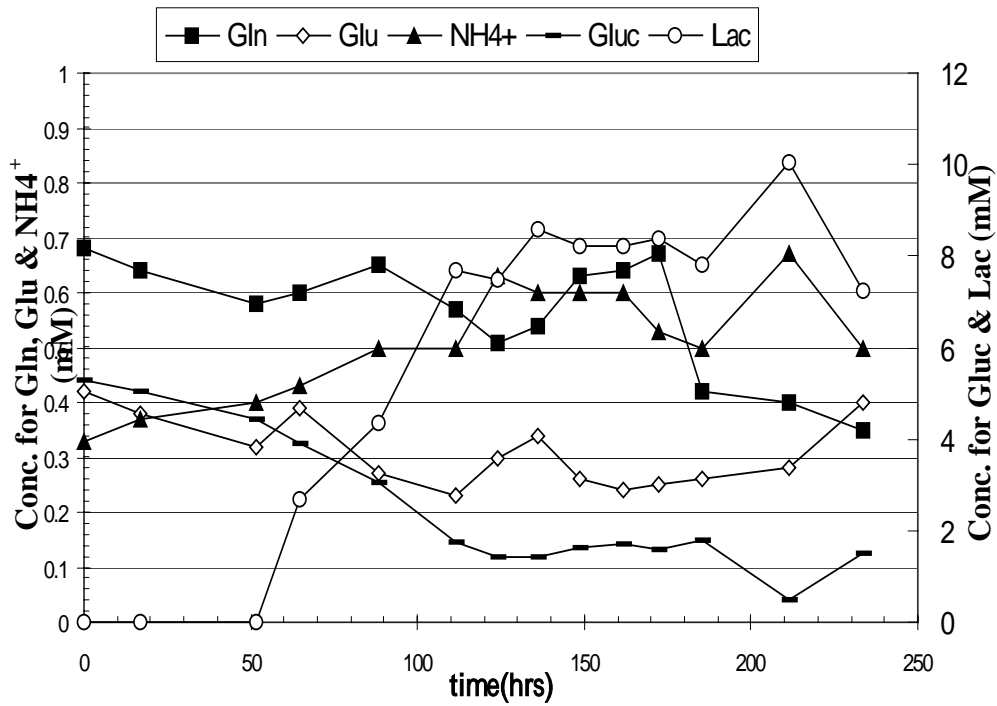
圖三、潮汐式生物反應器裝置圖



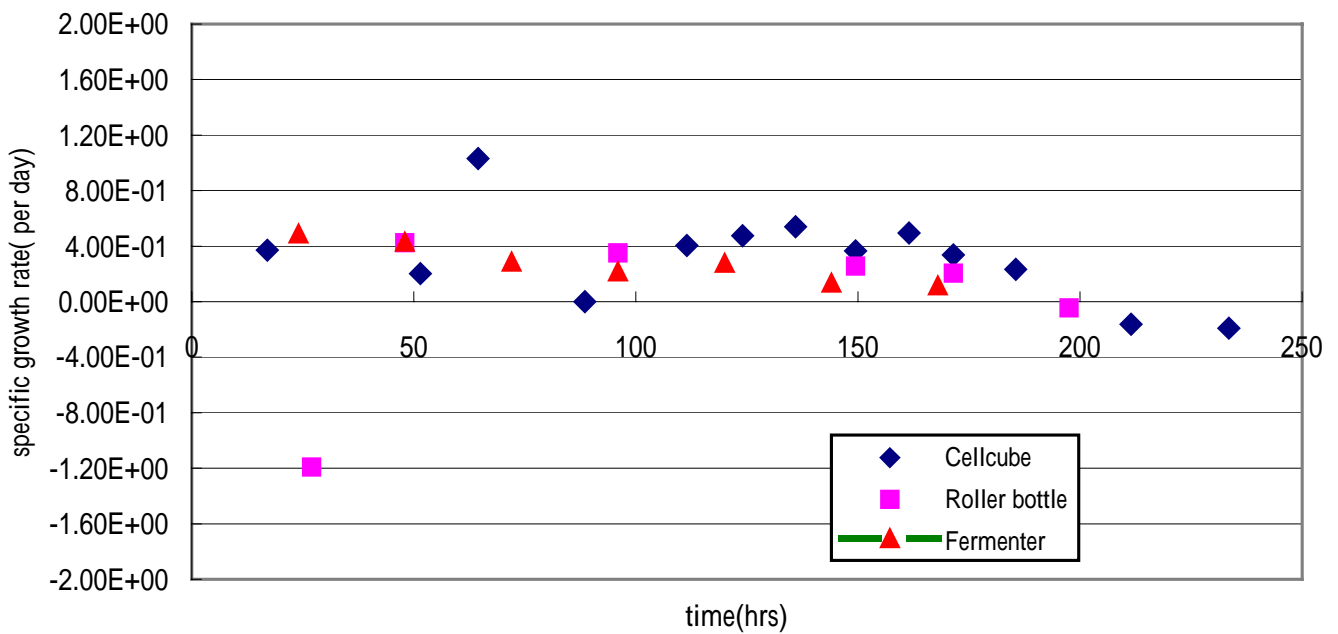








圖九、CellCube培養過程中 glucose, lactate, glutamine, glutamate 和 ammonia 濃度之變化



圖十、CellCube、Microcarrier和Rollerbottle 三種培養系統系統比生長速率之比較

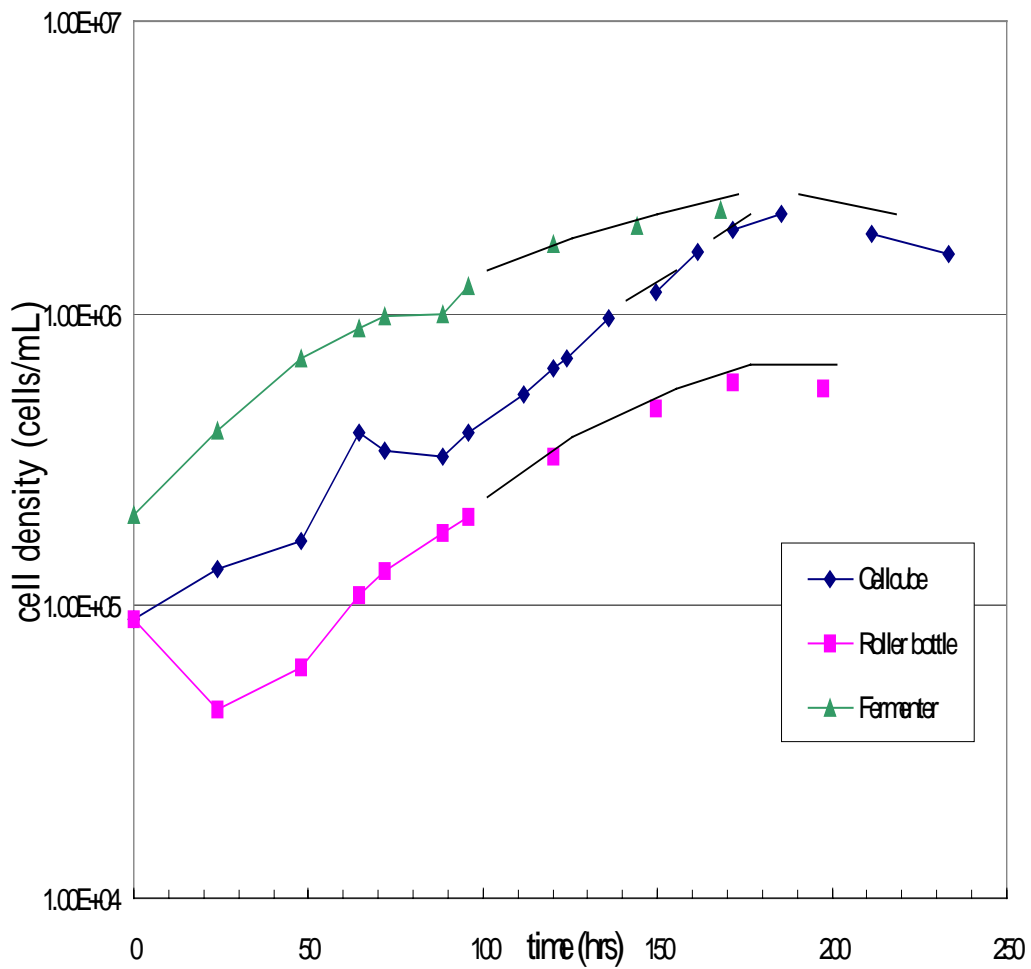


Fig 3 Cell density of CellCube, roller bottle and microcarrier during cultivation process.

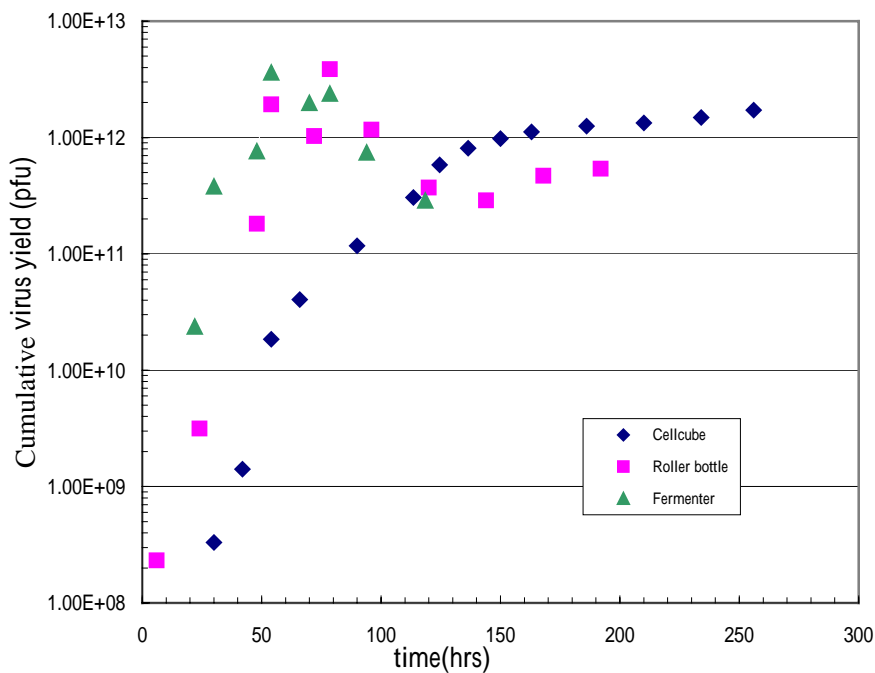
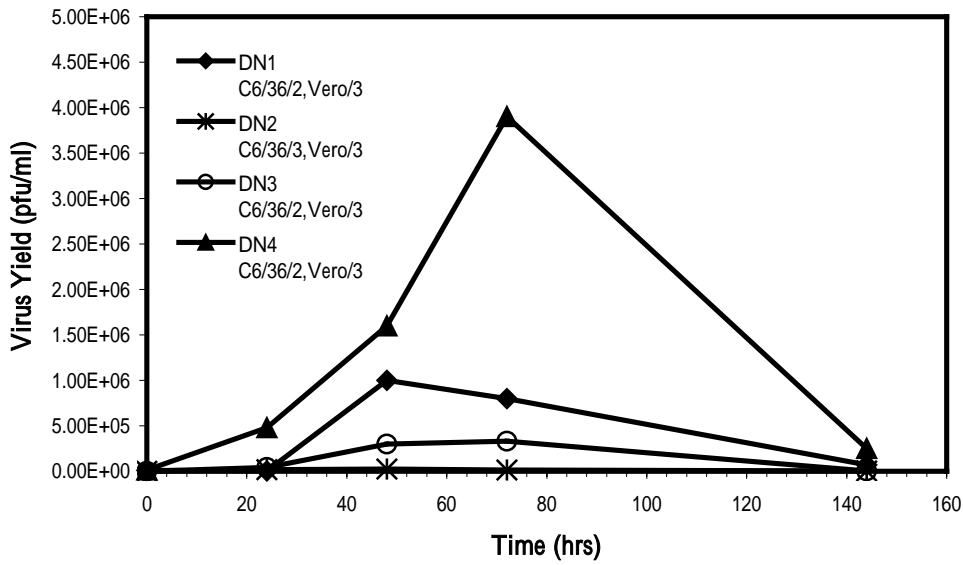


Fig.5 Cumulative Virus Yield of CellCube, Roller Bottle and Microcarrier Culture.

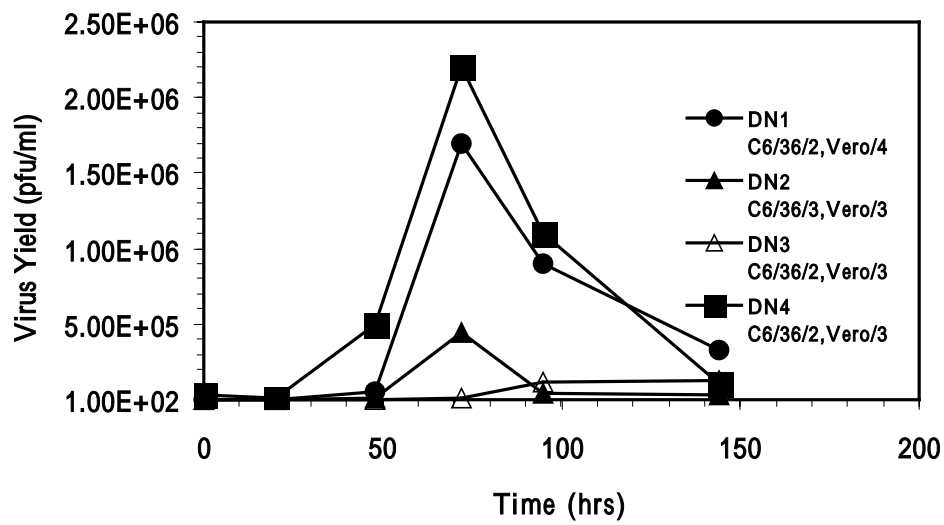
表一、 比較潮汐式、多層平板生物反應器、滾動瓶、微載體四種培養系統

之生產效率

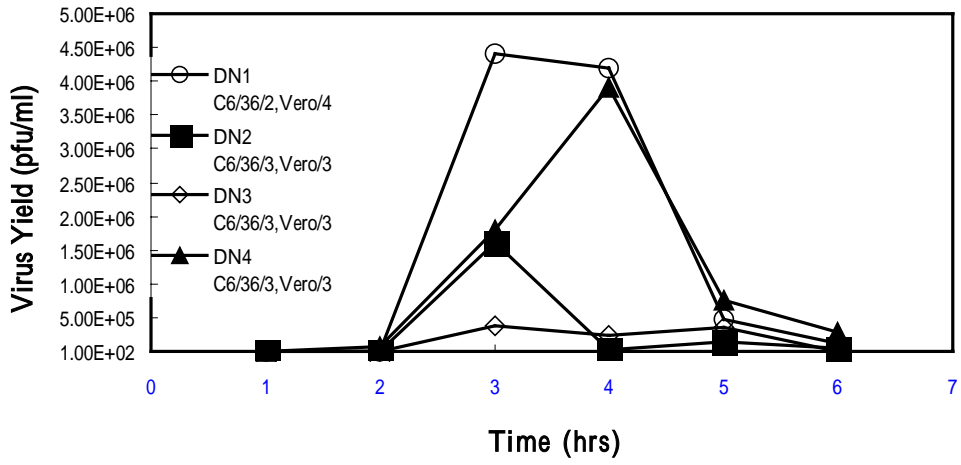
	Cell production rate(cells/l/day)	Virus production rate(pfu/l/day)	Cells/cm ² Surface area	Cell sp.virus Product. (pfu/10 ⁶ cells/day)
Tidal bioreactor	2.65×10^6	4.51×10^9	1.21×10^5	3.26×10^7
CellCube	1.41×10^7	3.11×10^9	3.10×10^5	7.44×10^7
Roller Bottle	2.5×10^8	2.89×10^{10}	2.74×10^5	3.36×10^8
Microcarrier	1.87×10^8	5.79×10^{10}	6.28×10^4	2.68×10^8



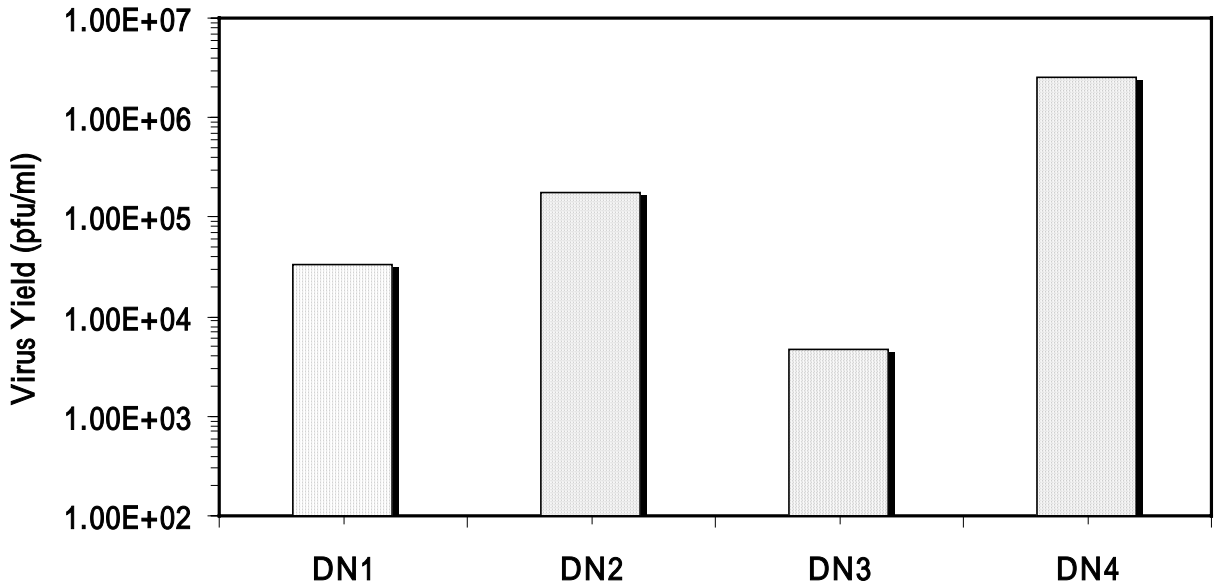
圖十、T-Flask上培養登革熱四型



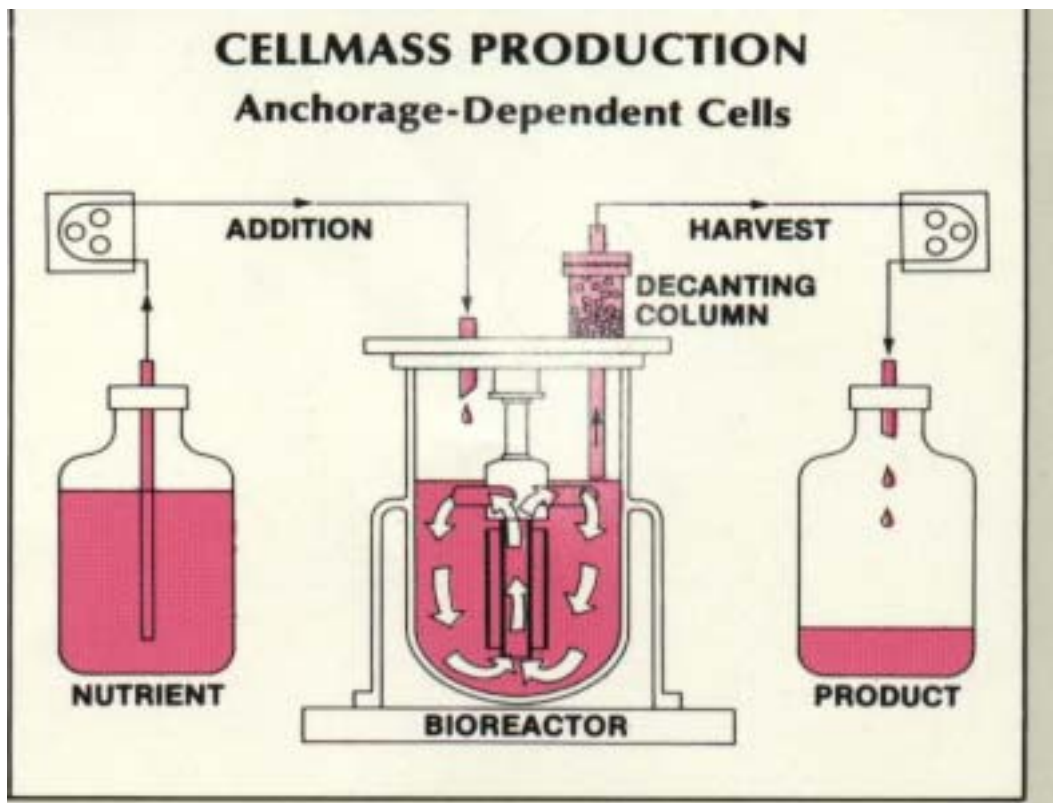
圖十一、攪拌瓶上動態培養登革熱四型病毒



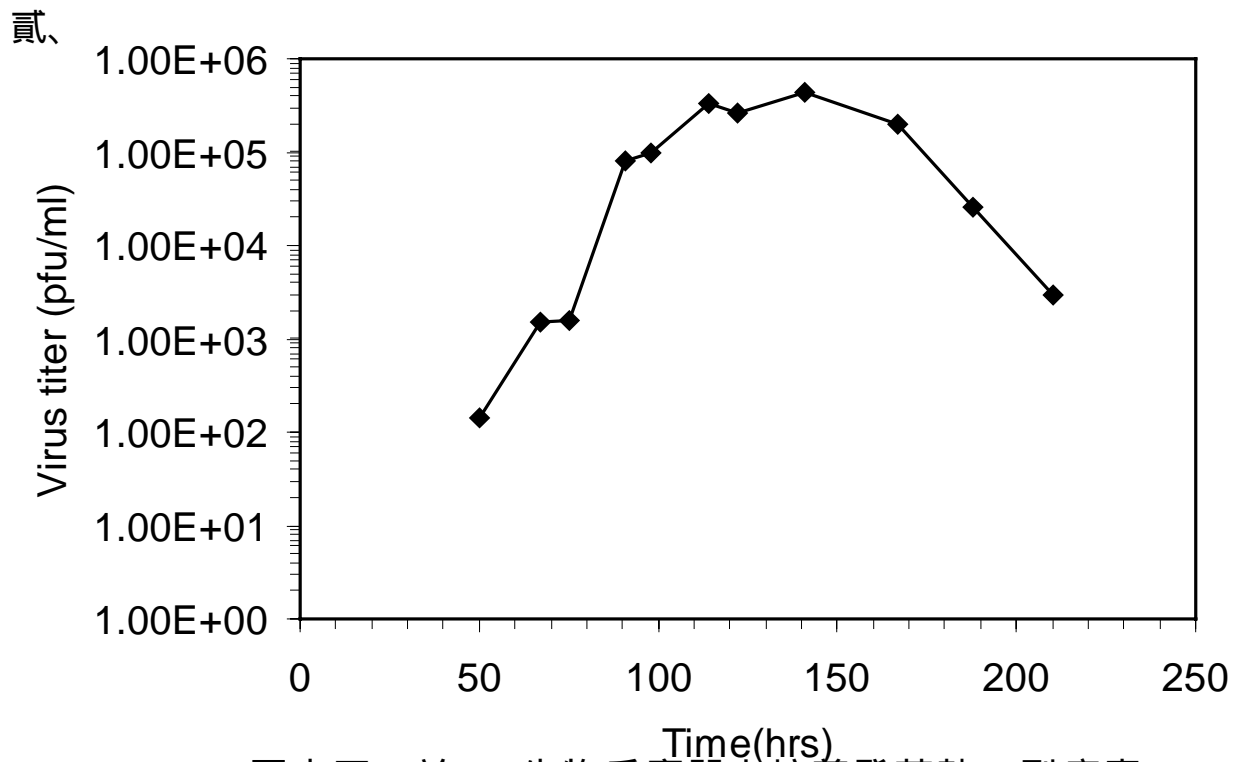
圖十二、登革熱四型病毒繁殖情形



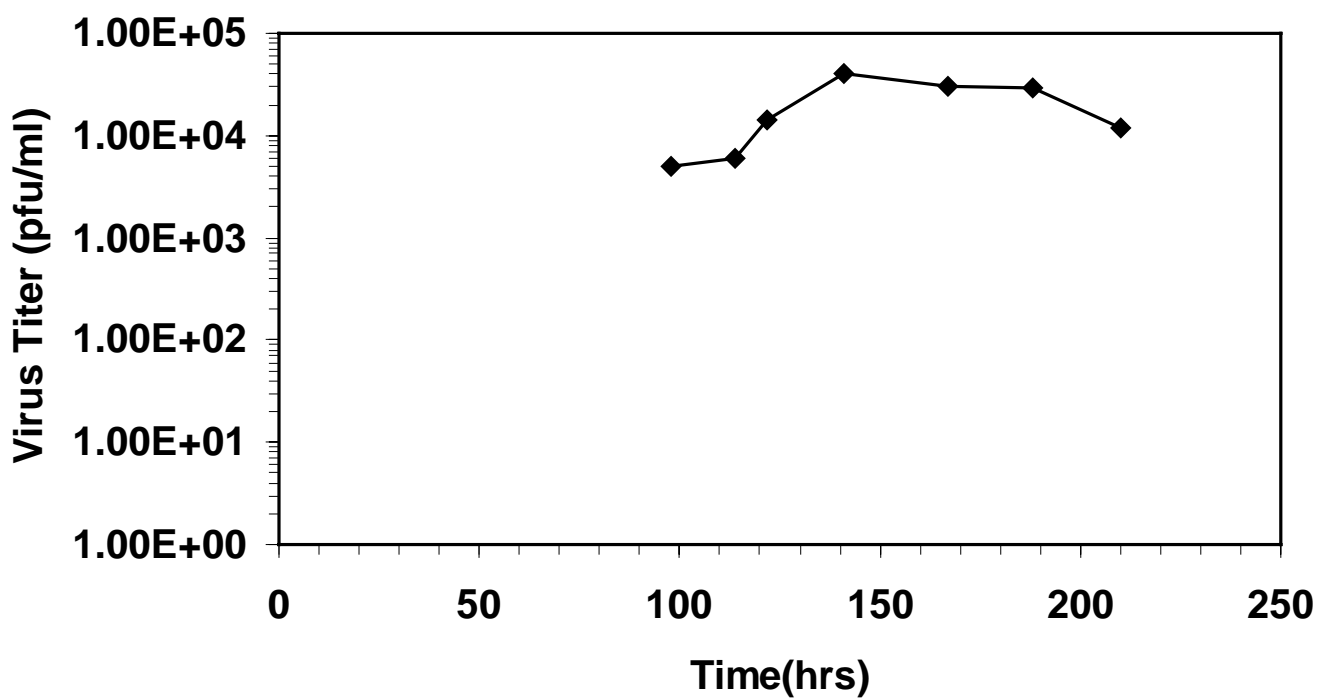
圖十三、登革熱四型病毒在滾動瓶上繁殖情形



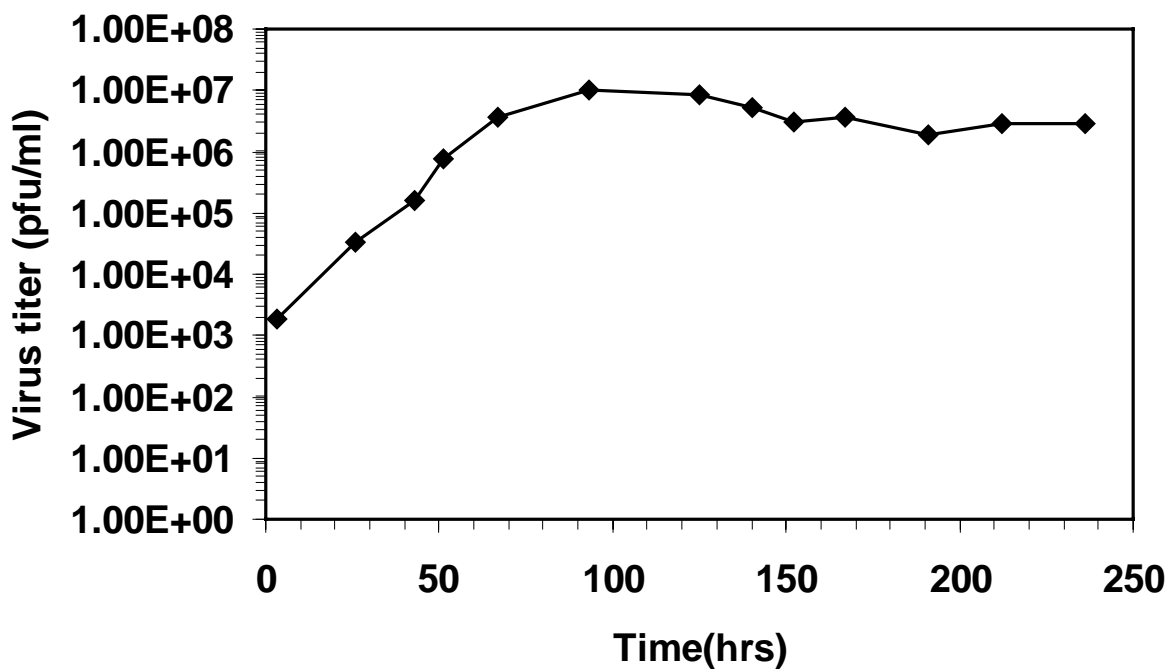
圖十四、微載體生物反應器裝置圖



圖十五、於5L 生物反應器上培養登革熱 1型病毒



圖十六、於5L 生物反應器上培養登革熱2型病毒



圖十七、於5L 生物反應器上培養登革熱4型病毒

參、附錄



圖一、滾動瓶培養設施微載體醱酵槽培養設施



圖二、微載體醱酵槽培養設施



圖三、CellCube 生物反應器培養設施

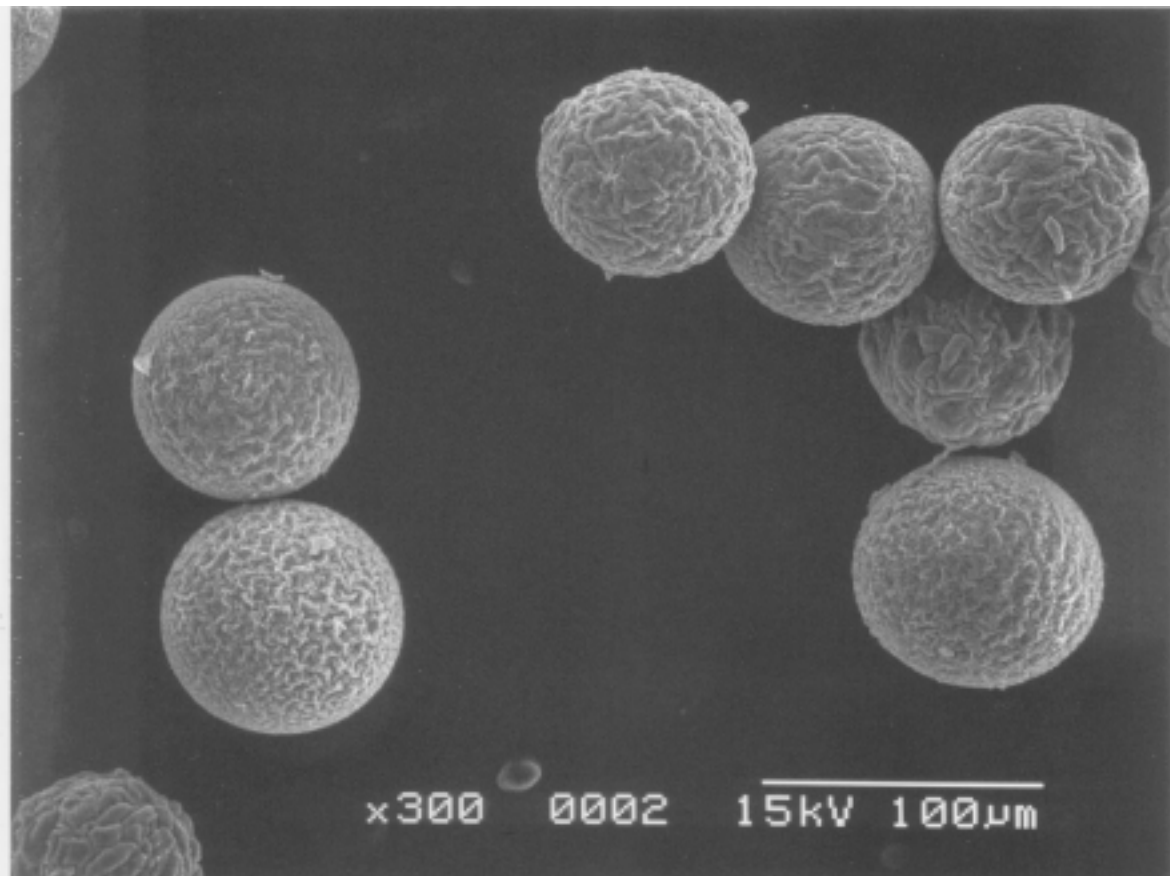


圖四、潮汐式生物反應器培養設施

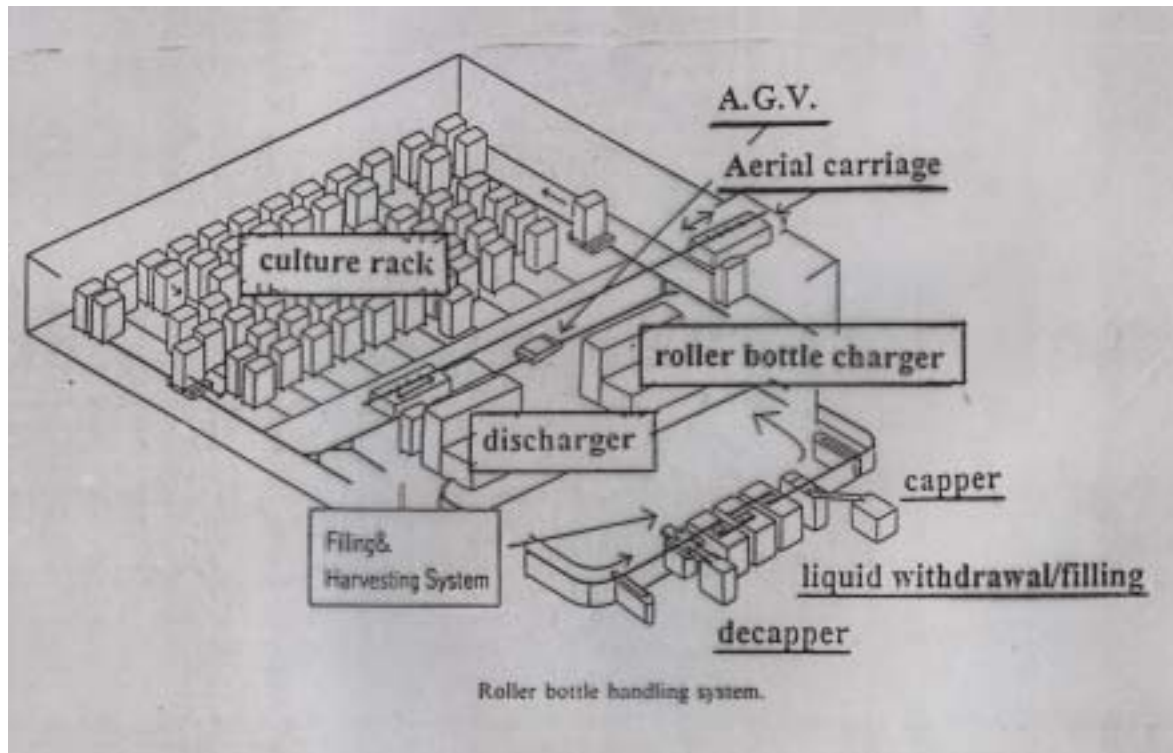


圖五、國外廠商動物細胞量產的滾動瓶(roller bottle)及攪拌瓶培養設施

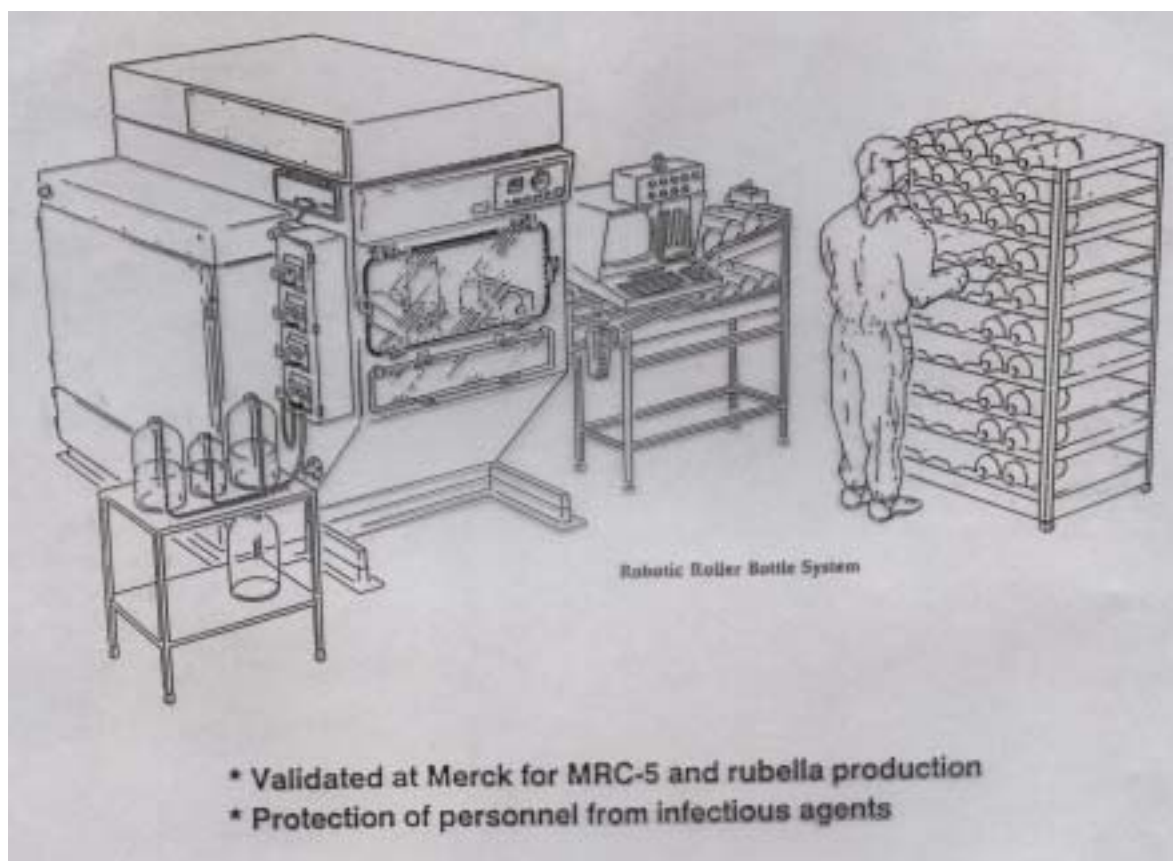
(本圖摘自網站上資料)



圖六、Vero 細胞生長在微載體上有些細胞被日本腦炎病毒裂解之電顯圖。



圖七、日本 Kirin 公司培養遺傳重組 CHO 細胞生產紅血球增生素 (erythropoietin, EPO) 之全自動化滾動瓶生產設施。



圖八、莫克公司培養 MRC 細胞生產 rubella 之半自動化滾動瓶生產設施。