การทดสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์ ด้วยวิธี CHO cell assay

สุภาภรณ์ ชุมพล,[1,*] อภิชัย ศุภสารสาทร,[1] สุกัลยาณี ไชยมี,[1] วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม,[1] และสุภาพร ภูมิอมร[1]

[1]*สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

**e-mail: supaporn.c@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

การตรวจความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีน เป็นรายการสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ วิธีดั้งเดิมทดสอบความเป็นพิษในหนูถีบจักร ซึ่งทำให้เกิดความทรมานต่อสัตว์ทดลอง ตามหลัก 3Rs จึงได้ศึกษาวิธีทางเลือกที่ใช้เซลล์ CHO โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และศึกษาความถูกต้องของวิธี พบว่าจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบในเพลท 96 หลุม คือ 2,000 เซลล์ต่อหลุม และระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลคือภายใน 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อท็อกซินไอกรน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน และขีดจำกัดความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.0008 IU/mL เมื่อทดสอบกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์ 1 ตัวอย่างที่เอาสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ออก พบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าในวัคซีนตัวอย่างไม่มีท็อกซินของเชื้อไอกรน แต่วิธีมีข้อจำกัดคือ สารเสริมฤทธิ์ที่มีอยู่ในวัคซีนรวมต้องมีปริมาณไม่มากกว่า 1.5 mg/dose อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นวิธีทดสอบทางเลือกสามารถใช้ทดแทนสัตว์ทดลอง และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนไอกรนไร้เซลล์สำเร็จรูปที่มีการผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศต่อไป

ที่มา

การตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese Hamster Ovary (CHO) cells เป็นรายการทดสอบเพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของวัคซีน โดยตรวจหา pertussis toxin (PTx) ที่อาจหลงเหลืออยู่ใน pertussis bulk หลังจากผ่านกระบวนการทำให้หมดพิษ โดยองค์การอนามัยโลกกำหนดให้วิธีนี้เป็นวิธีทดสอบทางเลือกใช้ทดแทนวิธี Histamine Sensitization test (HIST) แต่มีข้อจำกัด คือ สารเสริมฤทธิ์ (Aluminium adjuvant) ในวัคซีนก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ CHO ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการทดสอบใน final bulk และ final product จึงเป็นที่มาในการพัฒนาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนเพื่อให้สามารถทดสอบในผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูปได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1

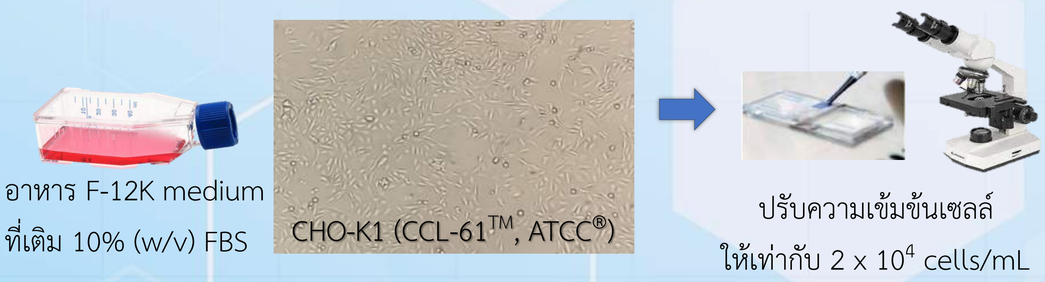
วิธีการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการทดสอบ ได้แก่ จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบในเพลท 96 หลุม และระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผล
2. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งเป็นรายการทดสอบ qualitative assay ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) และ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. เตรียมตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์

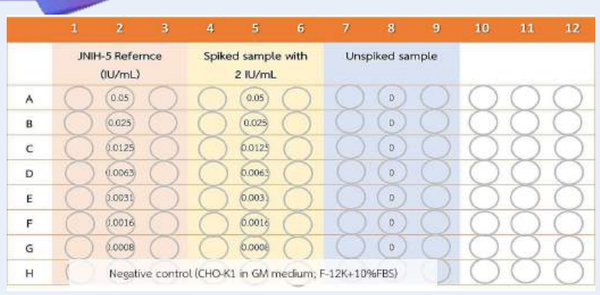
2. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1 (CCL-61™, ATCC®)



3. เตรียมสารมาตรฐาน WHO International Standard Bordetella pertussis toxin (LPF) PT 1st (JNIH-5, NIBSC) ด้วย PBS(-) ให้ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 0.05 IU/mL

4. เติมสารมาตรฐาน ตัวอย่างวัคซีนทั้ง unspiked และ spiked sample ลงในเพลททดสอบ ดังรูปที่ 1

วิธีวิจัย (ต่อ)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	JNIH-5 Refernce (IU/mL)			Spiked sample with 2 IU/mL			Unspiked sample					
A		0.05			0.05			0				
B		0.025			0.025			0				
C		0.0125			0.0125			0				
D		0.0063			0.0063			0				
E		0.0031			0.003			0				
F		0.0016			0.0016			0				
G		0.0008			0.0008			0				
H	Negative control (CHO-K1 in GM medium; F-12K+10%FBS)											

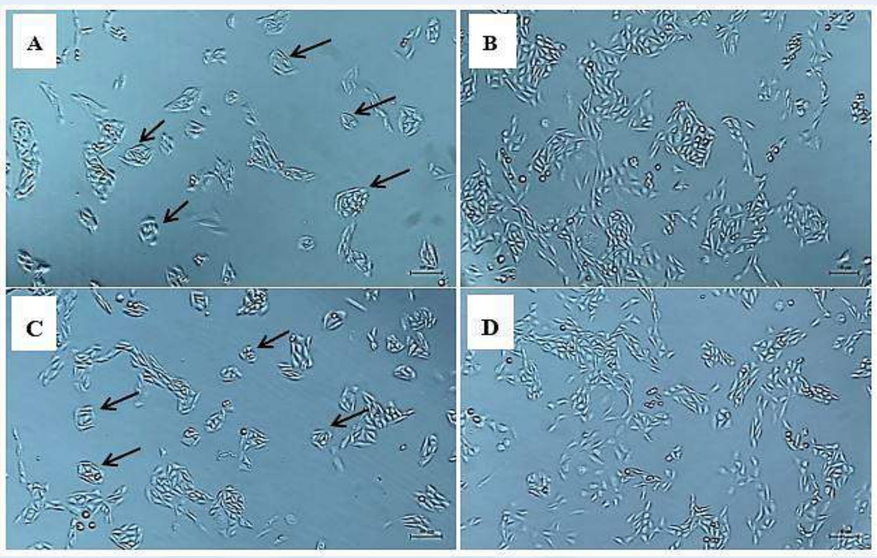
รูปที่ 1 Template ทดสอบสำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1

5. เติมเซลล์ CHO-K1 (2 x 10^4 cells/mL) ปริมาตร 100 µL ลงในเพลททดสอบ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม CO_2 incubator อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง
6. นำเพลททดสอบส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast เพื่อสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ CHO-K1 หากพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบ ≥10 clustering ขึ้นไป ให้รายงานผลเป็นบวก (+) แสดงว่าพบ PTx หลงเหลืออยู่ ในขณะที่หากไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ หรือพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ เป็นรูปดอกกุหลาบ ≤ 9 clustering ให้รายงานผลเป็นลบ (-)

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมต่อการทดสอบในเพลท 96 หลุม คือ 2,000 เซลล์ต่อหลุม และระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านผลคือภายใน 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อท็อกซินไอกรน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน โดยผู้อ่านผลการทดสอบ 3 ท่านอ่านผลตรงกัน ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ ด้วยวิธี CHO cell assay โดยรูป A: Positive control (0.05 IU/mL), B: Negative control, C: Spiked PTx in vaccine (0.05 IU/mL) และ D: Unspiked vaccine ลูกศรสีดำแสดงตัวอย่างตำแหน่งที่พบการเรียงตัวของเซลล์ CHO-K1 การเกาะกลุ่มเป็นรูปดอกกุหลาบ

ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ พบว่าขีดจำกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบ PTx เท่ากับ 0.0008 IU/mL และเมื่อทดสอบกับวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ จำนวน 1 ตัวอย่างที่กำจัดสารเสริมฤทธิ์ออก พบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าวัคซีนตัวอย่างไม่มีท็อกซินไอกรนหลงเหลือ

บทสรุป

จากการศึกษาวิธีทางเลือก CHO cell assay สำหรับตรวจความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์ พบว่าสามารถใช้ทดแทนสัตว์ทดลองตามหลัก 3Rs และใช้เป็นวิธีมาตรฐานตรวจความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในผลิตภัณฑ์วัคซีนรวมสำเร็จรูปได้ แต่มีข้อจำกัดคือ สารเสริมฤทธิ์ที่มีอยู่ในวัคซีนรวม ต้องมีปริมาณไม่มากกว่า 1.5 mg/dose

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Chapter IV. 2.2.1 Chinese Hamster Ovary (CHO) cells assay for pertussis toxin. In: Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. Geneva; 2013. p. 192-7.
2. Council of Europe. Chapter 2.6.33. Residual pertussis toxin. In: European Pharmacopoeia. Vol.1. 10th ed. (10.0). Strasbourg; 2019. p. 241-4.
3. World Health Organization. Annex 4 Supplementary Guidelines on Good Manufacturing Practices: Validation, Appendix 4 Analytical method validation. TRS 937, Geneva; 2006. p. 136 – 40.