

# 應用聚酯纖維載體培養融合瘤細胞株

李文榮\*、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

## 摘要

現今世界潮流由於動物福祉的意識盛行，以老鼠腹水生產單株抗體的方法並不適合量化生產，對於有大量抗體需求的領域而言，已有許多替代性的方法可供應用。例如以中空纖維(Hollow-fiber)之生物反應器、透析膜(Dialysis membrane)培養瓶製造單株抗體時，分別可以達到 0.2~0.3 mg/mL；0.1~1.5 mg/mL 抗體濃度，相較於必須不斷繼代培養且分泌抗體濃度僅 20  $\mu$ g/mL 的角瓶培養，顯然效能更佳。本試驗以 6 公克聚酯纖維載體(Polyester fabric carrier)於 500 mL 吊籃式旋轉瓶進行融合瘤細胞株培養，接種細胞濃度為  $1 \times 10^5$  cells/mL，接種量 430 mL。培養期間分別於第 5、6、7、8 日以批次式(Batch)各換液約二分之一。自第 9 日起，採灌注式饋料(Perfusion feed)再繼續培養 5 日後終止實驗，共收集約 4 公升培養液。以酵素連結免疫分析法(ELISA)檢測分泌抗體濃度，並與角瓶培養法培養三日以上培養液作對照。各階段收集液抗體反應強度為對照組之 2~4 倍；總產能大於使用 160 支 T<sub>175</sub> 角瓶每瓶 50 mL 進行培養後所獲得 8 公升培養液抗體含量。本試驗細胞株乃分讓而來，無製備所需抗原，因此未定量抗體濃度，惟聚酯纖維載體類似中空纖維，具有高單位體積之表面積比(Surface area/volume ratio)150  $\text{cm}^{-1}$ ，依結果顯示適合高細胞密度大量培養單融合瘤細胞株。

**關鍵詞：**不織布聚酯纖維載體；吊籃式培養瓶；融合瘤細胞

## 緒言

應用融合瘤細胞株製備單株抗體 (Monoclonal antibody) 的技術，由 Milstein 和 Kohler[5]於 1975 年首次發表後，發展至今已三十年，在免疫學範疇內已屬常規技術，在其他生命科學領域內的應用也更趨廣泛，目前已不局限在基礎科學研究和生醫檢驗領域範圍內，更有直接臨床治療學上的使用價值。

以塑膠角瓶(T-flask)靜置培養融合瘤細胞所產生的單株抗體量至多僅 20  $\mu$ g/mL[3]，遠低於將融合瘤細胞接種 BALB/C 小鼠腹腔內形成腹水可達 20 mg/mL 單株抗體量之產量[4]，兩者相差懸殊。因此，

目前仍以接種小鼠產生腹水為主要通用方法，以獲得大量高效價單株抗體。但此法需飼養動物，週期長，不適合工業化生產；若使用免疫缺陷性小鼠，更需配合「無特殊病原菌動物房」飼養，作業繁瑣。然而，最主要問題仍源自社會大眾對腹水小鼠承受、飼養及處理[1,3,4]。我國於 1998 年 11 月 4 日公佈「動物保護法」，行政院農業委員會於 2001 年 7 月 13 日發佈施行「動物實驗管理小組設置辦法」要求全國凡是利用動物進行實驗之醫院、藥廠、疫苗苦痛、緊迫的關注。

近二十多年來，世界各國為因應社會期待均普遍立法採用由研究機構自我監控管理機制，透過成立實

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

驗動物管理小組，來管理各機構對於實驗動物的使用製造廠、大專院校等機構，應於 2004 年 7 月 12 日以前依該辦法之規定，設置動物實驗管理小組，建立我國動物實驗管理制度。截至 2005 年 8 月底為止，已有 163 個機構依法成立動物實驗管理小組[1]，本所亦已於 2001 年 8 月 7 日成立動物實驗管理小組，督導相關動物實驗以合理且人性化之動物使用方式進行。

尋找有效的活體外動物細胞培養方法，除可以簡化抗體純化的過程與降低變異性，適合開發量產製程外；同時又可以替代或降低使用動物量，符合「實驗動物使用」的考量及「動物福祉」的課題[3,4]。

## 材料與方法

### 融合瘤細胞株：

係由本所黃金城博士分讓，抗家禽流行性感胃病毒蛋白之融合瘤細胞株。

### 培養基：

所有細胞均以 RPMI 1640(GIBCO)含 10 % 胎牛血清(GIBCO)於培養角瓶(T-flask)及吊籃式培養瓶(Spinner basket; CelliGen plus)培養。

此外，分別配製 3.5 g/L 葡萄糖水溶液及 3.5 mM 麩胺酸(Glutamine)水溶液，以 0.2  $\mu$  孔徑無菌濾膜過濾，於吊籃式旋轉瓶培養過程中視葡萄糖濃度變化監測結果添加調控。前述培養基均不含碳酸氫鈉及 Hepes。

### 不織布聚酯纖維(non-woven polyester fabric,NWPF)載體[2,7]：

本試驗採市售商品化聚酯纖維不織布載體 Fibra-Cel Disc(New Brunswick Scientific 產品)，為直徑 6 mm 圓片狀，含 50 % polyester 供細胞生長，另 50 % polypropylene 網狀結構作為結構支撐。其特性為不織布材質、表面經特別處理具生物相容性和親水性、90~94 % 多孔性、適用於充填床式生物反應器(Packing-Bed Bioreactor)、具有高 Surface/Volume 比(S/V ratio)等，且結構輕量化，每公克約 200 片纖維片，可提供 1200  $\text{cm}^2$  表面

積供細胞生長。使用時以 12 g/1L 濃度，裝載於吊籃式培養瓶內不銹鋼充填隔間內，經 121 $^{\circ}\text{C}$ ，20 分；溼熱滅菌後供培養使用。

### 吊籃式培養瓶(New Brunswick Scientific 產品)

如圖 1 所示，此款培養瓶體積為 500 mL。於瓶內有一不銹鋼反應槽，內部可充填 10 克不織布載體(Fibra-cel disc)，約佔 70 mL 體積；可提供 12,000  $\text{cm}^2$  培養面積。磁性攪拌子位於底部，配合攪拌器使用，形成培養基迴流。細胞接種初期，纖維片的網狀交織架構逐漸截留住攪拌環流中細胞，經貼附而後伸展並開始生長。循環路線由中央轉動軸的方向向上進入纖維片細胞層，流出後再回到培養瓶底部，形成一個氣體與養分的供應路線，可充分進行氣體及養分之混合交換。此外，內部通氣管可外接幫浦額外供氣。

### 灌流式供液裝置(Perfusion feeder device)：

於高細胞密度培養階段，採密閉系統灌注式培養，以微型蠕動幫浦(BelloFeeder-1000; Cescro 產品)將細胞培養瓶與培養基灌流瓶以矽膠管串聯，培養基輸出及回流體積一致，形成一封閉式迴路，培養瓶內培養基體積一定，養分維持於生長所需範圍以上，而代謝產物不因累積而太多。進行培養基再循環及灌流輔助時，計算單位時間內培養瓶與灌流瓶內總葡萄糖變化量，即葡萄糖利用速率(Glucose uptake rate, GUR)，調整灌注流速，以維持培養所需葡萄糖濃度。

當 GUR 達 8.0  $\text{mg}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot 500\text{ mL}^{-1}$  以上時，啟動灌注式饋料，流速 20 mL/hr；再經過 48 小時後，測得 GUR 約 15  $\text{mg}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot 500\text{ mL}^{-1}$ ，調整流速為 40 mL/hr。

### 細胞培養法：(如圖 2：實驗流程圖進行)

#### 角瓶培養方式

取新鮮繼代 48 小時內融合瘤細胞以培養基調整細胞濃度為  $1 \times 10^5$  cells. $\text{mL}^{-1}$  後，依  $2.4 \times 10^4$  cells. $\text{cm}^{-2}$  表面積接種密度[8]每支 6 mL 量，接種 16 支 T<sub>25</sub> 角瓶。置於 5 % CO<sub>2</sub>；37 $^{\circ}\text{C}$  飽和溼度培養箱開始培養，每隔 24 小時重覆取出 2 支角瓶供採樣測量葡萄糖濃度，並以 Trypan Blue 染色法計算

活細胞數及死細胞數。8 日後，以接種細胞後時間為橫軸，全細胞數及活細胞數為縱軸，作出細胞生長曲線圖。同時，以接種細胞後時間為橫軸，由葡萄糖濃度變化計算所得 GUR 數據為縱軸，作出 GUR 曲線圖。

### 吊籃式培養瓶 (Spinner Basket ; CelliGen plus)[2,8]培養方式

以與角瓶培養方式相同條件細胞液，接種 430 mL 至含 6 克不織布載體之吊籃式旋轉瓶內，使總體積量為 500 mL。整組系統置入 5 % CO<sub>2</sub>；37 °C 飽和溼度二氧化碳碳氧箱中，以 100 rpm 攪拌培養。培養期間依監測細胞生長代謝情形結果，包括細胞數及葡萄糖濃度變化，進行葡萄糖和麩胺酸添加以及培養基更換。實驗完成後，依監測所得數據作出生長曲線圖及 GUR 曲線圖。

操作設定包括速度設定、換液時機、換液方式：

速度設定：接種後培養的轉速為 100 rpm，當開始灌注式饋料時則調整為 150 rpm。

換液時機：培養前期，新鮮培養基經細胞消耗代謝後，葡萄糖濃度低於 50 mg/dl 時，累積之代謝產物可以批次饋料式 (Batch) 換液移除。當培養細胞密度增加，葡萄糖利用率高於 18 mg.hr<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> 時，則以灌注式饋料維持細胞生長。

換液方式：培養前期以批次式 (Batch) 換液 300 mL，每次換液二分之一。當細胞密度增加時，採灌注式饋料 (Perfusion feed)，灌流起始速度 20 mL.hr<sup>-1</sup>，依 GUR 值調整流速，上限為 40 mL.hr<sup>-1</sup>。

## 培養流程監控方法

### 細胞代謝分析：

培養基內葡萄糖濃度變化以測糖機 (GluCell, Cescor 產品) 監測。

葡萄糖濃度：葡萄糖是細胞生長主要碳源，亦與細胞附著有關。高密度細胞培養需補足其高消耗量，定時監控進行額外添加。

葡萄糖利用速率：培養過程中一段時間內細胞平均消耗葡萄糖的量。GUR 與細胞數目成正相關，其數值

可與生長曲線比較，以供製程調控參考。

### 細胞計數法：

#### Crystal Violet Dye (CVD)細胞核染色法[2, 7]

染劑為含 0.1 % 結晶紫之 0.1 M 檸檬酸溶液，可將細胞核紫染並游離出細胞外，以計算取樣之不織布載體上總細胞數，進而推算所有載體上細胞數。

首先，以無菌操作隨機取樣收集載體 (取 9 片 Fibracel)，平均分裝到 3 支 1.5 mL 小離心管，每管加入 0.6 mL 染劑作成三重覆。用試管振盪器震盪 2 分鐘，放入 37 °C 培養箱中作用 30 分鐘。然後，重覆前述步驟一次，使細胞完全溶解釋出細胞核。全程約 1 小時後，取樣以血球計算盤準備計算盤上 4 個中格 (1 mm × 1 mm) 之平均細胞核數，計算前需先以 PBS 稀釋到適當比例。

Fibracel Disc 載體上總細胞數計算方式：  
(Fibracel Disc 每 10 克大約是 2000 片載體)[9]

平均 1 中格細胞核數 × 稀釋倍數 × 10<sup>4</sup> ÷ 4 × 2000 片 = 總細胞數

#### Trypan blue 染色法

以 0.3 % Trypan blue 磷酸緩衝溶液與等量檢體混合，死細胞被染成藍色，可計算上清液內全細胞數及死細胞數。

首先，以無菌操作取培養上清液 0.3 mL 與 0.3 mL 染劑放入小離心管。經試管振盪器輕微震盪 1 分鐘後，取樣以血球計算盤準備計算盤上 4 個中格 (1 mm × 1 mm) 之染成藍色死細胞及全細胞平均數。

### 鏡檢形態觀察法：

#### Crystal Violet 染色法

0.5 % 結晶紫甲醇溶液染色五分鐘結晶紫染劑將不織布載體上細胞核染成紫色，可以光學顯微鏡直接觀察細胞生長及凋亡的比例情形。

首先，以無菌操作隨機取出載體數片，裝入 1.5 mL 小離心管。加 PBS 1.5 mL 以試管振盪器震盪 30 秒後，去除 PBS。共重覆 3 次，將未沾黏於纖維上的細胞沖洗掉。取出載體置以濾紙吸除多餘水份後，浸於結晶紫染液 5 分鐘。再用 RO 水沖洗至水澄清，保存於 PBS 中直接鏡檢。

### 抗體力價試驗：

以酵素連結免疫吸附法檢測培養上清液單株抗體力價，本試驗依黃金城博士製備之抗原及方法由其實驗室進行。陰性對照組為含 10 % 胎牛血清之 NS1 細胞株培養上清液，分別為原液、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  稀釋液。

## 結果

為了解融合瘤細胞株於不織布載體之生長性能，以角瓶為對照作比較，吊籃式培養瓶裝載 6 克 Fibra-cel Disc(可提供  $1200 \times 6 = 7200 \text{ cm}^2$ )，約相當 41 支  $T_{175}$  角瓶培養面積計算，依設定之培養條件，最高細胞密度  $6.95.0 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ ，共收集約 4 公升培養液。

### 融合瘤細胞株於不同培養方式之生長表現

#### 角瓶培養方式細胞增殖曲線與 GUR 之關係

融合瘤細胞接種於  $T_{25}$  角瓶後，經過 45 小時的遲滯期(Lag phase)即進入指數增殖期(Logarithmic growth phase)，約第 4 日後達穩定期(Stationary phase)。然後，細胞數目不變，但由 Trypan blue 染色法計數結果可見細胞逐漸死亡。圖 3 是以接種細胞後的時間為橫軸，取全細胞數和活細胞數為縱軸，得到的增殖曲線。

葡萄糖是細胞增殖時主要碳來源之一，細胞數目與細胞活力與葡萄糖利用率息息相關。以接種細胞後的時間為橫軸，GUR 為縱軸，結果發現 GUR 曲線與增殖曲線有直接關係(圖 4)。

#### 以聚酯纖維載體培養方式細胞數變化及 GUR 之關係(圖 5)

培養於吊籃式旋轉瓶 NWPF 載體上的細胞，採用 CVD 細胞核染色計算細胞數。以接種細胞後的時間為橫軸時，當細胞數為縱軸，得到增殖曲線；當 GUR 值為縱軸，得到 GUR 曲線。結果顯示增殖曲線雖然有隨著 GUR 起伏趨勢，但於培養初期三日及培養後期五日，細胞數有銳減情形(如圖 4 之 GUR 曲線前後二個波峰)。

#### 以聚酯纖維載體培養方式細胞數與培養基更換方式之關係(圖 6)

進行吊籃式培養方式時，分別於第 5、6、7、8 日以批次式(Batch)各換液約 300 mL，細胞數由  $2.0 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$  持續增加至  $6.95.0 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ 。第 9 日起，於 GUR 達  $8.0 \text{ mg.hr}^{-1}.500 \text{ mL}^{-1}$  以上時，採灌注式饋料(Perfusion feed)，流速 20 mL/hr。再經過 48 小時後，測得 GUR 約  $15 \text{ mg.hr}^{-1}.500 \text{ mL}^{-1}$ ；細胞數  $6.0 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ 。調整流速為 40 mL/hr，再繼續培養 3 日後終止實驗，細胞數  $3.62 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ ，共收集約 4 公升培養液。

#### 融合瘤細胞株於角瓶及聚酯纖維載體之生長性狀分析：(表 1)

細胞之增殖速度通常是以二倍時間(doubling time)來表示，二倍時間由下列公式求得 $[2,9]dx/dt = \mu x$  (t 是培養時間；x 是在時間 t 時的細胞密度； $\mu$  是特定生長速率 specific growth rate)

$\mu$  值計算公式：

$\ln(x/x_0) = \mu t$  ( $\ln$  是自然對數；x 是在時間 t 時的細胞密度； $x_0$  是接種細胞密度)

求出  $\mu$  值後，二倍時間  $t_d$  由下列公式算出：

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

生長速率試驗結果二倍時間如表 1，角瓶培養方式為 24 小時；聚酯纖維載體培養方式 68 小時。

#### 產生單株抗體濃度：

收集聚酯纖維載體培養法各階段上清液約 4 L，以酵素連結免疫分析法(ELISA)檢測其單株抗體濃度，並與角瓶培養法培養三日以上培養液作陽性對照。測試結果，陰性對照全無反應，陽性對照組稀釋 512 倍仍有陽性反應。聚酯纖維載體培養  $170^{\text{th}}$  及  $192^{\text{th}}$  小時上清液可稀釋 2048 倍，其他各階段收集液亦皆可稀釋 1024 倍仍有陽性反應，抗體反應強度為對照組之 2~4 倍(圖 7)，總產量大於 160 瓶  $T_{175}$  角瓶。

## 討論

依試驗之角瓶培養法結果，取全細胞數為縱軸時，可以得到典型的增殖曲線。由於角瓶培養是密閉系統，於不換液情形下，以活細胞數為縱軸時，增殖曲線不經穩定期(plateau) 直接由指數增殖期進入死滅期。此外，經由葡萄糖值計算出之 GUR 值，與 CVD 細胞核 DNA 染色法計算細胞數目之生長曲線相對應，GUR 值間接反映細胞生長情形，可作培養時立即監測。

以 NWPF 載體進行培養時，如同角瓶培養所見，細胞數隨 GUR 遞增而有漸增趨勢。至於培養初期三日(培養後 25<sup>th</sup>~68.5<sup>th</sup> 小時)及培養後期五日(培養後 236.5<sup>th</sup>~361.5<sup>th</sup> 小時)，細胞數銳減，未隨 GUR 曲線出現二個波峰情形，依照細胞數目與培養基更換方式的對應關係(圖 6)顯示：

第一個波峰消逝應是細胞適應系統期：接種後至 68.5<sup>th</sup> 小時，細胞被截留於纖維間開始增殖，未被截留者逐漸凋零。甚或未適應者或被截留後又脫落者亦逐漸死亡。因此，雖然 GUR 隨細胞增生而增加，但載體上的活細胞數並未增加。

第二個波峰消逝則導因於沖刷效應：培養後 145<sup>th</sup> 至 192<sup>th</sup> 小時間，每 24 小時每次 300 mL 以批次換液，細胞數及 GUR 皆遞增。培養後 219<sup>th</sup> 時改採灌流式饋料，起始速度每小時 20 mL，48 hr 後因 GUR 仍持續上升，改採每小時 40 mL。細胞於灌流開始後即不再增加，流速 40 mL/hr 時更有銳減情形。此外，計算換液時上清液內細胞數時(表 2)，發現以 40 mL/hr 開始灌流後，上清液中全細胞數目明顯增加，且大多為死細胞，印証增加灌流的速度會增高沖刷出細胞的可能性。

融合瘤細胞分泌單株抗體的濃度取決於細胞數與細胞活性。細胞生長性能可以經由測量一定時間內細胞增殖數目，測得細胞增殖兩倍時間(Doubling time)而評估，時間愈短表示生長愈快。以聚酯纖維載體培養的細胞增殖兩倍時間為 68 小時，耗時約為角瓶培養法 24 小時的 2.83 倍(表 1)，明顯遜於角瓶培養法，而且前者活細胞密度最高出現在  $6.95 \times 10^5$

cells.mL<sup>-1</sup>，不及後者之  $14.4 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>。然而，聚酯纖維載體培養法使用 500 mL 培養瓶，且採灌注式饋料時，若控制得宜活細胞密度可持續維持於  $6.0 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>，至於角瓶細胞則因靜置培養而逐漸凋零。此外，依酵素連結免疫分析法(ELISA)檢測分泌抗體反應強度結果，以聚酯纖維載體培養法所得者為角瓶培養法之 2 ~ 4 倍(圖 6)。另外，就 GUR 值而言，前者自灌流開始後即維持高於後者之 8.92 mg.hr<sup>-1</sup>.500 mL<sup>-1</sup> 並持續升高達最高值 19.37 mg.hr<sup>-1</sup>.500 mL<sup>-1</sup>。顯然前者細胞活性較佳，能分泌較多抗體。

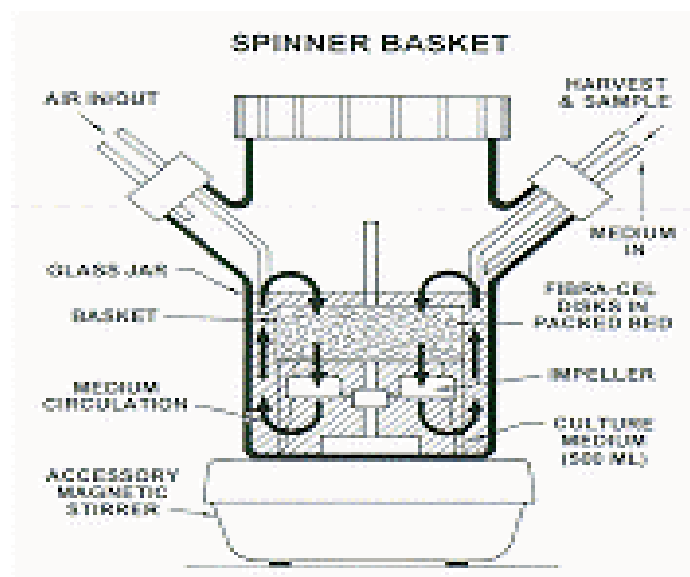
融合瘤細胞屬懸浮性細胞，不需貼附表面即可生長，但依培養於角瓶的經驗，細胞仍有沾黏表面的現象。本試驗之聚酯纖維載體乃裝載於吊籃式旋轉瓶培養，與一般旋轉瓶(Spinner)最大的不同點是吊籃式設計使培養的細胞被截留於籃內的載體上，而將細胞與磁性攪拌子區隔開，細胞不至於像旋轉瓶中的懸浮細胞直接與攪拌子接觸，細胞生長不受機械剪力影響。

非貼壁依附性(attachment-independent)細胞；如 sf-9，High-5 昆蟲細胞，以 NWPF 纖維載體培養時，主要於載體內纖維交錯處聚集成團增殖[7]。雖然懸浮性細胞無法以染色法確切表現其實際生長情形，但本試驗於鏡檢時仍可見融合瘤細胞被截留或沾黏於載體上細胞數隨培養時間而增多，高倍鏡檢時更可見細胞主要被截留於纖維交界處。

綜合以上結果顯示，不織布載體應用於生產單株抗體，相較於傳統角瓶培養，可以 2 倍濃度以上抗體持續分泌；培養環境若控制得宜，細胞則穩定生長不斷分泌等優勢。缺點則為其設備與載體相較於老鼠腹水生產法仍屬價昂。惟隨著科技日新月異，對於有大量單株抗體需求的領域而言，許多新穎的方法不但效能大幅提升且設備愈來愈便宜，以量制價之量化生產已使細胞培養方式與腹水生產方式間，價格差異快速消逝中[4]。由於融合瘤細胞具有生生不息之特性，一旦建立最適化條件，配合灌注式培養源源不絕的性能，應用於量化製程的開發將是一條可行且有效的途徑。

## 參考文獻

1. 李明峻。動物實驗的法律問題。台灣獸醫師第 2 期：77-82，2005。
2. Esin Aslankaraoğlu\*, S. İsmet Gürhan and Meneme Gumuderiolu. Anchorage-dependent and suspended baby hamster kidney cells on three dimensional non-woven polyester fabric discs :comparison of growth characteristics. Biotechnol. Appl. Biochem. 30, 65-71,1999.
3. Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. Monoclonal Antibody Production : A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies National Academy Press Washington, DC 1999.
4. John McArdle, Ph.D. Alternatives Research and Development Foundation Eden Prairie, Minnesota. Alternatives to Ascites Production of Monoclonal Antibodies. Animal Welfare Information Center Newsletter. 8,no.3-4, Winter 1997/1998.
5. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256,495-497, 1975 .
6. Laertis Ikonou, Jean-Christophe Drugmand, Georges Bastin, Yves-Jacques Schneider, and Spiros N. Agathos . Microcarrier Culture of Lepidopteran Cell Lines: Implications for Growth and Recombinant Protein Production. Biotechnol. Prog. 18, 1345-1355, 2002.
7. Meneme, Gümüdereliolu, Esin Aslankaraoğlu and S. İsmet Gürhan. Rabies virus production in non-woven polyester fabric (NWPF) packed-bed reactors. Biotechnol. Appl. Biochem. 33, 167-172, 2001.
8. Naghmeh Golmakany, Mohammad Javad Rasaee, Mehdi Furouzandeh, Seyed Abbas Shojaosadati, Soheila Kashanian and Kobra Omidfar. Continuous production of monoclonal antibody in a packed-bed bioreactor. Biotechnol. Appl. Biochem. 41, 273-278, 2005.
9. Sherley, J. L., P. B. Stadler, and J. S. Stadler. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. Cell Proliferation 28:137-144 ,1995.



From New Brunswick Scientific Co., Inc website

圖 1 吊籃式旋轉瓶培養示意圖

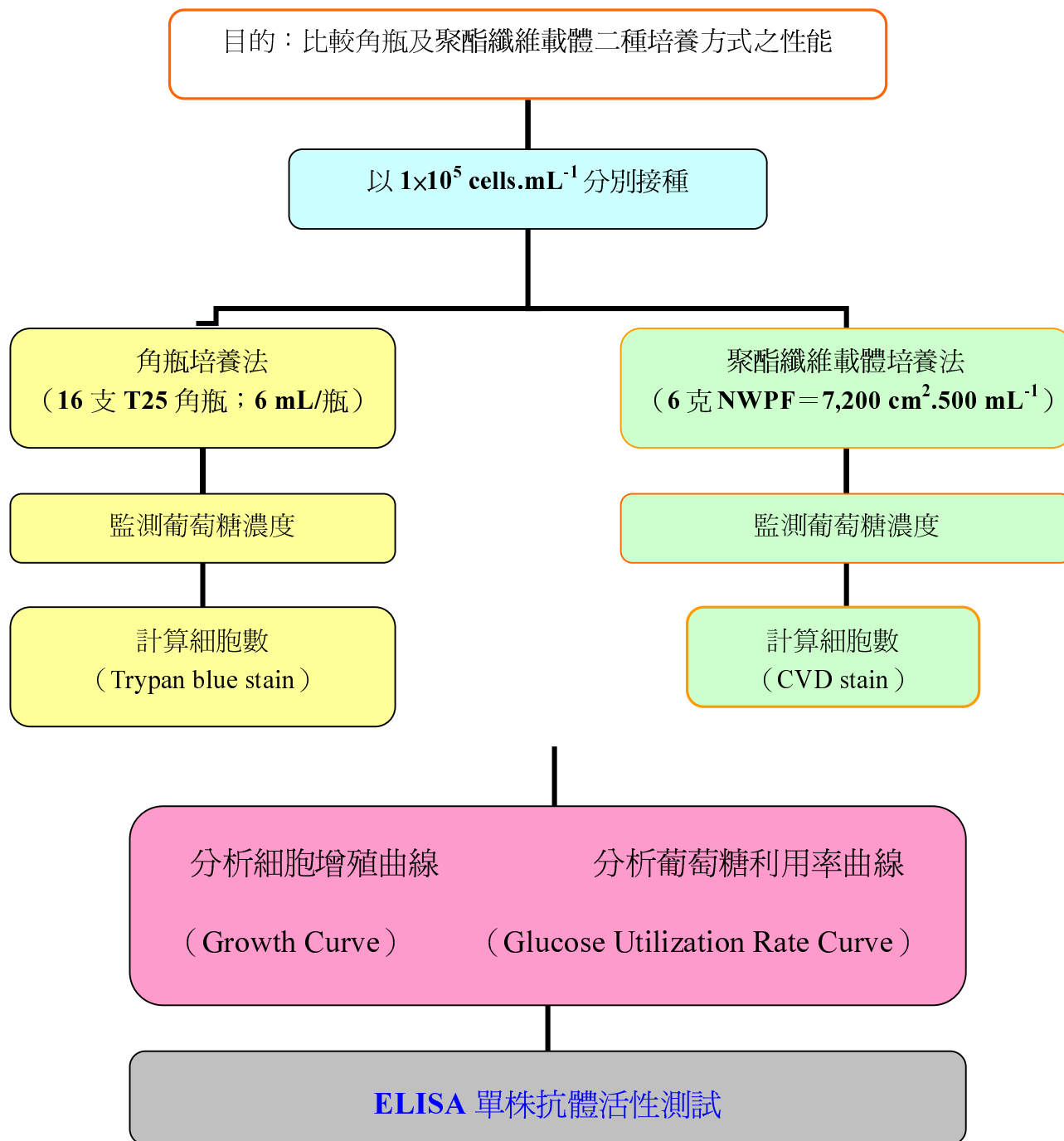


圖 2 實驗流程圖

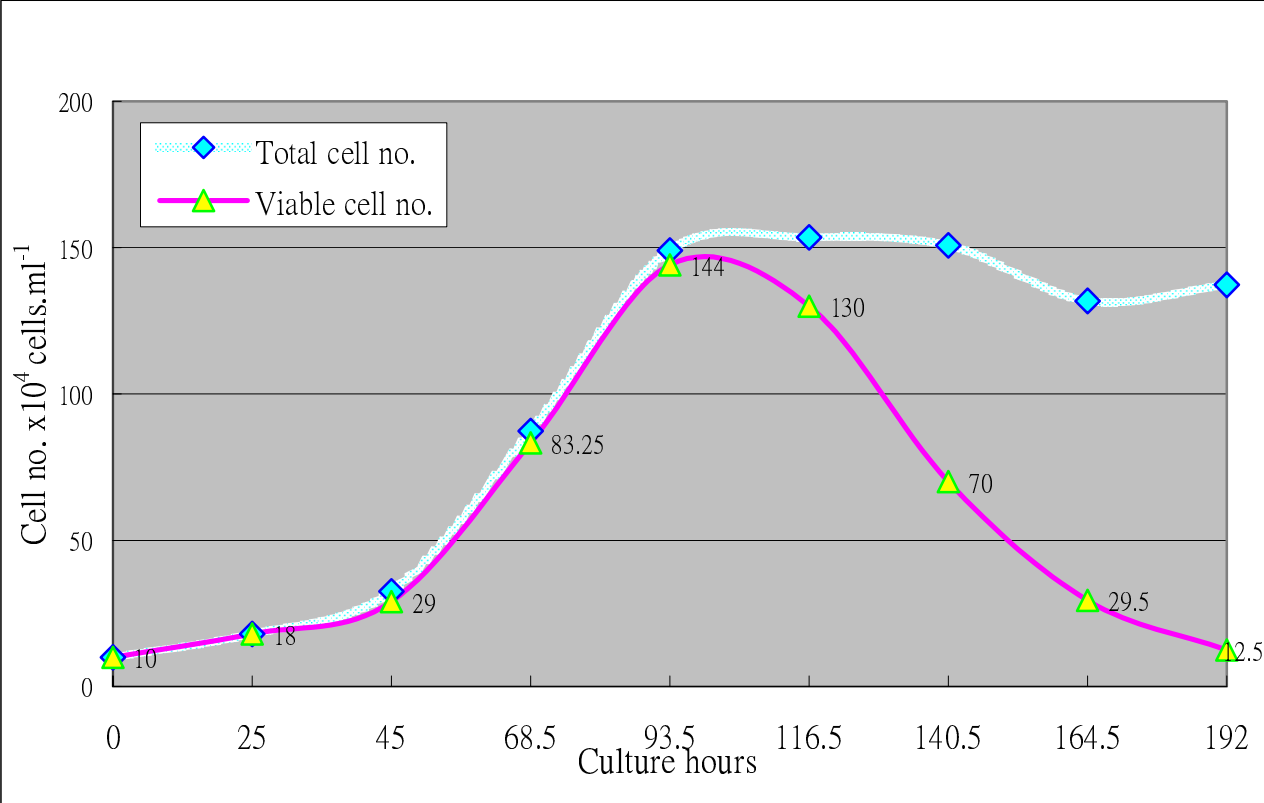


圖 3 融合瘤細胞以角瓶培養，所表現之細胞增殖曲線

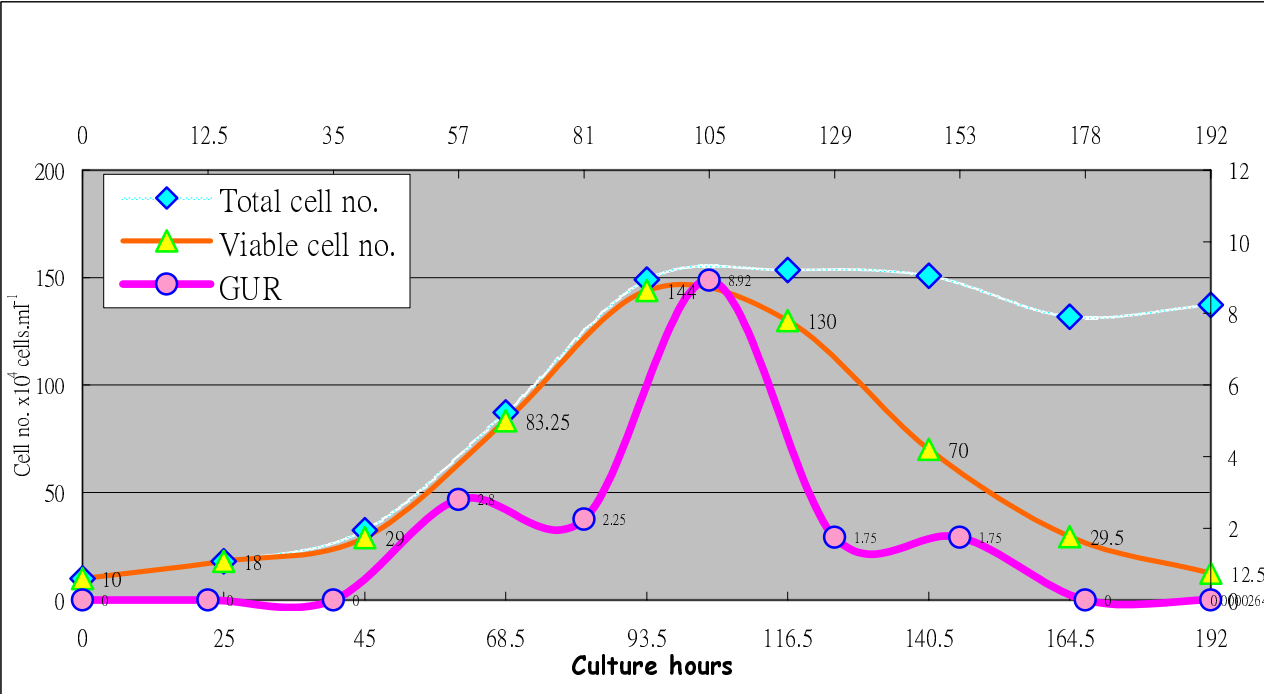


圖 4 以角瓶培養融合瘤細胞，其細胞增殖曲線與 GUR 曲線之關係

應用聚酯纖維載體培養融合瘤細胞株

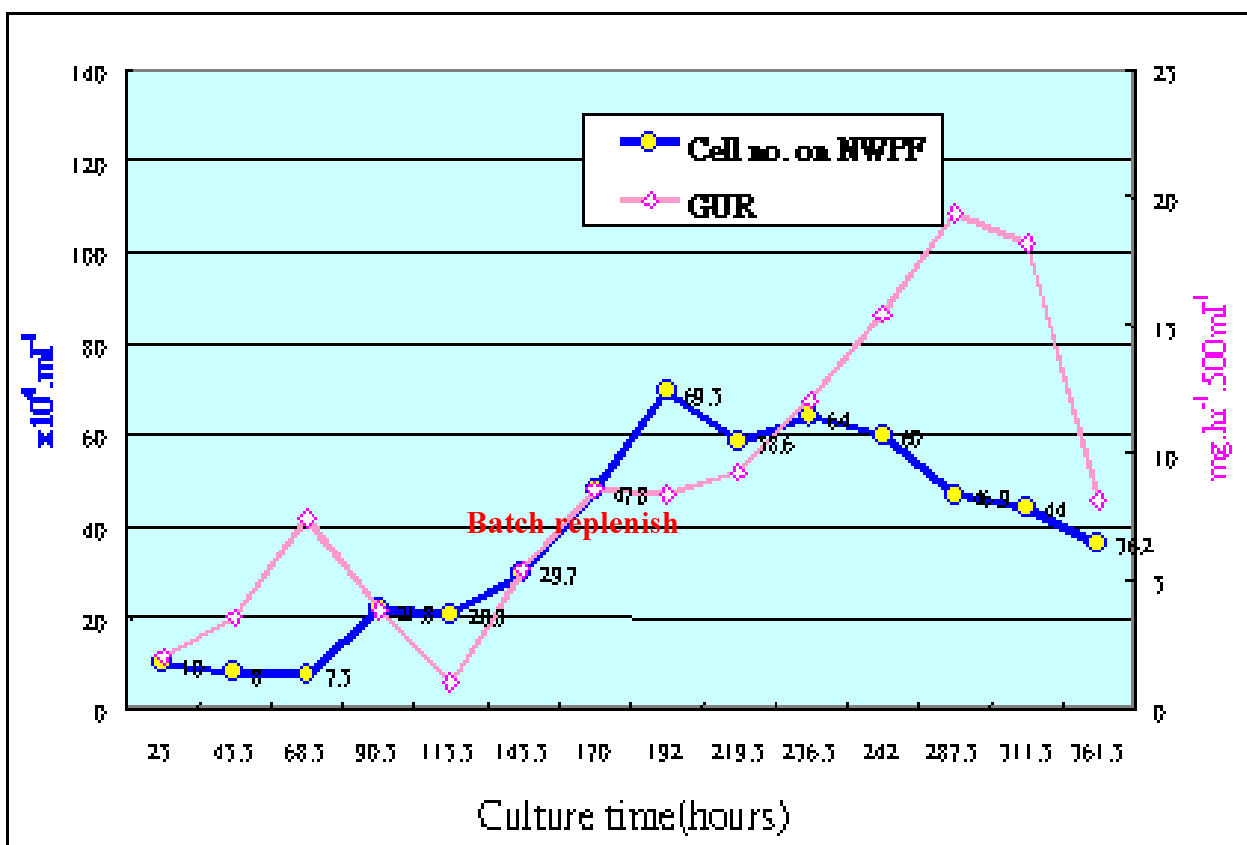


圖 5 以聚酯纖維載體培養融合瘤細胞，其細胞數目變化與 GUR 之關係

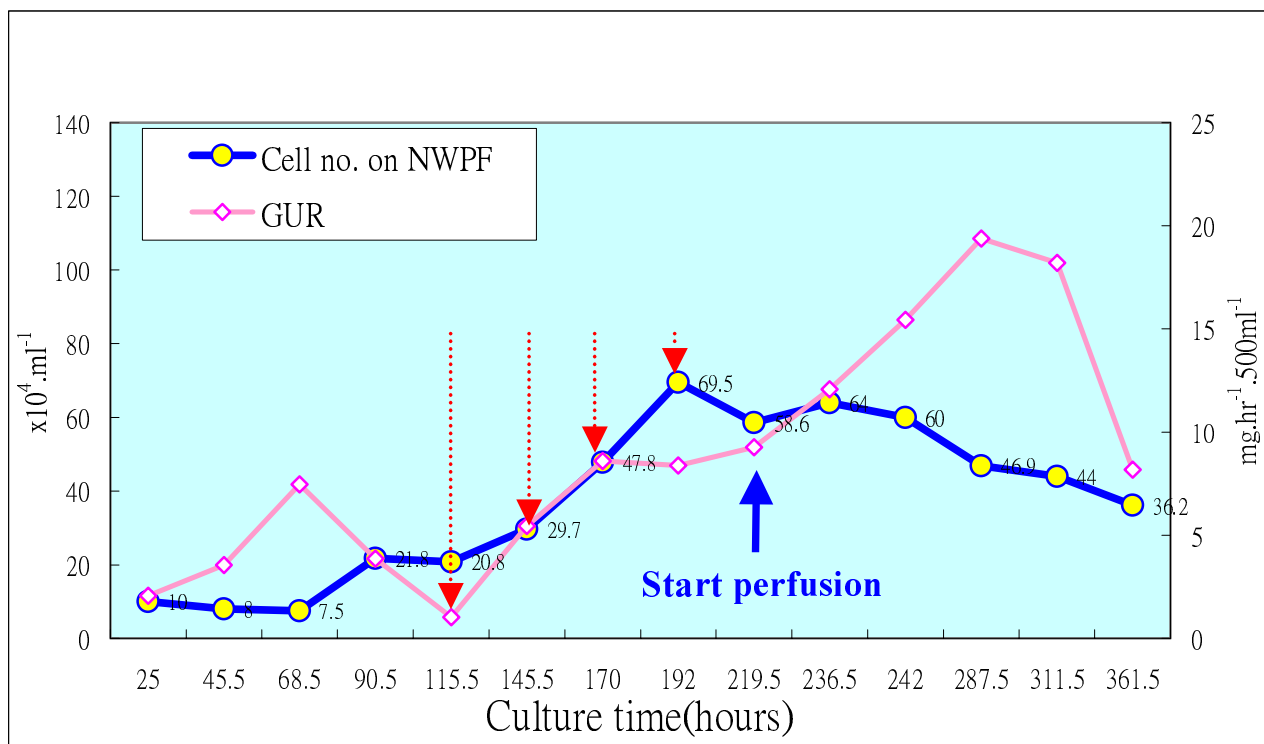


圖 6 以聚酯纖維載體培養融合瘤細胞，其培養基更換方式與細胞數目變化之關係

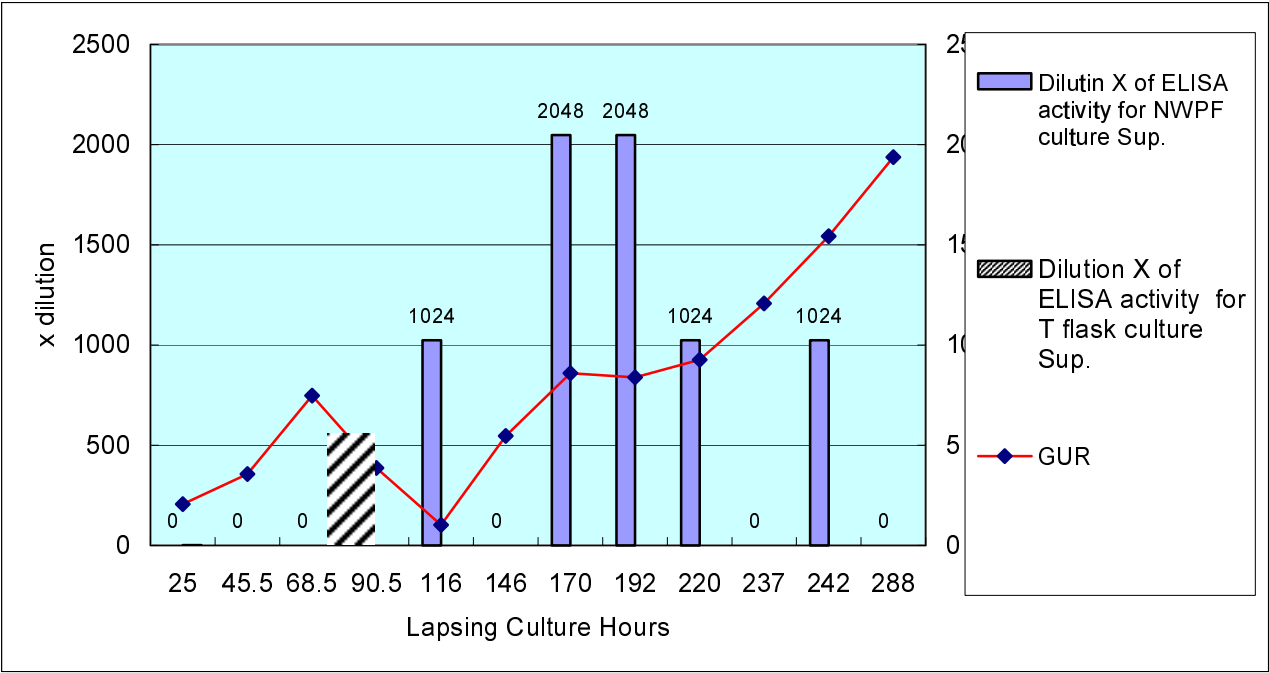


圖 7 聚酯纖維載體培養融合瘤細胞之上清液單株抗體活性

表 1 融合瘤細胞株於角瓶及聚酯纖維載體之增殖速度以二倍時間(doubling time)來表示，時間愈短生長愈快。

Culture type	Time (hrs)	$10^{-4} \times$ Inoculation cell density (cells·mL <sup>-1</sup> ) ( $X_0$ )	$10^{-4} \times$ Final cell density (cells·mL <sup>-1</sup> ) ( $X_{max}$ )	<b>Doubling time</b> (hr)	Specific growth, $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
T-flask	117	10	147	24	0.693
NWPF	192	10	69.5	68	0,242

表 2 融合瘤細胞株以聚酯纖維載體於含 10% 血清的 RPMI1640 中培養，換液時採樣計算培養上清液與載體上細胞數目值。

Culture Time (hrs)	0	1-144	145*	170*	192*	219**	236	242	287
NWPF cell no. $\times 10^{-4}$ (cells·mL <sup>-1</sup> )	0	ND	29.7	47.8	69.5	58.6	64	46.9	44
Supernatant Viable cell no. $\times 10^{-4}$ (cells·mL <sup>-1</sup> )	10	ND	10.5	18	15.8	12	ND	25.5	12
Supernatant dead cell no. $\times 10^{-4}$ (cells·mL <sup>-1</sup> )	0	ND	10	5	1.5	3	ND	41	10

\*145<sup>th</sup> 至 192<sup>th</sup> 小時間，約每 24 小時以批次換液一次。

\*\*219<sup>th</sup> 小時後改採灌流式饋料。

## Application of non-woven polyester fabric for cultivation of hybridoma cell line

Lee WJ\*, Huang CC

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

**Abstract** Monoclonal antibodies(Mabs). have been widely used in biological researches, medical diagnoses and therapies. The production of Mab from ascites by mouse can make a high yield ; however, the use of animals for large-scale production of Mab is restricted for the animal welfare concerns. In the current trend, many in vitro alternatives have been developed for Mab production. In this study the hybridoma cell culture was performed in a 500 mL spinner basket containing 6 g non-woven polyester fabric (NWPF) microcarrier. Cells for inoculum were prepared at density  $1 \times 10^5$  cell.mL<sup>-1</sup> of 430 mL culture medium. Cells were growing in batch culture until day 9 when the perfusion process was initiated. After 5 more days, culture was discontinued. During the 14 days culture period, four liters supernatant was harvested in total. ELISA was applied to evaluate the activity of secreting monoclonal antibody (Mab) from culture . According to the result, the Mab activity from spinner basket culture was 2-4 times higher than T-flask culture in control, and the Mab yield of operation was equivalent to 160 T175 flasks. Application of NWPF material could be a promising alternative to Mab production while optimal culture condition was established.

*Key words : Non-woven polyester fabric (NWPF) carrier ; Spinner basket flask ;  
Hybridoma cell*

---

\*Corresponding Author  
Animal Health Research Institute