

DOH 86-PM-2807

行政院衛生署預防醫學研究所八十 年度研究計畫

利用動物細胞量產日本腦炎疫苗用病毒液之先導型產
程開發

**Mass Production of Japanese Encephalitis Virus
Vaccine from Animal Cells : Pilot Scale Process
Development**

研究報告



執行單位：生物製劑製造組
計畫主持人：廖明一
研究人員：

吳夙欽，謝文欽

執行期間：

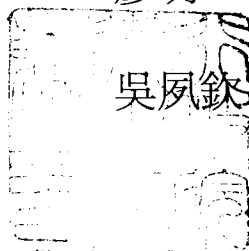
85年7月1日—86年6月30日

利用動物細胞量產日本腦炎疫苗用病毒液之先導型產
程開發

**Mass Production of Japanese Encephalitis Virus
Vaccine from Animal Cells :Pilot Scale Process
Development**

生物製劑製造組

廖明一



吳夙欽，謝文欽

85年7月1日—86年6月30日

行政院衛生署預防醫學研究所八十六年度研究發展計畫期末報告

利用動物細胞量產日本腦炎疫苗用病毒液之先導型產程開發
(DOH86-PM-007)

生製組 吳夙欽 謝文欽 廖明一

中文摘要 (關鍵辭: 疫苗, 病毒, 動物細胞, 攪拌型發酵槽, 擴大化生產)

本計劃選擇以 20 升攪拌型發酵槽為先導型產程系統，以大量製造日本腦炎疫苗株病毒液。首先對此反應槽的流體輸送現象與氧氣質傳速性質做基本的了解，並確培養方式。此產程基本上是利用微載體培養貼附性的 VERO 動物細胞，然後用來大量繁殖日本腦炎疫苗株病毒液。在整個培養過程中，約可分成三個階段：(1) 細胞貼附微載體階段，(2) 細胞生長階段，及(3) 病毒繁殖階段。本計畫的目的在研究此產程之可行性，並尋找出最適操作條件，以利擴大化生產日本腦炎疫苗。

英文摘要: (Keywords: viral vaccine, animal cell, stirred tank fermentor, large-scale production)

In this paper we purpose using a pilot-plant scale 20 liter stirred tank fermentor (working volume = 15 liter) to analyze the reactor behaviors such as the liquid mixing time and the mass transfer coefficient under different operating conditions. The 20 liter fermentor will be applied to produce Japanese encephalitis virus vaccine from growing microcarrier-attached VERO cells in cultures. The operation procedures for this cultivation will be studied as the following three steps: (1) the microcarrier attachment phase, (2) the cell growth phase, and (3) the virus production phase. The goal of this proposal will investigate/optimize the processes in the 20L stirred tank fermentor for large-scale vaccine production.

一、計畫緣起：

目前所用的日本腦炎疫苗，大部分仍以鼠腦當疫苗株病毒接種與繁殖的基質，再將病毒液加以純化及去活化處理，製成疫苗製劑。然而就大量繁殖病毒原液(bulk virus)而言，此種以活的動物或動物體內的器官或組織來生產疫苗的方法，不僅不符合經濟上的效應，況且在安全考量上也有顧忌。近來由於體外動物細胞培養技術上的突破，已進步到利用生物反應器(bioreactor)來大量培養細胞來生產疫苗用病毒液，成功的例子包括有小兒麻痺【Montagnon et al., 1981; Larsson and Litwin, 1987】，狂犬病【Van Wezel and Van Steenis, 1978; Mendonca et al., 1993】，麻疹【Mendonca et al., 1994】、德國麻疹【Sidorenko et al., 1989】，口蹄病【Meignier et al., 1980】..等等人用或動物用疫苗。

就病毒性疫苗製造程序中，攪拌型發酵槽(stirred tank fermentor)是最被廣泛應用的生物反應器之一【Shevitz et al., 1990】。攪拌型發酵槽利用攪葉攪拌與通氣方式，以提供細胞生長均質的環境及充足之氧氣供應，具備有操作方便、格式標準化、易於產程規模放大、成熟之其他相關的產程發展技術等優點。然而基本上以培養微生物而發展出的攪拌型發酵槽，在培養動物細胞上，仍有一些的問題。譬如說 (1) 許多動物細胞的特性是貼附性(anchorage dependent)，不能生長於自由懸浮於培養槽中 (2) 動物細胞因沒有細胞壁，十分脆弱，無法承受發酵槽內太高的攪葉轉速及通氣量。

就培養貼附性動物細胞，由於微載體(microcarrier)技術的發明(Van Wezel, 1967)，許多動物細胞株已發現能藉微載體上而懸浮於攪拌槽液中生長，解決了部份這方面的問題。然而在產程擴大化後的規模，由於發酵槽液量的增加，槽內流體流動型式的改變，可能造成因流體混合均勻度的不足，導致微載體產生凝聚塊，而產生細胞結塊而不利於生長的情形。因此在操作較大型之發酵槽培養貼附性動物細胞，對反應槽的流體輸送現象性質的了解，更形重要。就氧氣的供應量來說，由於在大型發酵槽內因培養基容量增加，氧氣的供求亦相對的提高，因此更需要對反應槽溶氧的控制，也十分重要。

最後就整個疫苗產程而言，利用微載體技術培養動物細胞來達成生產病毒的程序，可約列歸類分成三個階段：(1) 細胞貼附微載體階段 (2) 細胞生長階段 (3) 病毒繁殖階段。在細胞貼附微載體階段，如何在不增添其他設備條件下，使細胞能均勻分布於大型發酵槽中的微載體表面上。在細胞生長階段，由於微載體具有相當高的比表面積，如何尋找出最適培養條件下，使細胞能持續長滿至整個微載體表面。在病毒的繁殖階段，如何尋找適當病毒種苗量與繁殖時間，並嘗試由增加病毒吸附量，被感染細胞的狀況與代謝，病毒穩定性，針對大型攪拌型發酵槽的生產程序，如何尋找最

適當的操作方式和條件，以提高疫苗病毒液產量。本計劃的目的在研究此產程擴大化後之可行性與最適化。

三、研究方法及成果

3.1 攪拌型發酵槽部份

B.BRAUN製不銹鋼發酵槽 (20L-S)具20升操作容量，槽體之高度與直徑比約2:1，槽體為雙夾層，攪拌葉為螺旋型(helical stirrer)，氣體可自頂部和底部同時進口。發酵槽與配屬閥件、管路及空氣過濾器以高溫蒸氣殺菌。取樣管路同時可些在不同時間殺菌。發酵槽內之量測設備包括有溫度電偶計，pH電極及溶氧電極。溫度控制採比例積分微分自動控制系統。pH值 由通入CO₂氣體，溶氧量則可藉通入空氣或氧氣，所需CO₂與空氣或氧氣量由自動氣體控制系統(Mass Flow Controller)來決定。

3.2 實驗材料

a. 日本腦炎病毒：日本腦炎疫苗用病毒Beijing-1，取自接種而發病的哺乳鼠腦，經離心後所取得上層液，儲存於-80°C 冰箱。

b. 動物細胞： VERO 細胞株 (ATCC CCL 81)培養於199 細胞培養基含5%小牛血清。細胞培養於T flask，繼代時以Trypsin讓細胞脫離附著面，約以1: 10比例每週一次。若實驗需大量細胞時，以滾動瓶 (Roller Bottle) 培養。

c. 微載體配製：使用Pharmacia之微載體cytodex 1，秤重後浸泡於PBS三小時使其膨脹，以PBS清洗三次後，經高溫滅菌15分鐘。使用前，再以含5%小牛血清之199 培養基清洗三次。

四、結果與討論

4.4 醱酵槽操作條件之測定

經由實驗結果測知，能夠使微載體均勻混合而懸浮於15升醱酵液之最低攪拌為35rpm。若以水為系統，以表面通氣操作，測得之氧氣質傳係數k_La為0.18 hr⁻¹。以0.2 vvm空氣直接通氣，氧氣的質傳係數k_La提高約78倍。由於動物細胞一般十分脆弱，無法忍受較強烈環境剪刀。故我們首先以表面通氣方式培養細胞，當培養時溶氧度降至零時，再以0.01 vvm空氣直接通氣培養。

4.2 醱酵槽培養-VERO細胞貼附微載體階段

由於細胞貼附微載體的過程，主要是藉著細胞與微載體間的碰撞及相互間電核

吸引所造成。隨著培養槽的加大，碰撞頻率可能隨混合時間的增長而減少，細胞貼附微載體所需的時間亦相對的拉長。在使用2g/l Cytodex1微載體， 2×10^5 Vero Cells/ml 接種密度，比較在100ml懸浮轉動瓶與15升醱酵槽培養。實驗所得之一次貼附動力參數顯示，前者k值為 $2.233 \pm 0.834 \text{hr}^{-1}$ (或 $TD = 0.310 \text{ hr}$)，後者k值為 $0.539 \pm 0.096 \text{hr}^{-1}$ (或 $TD = 1.311 \text{ hr}$)。在相同濃度的微載體和接種細胞密度，培養體積由100ml增加至15升(150倍)，實驗結果顯示細胞貼附微載體速率約減緩4倍，然而細胞最終仍會附著在微載體上。

4.4 醱酵槽培養-VERO細胞生長階段

經多次實驗結果顯示，VERO細胞在100ml懸浮轉動瓶與15升醱酵槽生長曲線，及其估算得之比生長速率或doubling time，大致相同。然而在使用15升醱酵槽培養時，最初使用表面通氣，溶氧值在第2-3日降至零，此時再以0.01 vvm空氣來直接通氣。在使用100ml懸浮轉動瓶培養，似乎氧氣供應不成問題。培養4日後，VERO細胞密度可達 $1-2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 。

4.5 醱酵槽培養-日本腦炎病毒繁殖階段

當細胞培養4日後，更換掉60%培養基，並以 $MOI = 0.1$ 之日本腦炎病毒感染。由感染後病毒繁殖曲線，我們發現在使用15升醱酵槽培養，其病毒繁殖速度較使用100ml懸浮轉動瓶培養慢約1-2日。然而培養液所能得到之最高的病毒力價均可達 $1-2 \times 10^8 \text{ pfu/ml}$ ，兩者約略相同。

五、參考文獻

- 吳家驥 1996. 生物製程技術研習會 財團法人生技中心 DCB-PD-1995-022.
- Ford, D. E., Mashelkar, R. A., Ulbrecht, J. 1972. Mixing times in Newtonian and non-Newtonian fluids. *Proc. Technol. international.*, 17: 803-807.
- Larsson, B., Litwin, J. 1987. The growth of poliovirus in human diploid fibroblasts grown with cellulose microcarriers in suspension cultures. *Devel. Biol. Standard.* 66: 385-390.
- Meignier, B., Mougeot, H., Favre, H. 1980. Foot-and-mouth disease virus production on microcarrier-grown cells. *Vaccine* 7: 554-556.
- Mendonca, R. Z., Ioshimoto, L. M., Mendonca, R. M. Z. De Franco, M., Valentini, E. J. G., Becak, W., Raw, I., Pereira, C. A. 1993. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 1305-1319.

- Mendonca, R. Z., Vaz De Lima, L. R. A., Oliveira, M. I., Pereira, C. A., Hoshino-Shimizu, S. 1994. Studies of the efficiency of measles virus antigen production using VERO cell culture in a microcarrier system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1575-1587.
- Ioshimoto, L. M., Mendonca, R. M. Z. De Franco, M., Valentini, E. J. G., Becak, W., Raw, I., Pereira, C. A. 1993. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 1305-1319.
- Montagnon, B. J., Fanget, B., Nicolas, A. J. 1981. The large scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Devel. Biol. Standard.* 47: 55-64.
- Papoutsakis, E. T. 1991. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends Biotechnol.* 9: 316-324.
- Shevitz, J., La Porte, T. L., Stinnett, T. E. Production of viral vaccine in stirred bioreactors. In: Mizrahi A. (ed.) *Advances in biotechnological processes*, pp. 1-35, New York, John Wiley & Sons 1990.
- Sidorenko, E. S., Dorofeeva, L. V., Kaptsova, T. I. 1989. Experimental-scale measles and mumps vaccine production on microcarrier-grown cells. *Vaccine* 7: 554-556.
- Sobotka, M., Prokop, A., Dunn, I. J., Einsele, A. Review of methods for measurement of oxygen transfer in microbial system. *Annu. Rep. Ferment. Proc.* V.5, Chap. 5, 127-210, 1982.
- Van Wezel, A. L. 1977. Growth of cell strain and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature* 216: 64-65.
- Van Wezel, A. L., van Steenis, G. 1978. Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Devel. Biol. Standard.* 40: 69-75.

行政院衛生署圖書室



0012106

T
DOH
PM
86

OH86-PM-007