การพัฒนาเซลล์ไตลิงแขวนลอยสำหรับการผลิตวัคซีน

มาโนช โพธิ์สูง,* สุธิดา ตันติกำธน, ณัฐธนัญ ภิญโญสุขี, รัตนาวดี วิชาจารณ์, นุชนาฎ ชัชวาลการพาณิชย์ และปนัดดา เทพอัคศร

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

** e-mail: manoch.p@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

เซลล์ไตลิงเป็นเซลล์ยึดเกาะที่องค์การอนามัยโลกได้รับรองให้ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตวัคซีน โดยทั่วไปการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ไมโครแครริเออร์เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวยึดเกาะ อย่างไรก็ตามการใช้ไมโครแครริเออร์มีต้นทุนสูงและกระบวนการขยายขนาดการผลิตมีความซับซ้อนมากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเซลล์ไตลิงแขวนลอยโดยใช้อาหารสูตรที่ไม่มีซีรั่มที่พัฒนาขึ้นเอง (SFM01-M-2 (SUS)) ที่มีเดกซ์แทรนซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร การปรับเซลล์ไตลิงยึดเกาะเป็นแขวนลอยได้ทำในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 - 4 วัน จากผลการวิจัยพบว่าสภาวะของการเพาะเลี้ยงสามารถลดการเกาะกลุ่มของเซลล์ได้ เซลล์กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1.09 \pm 0.05 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของการเพาะเลี้ยง สรุปได้ว่าเซลล์ไตลิงสามารถปรับให้เจริญเติบโตแบบแขวนลอยได้ และสามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง (subculture) เพื่อใช้ทำการศึกษา genetic stability และ tumorigenicity ในสัตว์ทดลองต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์ไตลิง, อาหารสูตรดัดแปลงที่ไม่มีซีรั่ม (SFM01-M-2(SUS)), เซลล์ไตลิงแขวนลอย, ไมโครแครริเออร์

หลักการและเหตุผล

เซลล์ไตลิงเป็นเซลล์ยึดเกาะที่องค์การอนามัยโลกได้รับรองให้ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตวัคซีน เช่น โรคไข้หวัดใหญ่ โรคมือ เท้า ปากในเด็ก (Enterovirus 71) โรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงยังคงเป็นแบบยึดเกาะโดยอาศัยขวดเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ กันหรือแม้แต่การใช้ไมโครแครริเออร์สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเพาะเลี้ยงโดยอาศัยไมโครแครริเออร์มีข้อจำกัดเรื่องต้นทุนไมโครแครริเออร์ รวมถึงการออกแบบการกวนและการเติมอากาศเพื่อลดแรงเฉือนและการเติมอากาศให้มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการปรับเซลล์แบบแขวนลอยทำให้ง่ายต่อการขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และสามารถศึกษาพฤติกรรมการเกาะกลุ่มของเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยโดยเฉพาะปัจจัยทางเคมีของสูตรอาหาร เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} จากการศึกษาโดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L สามารถลดการเกาะกลุ่มของเซลล์ได้ เซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยที่ปรับสภาพสามารถที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับศึกษาการผลิตเชื้อไวรัสเพื่อการพัฒนาวัคซีนต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยในอาหารสูตร SFM01-M-2(SUS)

วิธีการวิจัย

1. การปรับเซลล์ไตลิงแบบยึดเกาะในอาหารสูตรที่ไม่มีซีรั่มที่พัฒนาขึ้นเอง (SFM01-M-2(SUS))

เพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบยึดเกาะโดยใช้อาหาร MEM + 10% FBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นปรับเซลล์โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่ไม่เติม Dextran sulfate จำนวน 3 - 5 ครั้ง

2. การปรับเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอย

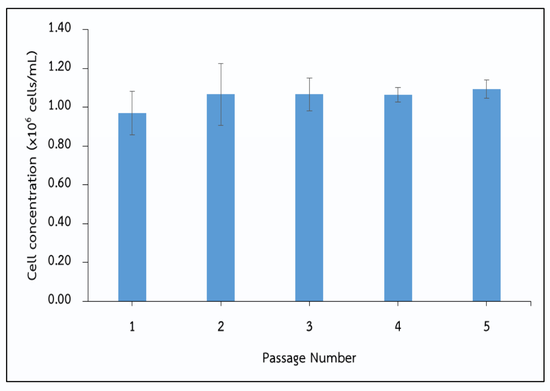
เพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 mL โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 cells/mL อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 วัน ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง (subculture) ทุกๆ 4 วัน จำนวน 5 ครั้ง

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง

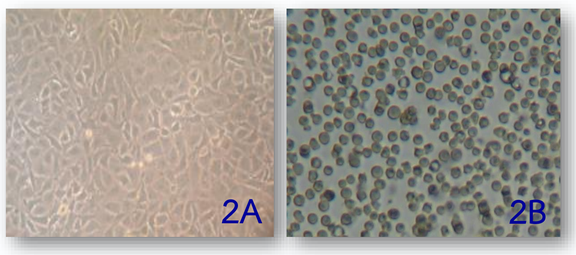
เพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 mL โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 cells/mL อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหาร 50% ในวันที่ 3 6 10 และ 13 ตามลำดับ

ผลการวิจัย

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยต่อเนื่องจำนวน 5 ครั้ง พบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีค่าระหว่าง 0.97 - $1.09 \pm 0.16 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 1) ลักษณะของเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยเพาะเลี้ยงที่ passage number 5 (รูปที่ 2B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด คือ $1.09 \pm 0.05 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 3)

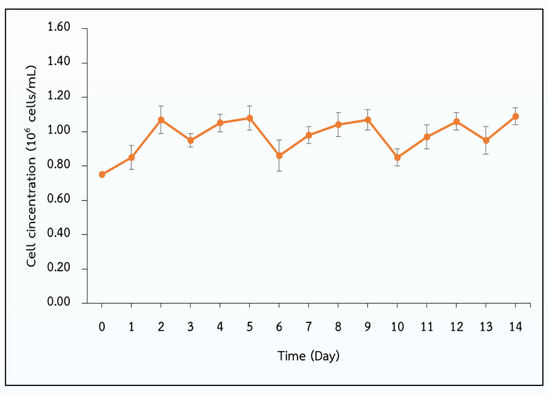


รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยอย่างต่อเนื่อง (sub-culture) จำนวน 5 ครั้ง ในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 mL โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 cells/mL อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 วัน (n=3)



เซลล์ไตลิงแบบยึดเกาะ | เซลล์ไตลิงแบบแขวนลอย

รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์ไตลิงแบบยึดเกาะ (2A) และลักษณะเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอย (2B) ที่ passage number 5 วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 mL โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 cells/mL อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%



รูปที่ 3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยงรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 mL โดยใช้อาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 7.5×10^5 cells/mL อัตราการเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหาร 50% ในวันที่ 3 6 10 และ 13 ตามลำดับ

ประโยชน์ของการวิจัย

เซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยที่ปรับสภาพในอาหารสูตร SFM01-M-2(SUS) ที่เติม Dextran sulfate 1.5 g/L และ Pluronic F-68 2 g/L สามารถใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นสำหรับการผลิตเชื้อไวรัสสำหรับการพัฒนาวัคซีน เช่น โรคไข้หวัดใหญ่ โรคมือ เท้า ปากในเด็ก (Enterovirus 71) โรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษา genetic stability และ tumorigenicity เพิ่มเติมเพื่อยืนยันความปลอดภัยของการใช้เซลล์ในการผลิตวัคซีนต่อไป

บทสรุป

เซลล์ไตลิงแบบยึดเกาะ (adherent-Vero cells) ได้ใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตวัคซีน แต่การขยายขนาดโดยอาศัยไมโครแครริเออร์ (microcarriers) ยังมีข้อจำกัดเรื่องต้นทุน การกวนและการเติมอากาศที่ต้องออกแบบเพื่อลดแรงเฉือน และการให้อากาศที่เพียงพอต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการปรับเซลล์ไตลิงแบบแขวนลอยทำให้การขยายขนาดมีความคล่องตัวมากขึ้นในการผลิตวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

Rourou S, Zakkour MB, Kallel H (2019) Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. Vaccine 37: 6987 - 6995

Shen CF, Guilbault C, Li X, Elahi SM, Ansorge S, Kamen A, Gilbert R (2019) Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. Vaccine 37: 6996 - 7002