

鼠疫活菌苗的真空乾燥及 有關活菌數的試驗*

陳正仁 陸士良 劉德鋒

(衛生部生物製品研究所)

自從 Girard^[1] 及 Outen^[2] 分別獲得製造鼠疫活菌苗用的無毒菌株——伊維 (E. V) 及歐騰 (Tjiwidej) 菌株——之後，鼠疫活菌苗曾在世界各地廣泛應用，得到良好的效果^[3,4,5]。1950年湯飛凡等^[6]曾對上述菌種作選擇試驗；並肯定無毒菌苗的免疫力。隨後鼠疫活菌苗在我國大量製造及進行大規模的預防注射。

鼠疫活菌苗的免疫效果與它的活菌數有密切關係。液體活菌苗在保存期間活菌很快死亡，其有效期不能超過 15 日，使菌苗的保存及運輸受到很大限制，不能滿足使用單位的要求。而冷凍乾燥活菌苗却能夠長期保存活菌，彌補了液體菌苗的缺點。Grasset^[5]曾報告乾燥保存的鼠疫菌種在兩年後並沒有降低免疫力。此後其他活菌苗如卡介苗、布氏桿菌活菌苗及牛痘苗等都相繼有乾燥製品的應用。1950年陳正仁、陳廣田^[7]報告了使用乾燥卡介苗的結果，並促進了我們在 1950 年起進行鼠疫活菌苗的真空乾燥工作。現就菌苗乾燥過程中發現的一些問題及針對這些問題所作的一些試驗作簡單的報導。

試驗方法

(一) 菌種

採用得自印度哈佛金 (Haffkine) 研究院之歐騰菌種。該菌種原為真空乾燥保存，自 1949 年啓用後亦以乾燥方法保存。

(二) 菌苗製造過程

啓開乾燥菌種後，接種至 10% 羊血肉浸液瓊脂上。培養生長後，移種至肚肝消化液瓊脂上作為菌苗生產用菌種。繼以同樣培養基作大量接種繁殖，經 37°C 24 小時後刮取菌苔至 pH 7.2 緩衝鹽水內。菌液冷藏 2—5°C 5 日，經純菌試驗合格後加入 40%

* 1956 年 10 月 12 日收到

乳糖液使其最後濃度成爲 10% 乳糖菌液。然後將菌苗分裝安瓶內，每安瓶裝 0.5 或 1.0 毫升。隨即進行冷凍乾燥。

(三) 乾燥方法

菌苗安瓶預先放至 -40°C 的低溫冰箱內冷凍 3—4 小時，再迅速移進真空乾燥箱內。立即抽真空，在 5 分鐘內使乾燥箱內真空度到達 200 微米（水銀）。在以後全部乾燥過程中保持真空度在 100 微米以下，乾燥機上吸附水分的冷凝器在 -39 至 -40°C 。乾燥時間及乾燥箱內鐵板溫度可以按試驗條件要求加以控制。

(四) 乾燥菌苗的保存狀態

菌苗乾燥完畢後，將通過氯化鈣吸水及除菌之空氣引入乾燥箱內。或將純度爲 99.7% 的氮氣經濃過除菌後引入箱內。取出菌苗後立即封口。真空封口方法是將乾燥後安瓶連接至抽氣分支管上，迅速抽真空，在真空度到達 100 微米時封口。用真空測驗器檢查安瓶是否保持真空。

(五) 活菌計數

進行乾燥菌苗活菌計數前檢查菌塊是否正常並重新測驗安瓶是否保持真空。乾燥菌苗在加入生理鹽水後在 5 秒鐘內完全溶化成爲均勻懸液。所有菌液均按照中央生物製品檢定所濃度標準以光電比色器測定濃度。將菌液按濃度稀釋成爲每毫升 10 億菌體，即一個注射劑量。自該濃度起作 10 倍稀釋，並取 10^{-5} 、 10^{-6} 及 10^{-7} 稀釋度各以 0.1 毫升接種至 10% 羊血肉浸液瓊脂上。在 37°C 培養 2 日及室溫 1 日後計算生長出菌落。選擇生長 10—100 個菌落的稀釋度計算活菌數，並推算出每 10 億菌體所含活菌數目。本文內活菌數以 10 億菌體所含活菌的百分數表示之。

(六) 水分測定

乾燥菌苗用卡氏 (Karl Fisher) 方法測定菌苗水分量；以乾燥菌苗重量與水分含量之百分數表示之。

試 驗 結 果

(一) 鼠疫菌苗保存期間溫度對活菌數的影響

爲了瞭解鼠疫活菌在緩衝鹽水內保存 5 日期間活菌數下降情形，我們曾將菌液存放於 $2-5^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，每隔一日取出樣品作活菌計數。經多次試驗說明這樣保存的菌液活菌數沒有顯著的減少。惟有一次菌液存放 5 日後活菌數與以往不同，不能達到過去數目。經詳細檢查發現菌液曾經放置在 $30-35^{\circ}\text{C}$ 間 18 小時。因此推想溫度與活菌數減少有關。我們在同一製造過程中將一管濃度爲 900 億/毫升的菌液分作三部分，分

別放置 2—5°、15° 及 37°C 中。在不同時間取出樣品作活菌計數。所得結果見表 1。

表 1 鼠疫菌液保存期間溫度與活菌數關係

菌液存放時間	存放溫度及活菌存放生存率		
	2—5°C	15°C	37°C
刮下菌液直接計數	100%	100%	100%
4—5 小時後	82%	77%	65.8%
17—24 小時後	90%	70%	1.1%
120—144 小時後	87%	64%	0.2%

從表 1 試驗結果說明菌液存放在 2—5°、15° 及 37°C 溫度中活菌數都下降，而以 37°C 者最為劇烈。菌液存放 4 小時後活菌數已經開始減少而在 5—6 日後在 37°C 保存者活菌率僅為 0.2%。根據試驗結果菌液冷藏能夠防止細菌大量死亡，因此在菌苗製造過程中應當避免將菌液放置室溫或較高溫度室內，甚至是短期的也不適宜。

(二) 低溫冷凍對鼠疫活菌的影響

微生物在低溫下 (—40 至 —70°C) 不致死亡反而能夠長期保存的事實早已經許多研究工作者報導及應用^[8,9,10]。Smith 氏^[11] 在綜合討論低溫對細胞及微生物的影響時認為逐漸降低溫度至零下能夠避免溫度休克 (Thermal Shock)，因而比快速冷凍更能保存細胞及微生物生存，同時也論及各種微生物對低溫是有不同的敏感性。我們曾以製造菌苗用的鼠疫菌液作低溫冷凍對活菌數的影響試驗。菌液以 1.0 毫升分裝至安瓶內，隨即放入 —40°C 低溫冰箱中，菌液在 15—20 分鐘內自室溫溫度降低至 —40°C。菌液冷凍 3—4 小時後取出放室溫溶化，然後作活菌計數試驗。所得結果說明鼠疫菌在冷凍過程中死亡率為 20—30%。至於菌苗在冷凍及乾燥連續進行的過程中是否由於冷凍而使活菌達到上述死亡率則目前尚未能以試驗方法得到結果。

(三) 菌苗乾燥過程中溫度、乾燥時間與含水量的關係

乾燥時間與含水量的關係：每次試驗均用同樣冷凍及乾燥機，同等數量菌苗安瓶 (2500 個)，每個裝量 1.0 毫升菌液，進行試驗找出合理的乾燥時間使菌苗乾燥後含水量不超過 3%。Flosdorf 及 Mudd^[12] 認為真空乾燥過程中為了加速水分的昇華作用，應當適當的供給菌苗熱量，即在真空情況下逐漸昇高乾燥箱內鐵板溫度。各種微生物與不同細菌之間，對這樣的增加溫度有不同的敏感性。因此在進行上述試驗時必須保證菌苗乾燥後活菌數不受影響。試驗結果見表 2。

菌苗含水量的試驗結果說明自含水量 7.9% 以上降低至 3% 以下的主要因素為延

表 2 鼠疫菌苗真空乾燥時間加溫過程與含水量試驗

冷凍時間 (小時)	乾燥時間 (小時)	乾燥箱鐵板溫度及時間 (C, 小時)	菌苗水分含量 (%)
3	9	0--2°, 9	大部未乾, >7.8
3	9	0--2°, 3, 3--5°, 6	6.53--7.9
3	12	0--2°, 3, 3--5°, 8, 20°, 1	5.3
3	14	0--2°, 3, 3--5°, 9, 30°, 2	2.32--2.53
3	16	0--2°, 3, 3--5°, 9, 30°, 4	2.18--2.82

長乾燥時間至 14 小時和逐漸增加乾燥箱鐵板溫度最後到達 30°C 並保持 2—4 小時。而在每次試驗乾燥所得菌苗的活菌數並無差別。根據上列試驗結果，我們應用到隨後 16 次同樣鼠疫菌苗乾燥過程中；最後得到改善的真空乾燥過程為：冷凍 2 小時，乾燥 14 小時，其中在開始乾燥時在鐵板溫度 -8—0°C 保持 6 小時，在 0—25°C 保持 4 小時，在 25°C 保持 4 小時。所得乾燥菌含水量全部都在 3% 以下，平均為 2.11%。

(四) 溶化乾燥菌苗溶液的溫度對活菌數的影響

我們將乾燥菌苗冷藏保存，定期作活菌計數。在長期的保存試驗過程中，發現同一批菌苗至夏季試驗時活菌數低，而再保存一個時期後在冬天作活菌計數時則活菌數却有增高。因此引起我們注意到作乾燥菌苗活菌計數時溫度的影響。我們曾進行試驗如下：取同一批菌苗在溫度為 15° 及 37°C 的試驗室內用與室內溫度相等的生理鹽水溶化菌苗，所得菌液再分成兩份，一份在原溫度稀釋，另一份在另一溫度下稀釋。在稀釋時全部均按同一濃度稀釋接種。而在不同溫度下溶化的菌液再次測定濃度以便了解溶液溫度對菌苗濃度的影響。試驗結果見表 3。

表 3 溶化乾燥鼠疫菌苗溶液的溫度及稀釋液的溫度與活菌數的關係

溶化乾燥菌苗溫度 °C	菌液濃度 (億/毫升)	稀釋液溫度 °C	活菌數 (%)	活存比較* (%)
15°	1170	15°	14.3	100
		37°	10.7	75
37°	650	15°	5.5	21
		37°	4.0	16

* 活存比較是以在 15°C 溶化及 15°C 稀釋所得活菌數作為 100% 計算。

試驗結果說明乾燥菌苗溶化時溶液溫度在 37°C 時活菌數減少，同時濃度也降低，竟相差一倍。而稀釋液溫度影響不够顯著，但在 37°C 中稀釋，活菌數仍較 15°C 者為少。我們曾進一步尋找在那一個溫度範圍內溶化乾燥菌苗較為合適。為此將同一批乾

燥菌苗分別在 1°, 7°, 19°, 28° 及 37°C 下作同一濃度標準溶化稀釋, 並接種至同一批培養基。所得菌液重新測定混濁度。結果見表 4。

表 4 在各種溫度下溶化及稀釋乾燥鼠疫菌苗對活菌數的影響

溶化菌苗及稀釋液溫度 °C	菌液混濁度 (億/毫升)	活菌數 (%)
1°	1320	13.3
7°	1230	16.5
19°	1170	14.5
28°	600	6.9
37°	765	3.1

(五) 乾燥菌苗的保存試驗

乾燥鼠疫活菌苗的優越性是在於能够長期保存活菌, 並且能够保持細菌原來質量。而乾燥菌苗的活菌保存率是與菌苗安瓶封口時安瓶內氣體有密切關係的。許多研究工作者曾經進行各種細菌乾燥後不同條件下封口的試驗。Maylor 及 Smith^[13] 曾將靈桿菌 (*Serratia marcescus*) 乾燥後封存在真空、氮氣、除氧氮氣及普通空氣中, 經過 49 日後計算活菌數, 結果真空封存活菌保存率在 99%, 氮氣封存為 28%, 除氧氮氣為 26%, 空氣封存 9%。我們曾作同樣試驗, 將乾燥鼠疫菌苗同一批分別用真空、除氧氮氣及普通空氣中封存。菌苗放 2—5°C 冷藏保存。在 1, 2, 3 及 6 個月後作活菌計數。試驗結果在保存 3 個月後真空封存菌苗活菌數為原來(活存率) 94%, 氮氣 53%, 空氣 25%。而保存 6 個月後真空菌苗活菌活存率為 56%, 氮氣 30.5%, 空氣 13%。這樣試驗結果說明細菌在乾燥狀態下仍然繼續死亡, 而安瓶封口時的氣體情況與活菌生存是有明顯的影響。同時為了達到乾燥菌苗活菌數長期保持的目的, 乾燥製品的保存溫度也有密切關係。我們曾經用同一批菌苗放置 2—5° 及 22°C 溫度保存 3 及 6 個月。在 3 個月後冷藏於 2—5°C 的菌苗活菌數為原來的 95% 而室溫 (22°C) 保存者則為 3.9%。6 個月後冷藏菌苗活菌保存率為 62%, 而室溫保存的菌苗則為 0.04%。這樣事實說明為了保證菌苗質量, 在保存及運輸期間必須在 2—5°C 下保存才不致使活菌大量減少。

討 論

冷凍乾燥方法在微生物學、食品工業及其他生物學部門的應用愈來愈廣泛。由於這種方法能够長期的保存微生物及複雜的有機物像血清等, 使得低溫冷凍及真空乾燥的研究對生物製品有重要及實際應用的意義。在進行試驗研究工作時, 應當注意到各

種各樣不同的冷凍及乾燥機器，與以各種製品的容器及裝量以至不同的細菌、病毒都要求不同的乾燥方法。本文僅對鼠疫活菌苗的冷凍乾燥方法進行試驗。所得結果與 Flosdorf 及 Mudd 所提出的理論相符；即在高度真空條件下可以適當的供給乾燥物品的熱量，得以加速水分的昇華作用。特別是在大部分水分（90%）已經排出後，即在乾燥最後階段時可以適當的增加乾燥物溫度。對鼠疫菌苗來說，乾燥最後階段容器溫度可以提升至 25—30°C。各種微生物對這樣的溫度要求不同。像牛痘苗在乾燥過程中溫度可以提升至 40°C。而這樣加溫的選擇必須根據製品的效力或活菌數來決定。在上述加溫試驗基礎上，我們在既快又省，同時又保證質量的原則下得到乾燥 14 小時的合理時間。

在製造及保存乾燥鼠疫活菌苗的過程中，有許多操作及客觀條件足以影響菌苗質量特別是活菌數，本文曾對其中一些條件作試驗研究。首先發現鼠疫菌不論在液體或乾燥狀態下保存，其生存率都與溫度有密切關係。而在溶化乾燥菌苗時，溶液的溫度也有顯著的影響。試驗說明液體內的鼠疫菌在 28—37°C 保存使活菌數大大的減少。而這樣的溫度正是鼠疫菌繁殖的溫度，在這樣溫度下新陳代謝必然增加。但是由於鼠疫菌所處的周圍環境不利於繁殖，這樣的增加新陳代謝只會加速細菌死亡。相反的在 2—5°C 溫度下，不論是乾燥或者是液體鼠疫菌却由於溫度帶來的不活動狀態而能夠保存活菌不致大量死亡。Колесов 曾認為甚至在乾燥狀態，細菌雖然沒有死亡但仍然會有極低微的新陳代謝。這樣就能夠說明在較高溫度（22°C 以上）及有氧氣供給（空氣封口）的條件下活菌死亡較多。

最後在乾燥試驗過程中，乾燥前及乾燥後活菌數本文均未詳細提及，我們發現在計算活菌數時所用的培養基對菌落生長影響很大，經過改良後的培養基，能夠使乾燥前活菌數自 40% 增至 50—60%，而乾燥後活菌數則自 16—18% 增至 25—35%。但是在本文內用同一種培養基所作試驗結果應當是能夠比較的。

摘 要

就鼠疫活菌的冷凍乾燥及保存的過程中進行試驗，結果說明鼠疫菌在緩衝鹽水 pH 7.2 內保存以 2—5°C 冷藏最合適，溫度愈高活菌死亡愈大。對菌苗冷凍乾燥過程的試驗結果得到乾燥時間 14 小時，乾燥至最後階段菌苗升溫到 25—30°C 能夠使菌苗含水量少於 3%。在溶化乾燥菌苗時，溶液溫度在 19°C 以下時所得活菌數較 28—37°C 溶化者多一倍，濃度亦增加一半。菌苗乾燥後以真空封存及 2—5°C 冷藏保存最為合適。

參 考 文 獻

- [1] Girard, *C. R. Soc. Biol.* 117: 601, 1934.
 [2] Otten, *Indian J. Med. Res.* 24: 73, 1936.
 [3] Girard & Robic, *Trop. Dis. Bull.* 777, 1943.
 [4] Otten, *Holland Med. J.* 30, 1941.
 [5] Grasset, *Transaction of the Royal Society of Trop. Med. & Hyg. Jan.* 1942.
 [6] 湯飛凡、劉瀾湘、王用楫、張振宜、陳正仁, 中華新醫學報 1: 291, 1950.
 [7] 陳正仁、陳廣田, 中華醫學雜誌(中文版), 36: 563, 1950.
 [8] Heines, *Proceeding of Royal Society, London*, 124, 1937—38.
 [9] Weiser & Osternd: *J. Bact.* 50: 413, 1945.
 [10] Glover, *J. Path. & Bact.* 58: 111, 1946.
 [11] Smith, Harris: Biological application to freeze and drying, Academic press inc. N. Y. 243, 1954.
 [12] Flosdorf & Mudd, *Freeze and Drying, Reinold corp.*, 34, 1949.
 [13] Maylor & Smith: *J. Bact.* 52: 565, 1946.

LYOPHILIZATION OF LIVING PLAGUE VACCINE WITH REFERENCE TO ITS VIABLE COUNT

CHEN CHENG-JEN, LU SHIH-LIANG and LIU TE-CHENG

National Vaccine and Serum Institute, Peking

(ABSTRACT)

Following a series of experiments on lyophilization of the living plague vaccine, we found that the bacterial suspension should be stored at 2—5°C before freeze and drying. The higher the temperature, the lower it will be the viability. The process of lyophilization was studied and the proper duration of drying was worked out to be 14 hours. The filled ampoules were freed in the drying chamber which had a temperature of -40°C and left there for 2 hours. On the beginning of drying the temperature was kept below -25°C for about 6 hours, then heat was supplied to raise the temperature gradually. At the last 4 hours, the temperature was maintained at 25—30°C. The vaccine dried in such a way was found to contain residual moisture less than 3%. During the reconstitution of the dried vaccine, the temperature of the suspending solution was important, more viable cells were recovered when it was below 19°C. Dried vaccine should be sealed in vacuum and stored at 2—5°C.