

初代仔猪腎臟細胞迴轉培養增殖 TGE弱毒TO株之研究

林榮培 賴秀穗 鍾明華

(臺灣省家畜衛生試驗所)

林再春

(行政院農業發展委員會)

試用迴轉瓶以迴轉培養法來培養初代仔猪腎臟細胞，其結果如下，培養時使用的細胞數以 1×10^8 最好，2天半即可完全形成單層細胞，其最終細胞數為 2.5×10^8 。迴轉數以10分鐘一轉者較4分50秒及5分50秒者為佳。生長培養液量則 250 ml 與 200 ml 者效果同樣好，但 100 ml 則不良。

在 37°C 用初代猪腎細胞靜置培養增殖 TO 弱毒，以 1:100 稀釋，病毒量為 5×10^8 TCID₅₀/ml 者，所生產之病毒量最高，於接種後36小時可達 10^8 TCID₅₀/ml。

在 37°C 下用初代猪腎細胞迴轉培養增殖 TO 弱毒，以 $10^{7.7}$ TCID₅₀ 接種者，所生產之病毒量最高，於接種後33~36小時可達 $10^{7.7}$ TCID₅₀/ml 其每細胞的病毒產量為 10 TCID₅₀/cell。

在 34°C 下用初代猪腎細胞迴轉培養增殖 TO 弱毒時，以 $10^{7.7}$ TCID₅₀ 接種者產量最高，於接種後40小時可達 10^8 TCID₅₀/ml 其每細胞的病毒產量為 20 TCID₅₀/cell。

猪傳染性胃腸炎(簡稱 TGE)之研究，自從三十餘年前(1946年)被發現⁽²⁾以來，一直未有甚大之進展，直到原田氏⁽⁶⁾發現可在猪腎細胞產生 CPE 之毒株後，才有突破性之發展。1975 年古內氏⁽⁴⁾、⁽⁵⁾發現經初代猪腎細胞馴化之 TO 弱毒株對小豬不但甚安全，而且具有免疫性，接種仔猪後 5 天即可防禦強毒之攻擊而不死亡，因而在疫苗之開發上出現了曙光。筆者等⁽¹⁾也證明 TO 弱毒對仔猪甚安全，但 TO 弱毒要使用於仔猪使其能防禦強毒，需要高力價之病毒，必須達到 10^7 TCID₅₀ 以上才有效。而以初代猪腎細胞之靜置培養來增殖 TO 弱毒常無法達到此要求，而迴轉培養法可提高某些病毒之力價⁽⁸⁾，基於此，故試以迴轉培養法來增殖 TO 弱毒。

材料與方法

細胞與培養基：初生仔猪之腎臟以0.25%之 trypsin 液(其中含有0.015%之 disodium EDTA)消化15分鐘，共消化四次，第一次者捨棄，其餘3次以 900 rpm 遠心5分鐘去除消化液後，使浮游於生長培養液(GM)中。生長培養液使用 Eagle's minimum essential medium(簡稱 MEM)(Gibco 出品)，其中加入10%小牛血清(GiBCO 出品)，1%之7.5% NaHCO₃。維持培養液(MM)則在 MEM 中加入2%胎牛血清(GiBCO 出品)，2%之7.5% NaHCO₃，以上兩者均再加入 200u/ml 的 penicillin, 200 μg/ml 的 streptomycin。

細胞培養：長型圓玻璃瓶即迴轉瓶(Rolling round bottle)，以迴轉培養法來培養細胞，迴轉瓶直徑 11 cm，長 26 cm，培養面積 897 cm²。生長培養液分別使用 100 ml, 200 ml 與 250 ml

，細胞數分別為 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 四種，置於迴轉培養器上，於 37°C 暖房中培養。細胞之計數使用 hemacytometer 並以 Erythrosin B 染色算其活細胞數。

靜置培養則使 $6 \text{ cm} \times 11 \text{ cm}$ 之長方型角瓶，培養面積為 66 cm^2 。生長培養液每瓶使用 25 ml，細胞數為每 ml 1×10^5 個細胞，在 37°C 暖房靜置培養。

試管培養使用 $1.1 \times 10 \text{ cm}$ 之試管，每試管加入 0.5 ml 含有 $3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 初代豬腎細胞之生長培養液，以橡皮塞密栓後， 37°C 靜置培養。

細胞計數：迴轉培養瓶、角瓶、試管內之細胞以 0.25% 之 Trypsin versence 加以消化下來，遠心、再浮游於 GM 中，以 Erythrosin B 染色後用 hemacytometer 計數。

病毒接種：迴轉瓶於形成單層細胞時，抽除培養液，以 PBS 洗一次，然後接種 TO 弱毒 15 ml，其病毒量分別為 $10^{7.7} \text{ TCID}_{50}$ 及 $10^{5.7} \text{ TCID}_{50}$ 二種，於 37°C 下迴轉感作二小時，再以 PBS 洗三次，最後加入 50 ml MM，分別在 37°C 及 34°C 下培養增殖。

靜置培養者於角瓶之細胞形成單層細胞時，抽除培養液，以 PBS 洗一次，然後接種 TO 弱毒，其量詳如後述，在 37°C 感作二小時，以 PBS 洗三次，加入等量之 MM 在 37°C 下培養增殖。

力價測定：將各試驗所收集之病毒，以 MEM 做 10 倍稀釋，每一稀釋接種於已形成單層細胞之初代仔豬腎細胞之試管四支，每支接種 0.1 ml，感作二小時，加入 0.4 ml MM，密栓後靜置培養於迴轉培養器上迴轉培養一星期，觀察其 CPE 情形，並計算其 TCID_{50} 。

生長曲線測定：迴轉瓶內之初代仔豬腎細胞（簡稱 SK 細胞）於 2 天半形成單層細胞後，依前述之病毒接種法接種病毒，然後於接種病毒後 8 小時、21 小時、24 小時、33 小時、36 小時、40 小時、50 小時、65 小時、96 小時每瓶每次各抽取 1 ml，保存於 -70°C 冰箱中供生長曲線測定之用。其測定法詳如前述之力價測定並同樣以迴轉培養為之。

靜置培養之生長曲線測定，角瓶培養初代 SK 細胞 4 天，形成單層細胞時，其細胞數 1.1×10^7 ，取角瓶 8 瓶，將 TO 弱毒原液 (10^5 TCID_{50}) 依照原液，10 倍稀釋、100 倍稀釋、1000 倍稀釋等四個處理，每處理接種 2 個角瓶，每瓶接種 5 ml，在 37°C 感作 1 小時，經 PBS 洗 3 次後加同量 (25 ml) 之 MM 於 37°C 下培養，分別於 2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、36 小時、48 小時、60 小時、72 小時，每一處理之二個角瓶，每瓶各抽取 0.5 ml 加以混合，保存於 -70°C 下供生長曲線測定之用。其測定法詳如前述之力價測定，並同樣以靜置培養為之。

結 果

1. 細胞數與單層細胞之形成：

將消化好的初代豬腎細胞分成四組，每組之細胞數分別為 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 ，其 GM 量均為 250 ml，於 37°C 以每 10 分鐘一迴轉之速度培養 4 天，培養結果其最終細胞數分別為 4.3×10^6 、 6×10^7 、 4×10^8 、 8.5×10^8 ，其細胞增殖比率分別為 4.3、6、4、及 1.7。其中以 1×10^8 這一組形成單層細胞之結果最好，全部長滿，而 1×10^6 及 1×10^7 者則未完全形成單層細胞，至於 5×10^8 者雖完全形成單層細胞，但細胞有結塊之情形出現。 1×10^8 這一組於培養 2 天半後即可完全形成單層細胞，其最終細胞數為 2.5×10^8 。詳如表 1。

靜置培養之角瓶其培養時之細胞數為 2.5×10^6 ，培養四天後形成單層細胞時之細胞數為 1.1×10^7 ，其細胞增殖比率為 4.4。

2. 初代豬腎細胞迴轉培養與迴轉數之關係：

將消化好之初代豬腎細胞 1×10^8 浮游於 250 ml GM 中，共 4 瓶，在 37°C 下分別於 4 分 50 秒，5 分 50 秒，7 分 20 秒及 10 分一迴轉培養器上培養 4 天，共做 3 個重覆，結果以 7 分 20 秒及 10 分一迴轉者形成單層細胞之情形最好，完全長滿。而 4 分 50 秒及 5 分 30 秒者細胞結塊之情形均甚嚴重，且有未長滿者。

表1. 初代豬腎細胞在迴轉培養瓶迴轉培養之結果

每瓶培養時細胞數(1)	4天後收穫時細胞數(2)	細胞增殖比率(%)	單層細胞形成情形
1×10^6	4.3×10^6	4.3	不完全
1×10^7	6×10^7	6	不完全
1×10^8	4×10^8	4	完全
5×10^8	8.5×10^8	1.7	完全但有細胞結塊情形

3. 迴轉培養之培養液量與細胞增殖之關係：

迴轉瓶3瓶其GM量分別為100 ml、200 ml、250 ml而所使用之消化好的初代豬腎之細胞數均為 1×10^8 在37°C以每10分鐘一迴轉之速度，迴轉培養4天，結果200 ml及250 ml者其單層細胞均長滿，而100 ml者則未長滿，且細胞有嚴重之結塊現象出現。

4. TO弱毒在初代豬腎細胞靜置培養增殖之生長曲線：

角瓶靜置培養增殖TO弱毒共四個處理，即原液(5×10^5 TCID₅₀)、10倍稀釋(5×10^4 TCID₅₀)、100倍稀釋(5×10^3 TCID₅₀)、1000倍稀釋(5×10^2 TCID₅₀)，其結果詳如圖1、其中以100倍稀釋者力價最高，於36小時的時候力價可達 10^6 TCID_{50/ml}而其餘三個處理均無法達到 10^6 TCID_{50/ml}。

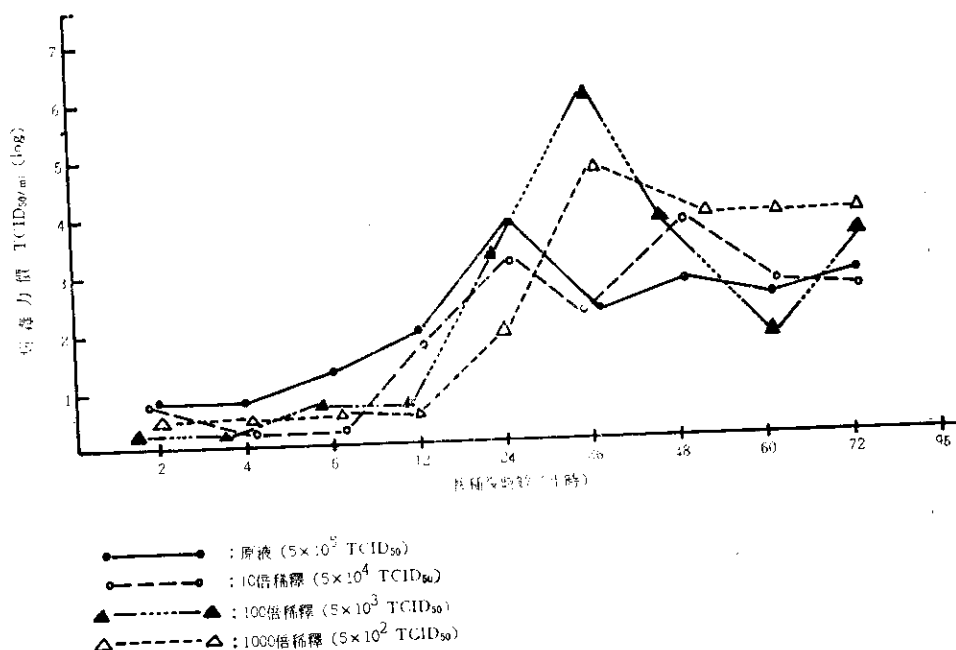
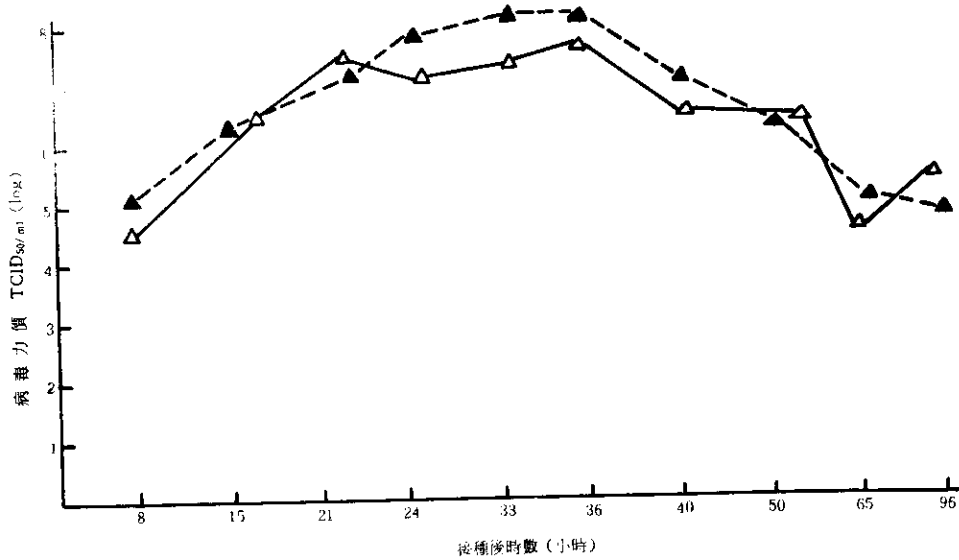


圖1. TO弱毒在初代豬腎細胞靜置培養增殖之生長曲線

5. TO弱毒在初代豬腎細胞迴轉培養增殖之生長曲線：

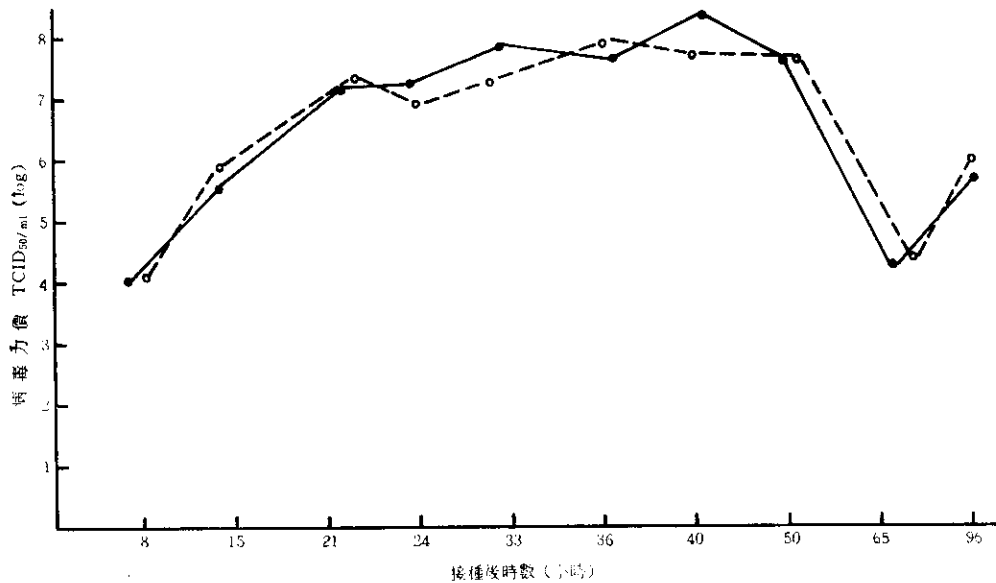
迴轉瓶之初代豬腎細胞於二天半形成單層細胞時分別接種TO弱毒 $10^{7.7}$ TCID₅₀及 $10^{5.7}$ TCID₅₀，在37°C下培養，其生長曲線詳如圖2。病毒於33~36小時的時候達最高力價， $10^{7.7}$ TCID₅₀者可達 $10^{7.7}$ TCID_{50/ml}， $10^{5.7}$ TCID₅₀者較差些。但力價下降甚速，50小時後僅存 10^5 TCID_{50/ml}而已。

迴轉瓶分別接種 $10^{7.7}$ TCID₅₀ 及 $10^{6.7}$ TCID₅₀ 者，並於 34°C 下增殖者，則於40小時方才達到最高力價、 $10^{7.7}$ TCID₅₀ 者可達 10^8 TCID₅₀/ml。而 $10^{6.7}$ TCID₅₀ 者則僅達 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml，50小時後尚有 $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml 之病毒力價。當病毒力價達到 10^8 TCID₅₀/ml 時，其每細胞之病毒產量為 20 TCID₅₀/cell。



▲ ——— ▲ TO弱毒 $10^{7.7}$ TCID₅₀
△ ——— △ TO弱毒 $10^{6.7}$ TCID₅₀

圖2. TO弱毒在初代豬腎細胞37°C迴轉培養之增殖生長曲線



● ——— ● : TO弱毒 $10^{7.7}$ TCID₅₀
○ ——— ○ : TO弱毒 $10^{6.7}$ TCID₅₀

圖3. TO弱毒在初代豬腎細胞34°C迴轉培養之增殖生長曲線

討 論

以迴轉培養法來大量增殖病毒的研究方面，Rosanoff⁽⁷⁾曾以人類的細胞 diploid 細胞株來增殖 Varicella 及 adenovirus 二種病毒，Ubertini⁽⁹⁾等以牛腎細胞來大量增殖口蹄疫病毒，Fenters 等⁽³⁾以 WI-38 細胞來培養 rhinovirus，Sato 等⁽⁸⁾以 HmLu-1 細胞來增殖牛流行熱病毒，均證明迴轉培養法增殖之病毒力價高於靜置法角瓶所增殖者，可用此法來大量增殖病毒並提高其力價。筆者在本試驗中也用初代豬腎細胞以迴轉培養法來增殖 TO 弱毒，其力價較靜置法高，可達 10^8 TCID₅₀/ml。TO 弱毒免疫仔豬時需要 10^7 TCID₅₀ 以上方有效⁽⁵⁾，如以靜置法增殖病毒，則必須再加以濃縮，而迴轉法則可不必，故較靜置培養法來得經濟而方便。

在 TO 弱毒增殖之溫度方面則 34°C 優於 37°C。

病毒如以原液接種於細胞，則其力價較以 100 倍稀釋者為低，考其原因，可能與攪攪素有關。Sato 等⁽⁸⁾在以 HmLu-1 細胞增殖牛流行熱病毒時，也發現有此現象，故彼等均以 100 倍稀釋之病毒來接種細胞，以減少攪攪作用。

在本試驗中同時發現迴轉培養細胞時，如果使用之細胞量太多 (5×10^8) 則細胞會結塊，太少則單層細胞無法完全形成，故細胞量之適當與否關係到培養的成敗。而迴轉培養器的速度也有關係，Sato 等⁽⁸⁾證明每 10 分鐘一迴轉者即每小時 6 迴轉培養細胞最好。本試驗中也以 7 分 20 秒及 10 分鐘一迴轉者較其他二者為佳。

誌 謝

本報告之完成承農業發展委員會之經費補助及陳所長守仕、謝主任快樂之鼓勵與指導，黃士則、周財發兩位先生之協助，謹此敬致謝忱！

參 考 文 獻

1. 林榮培、鍾明華、鄭建盛、傅祖慧、賴秀總、林再春 (1977) 傳染性胃腸炎弱毒 TO 株對小豬免疫之研究。臺灣省畜衛試研報 14: 31—40。
2. Doyle, L. P., and Hutchings, L. M. (1946) A Transmissible Gastroenteritis in Pigs. J. A. V. M. A., 257~259.
3. Fenters, J. D. et al.: Propagation of rhinovirus on WI-38 cell monolayers in rolling bottles. *Appl. Microbiol.* 15, 1460-1464 (1967).
4. Furuuchi, S., Shimizu, Y. & Kumagai, T. (1975) Comparison of Properties between virulent and attenuated strains of Transmissible gastroenteritis Virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* Vol. 15, 159~164.
5. Furuuchi, S., Shimizu, Y. & Kumagai, T. (1976) Vaccination of newborn pigs with an attenuated strain of transmissible gastroenteritis Virus. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 37, No. 2, 1401~1404.
6. Harada, K. Kumagai, T. and Sasahara, J. (1967) Studies on Transmissible Gastroenteritis in Pigs. III. Isolation of Cytopathogenic Virus and its use for serological Investigation. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 7, 127~137.
7. Rosanoff, E. (1963) Observations on the growth of varicella virus and adenovirus on human diploid cell strains. *In: Proceedings. Symposium on the Characterization and Uses of Human Diploid Cell Strains* (Opatija, Yugoslavia, 1963). 303—318.

8. Sato, K. et al. (1975) Rolling round bottle culture of HmLu-1 cells and the Production of bovine ephemeral fever virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quarl.* 15, 109—115.
9. Ubertini, B. et al. : Large scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. *Zbl. Vet Med.* B10, 93-101 (1963).

Rolling Round Bottle Culture of Piglet Kidney Cell and the Production of Attenuated TGE-TO Virus

Y. P. Lin, S. S. Lai and M. H. Jong

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

T. C. Lin

(Council for Agricultural Planning and Development Executive Yuan)

Summary

An attempt was made to cultivate piglet kidney cells in a rolling round bottle. As a result, the optimum conditions of cultivation were found to consist in the number of cells planted per bottle being 1×10^3 , the volume of growth medium per bottle being 200 ~250ml and the velocity of rolling being 6~8.2 revolutions per hour. It was possible to make a monolayer of cells develop all over the glass surface under these conditions.

An experiment was carried out to clarify the production of virus in the square bottle and rolling round bottle culture. The highest virus titer was obtained 36 hours after inoculation of square bottle culture with a 5×10^3 TCID₅₀ infective virus titer and 1:100 dilution of stock virus. Subjected to rolling cultivation at 37°C and 34°C, the highest virus titer was obtained 33-36 hours and 40 hours after inoculation of rolling round bottle culture with a $10^{7.7}$ TCID₅₀ infective virus titer. The virus yield was 10^2 TCID₅₀/ml as high in the rolling method as in the stationary method.