

# 10 L转瓶培养与10层细胞工厂培养制备麻疹单次病毒收获液比较

张和平, 刘鑫娜, 李慧, 杨兆荣, 李玲洁, 王菲, 蒿张静, 公殿力

北京民海生物科技有限公司, 北京

收稿日期: 2021年9月23日; 录用日期: 2021年10月18日; 发布日期: 2021年10月25日

## 摘要

目的: 对10 L转瓶培养与10层细胞工厂培养制备麻疹单次病毒收获液进行比较, 评价两种生产工艺的优劣。方法: 将10 L转瓶培养与10层细胞工厂培养制备麻疹单次病毒收获液的每一步进行比较, 通过关键质量指标的病毒滴度来对其生产工艺进行评价。结果: 10 L转瓶培养和10层细胞工厂培养制备麻疹单次病毒收获液的病毒滴度分别为 $5.6 \lg \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $5.6 \lg \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 。结论: 10 L转瓶培养工艺和10层细胞工厂培养工艺均可以制备麻疹单次病毒收获液, 二者没有显著性差异。

## 关键词

麻疹单次病毒收获液, 转瓶, 细胞工厂, 病毒滴度, 培养工艺

# Comparison of 10 L Spinner Bottle Cell Culture and 10 Layer Cell Factory Cell Culture in Preparing Measles Virus Single Harvest Fluid

Heping Zhang, Xinna Liu, Hui Li, Zhaorong Yang, Lingjie Li, Fei Wang, Zhangjing Hao, Dianli Gong

Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing

Received: Sep. 23<sup>rd</sup>, 2021; accepted: Oct. 18<sup>th</sup>, 2021; published: Oct. 25<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** The objective is to compare the advantages and shortages between 10 L spinner bottle

**文章引用:** 张和平, 刘鑫娜, 李慧, 杨兆荣, 李玲洁, 王菲, 蒿张静, 公殿力. 10 L转瓶培养与10层细胞工厂培养制备麻疹单次病毒收获液比较[J]. 生物医学, 2021, 11(4): 241-246. DOI: 10.12677/hjbm.2021.114031

cell culture and 10 layer cell factory cell culture in preparing measles virus single harvest fluid process. Methods: In each step, the two processes were assessed by viral titer, a Critical Quality Attribute (CQA) in measles virus harvest production. Results: The viral titer results of 10 L spinner bottle cell culture process and 10 layer cell factory cell culture process are 5.6 lgCCID<sub>50</sub>/mL and 5.6 lgCCID<sub>50</sub>/mL respectively. Conclusion: The measles virus single harvest fluid could be prepared by both spinner bottle cell culture and 10 layer cell factory cell culture, but there was no significant difference between them.

## Keywords

Measles Virus Single Harvest Fluid, Spinner Bottle, Cell Factory, Virus Titer, Cultivation Process

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

麻疹单次病毒收获液用于制备麻疹减毒活疫苗或含麻疹成分的联合减毒活疫苗。转瓶和细胞工厂均可以制备麻疹单次病毒收获液[1] [2]。麻疹单次病毒收获液是将麻疹病毒接种鸡胚细胞,经培养,加入稳定剂收获的病毒液。麻疹病毒在鸡胚细胞中繁殖,培养鸡胚细胞的容器既可以是转瓶,又可以是细胞工厂,这样就形成了转瓶培养工艺和细胞工厂培养工艺。转瓶培养工艺是将鸡胚细胞悬液及麻疹病毒接种到不同体积(常用体积为 10 L、15 L)的刻度血清瓶中,再将刻度血清瓶放置转瓶机上,于适宜温度下进行培养。刻度血清瓶随着转瓶机的运行而旋转,因此,称为转瓶,鸡胚细胞就贴到瓶壁上生长。细胞工厂是一个长方体中分为不同层数(常用层数为 10 层、40 层)的细胞培养容器,因其在较小的容器内,可以培养较大面积的细胞,而将其称作细胞工厂。细胞工厂培养工艺是将鸡胚细胞悬液及麻疹病毒接种到不同层数的细胞工厂中,放置到适宜温度下进行静止培养,鸡胚细胞贴到向上的面上生长。本文就 10 L 转瓶和 10 层细胞工厂制备麻疹单次病毒收获液比较,作一报道。

## 2. 材料及方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. SPF 鸡胚

购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。

#### 2.1.2. 毒种

麻疹病毒长-47 株,工作种子批为 35 代,原始种子来源于长春生物制品研究所。

#### 2.1.3. 培养液

2.5% 新生牛血清 0.2% 水解乳蛋白 Earle's 液, NaHCO<sub>3</sub> 调至适宜 pH 值。新生牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。水解乳蛋白购自 Thermo Fisher 公司。Earle's 平衡盐购自上海源培生物科技股份有限公司。NaHCO<sub>3</sub> 购自自贡鸿鹤制药有限责任公司。

#### 2.1.4. 维持液

199 培养基, NaHCO<sub>3</sub> 调至适宜 pH 值。199 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司。

### 2.1.5. 培养瓶

10 L 转瓶细胞培养面积为 2130 cm<sup>2</sup>。10 L 刻度血清瓶购自四川蜀玻集团有限责任公司。

### 2.1.6. 细胞工厂

10 层细胞工厂细胞培养面积为 6360 cm<sup>2</sup>。10 层细胞工厂购自康宁公司。

## 2.2. 方法

麻疹单次病毒收获液制备分为鸡胚孵化、鸡胚细胞制备及种毒、换液、洗换、冷释放、单次病毒收获液收获等步骤。两种生产工艺的鸡胚孵化步骤是相同的，因此，下面就其他步骤进行比较。

### 2.2.1. 鸡胚细胞制备及种毒

选用 9~11 日龄来自 SPF 鸡群的鸡胚蛋，经消毒后，无菌条件取出鸡胚，放至平皿中。去除鸡胚头部及内脏，加入细胞洗液洗涤鸡胚，将鸡胚剪成碎块，加入胰酶 37℃ 水浴消化。加入 0.2% 水解乳蛋白 Earle's 液洗涤组织块，吹打分散细胞，加入培养液制备细胞悬液。将麻疹病毒长-47 株毒种加入细胞悬液中，混合均匀，分装至 10 L 转瓶或 10 层细胞工厂，1500 mL/转瓶，2000 mL/细胞工厂，放置 33℃ ± 1℃ 培养。

### 2.2.2. 换液

病毒培养 3 天，换入新的培养液，2000 mL/转瓶，2000 mL/细胞工厂，继续培养。

### 2.2.3. 洗换

转瓶病毒培养 5 天，用 Earle's 液洗涤细胞面，换入维持液，3000 mL/转瓶。细胞工厂病毒培养 6 天，用 Earle's 液洗涤细胞面，换入维持液，2000 mL/细胞工厂。洗换后，继续培养。

### 2.2.4. 冷释放

洗换后，细胞病变达到 50% 以上，放入 2℃~8℃ 冷库进行冷释放。

### 2.2.5. 单次病毒收获液收获

冷释放 5 天，破碎细胞，加入稳定剂，混合均匀，取样，进行无菌检查、支原体检查、病毒滴定。

### 2.2.6. 麻疹单次病毒收获液病毒滴定

采用微量细胞病变法[3]。

### 2.2.7. 无菌检查、支原体检查

采用《中国药典》三部 2020 年版方法。

### 2.2.8. 统计学方法

资料的统计分析由 Excel 统计软件完成。

## 3. 结果

### 3.1. 鸡胚细胞制备及种毒

10 L 转瓶每瓶使用鸡胚 8~9 枚，10 层细胞工厂使用鸡胚 16~18 枚。细胞工厂使用鸡胚量是转瓶的 1 倍，制备相同批量(转瓶与细胞工厂个数相同)的麻疹单次病毒收获液使用细胞工厂所用鸡胚数是转瓶的 1 倍，因此，制备鸡胚细胞所需时间和人数均高于转瓶的。转瓶和细胞工厂使用培养液量不同，细胞工厂的高于转瓶的，1500 mL/转瓶，2000 mL/细胞工厂。

### 3.2. 换液

转瓶和细胞工厂换液量相同，每个均为 2000 mL，因此，相同批量的换液所需人数、时间、液量均相同。

### 3.3. 洗换

转瓶病毒培养 5 天，就可以达到洗换要求，即出现 25% 以上细胞病变。用 Earle's 液洗涤细胞面，2000 mL/瓶/次，洗 2 次，每瓶总液量为 4000 mL。洗换后换入维持液，3000 mL/瓶。细胞工厂病毒培养 6 天，才能达到洗换要求，即出现 25% 以上细胞病变。用 Earle's 液洗涤细胞面，4500 mL/细胞工厂/次，洗 3 次，每细胞工厂总液量为 13,500 mL。洗换后换入维持液，2000 mL/细胞工厂。细胞工厂洗换 Earle's 液量、时间均高于转瓶的，而维持液量却低于转瓶的。

### 3.4. 冷释放

洗换后 1 天均可以收冷，进行冷释放，冷释放时间相同。

### 3.5. 单次病毒收获液收获

单次病毒收获液收获操作步骤相同。单次病毒收获液无菌检查、支原体检查均符合要求。相同个数的转瓶与细胞工厂收获的单次病毒收获液液量，转瓶的多于细胞工厂 50%。10 L 转瓶细胞培养面积为 2130 cm<sup>2</sup>，10 层细胞工厂细胞培养面积为 6360 cm<sup>2</sup>，细胞工厂的培养面积是转瓶的将近 3 倍，两者的病毒滴度分别为 5.6 lgCCID<sub>50</sub>/mL、5.6 lgCCID<sub>50</sub>/mL，结果“见表 1”。经统计学分析，没有显著性差异，因此，转瓶与细胞工厂制备的单次病毒收获液病毒滴度相同。

**Table 1.** Statistics of single virus harvest fluid

**表 1.** 单次病毒收获液统计

批次	转瓶制备 (lgCCID <sub>50</sub> /mL)	细胞工厂制备 (lgCCID <sub>50</sub> /mL)	无菌检查	支原体检查
1	5.2	5.2	-	-
2	5.2	5.6	-	-
3	5.4	5.6	-	-
4	6.4	5.5	-	-
5	5.9	6.2	-	-
6	6.1	5.6	-	-
7	5.7	5.7	-	-
8	5.7	5.6	-	-
9	5.6	5.7	-	-
10	5.8	5.6	-	-
11	5.6	5.6	-	-
12	5.7	5.6	-	-
13	5.6	5.6	-	-
14	5.7	5.5	-	-
15	5.5	5.6	-	-
16	5.8	5.7	-	-

Continued

17	5.6	5.6	-	-
18	5.8	5.7	-	-
19	5.6	5.6	-	-
20	5.4	5.6	-	-
21	5.1		-	-
22	5.1		-	-
23	5.4		-	-
24	5.7		-	-
平均	5.6 ± 0.3	5.6 ± 0.2		

#### 4. 讨论

10 L 转瓶制备麻疹单次病毒收获液是传统的方法, 已经使用多年, 在特定时期制备出合格的麻疹单次病毒收获液, 配制出合格的麻疹减毒活疫苗或含麻疹成分的联合减毒活疫苗, 为计划免疫做出了应有的贡献。细胞工厂制备病毒性疫苗有一些应用, 主要用于甲肝疫苗、水痘疫苗等[4] [5], 制备麻疹单次病毒收获液应用较少。虽然制备甲肝疫苗、水痘疫苗具有一定的优越性, 但是制备麻疹疫苗(麻疹单次病毒收获液)却没有优越性。制备麻疹单次病毒收获液使用鸡胚原代细胞, 制备细胞时是将鸡胚无菌从鸡胚蛋中取出, 经去头、内脏, 剪碎, 胰酶消化, 分散细胞等步骤, 暴露时间较长, 因此, 制备细胞时所用时间越短越好, 可以更好保证无菌要求。制备相同数量的麻疹单次病毒收获液, 细胞工厂使用鸡胚量是 10 L 转瓶的 1 倍, 所用时间明显高于 10 L 转瓶, 不利于操作过程的无菌保证。

洗换步骤, 细胞工厂洗换时间比转瓶晚 1 天, 就是出现细胞病变的时间较晚。洗换是洗去牛血清白蛋白, 避免发生过敏反应, 涉及到疫苗的安全性, 牛血清白蛋白含量越低, 安全性越好。洗换所用的洗液量细胞工厂明显多于转瓶的, 即相同洗液量洗换去除牛血清白蛋白的效果不如转瓶的, 需要更多的洗液量才能到达相同的效果, 因此, 转瓶制备的麻疹单次病毒收获液牛血清白蛋白含量更低, 安全性更好。

鸡胚细胞贴壁不牢, 不如传代细胞贴壁牢靠, 加大洗液量可以将细胞从贴壁面上洗掉, 从而影响病毒滴度。

洗换后换入的维持液量细胞工厂明显低于转瓶的, 细胞工厂单产为 111 mL/胚, 转瓶为 333 mL/胚, 后者是前者的 3 倍, 并且病毒滴度没有差异。10 L 瓶还可以静止培养, 静止培养每瓶只使用最多 3 个鸡胚, 换入维持液也是 3000 mL, 这样算下来, 单产将更高, 为 1000 mL/胚, 所用鸡胚数量更少, 制备细胞悬液时间更短, 并且病毒滴度可以做到没有差异。

每个 10 L 转瓶细胞培养面积为 2130 cm<sup>2</sup>, 每个 10 层细胞工厂细胞培养面积为 6360 cm<sup>2</sup>, 细胞工厂的培养面积是转瓶的将近 3 倍, 但是, 两者单次病毒收获液病毒滴度却没有差异, 因此, 麻疹单次病毒收获液病毒滴度与细胞面积不是线性关系, 不是培养面积越大, 病毒滴度越高。对于有些病毒, 病毒滴度与培养面积是线性关系, 例如狂犬病毒, 需要用反应器培养, 增加细胞培养面积, 可以提高病毒滴度。对于麻疹病毒, 较小的培养面积可以制备出较高的病毒滴度, 以上结果就是最好的例证。对于麻疹病毒, 最佳的培养面积有待于进一步研究。

细胞工厂通过管路连接可以做到密闭操作, 10 L 转瓶或 10 L 静止培养通过改造连接系统, 同样可以做到密闭操作。第二步操作, 即鸡胚细胞悬液的制备, 两种工艺都做不到密闭操作。

细胞工厂为一次性使用, 废弃的细胞工厂需要处理, 是固体废弃物, 不利于环保。转瓶为玻璃材质, 可以循环使用, 大大降低处理的费用和难度, 非常利于环保。

综上所述，细胞工厂制备麻疹单次病毒收获液，没有优势。虽然细胞工厂在甲肝疫苗、水痘疫苗等制备上取得非常好的效果，但是，并不是所有的疫苗都适用，具体疫苗需要具体分析，不是所有的传统方法都已过时了，只要加以改进，同样可以制备出合格、更加安全的疫苗。

### 参考文献

- [1] 徐文青, 陈列胜, 朵煜涛, 等. 麻疹疫苗转瓶培养多次收液生产工艺的探索[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(1): 35-37.
- [2] 闫磊, 李海燕, 赵海波, 等. 麻疹减毒活疫苗细胞工厂多次收获工艺探索[J]. 国际生物制品学杂志, 2021, 44(2): 79-82.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 171.
- [4] 周妍, 王云霞, 仲宇航, 等. 细胞工厂制备冻干甲型肝炎减毒活疫苗的研究[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(8): 595-597.
- [5] 王亮, 杨月莲, 周锋, 等. 细胞工厂在水痘疫苗生产中的应用[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(10): 1178-1181.