

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม – เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 1 (2024): January – April

การตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์รังไข่หนูแฮมสเตอร์จีน

อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: อภิชัย ศุภสารสาทร สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
apichai.s@dmisc.mail.go.th

Specific Toxicity Testing of Residual Pertussis Toxin in Acellular Pertussis Vaccine Using Chinese Hamster Ovary Cells

Apichai Supasansatorn¹, Supaporn Chumpol¹, Sukanlayanee Chaimee¹, Wereyamarst Jaroenkunathum¹,
Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Apichai Supasansatorn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, apichai.s@dmisc.mail.go.th**Received:** 8 August 2022, **Revised:** 6 March 2024, **Accepted:** 15 March 2024

Abstract

Background: Pertussis is prevented by a combined acellular pertussis vaccine that contains Pertussis Toxoid (PTs) and Filamentous Haemagglutinin (FHA) as the main constituents. PTd is an inactivated Pertussis toxin (PT). The specific toxicity test of residual PT remaining in the vaccine must be controlled in order to meet the standard requirements to ensure the safety of vaccines. Some traditional methods were tested toxicity in mice which caused animal suffering. Therefore, the alternative CHO cell assay was developed for replacement of animal testing by In vitro assay following 3Rs concept. CHO-K1 cells had a specific response to PT. Then, the exposure of residual PT caused CHO-K1 cells morphological changes to rosette their shapes.

Objectives: To develop and use this as the alternative method for the determination of specific toxicity of PT in the combined vaccine which contains acellular pertussis by Chinese Hamster Ovary (CHO) cell assay by monitoring residual PT in finished product.

Methods: A validation method study of specific toxicity of PT in combined vaccine which contains acellular pertussis by CHO cell assay was conducted. The qualitative assay was examined in two parameters of specificity and limits of detection which was based on the international ICH guideline. One sample of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, acellular pertussis combined vaccine (Tdap) was used to study optimal conditions and examined the validity of the method.

Results: The results of validation with pertussis toxin (JN1H-5, NIBSC) were proved that the methods were specific to pertussis toxin that showed rosette-shaped clusters of CHO cells. The lowest limit of detection of pertussis toxin was 0.0015 IU/mL. One sample of Diphtheria -Tetanus - acellular Pertussis Vaccine combined vaccine was removed adjuvant and was tested by CHO cell assay. The negative presented results indicated that the vaccine sample absented residual pertussis toxin.

Conclusion: This assay was appropriate to be adapted as a standard method for specific toxicity based on residual pertussis toxin in a combined vaccine containing acellular pertussis in both local and imported vaccine products.

Keywords: acellular pertussis vaccine, pertussis toxin, specific toxicity, Chinese Hamster Ovary (CHO) cell

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: โรคไอกรนสามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Acellular pertussis: aP) ที่มี Pertussis toxoid (PTd) และ Filamentous Haemagglutinin (FHA) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่ง PTd คือท็อกซอยด์ที่ได้มาจากการทำให้ Pertussis toxin (PT) หมดความเป็นพิษลง เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของวัคซีน จึงต้องควบคุมระดับความเป็นพิษจาก PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในวัคซีน ให้ตามข้อกำหนดมาตรฐาน โดยการทดสอบ Specific toxicity ที่ใช้หนูถีบจักรเป็นสัตว์ทดลอง (*In vivo*) แต่ก่อให้เกิดความทรมานต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้นวิธีทางเลือก Chinese Hamster Ovary (CHO) cell assay จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อทดแทนการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3R โดยเซลล์ CHO-K1 มีความจำเพาะต่อ PT หากพบ PT หลงเหลืออยู่ ส่งผลทำให้เซลล์ CHO-K1 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเกาะกลุ่มคล้ายรูปดอกกุหลาบ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนรวมสำเร็จรูปที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบโดยใช้วิธีทางเลือก CHO cell assay สำหรับใช้ตรวจติดตามท็อกซินไอกรนที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีน

วิธีการวิจัย: ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO cells ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบในเชิงคุณภาพจึงดำเนินการศึกษาความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ คือ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี และขีดจำกัดของการตรวจพบ โดยอ้างอิงตามข้อกำหนดสากล ICH guideline เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมและความถูกต้องของวิธี และดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวม Tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, acellular pertussis vaccine (Tdap) จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐานท็อกซินไอกรน (JN1H-5, NIBSC) พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อท็อกซินไอกรน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และขีดจำกัดของปริมาณ PT ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจากการอ่านผลการทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.0015 IU/mL และเมื่อนำวิธีมาใช้ทดสอบกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์ จำนวน 1 ตัวอย่างที่กักตุนเสริมฤทธิ์ออก พบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าวัคซีนตัวอย่างไม่มีท็อกซินไอกรนหลงเหลือ

สรุป: วิธีการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO cell มีความจำเพาะเหมาะสมสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไกรนชนิดไร้เซลล์ทั้งผลิตภัณฑ์วัคซีนภายในประเทศและนำเข้ามาจากต่างประเทศได้

คำสำคัญ: วัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ ที่อกซินไกรน ความเป็นพิษเฉพาะ เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese Hamster Ovary (CHO)

บทนำ

โรคไกรน (Pertussis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* ซึ่งก่อโรคในคนเท่านั้น โรคไกรนในเด็กโตและผู้ใหญ่ มักมีอาการไม่รุนแรง และแยกได้ยากจากการติดเชื้ออื่น ๆ ที่ทำให้มีอาการของระบบทางเดินหายใจ แต่ในเด็กเล็กอาการไกรจะรุนแรงจนหยุดหายใจ และมีอาการไอแบบ paroxysms (ไอเป็นชุด ๆ อย่างรุนแรง) อาการหายใจเข้ามีเสียงดัง (whooping) และจากข้อมูลรายงานผู้ป่วยสงสัยโรคคอตีบในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 พบว่าได้รับรายงานผู้ป่วยจำนวน 32 ราย อัตราป่วย 0.01 ต่อประชากรแสนคน โดยมีผู้ป่วยเสียชีวิต 1 ราย¹

วัคซีนไกรนผลิตจากแอนติเจนของเชื้อไกรนที่นำมาผลิตวัคซีน ได้แก่ Pertussis toxin (PT), Filamentous hemagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) และ Fimbria agglutinin (FIM) ซึ่งวัคซีนมี 2 ชนิด ได้แก่ วัคซีนไกรนชนิดทั้งตัวเซลล์ (whole cell: wP) และวัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular: aP) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจากส่วนสารสกัดเฉพาะบางส่วนของตัวเชื้อไกรน

ตั้งแต่ 2 ถึง 4 ส่วนประกอบที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยจะมี PT และ FHA เป็นส่วนประกอบหลัก และใช้ร่วมกับที่อกซอยด์ของเชื้อคอตีบและบาดทะยักเป็นวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-ไกรนชนิดไร้เซลล์ (Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: Tdap) ข้อดีของวัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ (aP) อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้วัคซีนน้อยกว่าวัคซีนชนิดทั้งเซลล์ (whole cell)¹

ในการผลิตวัคซีนต้องผ่านการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนทางห้องปฏิบัติการจากผู้ผลิต และผ่านการทดสอบด้านความปลอดภัย (safety) การทดสอบด้านประสิทธิภาพ (efficacy) และการทดสอบด้านเคมี-กายภาพ (Physical-chemistry) และได้รับการอนุญาตขึ้นทะเบียนจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ทั้งนี้วัคซีนของแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความหลากหลายของสายพันธุ์ตัวเชื้อไกรน วิธีที่ใช้ในการผลิต วิธีการทำให้ PT หมดพิษ (detoxified) กลายเป็น Pertussis toxoid (PTxd) และปริมาณ PT และ

FHA ที่ใช้ผลิตวัคซีน ทำให้วัคซีนมีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ต่างกัน (product-specification) ส่งผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนที่ผู้บริโภครจะได้รับ การควบคุมคุณภาพวัคซีน

อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้านความปลอดภัย และประสิทธิภาพของวัคซีน จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมากในการทดสอบต่อครั้ง เพื่อการทดสอบความเป็นพิษ (Abnormal toxicity) ความเป็นพิษเฉพาะ (Specific toxicity) และความแรงหรือการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Potency/Immunogenicity test) ของวัคซีน ดังนั้นการลดการใช้สัตว์ทดลองลงในการทดสอบผลิตภัณฑ์ เป็นเรื่องที่ต้องดำเนินการให้สอดคล้องตามหลักนโยบาย 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) ที่ ลด ละ เลิก การใช้สัตว์ทดลอง² ซึ่งการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese Hamster Ovary (CHO)⁴⁻⁵ เป็นการทดสอบที่สามารถนำมาปรับใช้แทนวิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่ใช้สัตว์ทดลอง โดยการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ โดยใช้เซลล์ CHO-K1 ที่ใช้ในการตรวจหา pertussis toxin (PT) ที่อาจหลงเหลืออยู่ใน purified pertussis bulk หลังจากผ่านกระบวนการทำให้หมดพิษ (detoxification) โดยองค์การอนามัยโลก³ กำหนดให้เป็นวิธีทดสอบ

ทางเลือกสำหรับติดตามความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์ (in-house monitoring pertussis toxicity) แต่มีข้อจำกัดของวิธีคือ สารเสริมฤทธิ์ (Aluminium adjuvant) ในวัคซีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ CHO-K1 จึงเป็นที่มาในการพัฒนาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนที่ใช้ทดสอบในวัคซีน (final product) เพื่อใช้ทดแทนการทดสอบในสัตว์ทดลองตามหลัก 3Rs และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในผลิตภัณฑ์วัคซีนรวมสำเร็จรูปได้ โดยปัจจุบันยังไม่มี การนำมาใช้ทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัคซีนชนิดนี้ มีเพียงข้อมูลจากงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้วิธีทางเลือก CHO cell assay
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพด้านความปลอดภัยของวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยศึกษาความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐาน WHO International Standard Bordetella Pertussis Toxin

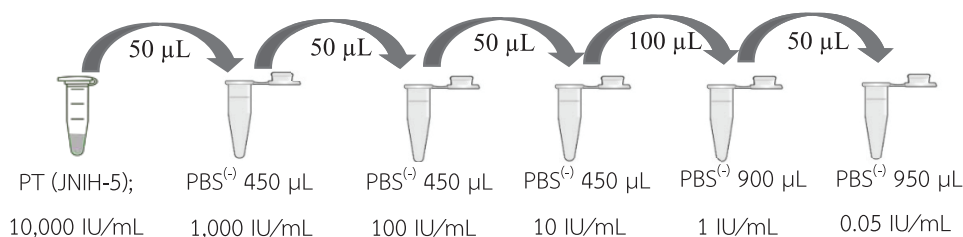
(LPF) PT 1st NIBSC Code: JN1H-5 และตัวอย่าง
วัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ tetanus toxoid,
reduced diphtheria toxoid, acellular
pertussis vaccine (Tdap) เป็นองค์ประกอบ
จำนวน 1 ตัวอย่าง ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese
Hamster Ovary (CHO-K1) ทำการตรวจสอบ
3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกันใน 1 ชุดการทดสอบ

ขั้นตอนการศึกษา

- นำตัวอย่างวัคซีนวัคซีนไอกรนชนิด
ไร้เซลล์ จำนวน 3 ขวด ขวดละ 0.5 mL รวมเป็น
ปริมาตร 1.5 mL มาผสมกันด้วย vortex mixer
จนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized vaccine)
ดูดวัคซีนปริมาตร 0.5 mL ใส่ใน Protein LoBind
tube ขนาด 1.5 mL เติม 10% W/V Solution of
tri-sodium citrate in 2xPBST ปริมาตร 0.5 mL
ลงไป ผสมกันด้วย vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิ
37°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง นำออกมาผสมกัน
ด้วย vortex mixer แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm
เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใส (supernatant)

ที่ได้ใน Protein Lo-bind tube ขนาด 1.5 mL
ทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่าง 1:10
ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่เติม 10%
(w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin
โดยเติม supernatant ปริมาตร 300 μ L ลงในอาหาร
เลี้ยงเซลล์ F-12K medium ปริมาตร 1,200 μ L
แบ่งตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง 1:10 ออกเป็น 2 ส่วน
คือ Unspiked และ Spiked sample โดย
Unspiked sample คือ ตัวอย่างวัคซีนที่ไม่เติม
PT ลงไป ขณะที่ Spiked sample คือ ตัวอย่าง
วัคซีนที่เติม PT ลงไป โดยเติม PT ความเข้มข้น
2 IU/mL ปริมาตร 16.25 μ L ลงในตัวอย่างวัคซีน
ปริมาตร 633.75 μ L ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บ
ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนการทดสอบ

- เตรียมสารมาตรฐานเพื่อใช้เป็น positive
control ทำการเจือจาง WHO International
Standard Bordetella Pertussis Toxin (LPF)
PT 1st NIBSC Code: JN1H-5 ด้วย PBS(-) ให้ได้
ความเข้มข้นตั้งต้น 0.05 IU/mL ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แบบการเจือจาง WHO International Standard Bordetella pertussis toxin (LPF) PT 1st NIBSC Code: JN1H-5 ด้วย PBS⁽⁻⁾

3. เตรียมเพลททดสอบ โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin ปริมาตร หลุมละ 100 μ l ลงในเพลท Sterile Tissue culture 96 wells plate, Flat bottom with Lid ในแถว B ถึง H ตั้งแต่คอลัมน์ที่ 1-9 เติมนสารมาตรฐาน (Positive control) ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.3.1 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบ ตำแหน่ง A1, A2 และ A3 (3 ซ้ำ) เติมน Spiked sample ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.2.9 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบตำแหน่ง A4, A5 และ A6 (3 ซ้ำ) เติมน Unspiked sample ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.2.8 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบตำแหน่ง A7, A8 และ A9 (3 ซ้ำ) เจือจางสารมาตรฐานด้วย F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 จะได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 7 ค่า ได้แก่ 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016 และ 0.0008 IU/mL เจือจาง Spiked sample ด้วย F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 4, 5 และ 6 จะได้ความเข้มข้นท้ายสุดที่ spiked PT ลงไป เท่ากับ 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016 และ 0.0008 IU/mL เจือจาง Unspiked sample ด้วย F-12K medium ที่เติม

10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 7, 8 และ 9 จะได้ระดับเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน 1:10-1:640

4. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง นำเซลล์ CHO-K1 เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร F-12K ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C โดยทำการ passage cell 1:10 แล้วนำไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ด้วย 0.05% Trypsin-EDTA solution นาน 1-2 นาทีแล้ว re-suspense ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี Trypan blue exclusion ด้วย hemacytometer และปรับความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 2×10^4 cells/mL

5. ทดสอบ โดยเติมเซลล์ CHO-K1 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 μ l ลงในเพลททดสอบ โดยเติมเซลล์ลงทุกหลุมในตำแหน่ง A1-A9 จนถึง H1-H9 และก่อนนำเพลทไปบ่มโดยตั้งทิ้งไว้เพื่อความสะดวกในการมองเห็นสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำเพลททดสอบไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) อุณหภูมิ 37°C นาน 40-48 ชั่วโมง การอ่านผล เมื่อครบเวลา นำเพลททดสอบเคาะเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างเซลล์ 1 รอบ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่ไม่เติม

FBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่ไม่เติม FBS ปริมาตร 200 ul ต่อหลุม แล้วจึงนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ที่กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 10x เพื่อสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1 หากพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบมากกว่าหรือเท่ากับ 10 clustering ขึ้นไป ให้รายงานผลเป็นบวก (+) ในขณะที่หากไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 หรือพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 clustering ให้รายงานผลเป็นลบ (-)

6. ศึกษาความถูกต้องของวิธี (Validation method)⁴ โดยการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) นำ WHO 1st International standard for pertussis toxin (JN1H-5) มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 1 IU/mL มาเติม (spike) ลงในตัวอย่างวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) โดยเติมลงในอัตราส่วน 1:10 (V/V) เพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ CHO-K1 ทำการทดสอบพร้อมกับ Positive control (สารมาตรฐาน WHO 1st International standard for pertussis toxin; NIBSC code JN1H-5), Negative control (F-12K Medium) และตัวอย่างวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่ไม่มีการ spike PT โดยทำการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ 3 ซ้ำ ใน 1 ชุดการทดสอบ และผู้อ่านผลการทดสอบจำนวน 3 คน โดยมีเกณฑ์การทดสอบดังนี้

1. Positive control (JN1H-5, NIBSC) ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลบวก (ต้องเกิดผลบวกเท่านั้น)

2. Negative control (อาหารเลี้ยงเซลล์) ต้องไม่พบการเกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบของเซลล์ CHO-K1 หากพบการเกาะกลุ่มต้องมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลลบ (ต้องเกิดผลลบเท่านั้น)

3. ตัวอย่างวัคซีนที่มีการ spike pertussis toxin ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลบวก (ต้องเกิดผลบวกเท่านั้น)

4. ตัวอย่างวัคซีนที่ไม่มีการ spike ต้องไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 รูปดอกกุหลาบ หากพบการเกาะกลุ่มต้องมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลลบ (ต้องเกิดผลลบเท่านั้น)

และตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) โดยนำ WHO 1st International standard for pertussis toxin เจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 4 IU/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K แล้วทำการเจือจาง PT reference ต่อเนื่องแบบ Two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016, 0.0008, 0.0004 และ 0.0002 IU/mL และ

ทำการทดสอบเทียบกับ Negative control ซึ่งการตรวจสอบชี้แจงจำกัดของวิธีดำเนินการทดสอบ จำนวน 3 ครั้ง เป็นอิสระต่อกัน โดยทำการทดสอบ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และผู้อ่านผลการทดสอบ จำนวน 3 คน อ่านค่า LOD จากระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปคล้ายดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าผลเป็นบวก

ผลการศึกษา

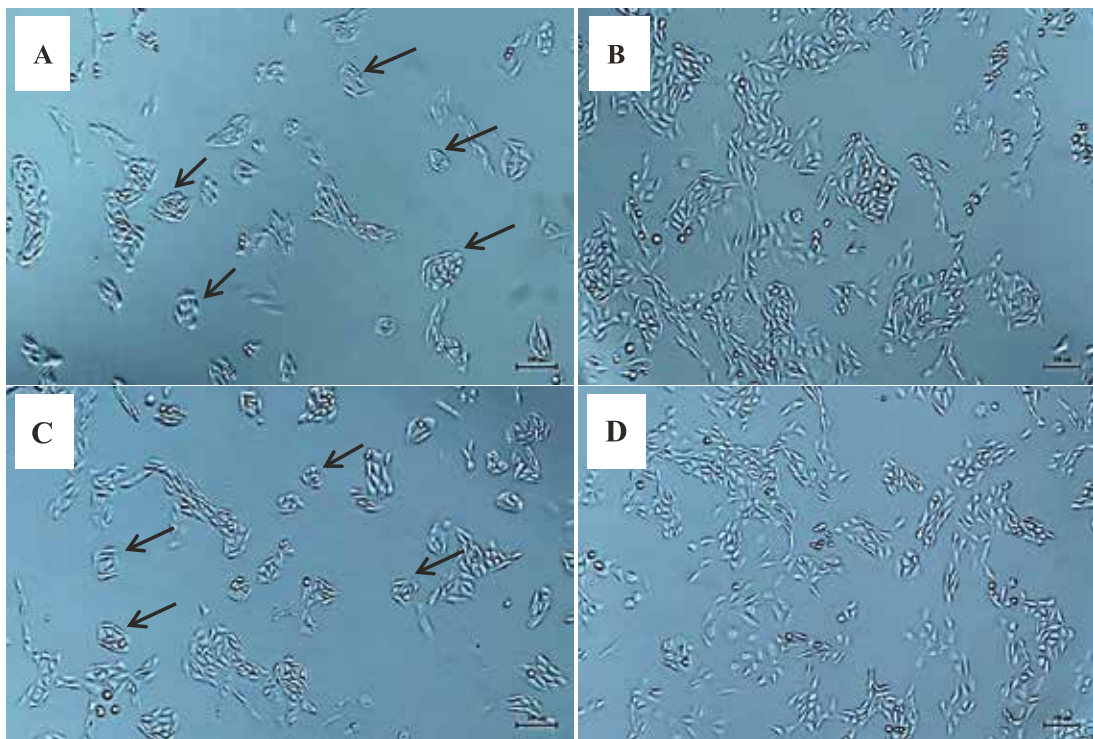
ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

พบว่า ผู้วิเคราะห์ทั้ง 3 ท่าน อ่านผลการทดสอบตรงกัน กล่าวคือ Positive control (JN1H-5, NIBSC) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.05 IU/mL พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปคล้าย

ดอกกุหลาบ (rosette shape) มากกว่า 10 กลุ่ม/ หลุมทดสอบ จึงรายงานผลเป็นบวก (+) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2A) Negative control (อาหารเลี้ยงเซลล์) พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 จึงรายงานผลเป็นลบ (-) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2B) ตัวอย่างวัคซีน วัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่มีการ spike pertussis toxin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.05 IU/mL พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปคล้าย ดอกกุหลาบ (rosette shape) มากกว่า 10 กลุ่ม/ หลุมทดสอบ จึงรายงานผลเป็นบวก (+) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2C) ในขณะที่ตัวอย่างวัคซีน วัคซีนรวม ที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่ไม่มีการ spike pertussis toxin พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 จึงรายงานผลเป็นลบ (-) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2D)

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาค่าความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรน ที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ ด้วยวิธี CHO cell assay

ผู้อ่านผลการทดสอบ	คนที่ 1			คนที่ 2			คนที่ 3		
ตัวอย่าง	การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)								
จำนวนซ้ำ	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Positive control (0.05 IU/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spiked PT in vaccine (0.05 IU/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Unspiked vaccine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negative control	-	-	-	-	-	-	-	-	-



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

ผลการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

จากการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบปริมาณท็อกซินไอกรนด้วยวิธีทดสอบ CHO cell assay พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบแต่ละท่านสังเกตเห็นการเกาะกลุ่มเป็นรูปดอกกุหลาบในแต่ละซ้ำของการทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการตรวจพบปริมาณ PT ต่ำสุดเท่ากับ 0.0008 IU/mL (รูปที่ 3) เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยจากทั้ง 3 ครั้งของการทดสอบพบว่ามีความเฉลี่ยเท่ากับ 0.0015 IU/mL (ตารางที่ 2)

โดยการทดสอบในแต่ละครั้งปริมาณ PT ต่ำสุดของการตรวจพบจะอยู่ในช่วง 0.0008–0.0031 IU/mL เนื่องจากการทดสอบ bioassay ที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบ โดยสังเกตการตอบสนองของเซลล์ CHO-K1 ต่อสาร PT และการตอบสนองของเซลล์ในแต่ละครั้งของการทดสอบอาจแตกต่างกัน อีกทั้งผู้อ่านแต่ละท่านมีการสังเกตและนับจำนวนเซลล์รูปดอกกุหลาบที่อาจแตกต่างกันได้ แต่ต้องไม่แตกต่างกันเกินกว่า 2 ระดับการเจือจางความเข้มข้นตามเกณฑ์ที่ยอมรับ (WHO/IVB/11.11, 2013)³

ตารางที่ 2 ผลตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง

ผู้อ่านผลการทดสอบ			คนที่ 1	คนที่ 2	คนที่ 3	ค่าเฉลี่ยในแต่ละครั้ง
ครั้งที่	วันที่	วันที่	ขีดจำกัดของการตรวจพบ PT			ของการทดสอบ
ทดสอบ	ทดสอบ	อ่านผล	(IU/mL)			(IU/mL)
1	08/02/64	10/02/64	0.0011	0.0023	0.0011	0.0015
2	02/03/64	04/03/64	0.0008	0.0011	0.0008	0.0009
3	15/03/64	17/03/64	0.0016	0.0026	0.0021	0.0021
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ครั้งของการทดสอบ			0.0012	0.0020	0.0013	0.0015



รูปที่ 3 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบปริมาณ pertussis toxin (JN1H-5, NIBSC) ด้วยวิธีทดสอบ CHO cell assay

อภิปรายผล

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1 ในการทดสอบ เป็นรายการทดสอบในเชิง semi-qualitative สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ CHO-K1 หากมี PT หลงเหลือในวัคซีน เซลล์ CHO-K1 จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเกาะกลุ่มคล้ายรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) ซึ่งจากทฤษฎีข้างต้น ทางคณะผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษาพัฒนาวิธีทดสอบเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป โดยหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ พบว่าจำนวนเซลล์ CHO-K1 ที่เหมาะสมในเพลท 96 หลุม คือ 2×10^4 cells/mL และระยะเวลาในการอ่านผลคือ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ Isbrucker et al., 2016⁵ และ Wagner et al., 2017⁶ ซึ่งศึกษาวิธีทดสอบ CHO cell assay เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป พบว่าความเข้มข้นเซลล์ CHO-K1 ที่เหมาะสมเท่ากับ 2×10^4 cells/mL เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมจะส่งผลให้สังเกตการเกิดเซลล์เกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบเมื่อตรวจพบ PT ได้ชัดเจน และระยะเวลาในการอ่านผลควรอ่านผลภายในช่วง 40-48 ชั่วโมง เนื่องจากหากบ่มเพลททดสอบเกินกว่า 48 ชั่วโมงทำให้สังเกตผลการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบยาก ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์สามารถเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ตามปกติจนไม่สามารถสังเกตเห็นเซลล์

เกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบได้ ดังนั้นระยะเวลาในการอ่านผลที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับการศึกษาของงานวิจัยอื่น⁵⁻⁶ และเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคณะผู้วิจัยดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) และขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) ซึ่งดำเนินการตามข้อกำหนดมาตรฐาน⁵ ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐานที่อกซินไอรอน (JN1H-5, NIBSC) พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อที่อกซินไอรอน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน และขีดจำกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบจากการอ่านผลได้เท่ากับ 0.0015 IU/ml และเมื่อนำวิธีมาใช้ทดสอบกับวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ พบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าวัคซีนตัวอย่างไม่มีที่อกซินไอรอนหลงเหลืออยู่

สรุปผล

จากผลการศึกษาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี CHO cell assay มีความจำเพาะของวิธี พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบชัดเจน และขีดจำกัดของการตรวจพบ PT ได้ต่ำสุด 0.0015 IU/ml วิธีนี้จึงเป็นวิธีทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนการทดสอบในสัตว์ทดลองตามหลัก 3Rs และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานตรวจความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนในผลิตภัณฑ์วัคซีนรวมได้

ข้อเสนอแนะ

วิธี CHO cell assay มีข้อจำกัดคือ สารเสริมฤทธิ์ที่มีอยู่ในวัคซีนรวมต้องมีปริมาณ ไม่มากกว่า 1.5 mg/dose จึงสามารถนำมาทดสอบ โดยวิธีนี้ได้ เนื่องจากสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง CHO และ สารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนแต่ละตำรับมีปริมาณไม่เท่ากัน จึงต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละ ตำรับยาก่อนนำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษ เฉพาะจากที่ออกซินไอกรนที่หลงเหลืออยู่ในวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงาน ในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2562. กรุงเทพฯ: เวิร์คพรีนติ้ง จำกัด; 2562.
2. Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals. *Biologicals* 2021;(74): 24-7.
3. 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.
4. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [Internet]. 2005. [cited 2020 Dec 18]:1-17. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
5. Isbrucker R, Daas A, Wagner L, Costanzo, A. Transferability study of CHO cell clustering assays for monitoring pertussis toxin activity in acellular pertussis vaccine. *Pharmeur Bio Sci Notes* 2016; 97-114.
6. Wagner LD, Corvette LJ, Ngundi MM, Burns DL. Towards replacement of the acellular pertussis vaccine safety test: Comparison of in vitro cytotoxic activity and in vivo activity in mice. *Vaccine* 2017;(35): 7160-5.