

日本腦炎백신 製造에 關한 研究

柳 健 熙 · 李 容 在

(東亞製藥株式會社 微生物課)

Studies on the Production of Japanese Encephalitis Virus Vaccine

YU, Kun Hee and Yong Jae LEE

(Department of Microbiology, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd.)

ABSTRACT

Because of the cases of Japanese Encephalitis (J.E.) were reported every year in Korea. We, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., produced J.E. virus vaccine, with lower price, since 1970 in order to prevent ourselves from being infected by the disease. And inoculated the J.E. virus vaccine for the children with a great success.

We are going to report several questions which brought about in producing the J.E. virus vaccine by alcohol precipitation, protamine sulfate treatment method.

The results obtained were as follows:

(1) In process treated with 40% alcohol, we used ethanol made in Germany, but it was too expensive to use it. As the result which we had studied about it, we were satisfied with J.E. virus vaccine which produced with alcohol made in Korea, and then, we treated with accurate specific gravity of 40% ethanol for the precipitation of the virus. And also, we knew that it was the best method to be treated it for 3hrs, at 13°C.

(2) When we treated with protamine sulfate (0.025mg/ml), we acquired the highest potent titer, and suited into purpose for the nitrogen concentration.

(3) The filtration of the purified J.E. virus vaccine, in case of millipore filter paper of large pore size was not suitable for the sterility. Therefore the pore size less than 0.8 μ (AA filter paper) in millipore filter paper was very suitable. But it seemed to be important subjects that the smaller was the pore size, the lower was the potent titer.

緒 論

日本腦炎 virus 가 1935 年 日本에서 發見된 이래 東南亞地方에서 널리 流行하고 있는 日本腦炎을 事前에 豫防하기 爲하여 日本 및 美國의 여러 學者들에 依하여 日本腦炎백신에 關한 研究가 활발히 繼續되었다.

이들 研究 業績을 살펴보면 Sabin (1943)은 日本腦炎 virus 가 mouse 腦內에서 잘 增殖한다는 것을 着案하여 日本腦炎에 感染된 mouse 腦를 가지고 formalin 不活性化 백신

製造에 成功하였다. 또한 美國이나 日本에서 神經組織인 mouse 腦를 使用하는 대신 孵化 鷄卵內에서 virus 增殖을 시켜 formalin 不活性化法으로 백신 生産 研究가 繼續되어 Warren Koprowski 및 Smadel (1946) 등은 Sabin (1943)의 mouse 腦 백신과 力價가 同等한 鷄胎兒 組織 백신을 生産하는데 成功하였다. mouse 腦組織을 使用하여 製造된 백신은 人體內에서 allergy 性 副作用을 두려워 하는 반면 鷄胎兒 組織 백신은 力價面에서 不安 定한 點은 서로의 研究 問題라 보겠다.

本人들은 二年前부터 中村(1965)의 alcohol과 protamine sulfate 沈澱法으로 精製하는 途中 야기되었던 여러가지 問題點을 解決하기 위하여 實驗하였던 그 結果에 대하여 論議해 보고저 한다.

材料 및 方法

① 使用 virus : 國立保健研究院에서 분양 받은 Nakayama-NIH strain 을 mouse 腦內 1代 繼代한 것

② 實驗動物 : ICRJCR 系 純種으로 12~15g 의 mouse.

③ 試藥 :

formalin : USP

protamine sulfate : J.P

alcohol : Merck 製와 工業用 alcohol(國產)

④ 試驗法 : 日本腦炎 바이러스의 毒力測定은 Reed and Muench 方法으로 測定하였음. 기타 力價 測定 및 檢定方法은 生物學的 製劑 基準에 따르고 이때 使用한 희석액은 滅菌生理 食鹽水로 하였다.

⑤ 백신의 貯藏방법

日本腦炎 바이러스에 感染된 mouse 腦를 20%로 乳劑하여 4°C에서 14,000 r.p.m.으로 高速遠心分離後 上清液을 採取하여 同量의 40% ethanol 을 加하고 13°C에서 3時間 放置後 高速遠心分離하여 沈澱部分을 再浮遊하여 (40%濃度), 每 ml 당 protamine sulfate 가 0.025mg 되게 하고 4°C에서 12時間 放置

後 高速 遠心分離한 후 그 上清을 採取하여 0.1%의 formalin을 含有시켜 不活化 하였다. 그 過程을 圖式化하면 다음과 같다.

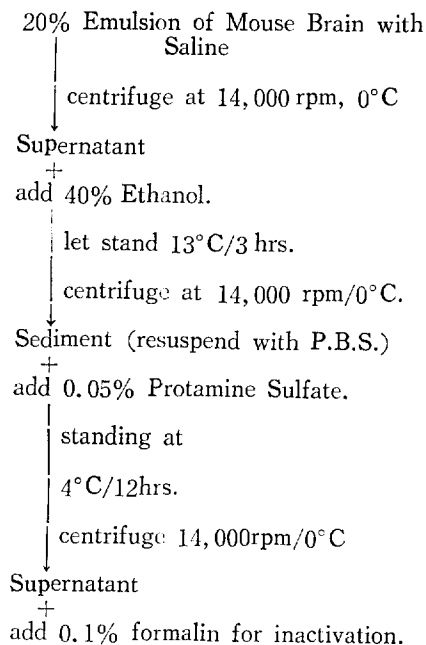


Fig. 1. Scheme of Vaccine Production

結果 및 考察

實驗(I) :

위에서 記述한 alcohol protamine sulfate 沈澱法으로 백신을 製造한 後 各段階別 毒力을 Reed and Muench 法으로 測定한 結果 Table 1 과 같았다.

Table 1. LD₅₀ of each step in the JE Virus Vaccine Purification.

Step	LD ₅₀ titer	Sterility test
20% Mouse Brain Emulsion	10 ^{-7.17}	Satisfactory
After Ethanol treatment	10 ^{-8.5}	Satisfactory
After protamine sulfate treatment	10 ^{-8.36}	Satisfactory

백신 生産에 使用한 試藥中 alcohol 處理段階에서 Merck 製를 使用하였으나 이는 너무 高價이므로 國產 alcohol을 使用하여 比較 實驗한 結果 毒力은 Table 2 와 같았다.

Table 2에서 보는 바와 같이 두 alcohol을 比較할 때 약간의 差異가 있으나 이는 實驗間 誤差로 보면 별 差異가 없다고 보여진다.

Table 2. Comparison of LD₅₀ between Ethanol made in Germany and in Korea

Level	LD ₅₀		EID ₅₀		Nitrogen contents	Safety test	Sterility test	Inactivation test
	Prepurification	Post purification	Sample vaccine	Reference vaccine				
Ethanol (Germany)	10 ^{-8.35}	10 ^{-7.5}	4 ^{2.19}	4 ^{1.93}	0.018 mg/ml	satisfactory	satisfactory	satisfactory
Ethanol (Korea)	10 ^{-8.35}	10 ^{-7.35}	4 ^{2.17}	4 ^{1.93}	0.018 mg/ml	satisfactory	satisfactory	satisfactory

(대한약전(K.P.II) 질소정량법에 의한 것임)

實驗(II) : 백신 精製 過程中 ethanol 處理時間 및 溫度에 對하여 다음과 같이 實驗하였다. 2시간, 3시간, 4시간으로 두고 溫度를 11°C, 13°C, 15°C로 處理하여 毒力을 測定한 結果 Table 3과 같았다.

Table 3. Comparison of LD₅₀ between treated Temperature and Time of Ethanol

Temp. and LD ₅₀	LD ₅₀ (11°C)	LD ₅₀ (13°C)	LD ₅₀ (15°C)
2 hrs.	10 ^{-7.5}	10 ^{-7.5}	10 ^{-7.35}
3 hrs	10 ^{-7.75}	10 ^{-8.0}	10 ^{-7.75}
4 hrs	10 ^{-7.5}	10 ^{-7.75}	10 ^{-7.5}

※ Virus titer: LD₅₀=10^{-8.35}
Ethanol (Merck)

以上的 實驗 結果로 보아 13°C에서 3時間 貯藏하여 두는 것이 가장 效果의임을 알았다.

實驗(III) : 精製中 protamine sulfate의 含量과 處理時間이 백신의 毒力 및 nitrogen 含量에 크게 영향을 미칠 것으로 보고 다음과 같이 實

驗하였다. 이때 處理 溫度는 4°C 냉장고에 同時 保管하였다.

Table 4를 볼때 0.025mg/ml의 protamine sulfate를 含有시켜 10 hrs 處理한 後 毒力은 20% 乳劑時 10^{-8.35}와 별 差異가 없었고 nitrogen 含量도 生物學的 製劑 基準에 適合한 成績을 얻었다.

Table 4. Comparison of LD₅₀ at each Protamine sulfate concentration and Teated hour.

Protamine sulfate concentration	8 hours		10 hours		12 hours		Sterility test
	LD ₅₀	Nitrogen contents	LD ₅₀	Nitrogen contents	LD ₅₀	Nitrogen contents	
0.025%	10 ^{-7.5}	0.019mg/ml	10 ⁻⁸	0.018mg/ml	10 ^{-7.75}	0.018mg/ml	satisfactory
0.02 %	10 ^{-7.17}	0.02mg/ml	10 ^{-7.5}	0.016mg/ml	10 ^{-7.5}	0.019mg/ml	satisfactory
0.01 %	10 ^{-7.35}	0.026mg/ml	10 ^{-7.75}	0.018mg/ml	10 ^{-7.5}	0.019mg/ml	satisfactory

(대한약전(K.P.II) 질소정량법에 의한 것임)

實驗(IV) : 백신 精製後 最終的으로 0.45μ의 pore size를 가진 millipore filter paper를 使用해 왔으나 이것이 力價에 미치는지 여부를 검토 實驗한 結果 다음과 같았다.

Table 5.를 보면 filter 前 mouse LD₅₀가

10^{-8.17}이던 것이 pore size에 따라 懸殊한 差異가 있음을 볼 수 있다. 그러나 RA filter paper는 sterility에 不適合하므로 AA filter paper의 pore size보다 작을수록 sterility는 安全하나 力價가 떨어지는 研究 課題라 아니할 수 없다.

Table 5. Comparison of LD₅₀, EID₅₀ and Nitrogen contents at each filter paper pore size.

Millipore filter paper pore size	LD ₅₀ (PFU)	EID ₅₀		Nitrogen contents	Sterility test	Safety test
		Sample vaccine	Reference vaccine			
1.2μ(RA)	10 ^{-7.85}	4 ^{2.4}	4 ^{1.87}	0.020mg/ml	dissatisfactory	dissatisfactory
0.8μ(AA)	10 ^{-7.5}	4 ^{2.1}	4 ^{1.87}	0.019mg/ml	satisfactory	satisfactory
0.45μ(HA)	10 ^{-7.85}	4 ^{1.97}	4 ^{1.87}	0.018mg/ml	satisfactory	satisfactory
0.22μ(GS)	10 ^{-7.17}	4 ^{1.91}	4 ^{1.87}	0.016mg/ml	satisfactory	satisfactory

(대한약전〈K.P.II〉 질소정량법에 의한 것임)

※ Mouse Brain 을 20% 乳劑後 Mouse LD₅₀ 測定

摘 要

以上の 實驗 結果로 보아 alcohol, protamine sulfate 沈澱法으로 JE virus vaccine 을 生産함에 (1) alcohol 處理過程에서 比重단 正確히 맞춘다면 外國製 alcohol 을 使用하지 않아도 效果的이고 處理 時間은 3 時間(13°C) 處理하는 것이 가장 높은 titer 를 얻을 수 있었다. (2) protamine sulfate 의 含量은 0.025mg/ml 이 毒力이 가장 좋고 nitrogen 含量에도 適合하였다. 그리고 處理 時間은 4°C 에서 10 時間 處理하는 것이 가장 높고 安定된 結果를 얻을 수 있었다. (3) 백신의 filtration 은 vaccine 의 力價面으로 볼 때 pore size 가 큰 여과지를 使用 함이 높은 力價를 유지 할 수 있으나 여과지의 pore size 와 nitrogen 含量 問題, sterility 한 面으로 볼 때 더 研究해야 될 것으로 본다. 그리고 백신 生産도중 formalin 含量이 백신의 力價에 미치는 영향과 安定劑에 對하여는 不斷히 研究중에 있다.

引 用 文 獻

1. Sabin, A.B. et al. 1943. The St. Louis and Japanese B type of epidemic encephalitis, Development of noninfective vaccine, Report of basic data. *J.A.M.A.*, 122, 477
2. Warren, J. and Hough, R.G. 1946. A vaccine against Japanese B. encephalitis prepared from infected chick embryo. *Proc. Soc. Esp. Med.*, 61, 109
3. Warren, J. Morvin, L. 1952. Separation of encephalomyocarditis virus from tissue components by mean of protamine sulfate precipitation and enzyme digestion. *J. of Bact.*, 63, 1.
4. 中村 I. 1965. 日本腦炎ワクチンに關する研究, 第 13 回 日本ウイルス學會記
5. 日本のワクチン: 國立豫防衛生研究所學友會編.