

大瓶旋转培养地鼠肾细胞用于流行性乙型脑炎疫苗生产

成都生物制品研究所脑炎组

(成 都)

地鼠肾组织经胰酶消化后,接种于盛有 2000 毫升含 5% 小牛血清的营养液的 15 升大瓶内,在旋转机上(4—5 转/小时) 37—38℃ 培养 42—48 小时,瓶壁周围即布满繁殖成致密单层的细胞。然后接种乙型脑炎病毒“P₃”毒种,37—38℃ 静置培养 36—48 小时。当 25—50% 细胞圆缩,病变区明显和较多细胞脱落时收获,毒力 $\log LD_{50}$ 为 5.0—6.5 者占 74%; $\log LD_{50}$ 为 4.5—4.9 者占 26%。所制疫苗的 $ID_{50} = 10^{-3}$ 毫升以下者占 84.6%。疫苗在 8℃ 保存一年半, ID_{50} 没有降低。

用克氏扁瓶生产流行性乙型脑炎疫苗(下称乙脑疫苗),产量低,规模小,不能满足广大工农兵的需要。遵照毛主席关于“**备战、备荒、为人民**”的伟大战略方针和“**把医疗卫生工作的重点放到农村去**”的指示,从 1970 年开始我们试验了用大瓶旋转培养地鼠肾细胞,并用来生产乙脑疫苗。现将结果报告如下。

一、地鼠肾细胞的旋转培养

生长繁殖快,形态正常的细胞是组织培养高质量乙脑疫苗的基础。所以,消化后之单个细胞的活力要强,数量要多,并且要易于培养。为此,试验了旋转培养地鼠肾细胞的方法。

(一) 细胞的消化

用 14—15 日龄之地鼠,无菌操作取肾,剪成 2—3 立方毫米的小块,加入胰酶(胰酶活力在 50 单位者用 0.15%—0.2%;活力单位在 120 左右的用 0.1—0.15%),于 4—6℃ 作用 16—18 小时,导出胰酶液,用无菌水洗涤肾块 3 次,再加入玻璃珠振荡使细胞分散,收集上层细胞悬液。这样得到的细胞生长繁殖快、活力高,用于进行以下试验。

(二) 细胞旋转培养试验

1. 为寻找一种能使细胞生长好、繁殖快的营养液,首先进行了营养液试验:

(1) 营养液成分 乳蛋白营养液: 1 升 Hank's 液^[1]中加入 2 克乳白蛋白。

106 营养液: 乳蛋白营养液中加入半胱氨酸 10 毫克,谷氨酰胺 100 毫克,抗坏血酸 2 毫克,维生素 E 0.2 毫克, Tween 80 25 毫克。

209 营养液: 106 营养液中加入异亮氨酸 50 毫克、核糖核酸和去氧核糖核酸各 30 毫克。

(2) 三种营养液培养细胞的效果

在 106 和 209 营养液中加入 1%—7% 的小牛血清培养细胞,48 小时后用显微镜检查结果,发现两种营养液效果相同,加 3% 小牛血清于上述两种培养液中,所培养出的单层细胞致密。因此,用 106 营养液与乳蛋白营养液加入不同量小牛血清,培养不同日龄之地鼠肾细胞进行比较,结果表明(表 1),当鼠龄大,营养液含血清量少时,106 营养液优于乳蛋白营养液。

2. 旋转培养时转速试验:

本文于 1976 年 6 月 10 日收到。

表 1 细胞在两种营养液中生长情况的比较*

地鼠日龄	小牛血清含量 (%)	营养液	培 养 时 间 (小时)						
			12	30	36	44	48	58	72
14—15	5	乳蛋白 106	+	++	++	+++			
		106	+	++	+++	+++			
	3	乳蛋白 106	+	++	++	+++			
		106	+	+++	+++	+++			
18—20	3	乳蛋白 106	±	+	++	++	+++	+++	
		106	+	++	++	+++	+++	+++	
	2	乳蛋白 106	—	+	+	+	+	++	++
		106	±	+	++	++	+++	+++	+++
25—30	3	乳蛋白 106	—	+	+	++	++	++	++
		106	±	+	++	++	+++	+++	+++
	2	乳蛋白 106	—	±	±	±	±	—	—
		106	±	+	+	++	++	++	++

* “—”，细胞未生长或团缩；“±”，在几个视野中才看到小的细胞繁殖团；“+”，每个视野可见数个细胞繁殖团；“++”，细胞繁殖增多，空隙占 1/3 左右；“+++”，细胞繁殖成致密单层。

旋转培养细胞时，旋转速度是细胞能否均匀地粘附于瓶壁四周的关键之一。在 15 升培养瓶中种入 30 个地鼠肾，按细胞消化法消化后收集细胞，加入 2 升营养液，于 37—38℃ 比较不同旋转速度下细胞粘壁情况，结果见表 2。

表 2 不同旋转速度下细胞粘壁情况

旋转速度 (次/小时)	细胞粘壁情况
6—7	粘壁少、繁殖不均匀，细胞成团，重叠较多，空隙较大
4—5	粘壁多，均匀，生长繁殖较致密
3	粘壁多，较不均匀，细胞单层较薄

3. 地鼠日龄与细胞生长繁殖的关系：

用加 3% 小牛血清的 106 营养液，分别接种 14—15、18—20、25—30 日龄之地鼠肾细胞，37—38℃ 温室旋转培养，在不同时间观察细胞生长繁殖情况，结果见表 3。由表 3 可见，14—15 日龄的地鼠肾细胞活力较强，25—30 日者活力较弱。

表 3 地鼠日龄与细胞生长繁殖的关系

地鼠日龄	培养时间 (小时) 及细胞生长情况*				
	30	36	44	48	53
14—15	+++	+++	+++		
18—20	++	++	+++	+++	
25—30	+	++	++	+++	+++

* 表示方法见表 1 附注。

二、病毒的大瓶培养

(一) 材料与方法

毒种：乙脑“P₃株”小白鼠鼠脑毒种，由北京药品生物制品检定所提供。

维持液：1 克人白蛋白和 30 毫克半胱氨酸溶于 1 升 Hank's 液中。

种毒方法：将毒种接种于生长繁殖较致密的经洗涤之地鼠肾单细胞层上，加满维持液，毒种最终浓度为 10⁻⁴，37—38℃ 静置培养。

毒力测定方法：取病毒培养液按 10⁻¹—10⁻⁶ 作系列稀释，用每个稀释度的液体

脑腔接种 7—10 克小白鼠 4 只, 每只 0.04 毫升, 逐日观察发病情况、记录至 14 天。用 Reed 及 Muench 法^[2] 计算半数致死量。

(二) 结果

1. 培养温度与种毒时维持液温度的关系:

种毒时分别采用 31℃, 23℃, 16℃ 三种温度的维持液, 在 36℃ 或 38℃ 温室培养病毒, 不同时间取样测定毒力, 同时用与维持液相同温度的同量蒸馏水作对照, 观察维持液温度达到平衡的时间。结果见图 1 和图 2。由结果可见, 三种温度的维持液在 38℃ 下经 36 小时后升至 38℃, 其毒

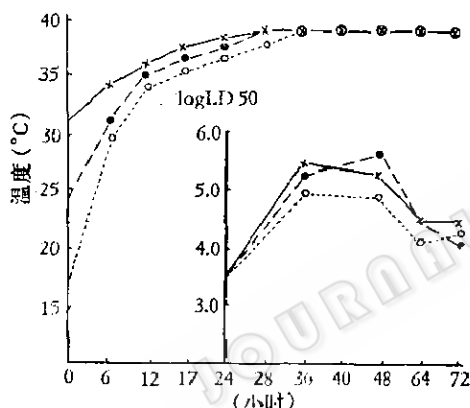


图 1 三种温度的维持液升至 38℃ 时的情况和毒力高峰出现时间

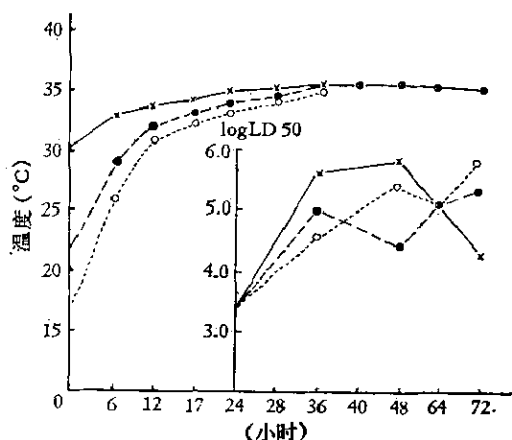


图 2 三种温度的维持液升至 36℃ 时的情况和毒力高峰出现时间

力高峰在 36—48 小时, 三种温度的维持液对毒力高低无甚影响; 在 36℃ 下, 31℃ 和 23℃ 的维持液于 36 小时后达 36℃, 16℃ 的维持液则在 40 小时后, 用 31℃ 和 23℃ 维持液时, 毒力高峰出现在 36 小时后, 而用 16℃ 维持液时, 则在 48 小时后。三者毒力区别也不大。

2. 病毒释放时间:

将毒种接种于 24℃ 维持液中(最终浓度为 10^{-4}), 混匀后, 接种进含洗涤细胞和无细胞的瓶内(对照), 每瓶 16 升, 37℃ 温室静置培养, 不同时间取样, 测定毒力, 结果见图 3。由图 3 可见, 培养 18 小时后开始大量释放病毒, 36 小时达高峰; 对照瓶内毒力直线下降, 但 36 小时后悬液仍有相当毒力, 可能该维持液可延长病毒存活时间, 有待进一步试验。

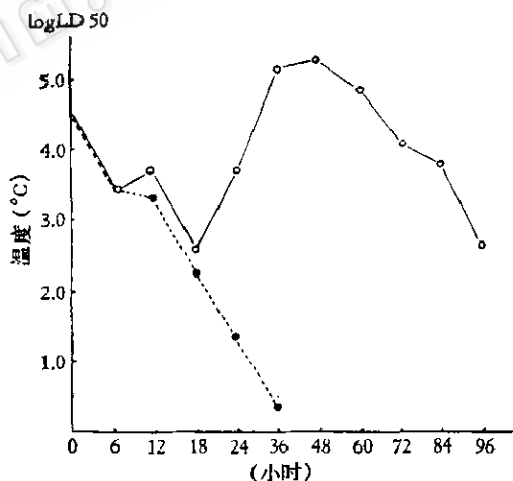


图 3 接种病毒后毒力变化情况

3. 细胞病变与毒力关系:

为收取毒力较高的病毒悬液, 以细胞病变程度为标准来确定收取时间较为适宜。为此我们进行了细胞病变与毒力关系的比较观察。

细胞经种毒后, 置 37℃ 培养, 在细胞不同病变阶段和细胞病变后脱落 80—100% 时取样测定毒力, 结果见表 4。由表 4 可见

表 4 不同细胞病变时的病毒毒力

瓶 号	细 胞 病 变 程 度 及 毒 力 (Log LD ₅₀)							
	未病变	无明显病变	病变区明显, 25% 细胞圆缩	细胞脱落较 多, 50% 细胞圆缩	大量细胞脱 落, 75% 细胞圆缩	80% 细胞脱落	90% 细胞脱落	100% 细胞脱落
1	2.5—3.5	5.2	5.3	—	4.7	4.2	4.0	2.7
2	2.3—3.5	4.3	5.5	5.0	4.8	—	4.0	3.0
3	2.3—3.4	4.0	5.5	5.0	5.3	—	4.5	3.8
4	—	—	5.5	5.5	5.0	4.5	3.5	3.3

表 5 13 批疫苗的效力

疫苗批号	效 力 ID ₅₀ ×10 ⁴ (毫升)	对 照 (浓度为 10 ⁻³ 时的死亡 百分率)	疫苗批号	效 力 ID ₅₀ ×10 ⁴ (毫升)	对 照 (浓度为 10 ⁻³ 时的死亡 百分率)
20	5.0	90	38	5.8	80
21	10	90	39	4.1	80
25	7.0	80	52	6.6	90
28	10	100	53	5.2	90
35	10	80	56	8.0	80
36	5.3	80	58	5.4	80
37	4.1	80			

在出现明显病变区, 有较多细胞脱落, 圆缩细胞达 25—50% 时收液可获较高毒力。

三、疫苗的试制及稳定性

在以上试验基础上, 选用 106 培养液试制了乙脑疫苗。在试制的 50 批疫苗中, 毒力 (Log LD₅₀) 为 5.0—6.5 者占 74%; 4.5—4.9 者占 26%。测定 13 批疫苗 (1:2000 甲醛在 36℃ 灭活 3 天后安全试验合格), 疫苗效力 (ID₅₀) 为 10⁻³ 毫升以下者占 84.6% (见表 5)。

在 8℃ 下保存所制疫苗 5 批, 一年半后检查疫苗效力, 未见效力下降 (表 6)。

表 6 疫苗稳定性

批号	疫 苗	原来效力 ID ₅₀ ×10 ³ (毫升)	保存一年半后效力* ID ₅₀ ×10 ³ (毫升)
1	半 成 品	1.2	0.55
2	成 品	2.1	1.6
3	成 品	1.3	0.74
4	成 品	6.0	0.6
5	成 品	3.5	1.3

* 保存一年半后, 疫苗效力的测定值偏高, 多系动物试验误差。

参 考 资 料

- [1] 北京协和医院检验科主编: 病毒实验诊断手册, 人民卫生出版社, 第 66—67 页, 1960。
- [2] Reed, L. J. and Muench, H.: *Am. J. Hyg.*, 27: 493—497, 1938。

APPLICATION OF ROTATING CULTIVATION OF HAMSTER KIDNEY CELLS FOR THE PRODUCTION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS VACCINE

Japanese B Encephalitis Virus Research Group, Chengdu Institute
of Serum and Vaccine
(Chengdu)

1. After trypsinization of the kidney tissue of 14—20 days old hamsters, the cell suspension was inoculated onto the wall of a 151. bottle. To each bottle, kidney tissue from 30 hamsters and 21. growth medium containing 5% calf serum were added. The bottles were incubated in a spinner with different speeds, at 37—38°C. The best results were obtained at 4—5 revolutions per hour: most of the cells adhered uniformly on to the glass wall, multiplying in all directions and forming a dense, homogeneous monolayer.

2. Growth medium was removed. After washing with Hank's solution, the monolayer was inoculated with "P₃" mouse brain strain of Japanese encephalitis virus. 15—16 l maintenance medium containing 0.1% human serum albumin and Hank's solution containing cysteine

3% mg were added. The final virus concentration was 10^{-4} . Stationary cultivation was carried out at 37—38°C for 36—48 hours. Virus was harvested at a time when 25—50 cell spheroid shrinkage, noticeable cytopathogenetic effect and more cells detachment were occurred.

3. Formaldehyde in a final concentration 1:2000 was added to the harvested fluid. Inactivation proceeded at 36°C for 3 days. The 50% immunizing dose (ID_{50}) was determined by intraperitoneal challenge after immunizing the mice with 13 lots of vaccine. The ID_{50} of 84.6% vaccines prepared was 10^{-3} ml.

4. Five lots of vaccine had been kept at 8°C for 18 months without lowering the ID_{50} .