

B.C.G. ワクチン製造に於ける自然凝集と 其の對策に就いて

財団法人結核豫防會結核研究所石川分室北陸 B.C.G. 製造所(指導 柳澤 謙)

小川 辰次 大島登輝夫 池田 外男 關 又 藏

I 諸 論

我々は夏季の酷暑の候に、手振法によつて、B.C.G. ワクチンを製造する際に、自然凝集に悩んだ。製造法に就いての諸先輩⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾の報告の中に

も、此の事に就いては一言も觸れてゐないので、我々は凝集の原因を追及すると共に、之が對策に就いて種々實驗したので、御批判を仰ぎたい。

II 實 験 方 法

1) BCGワクチンの製造方法

ソートン培地或ひはグリセリン水馬鈴薯培地培養、2週間前後發育のものを選んで、型の様に化學天秤で秤量し、水晶玉入の肉厚の1立の内容の平底コルペンに入れて、1分間180廻轉前後の割合で4分間廻轉させ、摺れたら、1c.c. 前後の滅菌蒸溜水を加へ、更に1分間振り廻し、之に残りの滅菌蒸溜水を加へて、1cc 中 30mg を含む様に原液を作り、之を 0.5% グラチン加生理的食鹽水で50倍に稀釋して、1c.c. 中に 0.6mg 含むワクチンを作つた。

2) 凝集の強さの判定方法

出來上つたワクチンを中試験管に5~6c.c. 入れ肉眼で凝集の程度を檢査し、翌日迄氷室に放置し、沈澱の有無を檢査し、更に出來上つた直後のワクチンの塗抹染色標本を見て參考とし、凝集の

度合を次の様に分けた。

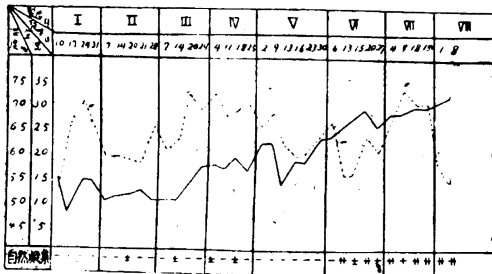
- 一…凝集の認められないもの(翌日見ても沈澱は認められない)
- ±…熟視すると微かな凝集のあるもの(翌日沈澱の痕跡を認める)
- 十…直ちに凝集のはつきりわかるもの(翌日沈澱の少量を認める)
- 卅…凝集の著明なもの(10分後には著明な沈澱を認める)

3) 濕度、室温及び水晶玉入コルペン中の温度の測定方法

濕度は比濕を、又室温は水銀寒暖計により、夫々ワクチン製造の直前に讀んだ。又コルペン中の温度は、綿栓の上から小さな孔をあけて其處から水銀寒暖計を挿し入れ、其の折々の温度を讀んだ。

III 實 験 成 績

第1圖 室温及び濕度の動きとワクチンの自然凝集



註 製造月日中の I, II等は月を表はし10, 17等は日を表す實線は室温、點線は湿度を示す。

1. 自然凝集の統計的觀察

1ヶ年を通しての我々の成績を見ると、1月、2月、3月の様に室温が15°C以下の月、又4月5月の様に20°C前後では、凝集反應は殆んど認められない。6月の末頃になつて25°Cの線を越す様になると、之に相應して凝集の程度も強くなり、又回数も増して來る。更に温度が上昇して30°C前後となる7月、8月、9月に於ては例外なしに凝集は強度に起る様になる。9月下旬、10月と温度が次第に下降して25°Cの線を上下する

様になると、凝集の度も次第に軽度となり、20°Cの線或ひはそれ以下となる。11月及び15°C以下となる12月に於ては凝集は殆んど認められない。更に我々は室温を3段階に分けて、凝集とを對比して見た。

第1表 室温と自然凝集との関係

室温	凝集の度合			
	-	±	+	卅
7°~15°C	24	4	0	0
16°~25°C	18	3	0	1
26°~33°C	0	1	2	6

註：数字は回数を示す

其の成績は第1表の様であつて、室温が高くなるに随つて、自然凝集の程度が強くなり、頻数となつて来る事がわかる。次に湿度との関係を見ると、凝集との間には一定の関係は認められない。即ち夏期に於ける自然凝集の頻發は、室温の上昇が大きな役目を演じてゐる事がわかつた。

2. 対策の實驗的研究

自然凝集の原因が室温の上昇である故対策は簡單である。即ち凝集しない程度に迄室温を下げるに云ふ事の一語につきる。然し室の冷房と云ふ事は、仲々簡單にはゆかない。それで我々は製造操作中に、コルベンの中の温度が凝集點に達しない様にと、種々實驗を重ねた。即ち水晶玉入コルベンや、原液調製液、稀釋液等を氷室に冷却したり、或ひは手の温度や、室の温度の影響を、可及的に避ける爲に、手袋を使用したり、コルベンをガーゼで包んで見たりしたが、之等の事柄は、ある程度、効果的であるが、然し室温が高くなると自然凝集を阻止する事が出来ない事がわかつた。それで最後に、氷水で製造前にコルベンを冷却すると共に、製造操作中にも冷却する事を考へ出した。即ち直徑20cmの水槽の中に氷と水を入れ(2°C~3°C)、コルベンを此の中に漬けた時、球部がかくれる程度にして置く。この氷水の中に水晶玉入コルベンを漬けると、最初の温度が30°Cであれば10分前後で、10°Cとなる事がわかつた。この状態のものを、高温の室温中で其のまま製造操作をやつてゆくと、最後の温度が26°C以

上となり凝集するが、菌塊を入れて4分手振後に原液調製液を注入する際及び、其の後1分間手振して、1c.c.中30mg含む様になる様に残りの液を入れる際にも、同様にコルベンを氷水に漬けて冷却する様にして製造すると21°Cとなり凝集しない事を發見した。それで此の様にして、室温31.5°C, 32.5°C, 33°Cの中で製造して見ると常に、凝集の無い立派なワクチンを作り出す事が出来た。我々は更に實驗した結果、製造操作中の冷却が充分であれば、製造前にコルベンを冷却する必要の無い事もわかつた。即ち水晶玉によつて均等に挿りつぶされた菌體が、蒸溜水とまじる際に、高温であれば、凝集される事がわかつた。

3. 自然凝集を起す温度に就いて

凝集其のものには、種々の段階があるが、此處で我々の稱するのは、(±)程度の、極く軽度のものを限度とした場合である。我々は此の温度を決定する爲に、B.C.G. ワクチン製造中の挿りつぶされた菌塊と、滅菌蒸溜水との混合した時の温度と其の凝集の度合とを對比して見た。其の成績は第2表の様である。

第2表中()の中に記した温度は、氷水にコルベンを漬けて冷却した時の温度を示す。即ち手振前(16)とあるのは、手振する前に氷水で冷却して、16°Cとした事を示し、1分手振後(19)とあるのは、4分手振後に氷水に漬けて乍ら綿栓をとり、少量の蒸溜水を入れ、綿栓を閉ち、再び手振1分した時の温度が、19°Cである事を示してゐる。又原液完成時(15)とあるのは、1分手振後に再び氷水に水晶玉入コルベンを漬けて、冷却し乍ら、1c.c.中30mg含む様に、蒸溜水を加へて、綿栓を閉ち、充分に混和した時の温度が、18°Cと云ふ事である。

28/VII, 5/VIIIの實驗は製造操作中のどこかで冷却してゐるし、10/IX, 7/XIの實驗は、室温の中で、冷却する事無しに、操作されたものである。

この表で見る様に、手振前に冷却しないコルベンを用ひて、手振4分後には、31.5°Cとあつたものでも、冷却し乍ら製造して見ると、コルベンの中の温度は、1分手振後には25.5°Cとなり、

第2表 自然凝集を起すコルペン内の温度

製造日	実験番號	室温	氷水の温度	コルペン内の温度の變化				自然凝集の判定
				手振前	4分 手振後	1分 手振後	原液 完成時	
2S/VI	(1)	29	1.5	(16)	26	(19)	(18)	-
	(2)	30		(16)	25	27.5	28	±
	(3)	31		29.5	31.5	(22.5)	(19.5)	-
5/X	(1)	27.5	2.0	(16)	24.5	(18)	(15.2)	-
	(2)	29		(16)	24	26	28	±
	(3)	29.5		28.5	31	31	(21)	±
10/X		21		20	25	25	25	±
7/XI		20.5		19	22.5	25	23	-

註. 1) 自然凝集中の「±」とは ± よりは凝集の程度の多少強いものを示す
 2) () 中の温度は冷却した事を示す

更に原液完成時には 19.5°C と低下して、結局凝集の起らないワクチンを得てゐるし、最初に 16°C 氷水で冷却したもので、途中の操作中に冷却しないと、25°C となり、27.5°C となり最後に 28°C となつて、出来上つたワクチンは ± となつてゐる。即ち揺りつぶされた菌塊と滅菌蒸溜水が混和される時の温度が高いと、凝集される事がわかる。それで凝集の軽度である ± の部分の、手振1分後と、原液完成時の温度を拾つて見

ると、前者では 27.5°C, 26°C, 31°C, 25°C であつて、原液完成時には、28°C, 28°C, 21°C, 25°C となつてゐる。31°C の場合は冷却したので 21°C となつてゐるが、其の他の場合は冷却してゐない。之等の事から恐らく 25°C 前後が凝集される、最低温度の限度ではなからうか。即ち揺りつぶされた菌塊と滅菌蒸溜水が充分に混和される間中は、少くとも 25°C 前後以下の温度が必要なのではなからうか。

IV 對 策

我々は水晶玉入コルペンの中の温度を凝集點に達しない様にする爲に、製造操作中氷水 (2~3°C) の中にコルペンを漬けて冷却し乍ら製造する事により、室温の如何にかかわらず、常に凝集の認められない、立派な B.C.G. ワクチンを得る事が出来た。しかし室温が 20°C 以上の場合でも、必ずしも氷水で、コルペンを冷却し乍ら製造する必要は無い。要するに、種々の處置により菌塊が充分に揺りつぶされて、滅菌蒸溜水と混和する操作中の温度が 25°C 以上に出ない様にすればよい。随つ

て氷を得られない時は、井戸水を利用して冷却するとか、或ひは、手の温度の影響を出来るだけ避ける爲に手袋を用ひるとか、或ひは蒸溜水を冷却して用ひるとかなどの方法を綜合して用ひる事により此の目的を達する事が出来る。尙朝の涼しい中に作る事も一つの方法であると思ふし、又電氣冷蔵庫でもあれば、製造を始める前に充分に冷却したコルペンを使用すると同時に、製造途中で冷却し、凝集點に達しない様にするとよいと思ふ。

V 結 論

1) 夏期酷暑の候に起る B.C.G. ワクチンの自然凝集は、室温の上昇による影響が大部分であつ

て、濕度による影響は殆んど認められない。

2) B.C.G. ワクチンの自然凝集は、揺りつぶされ

た菌塊が、滅菌蒸溜水と混合する時の温度が25°C以上の場合に起る。

3) 製造操作中、即ち4分手振後に、最初の滅菌蒸溜水を入れる間、及び其の後の滅菌蒸溜水を入れる間、氷水(2°C~3°C)の槽中に、球部がかかる程度の深さに、水晶玉入コルベンを漬け、冷却し乍ら製造すると、凝集の認められないワクチンを得る事が出来る。

(柳澤謙博士の御校閲を謝す)

、 主 要 文 献

- 1) 日本學術振興會第八小委員會(委員長熊谷岱藏)
「結核豫防接種に關する報告書」昭 18.
- 2) 柳澤, 大林; 結核, 20; 505, 昭 17.
- 3) 柳澤, 大林; 結核研究所研究概要 217, 昭18.5