维普资讯 http://www.cqvip.com

95,10(4) 273—277 6770(1) 273-330

第10卷 第4期 中国病毒学 Vol. 10 No. 4
1995年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1995

流行性乙型脑炎病毒在Vero细胞上传代适应的研究

石慧颖 丁志芬 常振彦

(北京生物制品研究所,北京 100024)

R373.31

提要 通过乙脑病毒P_3株以不同方式在鼠脑和Vero细胞间传代适应的研究,培育出适于工业化大生产制备乙脑疫苗的生产毒种。其毒力可达7.0±0.5 $lgLD_{50}$/0.04 ml,空斑滴度为7.5±0.5 PFU/ml,免疫原性ID_{50}值为0.000016—0.000023 ml;在含有适量人白蛋白的199营养液内,该毒种于—30℃至少可稳定一年;与鼠脑组织毒种相比,传代细胞毒种的毒力、免疫原性及稳定性均与其相当。然而,后者不含脑组织,至少降低了一种过敏的危险。另外,细胞毒种的制备无需手工解剖鼠脑,易于控制外源因子污染,易于标准化。对于大规模生产疫苗、提高疫苗产量和质量,传代细胞毒种比鼠脑组织悬液毒种具有明显的优点。

关键词 乙型脑炎病毒,传代适应,Vero细胞 流行性,

目前,制备流行性乙型脑炎灭活疫苗的毒种是病毒感染鼠脑悬液。尽管这种鼠脑毒种经过了高速离心,但仍然含有一定的鼠脑成份。而且,由于感染的小鼠不是SPF动物,可能带来某些外源因子,尤其是鼠源病毒的污染。Vero细胞已被WHO批准可用作疫苗生产的基质[1],乙脑病毒不仅能在Vero细胞上很好地生长繁殖,而且免疫原性也较好[2]。为排除鼠脑毒种可能带来的外源因子污染,制备高质量的Vero细胞乙脑灭活疫苗,我们进行了乙脑病毒在Vero细胞上传代适应的研究。

材料和方法

1 **病毒** 乙脑病毒P_3株,由中国药品生物制品检定所提供。代次:P_3—3。

2 **细胞及其培养** Vero细胞,来自ATCC。传代时用0.25%的胰蛋白酶消化,按1∶2—1∶4分种到100 ml装量的小方瓶内,加入含10%胎牛血清(乙脑抗体阴性)的199液,于37℃培养。

3 **动物** 昆明种小白鼠,8—10 g。

4 **P_3株乙脑病毒传代适应方法**

4.1 方法A:将乙脑病毒P_3株第三代适当稀释后接种到已经生长成片的Vero细胞上(120代—140代),该细胞在含人白蛋白的199液中于37℃培养72小时,收获培养上清液,取滴定样品于—70℃冻存,其余经福尔马林灭活制成疫苗。取该第一代病毒液适当稀释接种Vero细胞,每72小时传一代,共传27代。第一代记为P_3V_1,以后依次记为P_3V_2、P_3V_3…P_3V_{27}。

4.2 方法B:取方法A中第5代(P_3V_5)接种小鼠脑腔,0.04 ml/只,观察至有典型乙脑症状时解剖鼠脑,制备脑组织悬液,离心后取上清记为V_5B_1,将V_5B_1适当稀释接种Vero细胞,72小时后收获上清记为$V_5B_1V_1$,将

本文于1994年7月16日收到,1995年4月10日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

$V_5B_1V_1$ 连续在 Vero 细胞上传至 $V_5B_1V_{10}$，取 $V_5B_1V_{10}$ 第二次接种小鼠，方法同前，制得鼠脑悬液为 $V_5B_1V_{10}B_1$，此 $V_5B_1V_{10}B_1$ 在 Vero 细胞上又连续传 19 代，至 $V_5B_1V_{10}B_{19}$，终止传代，滴定每代病毒，测其免疫原性。

5 **病毒滴定方法** 用小鼠脑腔接种法[3]检定病毒毒力；蚀斑法测定病毒滴度(PFU/ml)；用补体结合试验测病毒的补结效价。

6 **病毒免疫原性测定** 病毒液经福尔马林灭活后用腹腔免疫、脑腔刺激、腹腔攻击的方法[3]测其效力 ID_{50}(ml)。

7 **疫苗试制** 分别用 15 L 玻璃转瓶和 1000 ml 玻璃搅拌瓶培养细胞，成片后接种乙脑病毒。种毒后 48 小时开始每天收获一次，共收 5 次。以福尔马林制成灭活乙脑疫苗。

结 果

1 Vero 细胞传代乙脑病毒的滴度及免疫原性

每代毒种的毒力在收获的当时进行毒力滴定，灭活疫苗的效力也在灭活后立即测定；同时全部传代结束后再进行一次各代毒种的同批毒力滴定和同批效力试验。两种检定方式结果一致。表 1 列出的是同批毒力滴定和同批效力试验结果。各代毒种的毒力无明显变化，在 lg LD_{50} 6.33 至 7.33/0.04 ml 内波动；空斑实验结果显示同样的规律。PFU 值在 7.10/ml 至 7.50/ml 之间波动。然而，乙脑病毒 P_3 株在 Vero 细胞上传代后免疫原性有明显的下降，表现在灭活疫苗的 ID_{50} 值有明显有上升趋势。从 P_3V_1 至 P_3V_{10}，ID_{50} 值基本稳定在 0.000016 ml 至 0.000037 ml，P_3V_{20} 变化很大，为 0.0053 ml；至 P_3V_{27}，已高到 0.01 ml；现行乙脑灭活疫苗效力合格的标准为 0.00032 ml，因此，10 代以后的传代毒种已经无法用于制备疫苗。实验结果还表明，灭活后病毒的补结效价低于灭活前。

表 1 Vero 细胞传代乙脑病毒 P_3V_1-P_3V_{27} 的滴度和免疫原性

Table 1 Virus titre and immunogenicity in JEV propagated in Vero cells

传代代次 Passages No.	病毒滴度 Virus Titre		抗原含量 Antigen(CF)		疫苗效力 Efficacy
	LD_{50}/0.04ml	PFU/ml	Active	Inactive	ID_{50}(ml)
1	6.77	7.32	1:8	1:4	0.000024
5	6.33	7.10	1:8	1:4	0.000037
10	6.50	7.35	1:8	1:4	0.000016
20	7.33	7.45	1:4	1:2	0.0053
27	7.00	7.50	1:2	1:2	0.01
JE Vaccine on PHK Cell 地鼠肾细胞乙脑疫苗	6.77	7.20	1:2	1:2	0.00023

2 Vero 细胞乙脑病毒回传鼠脑后免疫原性的变化

表 1 结果显示出 Vero 细胞传代毒种 10 代以后免疫原性开始下降。能否通过鼠脑内回传培养恢复其免疫原性？结果显示回传的恢复作用是肯定的。回传试验开始是盲目的，因为不知在 Vero 细胞上传多少代后免疫原性开始下降。因此，一方面单纯在 Vero 细胞上连续传代，另一方面将细胞传代毒种第五代回传一次鼠脑后在 Vero 细胞上继续传代，总传代至 15 代再回传一次，将经过这样两次回传鼠脑的第 20 代与单纯细胞上传代的第 20 代进行比较：前者 ID_{50} 值为 0.0001 ml，用现行的疫苗效力标准是合格的；后者为 0.0053 ml，要达到前者的免疫效果免疫剂量需提高十几倍；显然，前者的免疫原性高于后者，即通过鼠脑内传代能提高细胞传代毒种的免疫原性。本试验经过重复，结果一致。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　四传鼠脑对 Vero 细胞传代毒种免疫原性的影响

Table 2　Immunogenicity of JEV propagated in Vero cell and alternated between in mouse brain and in Vero cell

Vero 细胞上连续传代 Propagated in Vero cell		鼠脑和 Vero 间交替传代 Alternated between in mouse brain and in Vero cell	
Passage No.	ID_{50}(ml)	Passage No.	ID_{50}(ml)
P_3V_1	0.000024	$V_5B_1V_1$	0.000017
P_3V_5	0.000043	$V_5B_1V_5$	0.000037
P_3V_{10}	0.00001	$V_5B_1V_{10}B_1V_5$	0.0001
P_3V_{20}	0.0053	$V_5B_1V_{10}B_1V_{15}$	0.00023
P_3V_{27}	>0.01	$V_5B_1V_{10}B_1V_{19}$	0.00081

3　细胞培养毒种和鼠脑毒种制备 Vero 细胞乙脑疫苗的比较

按现行地鼠肾细胞乙脑疫苗制备规程分别用 P_3V_{10} 和鼠脑毒种 3 代接种 15L 转瓶培养的 Vero 细胞,24 小时后洗换一次,48 小时开始收获,每 24 小时收一次,共收 5 次,合并,检定合并液的毒力和疫苗效价,结果见表 3。在病毒毒力方面,二者没有差别,然而,免疫原性差别较大,Vero 细胞毒种制备疫苗的效价比鼠脑毒种高近十倍,因而传代细胞毒种适合于制备疫苗。

表 3　细胞毒种与鼠脑毒种制备疫苗的比较

Table 3　The comparison of JEV between propagated in mouse brain and in Vero cell in producing inactivated JE vaccine

JE 病毒 Virus	滴度 Titre(ID_{50}/0.04ml)	疫苗效力 Potency(ID_{50}ml)
P_3V_{10}	6.77	0.000016
	7.00	0.000038
	7.50	0.00004
P_3	6.50	0.00032
	6.77	0.0001
	7.00	0.00023

4　用 Vero 细胞传代毒种在微载体系统制备乙脑灭活疫苗

乙脑病毒在 Vero 细胞上的生长曲线如图 1。Vero 细胞乙脑病毒在 Vero 细胞上繁殖高峰长达 4 天,因此采取每天收液、共收 5 次的方式制备疫苗。以 1L 玻璃搅拌瓶(Technic)在微载

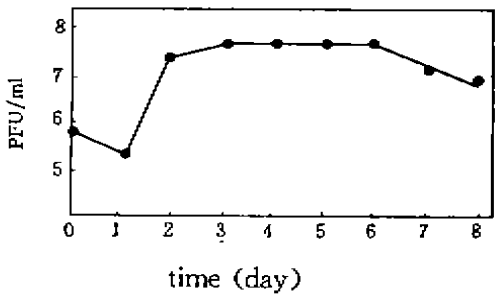

图 1　乙脑病毒在 Vero 细胞上的生长曲线

Fig1　The growth curve of JEV in Vero cell

维普资讯 http://www.cqvip.com

体上培养 Vero 细胞，种毒后可收 5 次，共收获病毒液 1500 ml。表 4 是众多批疫苗中的一批检定结果。Vero 细胞乙脑疫苗一次种毒收获五次，每批滴度都高于地鼠肾细胞乙脑疫苗只收一次的病毒滴度，而疫苗效力也可与地鼠肾细胞疫苗的效力相比。也就是说，同样的细胞量，Vero 细胞制备的疫苗是地鼠肾细胞制备疫苗的 5 倍，大大提高了疫苗的产量。再经过纯化，高质高产的疫苗便不难诞生了。

表 4 用 Vero 细胞传代毒种在微载体系统制备乙脑灭活疫苗

Table 4 Titre and potency of vaccine produced from Vero cell in microcarrer system with JE virus P_3V_{10}

收获时间 Harvest time (hr)	体积 Volume (ml)	病毒滴度 Virus titre (PFU/ml)	疫苗效力 Potency ID_{50}(ml)
48	300	7.5	—
72	300	7.21	—
96	300	7.21	—
120	300	8.01	—
144	300	7.63	—
总计 Total	1500	7.50	0.000057
地鼠肾细胞乙脑疫苗 JE vaccine on PHK cell*		7.20	0.000023

PHK: Primary Hamster Kindney

讨 论

乙脑病毒在鼠脑内传代虽然能保持稳定的免疫原性[4]，但是，直接使用感染鼠脑悬液为毒种制备疫苗，有可能使疫苗含有少量脑组织，而且鼠脑毒种有被鼠源病毒污染的可能。制备毒种过程或质量检定过程都很麻烦，无法适应工业化大模规制备疫苗的要求。

Vero 细胞传代乙脑病毒 10 代以内很稳定，而且在制备 Vero 细胞乙脑疫苗方面，10 代以内的细胞传代毒种的免疫原性略优于鼠脑毒种。Vero 细胞毒种可用微载体在发酵罐生产，并可进行全面检定。由于所用传代的细胞是经过各项检定的，因此可人为控制毒种的质量，保证其不受外源因子污染，这就确定了毒种的安全性和稳定性。

实验结果显示乙脑病毒在 Vero 细胞上传代，10 代以后免疫原性有明显的下降，至 B_3V_{27} 已有惊人的下降，本结果经过重复试验，仍显示出同样的规律。重新从鼠脑毒种开始传代，传至 27 代，再做滴度和免疫原性检测，结果与第一次一致。因此可以断定，本实验结果反映的是真实规律，此规律表明：务必以 10 代以内的传代毒种制备疫苗，10 代以后不宜用于制备灭活疫苗。

参 考 文 献

1 J C Petricciani. Cell, Science and Health, Develop Biol Standard, 1988;70:3—10

2 石慧颖，丁志芬，常振彦，等. 用 Vero 细胞制备流行性乙型脑炎灭活疫苗的研究. 科技资料汇编，卫生部北京生物制品研究所. 1988:96—99

3 中华人民共和国卫生部. 流行性乙型脑类疫苗制造及检定规程. 生产制品规程，1979:2—01

4 顾佩伟. 虫媒病毒及流行性乙型脑炎. 国家计划免疫讲习班文集，1982:146—148

维普资讯 http://www.cqvip.com

The Study on Adaptation of Japanese Encephalitis Virus in Vero Cells

Shi Huiying　Ding Zhifen　Chang Zhenyan

(*National Vaccine and Serum Institute, Beijing* 100024)

P_3 strain of Japanese Encephalitis (JE) virus was adapted in Vero cells for 27 passages. No significant changes were found on virus titre and CPE after adaptation, but the immunogenicity was getting weaker after 10 passages. The immunogenicity weakened could be recovered partially by repassaging the Vero-cells adapted virus in mouse brain. Less than 10 passages of adapted virus growing in Vero cells could be used as seed virus for production of JE vaccine instead of virus prepared from mouse brain. Using the adapted virus for vaccine production could be easier to avoid the contamination of extraneous agents compared with using the virus from mouse brain.

Key words　Japanese Encephalitis Virus, Adaptation of virus, Vero cells