



วารสารอาหารและยา
ปีที่ 29 ฉบับที่ 3 (2565): กันยายน - ธันวาคม
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 29 No. 3 (2022): September - December



การทดสอบปริมาณเอนโดท็อกซินในผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุด้วยวิธี Recombinant Factor C

เอกลักษณ์ สงแทน¹ กนิษฐา ภูวนานรานุบาล¹

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

ที่อยู่ติดต่อ: เอกลักษณ์ สงแทน สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
ekalak.s@dmcs.mail.go.th

Endotoxin Content Testing in Biological Products with Recombinant Factor C

Ekalak Songtan¹, Kanitta Phuwanartnaranubarn¹

¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

Contact address: Ekalak Songtan, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, ekalak.s@dmcs.mail.go.th

Received: 23 October 2021, Revised: 15 December 2021, Accepted: 1 September 2022

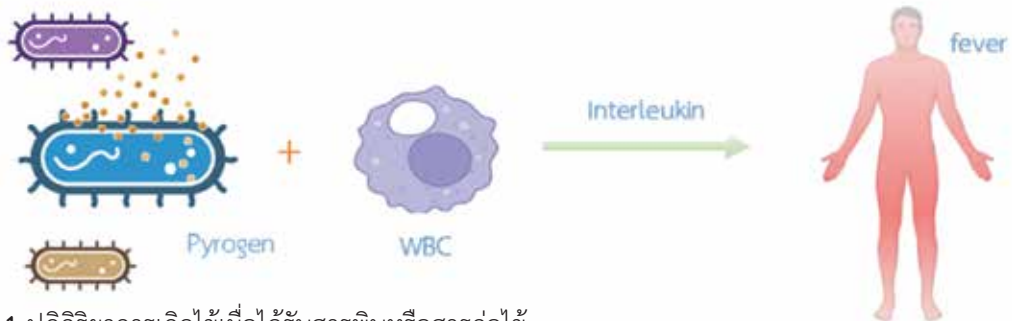
ผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ (biological products) ส่วนใหญ่มักเป็นยาที่ให้โดยการฉีดเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งในกระบวนการผลิตยาสีวภูตุนั้นอาจมีสิ่งปนเปื้อน (impurity) ต่าง ๆ รวมทั้ง สารพิษจากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสารก่อไข้ เรียกว่า ไพโรเจน (pyrogen) ระหว่างการผลิตได้ ดังนั้น การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์สู่ตลาดต้องมีกระบวนการควบคุมอย่างเข้มงวด¹ หนึ่งในวิธีการทดสอบที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์สารก่อไข้ในยาชีววัตถุคือการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนโดท็อกซิน (endotoxin) ซึ่งมีหลายวิธี โดยแต่ละวิธีมีความไวในการตรวจวัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ วิธี gel clot method, turbidimetric kinetic method และ chromogenic kinetic method²⁻⁴ แต่ในปัจจุบัน European Pharmacopoeia (Ph. Eur) เล่มที่ 10.3 (supplement) ได้ยอมรับวิธีใหม่เพิ่มอีก 1 วิธีคือ Recombinant Factor C (rFC) เป็นการนำสารสังเคราะห์ rFC⁵ เป็นวิธีทางเลือกแทนการใช้ Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ซึ่งเป็น reagent

ที่สกัดมาจากแมงดาทะเล เพื่อลดการใช้สัตว์และป้องกันการขาดแคลนของ LAL ในอนาคต และมีแนวโน้มที่ผู้ผลิตยาสีววัตถุทั้งในประเทศและต่างประเทศจะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์มากขึ้น ดังนั้น บทความนี้จึงนำเสนอข้อมูลความเป็นมาของการทดสอบโดยวิธี LAL และสถานการณ์ปัจจุบันของการนำวิธีทางเลือกใหม่ของ rFC มาใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพยาสีววัตถุ เพื่อจุดประกายให้ประเทศไทยก้าวทันต่อเทคโนโลยีที่เปลี่ยนแปลงไป และตอบรับกระแสลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์

แนวทางการทดสอบปริมาณเอนโดท็อกซินในห้องปฏิบัติการ

Bacterial endotoxin ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ จัดเป็นสารพิษหรือสารก่อไข้ที่พบบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) เมื่อเซลล์ถูกทำลายจะปล่อย

สารพิษออกมาเป็นสารกลุ่มไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี⁶ ทำให้เกิดอาการไข้ภายในร่างกาย (pyrogenicity) เนื่องจากเอนโดท็อกซินไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว⁷ ดังรูปที่ 1 การหลั่งสารที่มีผลต่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย ทำให้อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น นอกจากนี้ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเลือด (blood change) มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงชั่วคราวแล้วเพิ่มจำนวนสูงขึ้น สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelet) โดยมีผลให้เกล็ดเลือดปล่อยสารที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดภายในเส้นเลือดฝอย เกิดการบวมน้ำและเลือดออกได้ และมีการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของเลือด⁸⁻¹⁰ เมื่อร่างกายได้รับการฉีดยาชีววัตถุที่มีการปนเปื้อนเอนโดท็อกซินเข้าสู่ร่างกายจะไปทำปฏิกิริยากับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ แต่ไม่จำเป็นเสมอไปว่าอาการต่าง ๆ ที่เกิดจากการได้รับสารก่อไข้หรือไพโรเจน จะจำกัดเฉพาะที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารก่อไข้พบมาจากหลายแหล่ง⁶ แต่มีรายงานว่าสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรียแกรมลบถึงร้อยละ 50 - 60¹¹ ดังนั้น การทดสอบปริมาณเอนโดท็อกซินในผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุ จึงมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตยาชีววัตถุและเครื่องมือแพทย์



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการเกิดไข้เมื่อได้รับสารพิษหรือสารก่อไข้

ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานที่ควบคุมกำกับการผลิตภัณฑ์ยาชีววัตถุและเครื่องมือแพทย์ระดับโลก เช่น U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA)¹² European Medicines Agency (EMA)¹³

รวมไปถึง World Health Organization (WHO)¹⁴ และหน่วยงานที่จัดทำตำรายาสากลต่าง ๆ (Pharmacopoeia) จึงกำหนดให้ต้องทดสอบการปนเปื้อนของสารก่อไข้ในกลุ่มยาที่ให้โดยผ่านการฉีด (parenteral drug) ซึ่งในอดีตมีการทดสอบสารก่อไข้โดยวิธีการทดสอบกับกระต่ายที่พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1912 โดย Hort and Pentold โดยการฉีดสารละลายเข้าไปในกระต่าย และอ่านผลจากการวัดอุณหภูมิของกระต่ายในระยะเวลาที่กำหนด ต่อมาได้รับการยอมรับจนถูกบรรจุเป็นวิธีมาตรฐานในตำรายาสากล United States Pharmacopoeia (USP) บทที่ 151 Rabbit pyrogen test ปี ค.ศ. 1942¹⁵

แต่ด้วยวิธีทดสอบกับกระต่ายนั้น พบข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ความแปรปรวนของผลการทดสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้สัตว์ทดลองในแต่ละตัวไม่เท่ากัน การใช้ระยะเวลาในการทดลอง จำนวนหรือปริมาณของสัตว์ทดลอง พื้นที่ที่ใช้ค่อนข้างมาก และมียาบางกลุ่มที่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้¹⁶ จึงมีการพัฒนาวิธีใหม่ ๆ มาใช้ทดสอบ โดยในปี ค.ศ. 1968 Levin และ Bang นักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจอห์น ฮอปกินส์ พบการตายของแมงดาทะเลสายพันธุ์แอตแลนติก (Horseshoe crab, *Limulus polyphemus*) เป็นจำนวนมากตามชายฝั่งทะเลโดยเลือดสีน้ำเงินของแมงดาทะเลมีการจับตัวเป็นก้อน

เมื่อนำเลือดไปเพาะเชื้อพบแบคทีเรียชนิดแกรมลบ จึงทำการวิจัยจนพบว่าปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนโดท็อกซินจากแบคทีเรียแกรมลบและอะมีบไซต์ไลเซต (amebocyte

lysate) ของแมงดาทะเล จึงได้ทำการสกัดสารจากเซลล์อะมีโบไซต์ (amebocyte cell) นำไปเตรียมเป็นน้ำยาทดสอบ LAL โดยปฏิกิริยาจะเกิดการแข็งตัวเมื่อ LAL ทำปฏิกิริยากับเอนโดท็อกซินในปริมาณเพียงเล็กน้อย ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 Levin และ Cooper ได้ทดสอบหาสารไพโรเจนในสารเภสัชซึ่งใช้ที่ใช้ในทางการแพทย์ที่ไม่สามารถใช้วิธีกระต่ายได้ จึงได้ทดลองนำน้ำยา LAL มาทำการทดสอบ¹⁵⁻¹⁷ จนในปี ค.ศ. 1980 USP กำหนดให้ LAL เป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งเพิ่มเติมจากการทดสอบโดยใช้กระต่ายใน USP บทที่ 85 bacterial endotoxin test และในตำรายาสากลและข้อกำหนดอื่น ๆ ได้แก่ Ph. Eur บทที่ 2.6.14 bacterial endotoxins และ WHO หัวข้อ 3.4 test for bacterial endotoxins เป็นต้น ปัจจุบันเทคนิคการทดสอบเอนโดท็อกซินโดยวิธี LAL มี 3 วิธี ได้แก่ gel clot method โดยดูปฏิกิริยาการแข็งตัวเป็นเจล วิธี turbidimetric kinetic method และวิธี chromogenic kinetic method ซึ่งเป็นการวัดปฏิกิริยา ความขุ่น และสีตามลำดับ

กระแสนุรักษ์นำไปสู่การพัฒนาวิธีการเลือก

ด้วยการทดสอบหาปริมาณเอนโดท็อกซินโดยวิธี LAL ทำได้ง่าย ใช้พื้นที่ วัสดุ อุปกรณ์น้อย รวดเร็วกว่าการทดสอบในกระต่าย สามารถทดสอบในสารรังสีหรือยาอื่น ๆ ที่วิธีกระต่ายไม่สามารถทดสอบได้ และถึงแม้วิธีนี้จะตรวจสอบได้เฉพาะสารก่อไข้จากเอนโดท็อกซินที่มาจากแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น แต่สารไพโรเจนส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียแกรมลบ จึงมีความต้องการสาร LAL สูงขึ้นตามการเติบโตของอุตสาหกรรมการผลิต¹⁸ ทำให้กลุ่มอนุรักษ์ต่าง ๆ เข้ามารณรงค์การอนุรักษ์แมงดาทะเลสายพันธุ์แอตแลนติกที่ถูกจับไปผลิต LAL มากกว่า 500,000 ตัวต่อปี¹⁹ ดังตัวอย่างของบทความต่าง ๆ ที่เรียกร้องการอนุรักษ์แมงดาทะเล

สายพันธุ์แอตแลนติกและสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *The Blood Harvest, the Atlantic*²⁰, *The Narrow Edge: A Tiny Bird, an Ancient Crab, and an Epic Journey*²¹, *Medical Labs May Be Killing Horseshoe Crabs*²², *The Last Days of the Blue-Blood Harvest*²³, *Inside the Biomedical Revolution to Save Horseshoe Crabs and the Shorebirds That Need Them*²⁴

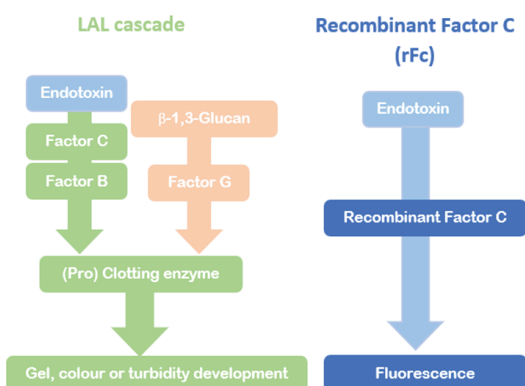
การจับแมงดาทะเลแต่ละตัวจะถูกจับเพื่อเก็บเลือด ร้อยละ 25 - 40 จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อหรือปล่อยกลับสู่ธรรมชาติ ซึ่งร้อยละ 8 - 30 มักไม่รอดชีวิต โดยที่ LAL ประมาณ 1 ลิตร ต้องใช้แมงดาทะเลตัวผู้ประมาณ 244 ตัว หรือตัวเมีย 96 ตัว²⁵ แต่หน่วยงานสากลต่าง ๆ ที่ตอบรับกระแสการอนุรักษ์นี้จึงได้นำหลักการต่าง ๆ มาใช้ หนึ่งในหลักการที่สำคัญคือ การใช้สัตว์เพื่องานทดลองทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับอย่างเป็นทางการของ Russell and Burch's the principles of humane experimental technique หรือหลักการ 3Rs ของ Russell และ Burch ที่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1959 หลักการนี้ว่าด้วยการพยายามลดจำนวนสัตว์ทดลองที่ต้องใช้ให้มากที่สุด (reduction) หากจำเป็นต้องใช้สัตว์ต้องคำนึงถึงสวัสดิภาพของสัตว์ (refinement) โดยสถานที่ต้องไม่คับแคบ ปลอดภัย มีอาหารและน้ำเพียงพอ และข้อสุดท้ายคือการใช้วิธีอื่นทดแทนสัตว์ทดลอง (replacement) เช่น ใช้เซลล์ เนื้อเยื่อ หรือสารสังเคราะห์แทนการใช้สัตว์ หรือเลือกการทดลองที่ไม่ใช้สัตว์หากผลการทดสอบที่ได้ไม่ต่างกัน²⁶ และในปี ค.ศ. 2010 สหภาพยุโรป (European Union: EU) ได้ออกกฏบัญญัติ Directive 2010/6327 ที่รับหลักการ 3Rs นี้มาใช้หากองค์กรหรือประเทศใดต้องดำเนินงานร่วมกับสหภาพยุโรป

ด้วยเหตุนี้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ และกลุ่มอุตสาหกรรมการผลิตยา ต้องพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ใหม่ในการตรวจการปนเปื้อนของสารก่อไข้แทนวิธีการใช้กระต่าย และการทดสอบปริมาณเอนโดท็อกซินที่ใช้ LAL ที่สกัดจากแมงดาทะเล ซึ่งหนึ่งในวิธีที่ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงจนเป็นที่ยอมรับในระดับสากลว่า ผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ LAL คือ วิธีการใช้ rFC ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบคุณสมบัติของ LAL ที่ได้จากเลือดของแมงดาทะเล²⁸

วิธีทางเลือกใหม่ในการทดสอบปริมาณเอนโดท็อกซินด้วย rFC

นับตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1970 หน่วยงานวิทยาศาสตร์แห่งชาติสิงคโปร์ได้สังเคราะห์สารเลียนแบบ LAL เพื่อทดแทนสารจากเลือดแมงดาทะเลและได้จดสิทธิบัตร²⁹ ต่อมาเรียกสารดังกล่าวว่า Recombinant Factor C (rFC) โดยมีหลักการการเกิดปฏิกิริยาต่อเอนโดท็อกซิน เมื่อเปรียบเทียบกับ LAL ดังรูปที่ 2

หลักการวิธี LAL คือ เอนโดท็อกซินในตัวอย่างจะไปกระตุ้น factor C ที่มีอยู่ใน LAL lysate ให้เปลี่ยนเป็น activated factor C เพื่อไปกระตุ้น factor B ให้เป็น activated factor B ซึ่งไปกระตุ้นให้ proclotting enzyme กลายเป็น clotting enzyme เพื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นให้สามารถ



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่างการทดสอบโดยใช้วิธี LAL และ rFC³⁰

วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี คือ (1) การวัดปฏิกิริยาการเกิดสี (chromogenic kinetic method) (2) การวัดปฏิกิริยาความขุ่น (turbidimetric kinetic method) และ (3) การเกิดเจล (gel clot method) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ สำหรับ rFC จะทำปฏิกิริยากับเอนโดท็อกซินกลายเป็น activated rFC และเมื่อเติม fluorogenic substrate จะสามารถวัดปฏิกิริยาได้³¹⁻³² ซึ่งพบการนำวิธี rFC มาพัฒนาเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบการปนเปื้อนของเอนโดท็อกซิน ตัวอย่างของการศึกษาที่เปรียบเทียบระหว่างสองวิธีดังกล่าวเป็นการตรวจเอนโดท็อกซินในวัคซีนไฝนบ้าน³³

จากนั้นเริ่มมีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีตรวจสอบปริมาณเอนโดท็อกซินในยาชีววัตถุกลุ่มยาโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองวิธี ด้วยวิธี gel-clot method, turbidimetric kinetic method และ chromogenic method³⁴ ต่อมาจึงมีการใช้ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ นอกจากนั้นยังมีรายงานผลการศึกษาระหว่างทั้งสองวิธีหลายฉบับ เช่น การพัฒนาวิธีตรวจยาฉีดกลุ่มยาโปรตีนที่ศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น การศึกษาเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์วัคซีนที่มีคุณสมบัติและมีส่วนประกอบที่มีความหลากหลาย ได้แก่ วัคซีนที่มีองค์ประกอบของโปรตีนสูง วัคซีนที่ไม่มีองค์ประกอบของสารรบกวนต่อการทดสอบเอนโดท็อกซิน วัคซีนที่มีเอนโดท็อกซินปนเปื้อนเป็นปกติ และวัคซีนที่มีสีเข้มที่มักจะไม่สามารถวิเคราะห์ผลโดย chromogenic method ได้เนื่องจากเกิดการรบกวนของสี การศึกษาในน้ำสำหรับยาฉีด (water for injection) การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการที่ทดสอบโดยใช้ LAL และ rFC ในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ให้ผลที่สอดคล้องกันระหว่าง rFC และ LAL³⁵⁻³⁸ ข้อดีในการใช้ rFC คือ เนื่องจากเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ดังนั้นการผลิตรุ่นต่อรุ่น (batch to batch) จึงมีความสม่ำเสมอ มีความเสถียรมากกว่าสาร LAL จากธรรมชาติ และสามารถกำจัด

ปฏิกิริยารบกวนของ Beta-glucan ที่ทำให้เกิดผลบวกปลอมเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LAL ในยาชีววัตถุที่พบ glucan ซึ่งเมื่อใช้วิธี rFC จะไม่เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว

สำหรับหน่วยงานที่ทำหน้าที่ควบคุมกำกับคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยา ได้แก่ U.S. FDA ได้ออกคำแนะนำ guidance for industry: pyrogen and endotoxins testing: questions and answers ปี ค.ศ 2012 แทนเอกสารฉบับปี 1987 ซึ่งระบุว่าการใช้วิธี rFC เป็นวิธีที่ U.S. FDA ให้การยอมรับ โดยที่ห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีนี้ไปใช้ต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม USP บทที่ 1225 validation of compendial methods ก่อน ส่วนใน EU ได้เผยแพร่บทที่แก้ไขใน Ph. Eur. เพื่อให้วิธี rFC เป็นวิธีทางเลือกเพื่อตอบสนองหลักปฏิบัติสำหรับหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองทดแทน LAL ซึ่งใช้สารที่สกัดจากสัตว์ และวิธีการทดสอบไพโรเจนในกระต่าย ซึ่งปัจจุบันใช้ Ph. Eur เล่มที่ 10.3 บทที่ 2.3.32 ปี ค.ศ. 2021 ให้ถือว่าวิธีนี้เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาเอนโดท็อกซินอย่างเป็นทางการ³⁹

จากความวิตกกังวลถึงปัญหาการขาดแคลนของ LAL ซึ่งมาจากความต้องการใช้มากขึ้นอย่างต่อเนื่องจนไม่เพียงพอต่ออุตสาหกรรมการผลิตยาทั่วโลก ส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรแมงดาทะเลที่ลดลง ในหลายปีที่ผ่านมาจึงมีความพยายามพัฒนาวิธีอื่นทดแทนเพื่อลดการใช้สัตว์ การใช้สารสังเคราะห์ rFC จากเดิมที่มีผู้ผลิต rFC เพียงรายเดียว จนเมื่อสิทธิบัตรหมดอายุลงในปี ค.ศ. 2017 ส่งผลให้มีผู้ผลิตชุดทดสอบที่ใช้ rFC จำหน่ายมากขึ้นในท้องตลาด เช่น Hyglos /bioMérieux, Lonza, Seikagaku ทำให้ลดความกังวลถึงภาวะการขาดตลาดของน้ำยา rFC และเนื่องจาก rFC ได้จากกระบวนการสังเคราะห์จึงสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก วิธีการมีความเสถียร จึงมีความยั่งยืนมากกว่า LAL⁴⁰ สะท้อนจากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ต่าง ๆ ที่นำวิธีการหาปริมาณ

เอนโดท็อกซินโดย rFC มีจำนวนเพิ่มขึ้น และยังพบว่าเป็นที่ยอมรับและเป็นการส่งเสริมแนวปฏิบัติสากลตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์เพื่องานทดลองวิทยาศาสตร์ด้วย ซึ่งในปี ค.ศ. 2018 U.S. FDA ได้อนุมัติยา Galcanezumab สำหรับรักษาไมเกรนในผู้ใหญ่โดยเป็น ยาในกลุ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เป็นชนิดแรกที่มีการทดสอบเอนโดท็อกซิน โดยใช้ rFC แทน LAL แบบดั้งเดิม ปัจจุบันมีการขึ้นทะเบียนแล้วในอีกหลายประเทศ

ตามที่ Ph. Eur. ได้ประกาศให้วิธี rFC เป็นวิธีทางเลือกอย่างเป็นทางการ⁴¹ โดย USP ยังอยู่ในช่วงศึกษาเพิ่มเติมและคาดว่าจะประกาศอย่างเป็นทางการในฉบับใหม่⁴² สำหรับตำรายาประเทศญี่ปุ่น (Japanese Pharmacopoeia: JP) ที่จัดทำโดย Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) ได้เผยแพร่ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธี LAL และ rFC ซึ่งให้ผลการทดสอบที่เท่าเทียมกัน⁴³ ขณะที่ตำรายาประเทศจีน (Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Ch.P) ได้จัดทำแนวทางเบื้องต้นออกมารองรับและจะประกาศอย่างเป็นทางการเมื่อมีการประกาศใช้ฉบับใหม่ และถึงแม้ปัจจุบันการทดสอบสารก่อไข้จะมีวิธี Monocyte Activation Test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงและหาปริมาณสารก่อไข้โดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง โดยสามารถทดสอบสารก่อไข้ครอบคลุมกว่าวิธี rFC หรือ LAL และปัจจุบันได้มีการประกาศให้วิธีนี้เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งใน Ph. Eur. บทที่ 2.6.30 ด้วย⁴⁴ แต่วิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมเท่าวิธี rFC เพราะมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อครั้งค่อนข้างสูง และการทดสอบแต่ละครั้งใช้เวลานานกว่า และจากที่พบว่าสารก่อไข้มาจากแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ หากห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทั่วโลกสามารถนำสารสังเคราะห์ที่ทดแทน LAL เช่น rFC มาใช้ได้ คาดว่าในอนาคตจะสามารถลดการใช้เลือดแมงดาทะเลได้ถึงร้อยละ 95¹⁹

บทสรุป

การทดสอบสารพิษก่อไข้ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตยาชีววัตถุเป็นการทดสอบที่สำคัญเพื่อให้ผู้รับยาชีววัตถุมีความปลอดภัยและเพื่อรับผลิตภัณฑ์ที่มีมาตรฐาน มีวิธีทดสอบดั้งเดิมแบบ LAL ในกระต่าย ต่อมาใช้วิธีเดียวกันแต่ได้จากเลือดแมงดาทะเล แต่มีข้อจำกัดของจำนวนแมงดาทะเลและกระแสนุรักษ์นิยม จึงมีการพัฒนาวิธี rFC ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบคุณสมบัติของ LAL ที่ได้จากเลือดแมงดาทะเล ซึ่งเทียบเท่ากับวิธี LAL สามารถตรวจสอบคุณภาพยาชีววัตถุและสามารถปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์ได้เช่นเดียวกับวิธี LAL สำหรับการประกอบการขึ้นทะเบียน การรับรองรุ่นการผลิต และการเฝ้าระวังหลังการจำหน่ายออกสู่ตลาดของยาชีววัตถุได้

เอกสารอ้างอิง

1. Silveira RL, Andrade SS, Schmidt CA, Casali RG, Dalmora SL. Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products. *Braz.J Microbiology* 2004;35(1-2):48-53. doi: 10.1590/S1517-83822004000100007.
2. European Directorate for Quality of Medicine & Healthcare of the Council of Europe. European pharmacopoeia 10.0: bacterial endotoxins. Strasbourg: Council of Europe; 2019. p. 209-213.
3. European Directorate for Quality of Medicine & Healthcare of the Council of Europe. European pharmacopoeia 10.0: guidelines for using the test for bacterial endotoxins. Strasbourg: Council of Europe; 2019. p. 639-642.
4. U.S. Pharmacopoeia National Formulary. <85> Bacterial endotoxins test. In: USP43–NF38 [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 23]. Available from: <https://www.usp.org/harmonization-standards/pdg/general-methods/bacterial-endotoxins>
5. European Directorate for Quality of Medicine & Healthcare of the Council of Europe. European pharmacopoeia 10.3: Test for bacterial endotoxins using recombinant factor c. Strasbourg: Council of Europe; 2021. p. 4776-7.
6. Hartung T, Borel A, Schmitz G. Detecting the broad spectrum of pyrogens with the human whole-blood monocyte activation test [Internet]. NY: BioProcess International. 2016 [cited 2021 Mar 23]. 14(3):38-56. Available from: <https://bioprocessintl.com/analytical/downstream-validation/detecting-the-broad-spectrum-of-pyrogens-with-the-human-whole-blood-monocyte-activation-test/>
7. Sastalla I, Monack DM, Kubatzky KF. Bacterial exotoxins: how bacteria fight the immune system. *Front. Immunology* 2016;7:300. doi: 10.3389/fimmu.2016.00300.
8. Sandle T. Endotoxin and Pyrogen Testing. In *pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control*. New Delhi: Woodhead. 2015. p. 131-145.
9. Williams KL. Endotoxin detection and control in pharma, limulus, and mammalian systems. Springer: Cham; 2019. p. 95-155.
10. Albertus B, Lambertus GT. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research* 2003;9(1):3-24. doi:10.1177/09680519030090010101.
11. Rangel-Frausto MS. The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13(2): 299-312. doi: 10.1016/s0891-5520(05)70076-3. PMID: 10340168.
12. Department of Health and Human Services. Guidance for industry pyrogen and endotoxins testing: questions and answers [Internet]. Washington DC: U.S. FDA; 2012 [cited 2021 Feb 13]. Available from: <https://www.fda.gov/media/83477/download>
13. European Medicines Agency. ICH guideline Q4B annex 14 to note for evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on bacterial endotoxins tests – general chapter [Internet]. London: EMA; 2013 [cited 2021 Feb 13]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en.pdf

14. World Health Organization. 3.4 Test for bacterial endotoxins [Internet]. Geneva: WHO; 2012 [cited 2021 Feb 13]. Available from: https://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Bacterial-endotoxins_QAS11-452_FINAL_July12.pdf
15. Dubczak J. Past, present, and future of endotoxin testing [Internet]. American Pharmaceutical Review; 2020 [cited 2021 Mar 23]; 23(7):40-43. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/571720-Past-Present-and-Future-of-Endotoxin-Testing/>
16. จิตติพร ภาควิชาเภสัชศาสตร์. การทดสอบสารไพโรเจนในผลิตภัณฑ์ยาฉีดปราศจากเชื้อ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554;21(1):37-40.
17. Gorman R. Atlantic horseshoe crabs and endotoxin testing: perspectives on alternatives, sustainable methods, & the 3Rs (replacement, reduction and refinement). *Front. Mar. Sci.* 2020; 7:833. doi: 10.3389/fmars.2020.582132.
18. Krisfalusi GJ, Ali W, Dellinger K, Robertson L. The role of horseshoe crabs in the biomedical industry and recent trends impacting species sustainability. *Front. Mar. Sci.* 2018;5:185. doi: 10.3389/fmars.2018.00185.
19. Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS Biol.* 2018;16(10):1-15. doi: 10.1371/journal.pbio.2006607.
20. Madrigal AC. The blood harvest [Internet]. Washington DC; The Atlantic; 2014 [cited 2021 Feb 24]. Available from: <https://shapeoflife.org/sites/default/files/global/the-blood-harvest-technology-the-atlantic.pdf>
21. Kocek AR. The narrow edge: a tiny bird, an ancient crab, and an epic journey. *The Condor: Ornithological Applications* 2018;120:247-248. doi: 10.1650/CONDOR-17-228.1.
22. Chesler C. Medical labs may be killing horseshoe crabs. *Scientific American* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 24]. Available from: <https://www.scientificamerican.com/article/medical-labs-may-be-killing-horseshoe-crabs/>
23. Zhang S. The last days of the blue-blood harvest [Internet]. Washington DC: The Atlantic; 2018 [cited 2021 Feb 24]. Available from: <https://www.theatlantic.com/science/archive/2018/05/blood-in-the-water/559229/>
24. Deborah C. Inside the biomedical revolution to save horseshoe crabs and the shorebirds that need them [Internet]. NY: Audubon; 2018 [cited 2021 Feb 24]. Available from: <https://www.audubon.org/magazine/summer-2018/inside-biomedical-revolution-save-horseshoe-crabs>
25. Rebecca LA, Winsor HW, Christopher CC. Sub-lethal behavioral and physiological effects of the biomedical bleeding process on the American horseshoe crab, *limulus polyphemus*. *Bio Bull* 2013;225(3):137-151. doi: 10.1086/BBLv225n3p137.
26. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique [Internet]. London: Methuen; 1959 [cited 2021 Feb 28]. Available from: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>
27. The European Union. Directive 2010/63/ EU of The european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Journal of the European Union* [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
28. Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing. *Trends in Biotechnol* 2001 Aug;19(8):277-81. doi: 10.1016/s0167-7799(01)01694-8. PMID: 11451451.
29. Ding J, Ho B. Cloned factor C cDNA of the Singapore horseshoe crab, *carinoscorpius rotundicauda* and purification of factor C proenzyme [Internet]. US Patent; 1998 No. 5712144. [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c0/d7/95/290092910d8823/US5712144.pdf>

30. Piehler M, Roeder R, Blessing S, Reich J. Comparison of LAL and rFC assays participation in a proficiency test program between 2014 and 2019. *Microorganisms* 2020;8(3):418. doi: 10.3390/microorganisms8030418. PMID: 32188126; PMCID: PMC7143553.
31. Bolden J. Recombinant factor C in endotoxin detection and control in pharma, limulus, and mammalian systems. Springer: Cham; 2019. doi: 10.1007/978-3-030-17148-3_13.
32. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection—from limulus amoebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem* 2010;53:187-208. doi: 10.1007/978-90-481-9078-2_9. PMID: 20593268.
33. Alwis KU, Milton DK. Recombinant factor C assay for measuring endotoxin in house dust: comparison with LAL, and (1→3)-beta-D-glucans. *Am J Ind Med* 2006 Apr;49(4):296-300. doi: 10.1002/ajim.20264. PMID: 16550568.
34. Chen L, Mozier N. Comparison of limulus amoebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions. *J Pharm Biomed Anal* 2013 Jun; 80:180-5. doi: 10.1016/j.jpba.2013.03.011. Epub 2013 Mar 26. PMID: 23584077.
35. Bolden J, Smith K. Application of recombinant factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. *PDA J Pharm Sci Technol* 2017;71(5):405-412. doi: 10.5731/pdajpst.2017.007849. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28733334.
36. Marius M, Vacher F, Bonnevey T. Comparison of LAL and recombinant factor C endotoxin testing assays in human vaccines with complex matrices. *PDA J Pharm Sci Technol* 2020;74(4): 394-407. doi: 10.5731/pdajpst.2019.010389. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32179709.
37. Marius M, Vacher, F, Bonnevey T. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices. *Biologicals* 2020 Sep;67:49-55. doi: 10.1016/j.biologicals.2020.07.001. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32753293.
38. Dubczak J, Reid N, Tsuchiya M. Evaluation of limulus amoebocyte lysate and recombinant endotoxin alternative assays for an assessment of endotoxin detection specificity. *Eur J Pharm Sci* 2021 Apr 1;159:105716. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105716. Epub 2021 Jan 14.
39. Council of Europe. Recombinant factor C: new Ph. Eur. chapter available as of 1 July 2020 [Internet]. Strasbourg: Council of Europe; 2020 [cited 2021 Mar 23] Available from: <https://www.edqm.eu/en/news/recombinant-factor-c-new-ph-eur-chapter-available-1-july-2020>
40. Bolden J, Knutsen C, Levin J, Milne C, Morris T, Mozier N, von Wintzingerode F. Currently available recombinant alternatives to horseshoe crab blood lysates: are they comparable for the detection of environmental bacterial endotoxins? a review. *PDA J Pharm Sci Technol* 2020;74(5):602-611. doi: 10.5731/pdajpst.2020.012187. Epub 2020 Aug 14. PMID: 32817324.
41. U.S. Pharmacopoeia National Formulary. USP provides guidelines for recombinant factor C (rFC) a non-animal-derived reagent critical to development of vaccines and other sterile pharmaceutical products [Internet]. MD: US Pharmacopeial Convention; 2020 [cited 2021 Mar 23] Available from: <https://www.usp.org/news/rfc-horseshoe-crabs-statement>
42. Loverock B, Simon B, Burgenson A, Baines A. A recombinant factor C procedure for the detection of gram-negative bacterial endotoxin. *Pharmacopeial Forum* 2010;36(1):321-329.
43. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japanese Pharmacopeia: bacterial endotoxins test and alternative methods using recombinant protein-reagents for endotoxin assay [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 23]. Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000231653.pdf>
44. European Directorate for Quality of Medicine & Healthcare of the Council of Europe. European Pharmacopoeia 10.0: 2.6.30 monocyte activation test. Strasbourg: Council of Europe; 2019. p. 233-39.