冷凍乾燥(B.C.G.) 生産에 關한 研究(第1報)

大韓結核協會 細菌病理部

申 鉉 五

Experimental study on production of Freeze Dried B.C.G. Vaccine in Korea

Huyn Oh Shin

Dept. of bacteriology and pathology, The Institute of Tuberculosis, KNTA

Author prepared 30 lots of Freeze dried B.C.G. Vaccine with using Stokes Freeze dryer.

The vaccine was dried for 24 hours in a vacuum of 200 micron at 25°C, after few hours initial freezing at -40°C.

The number of viable count was determined by the quantitative culture on Löwenstein-Jensen medium.

The survival rate was 37% compared before freeze drying and the viable rate after 3 months storage at 5°C was 81% and 56% after 6 months.

In regard to the tuberculin conversion rate to schoolchildren, the freeze dried B.C.G. vaccine showed 66% comparing with the wet B.C.G. vaccine which showed 76%.

And the size of average induration by the freeze dried vaccine was a little smaller than that by the wet vaccine, the size of the vaccination lesion by the freeze dried B.C.G. vaccine was smaller than that of wet B.C.G. vaccine.

I. 結 論

液體 비·씨·지 백신은 熱에 對한 安定性이 不安定하여 그 生菌數가 急速히 減少됨으로서 有效期間이 짧으며 또한 檢定을 끝내기 前에 人體에 接種되는 等의 缺點을 갖고 있다. 乾燥 비·씨·지 백신은 이러한 液體 비씨지 백신의 短點이 補完된것으로 백신의 普及에 많은 도움을 주고있다.

著者は 現在 우리 나라에서 使用되고 있는 液體 비·씨·지 백신을 보다 優秀한 乾燥 비씨지 백신으로 代替하기 爲한 基礎實驗으로 다음과 같이 實驗하였기 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 實驗方法

1. 비씨지 백신의 製造

本實驗에서 使用한 菌株은 1173 P2이며 通常의 方法으로 Sauton Potato Media를 거쳐 Sauton Media에서 增菌培養된 後 다시 Sauton Media에 7~9日間生産培養된 菌膜을 採集하여 1/4 濃度로 稀釋한 Sauton Media로 最終濃度를 1 mg/ml가 되도록 稀釋하였다.

다만 乾燥用인 백신은 稀釋液으로 1%의 Sodium Glutamate 溶液¹⁾을 使用하여 最終濃度를 20mg/ml가 되도록 稀釋하였다.

2. 비씨지 백신의 乾燥^{2) 3)}

乾燥用 비씨지 백신을 0.5ml 씩 乾燥用 앰플에 分注하여 零下 40°C까지 徐徐히 凍結시킨후 冷凍乾燥機(STOKE, Model 1003-P-2)의 乾燥棚에 옮기고 即時減壓을 始作하였다.

乾燥機內의 眞空이 500μHg에 이르렀을 때 乾燥機의 溫度를 올리기 始作하여 乾燥棚의 溫度를 25°C, 乾燥機內의 眞空을 100~200μHg로 維持하면서 24時間 乾燥하였다. 乾燥後에는 앰플을 Manifold에 連結하여 100~200μHg의 眞空下에서 熔封하였다.

3. 비·씨·지. 백신의 檢定

위와 같이 製造한 비·씨·지. 백신을 無菌試驗, 安全試驗, 力價試驗 等 生物學的製劑基準^{4) 5)}에 依한 檢定을 實施하였다.

특히 乾燥 백신의 力價試驗은 다음과 같은 試驗을 重點으로 實施하였다.

가) 乾燥前後의 生菌數比較^{6,7)}

乾燥直前の 백신과 乾燥直後の 生理食鹽水에 再浮遊시킨 백신을 一定濃度까지 稀釋하여 Lowenstein-Jensen Media에 0.1ml씩 移植하여 培養하여 6週後에 生成한 集落을 세어 每 ml 當의 菌數로 換算하였다.

나) 保存期間 및 保存溫度에 따른 生菌數의 變化

乾燥된 백신을 3分하여 冷蔵庫, 室温 및 孵卵器에 各 保管하면서 1 個月, 3 個月, 6 個月 後에 生理食鹽水로 再浮遊시켜 一定濃度까지 稀釋하여 Lowenstein-Jensen Media에 培養하여 6 週後에 生成하는 集落을 세어 每 ml 當의 菌數로 換算하였다.

4. 動物試驗 및 人體試驗⁸⁾

實驗製造한 乾燥 백신과 液體 백신을 다음과 같이 實驗動物과 人體에 接種하여 其效果를 比較하였다.

여기에서 使用한 乾燥 백신은 製造後 3 個月間 冷蔵庫에 保管한 것으로 使用前에 生理食鹽水로 液體 백신과 같은 濃度인 1mg/ml로 再浮遊시켜 使用하였으며 液體 백신은 通常의 方法으로 製造한 製造直後の 백신을 使用하였다.

가) 動物試驗

體重 300~400g 의 Guinea pig를 使用하였다. Guinea pig는 同數의 2群으로 나누어 各 乾燥 백신과 液體 백신을 接種하여 生기는 皮膚反應을 調査하였다.

乾燥 백신과 液體 백신을 生理食鹽水로 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000의 濃度가 되도록 稀釋하여 Guinea Pig 한 마리마다 腹部 4 個所에 0.1ml씩 皮內注射하였다.

接種 1週日째부터 5週까지 每週 3回씩 Guinea pig의 皮膚反應을 觀察하였다.

나) 人體試驗

서울市內의 1 個 國民學校 1學年兒童 572명에 P.P.D*. 를 1 Tu씩 接種하고 72時間 後에 判讀하여 Tuberculin 反應 陰性인 兒童 417명을 選定하였다.

이들은 다시 過去에 비씨지 接種을 받은 事實有無를

가리기 爲하여 兒童들의 어깨를 調査하여 비씨지 接種에 依한 癰痕이 있는 群 143명과 비씨지 癰痕이 없는 群 274명으로 區分하였다.

비씨지 癰痕이 없는 群에서 30명, 비씨지 癰痕이 있는 群에서 20명을 選出하여 乾燥 비씨지 백신을 0.1ml씩 接種하고 나머지 兒童들에게는 液體 비씨지 백신을 0.1ml씩 接種하였다.

백신 接種 9週 後에 다시 P.P.D.로서 Tuberculin 反應을 調査하고 同時에 비씨지 백신創傷을 調査하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 비씨지 백신의 檢定

實驗製造한 乾燥 및 液體 백신을 生物學的 製劑基準에 依한 無菌試驗 및 安全試驗을 實施한 結果 基準에 適合하였다.

가). 乾燥 前後의 生菌數變化

總 24 Lot의 백신을 實驗한 結果는 <表 1>에서 보는 바와 같이 乾燥 直前に 平均 19×10^6 이든 生菌數가 乾燥 直後에는 7.2×10^6 으로 減少되어 平均 37%의 生存率을 보이고 있다.

* RT 23, N.I.H. Lot 7205

Table 1. Viable Units on Before and After Freeze Drying

No Vaccine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Before F.D.	20.2	22.1	18.5	20.3	16.0	19.0	21.2	22.4	19.0	20.0	18.2	21.2	21.0	17.3
After F.D.	8.5	6.3	8.2	6.3	6.5	8.0	8.1	9.2	11.0	6.8	7.3	7.0	7.0	7.2

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Average
Before F.D.	19.6	15.4	16.0	20.1	17.8	19.0	21.1	15.5	19.4	17.6	19.0
After F.D.	5.8	7.2	7.1	6.1	6.2	6.4	7.5	7.3	4.3	7.7	7.2

Table 2. Viable Units on Various Storage Duration and Temperature

TE- MP. °C	No. Mon.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Aver- age	Vi- able rate	
5°C	1 M.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2 M.	6.5	4.2	6.6	6.4	5.3	5.6	8.2	5.3	7.3	6.5	4.9	6.3	6.4	8.3	6.2	4.8	5.6	6.6	6.2	3.6	5.4	4.4	2.6	3.6	7	5.9	78
	3 M.	—	4.6	3.8	4.1	5.6	4.2	3.8	4.2	3.1	3.8	4.5	4.0	3.5	4.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.1	57
15°C	1 M.	5.6	4.8	6.1	6.4	2.3	8.5	9.4	8.6	3.5	7.4	0.4	0.5	3.3	8.6	2.4	3.5	5.1	4.7	5.6	4.2	5.0	6.1	4.3	—	—	5.0	65
	2 M.	2.6	2.9	3.5	2.7	3.0	3.7	3.2	2.6	—	2.6	2.7	3.2	2.4	2.1	2.9	3.3	2.3	2.6	3.2	3.5	2.7	—	3.0	3.5	—	2.9	40
	3 M.	1.7	2.0	1.8	1.5	0.8	2.0	—	1.2	1.6	1.8	1.6	0.5	1.0	1.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.4	19
37°C	1 M.	2.6	2.7	3.1	3.6	3.8	3.3	4.0	3.1	3.8	3.0	3.3	3.2	2.8	3.2	3.2	2.8	3.0	2.8	2.5	3.0	—	—	—	—	—	3.1	4.3
	2 M.*	1.2	1.4	1.5	2.2	1.2	1.7	1.6	—	1.7	2.8	2.0	2.3	—	1.2	0.9	1.7	—	2.0	1.8	2.1	—	—	—	—	—	1.7	2.3
	3 M.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

※ viable unit×10⁵

Table 3. Skin Reaction of each vaccine in Guinea pigs

WET					
Animal	Concent	1	0.1	0.01	0.001
1		12	12	10	0
2		15	13	10	7
3		13	11	11	1
4		11	12	10	0
5		13	11	10	1
6		11	10	1	0
7		—	—	—	—
8		11	11	9	0
9		13	13	11	9
10		13	11	10	1
11		12	13	10	1
12		12	12	9	1
Total		138	128	102	21
Average		6.4	5.8	4.6	0.9

DRIED					
Animal	Concent	1	0.1	0.01	0.001
1		13	11	11	0
2		13	11	13	4
3		12	11	11	2
4		15	14	11	2
5		11	13	11	1
6		12	11	12	1
7		12	12	11	1
8		13	12	9	1
9		12	9	7	1
10		13	12	7	6
11		13	11	9	4
12		12	11	10	1
Total		151	138	122	24
Average		6.3	5.7	5.0	1.0

나). 保存溫度 및 保存期間에 따른 生菌數의 變化

乾燥백신을 冷藏庫에 保管할 때는 3個月에서 78%, 6個月에서 57%의 生存率을 보이며 保存期間에 따라 漸次 減少되고 있다. 室温保管에서는 1個月에서 65%, 3個月에서 40%, 6個月에서 19%의 生存率을 보이며 孵卵器와 같은 高温에서 保管할 때는 1個月에서 43%로 當初의 生菌數의 1/2 以下로 떨어지며 6個月에서는 生菌을 찾아볼 수 없다<表 2. 圖 1>.

2. 動物試驗

液體 및 乾燥 백신의 實驗動物에 對한 皮膚反應에서 는 特別한 差異는 찾아볼 수 없다<表 3>.

3. 人體試驗

비씨지 백신 接種後의 兒童들에 對한 Tuberculin 反應의 크기는 <表 4>에서 보는 바와 같이 液體 백신에서 平均 10.9mm, 乾燥 백신에서 平均 9.2mm를 보여 乾燥백신은 液體백신보다 작은 反應을 보이고 있으며 過去에 비.췌.지. 백신을 接種 받은 事實이 있는 兒童들에 對한 Tuberculin 反應의 크기는 液體백신에서 11.9mm, 乾燥백신에서 12.6mm를 보여주고 있다<表 5>. 이들 Tuberculin 反應의 크기에 따른 百分率의 分布는 <圖 2, 3>과 같다. 비.췌.지.創傷의 크기는 液體 백신에서 10.9mm, 乾燥로 백신에서 9.2mm이며<表 6> 이들 創傷의 크기에 따른 百分率의 分布는 <圖 4>와 같다.

FIG. 2 PERCENT DISTRIBUTION BY SIZE OF POST VACCINATION TUBERCULIN REACTION FOR EACH OF TWO VACCINES (W/B.C.G. SCAR)

FIG. 3 PERCENT DISTRIBUTION BY SIZE OF POST VACCINATION TUBERCULIN REACTION FOR EACH OF TWO VACCINES (W/O B.C.G. SCAR)

FIG. 4 PERCENT DISTRIBUTION BY SIZE OF VACCINATION LESIONS FOR EACH OF TWO VACCINES

IV. 考 察

비.씨.지.백신은 냉동乾燥에 의하여 相當數의 生菌의 減少를 가져온다는 것은 널리 알려진 事實로서 Sawada¹⁵ 등은 48%의 生存率을 보인다고 하였으나 이번 實驗에서

는 37%의 生存率을 보였다.

이번 實驗을 통하여 實驗生産된 乾燥 백신은 圖 1에서 볼 때 冷藏庫保管時는 6個月 以上, 室温保管時는 3個月까지 其 生菌數가 實用可能할 程度로 維持되고있다.

Table 4. Distribution by size of Tuberculin Reaction Among Schoolchildren who had no. B.C.G. scar

Induration (mm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	No. of Tested	mean size
Vaccine																												
wet	31	—	—	—	—	2	1	7	9	9	21	9	43	24	25	33	12	8	4	2	3	1	—	—	—	—	244	10.9
Dried	3	—	1	2	1	—	2	1	—	—	4	5	4	3	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30	9.2

Table 5. Distribution by size of Tuberculin Reaction Among Schoolchildren who had B.C.G. scar

Induration (mm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	No. of Tested	mean size
vaccine																												
wet	13	—	—	—	—	—	3	1	—	1	9	4	19	22	19	16	6	4	3	1	1	—	1	—	—	—	123	11.9
Dried	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	1	2	2	4	4	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	20	12.6

Table 6. Distribution by size of B.C.G. Lesion Among Schoolchildren

Lesion (mm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	No. of Tested	mean size
Vaccine																												
wet	4	—	1	4	19	55	98	57	21	9	3	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	244	6.1
Dried	—	—	—	—	6	8	13	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30	5.4

人體試驗의 結果는 Tuberculin 反應의 크기가 10mm 以上을 Tuberculin 反應 陽性이라 할 때 비.썸.지.백신接種에 의한 Tuberculin 反應陽轉率은 液體 비.썸.지.백신에서 76%, 乾燥비.썸.지.백신에서 66%이다.

이와 같이 Tuberculin 反應의 크기 및 陽轉率이 낮은 理由는 老朽한 乾燥機의 性能에 起因하는 것으로 生覺되며 앞으로 더 많은 人員에 對한 繼續的인 實驗을 通하여 人體接種量을 決定짓고 또 乾燥로 因한 生菌數의 減少를 考慮한 菌濃度 등이 決定되면 乾燥백신은 3~6個月間의 使用이 可能할 것으로 思料되며 輸送 保管 등이 困難한 地域에 對한 接種에 使用될 수 있을 것이며 앞으로 冷凍乾燥機의 補修乃至는 새로운 乾燥機의 導入과 繼續的인 研究로 보다 優秀한 乾燥비.썸.지.백신의 生産이 이루어질 것으로 믿는다.

V. 結 論

著者は 冷凍乾燥 비.썸.지.백신을 實驗製造하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 冷凍乾燥에 依한 비.썸.지.菌의 生存率은 37%였다.
2. 乾燥 백신을 冷藏庫에 保管時는 6個月 以上, 室温 保管時는 3個月까지 實用可能한 生菌數를 維持하였다.
3. 人體試驗의 結果 著者が 試驗生産한 乾燥 백신은 우리 나라에서 使用하는 液體백신보다 post vaccinat-

ion allergy의 硬結의 크기가 적으며 液體 백신의 Tuberculin 反應 陽轉率 76%에 比해 乾燥백신은 66%였다.

4. 앞으로 계속 方法을 研究하여 短點을 改善해야 할 것으로 보인다.

Reference

1. Obayashi et al: *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1957; 17, 255
2. Ebina et al: *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku-Univ-C.* 1962, 9, 27.
3. Knud et al: *Bull. Wld. Hlth. Org.* 22, 185, 1960.
4. Minimum Requirement of Biologic Product: 1973. N.I.H.
5. Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser. 329. 1966.
6. Sawada et al: *Study on B.C.G. Strain International symposium on B.C.G. Vaccine* Frankfurt 1970.
7. Wld. Hlth. Org/TB/Tech Guide/67, 6
8. J. Nyboe et al: *Progress Reprt for assay of B.C.G. Vaccine.* 1965/66
9. B.C.G. Vaccination in Japan: *Japan Antituberculosis association.*