วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 เม.ย.-มิ.ย. 2536

Journal of Health Science
Vol. 2 No.2 Apr.-Jun. 1993

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การทดลองผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าจากเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟัก

Production of Purified Chick Embrio Cell Rabies Vaccine

กาญจนา ลีละสิริ ภ.บ.
ธีรนารถ จิวะไพศาลพงศ์ วท.บ. (จุลชีวะ)
ประกอบ เรืองไรรัตนโรจน์ ภ.ม.
อภิชัย ศุภสารสาธร จพก.
กองชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Kanchana Leelasiri B.Sc. (Pharm)
Teeranart Jivapaisampong B.Sc. (Micro)
Prakorb Ruangrairatanaroj M.Sc. (Pharm)
Apichai Supasamsathorn M.L.T.
Division of Biological Products,
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าจากเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟัก ดำเนินการโดยเพาะเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าสายพันธุ์ Hep-flurry ในเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟัก รวบรวมน้ำเลี้ยงเชื้อ (Harvest) ในวันที่ 6, 11 และ 16 หลังเพาะเลี้ยง ได้น้ำเลี้ยงเชื้อที่มี HA titer ประมาณ 1:32 ฆ่าเชื้อไวรัสด้วย B-propiolactone เข้มข้น 1:4000 แล้วทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์โดยใช้เครื่องกรอง Ultrafiltration และเครื่องปั่นเย็นความเร็วสูง (Ultracentrifugation) นำไวรัสบริสุทธิ์มาละลาย โดยให้มีค่า HA titer ไม่น้อยกว่า 1:256 และแบ่งบรรจุขวดๆ ละ 1.2 มล. นำไปผ่านขบวนการทำแห้ง (Lyophilization) และตรวจสอบคุณภาพประสิทธิภาพตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก สามารถผลิตวัคซีนชนิดแห้งที่มีคุณภาพได้ตามมาตรฐานรวม 4,400 โด๊ส

Abstract

The production of PCEC rabies vaccine had been performed by the following method. The primary chick embryo cell was cultured from the 7-day old chick embryonated eggs and the rabies virus, Hep-flurry strain was inoculated into this cell culture. On the 6th, 11th and 16th day after inoculation, the culture fluid was harvested. The crude viral suspension must have HA titer not less than 1:32. Then viral suspension fluid wasinactivated by adding 1:4000 B-propiolactone. The inactivated virus suspension was concentrated and purified by ultrafiltration and ultracen-trifugation, respectively. The purified virus suspension was then diluted to have final HA titer at least 1:256. Finally, the vaccine was lyophilized and the quality control tests of the lyophilized vaccine were performed according to WHO requirements for Rabies Vaccine for Human Use. Fourty - four hundred doses (4,400 doses) of the vaccine produced passed all quality control tests.

Scanned by CamScanner

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดต่อร้ายแรงโรคหนึ่ง โดยผู้ที่เป็นโรคได้รับเชื้อจากสัตว์ที่มีเชื้อกัด โดยเฉพาะสุนัข อุบัติการของโรคนี้ในประเทศไทยมีปีละประมาณ 200 ราย[1] นับเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญที่ต้องแก้ไข ผู้ที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าถึงแก่กรรมทุกรายเนื่องจากไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะ การป้องกันไม่ให้เกิด โรคจึงเป็นแนวทางการรักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน การป้องกันการเกิดโรคทำได้โดยการเสริมภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน หรือให้ภูมิคุ้มกันจำเพาะแก่ผู้ที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค วัคซีนที่ใช้ฉีดป้องกันมีหลายชนิด แต่ที่ผลิตขึ้นใช้ในประ- เทศไทยมีชนิดเดียวคือ ผลิตจากสมองหนูแรกเกิด ซึ่งมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยด้อยกว่าวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง[2,3] วัคซีนผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงเช่น ผลิตจาก Human diploid cell, Vero cell และจากเซลล์ไข่ไก่ฟัก ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง จากการเปรียบเทียบต้นทุนการ ผลิตกับประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิด พบว่าการผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟักมีต้นทุนต่ำสุด มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยเท่าเทียมกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่น คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าจากเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟัก โดยทดลองผลิตในระดับ Pilot scale เพื่อเป็นแนวทางในการนำเทคโนโลยีการผลิตไปสู่การผลิตขั้นอุตสาหกรรมขึ้นใช้เองในประเทศต่อไป ดำเนินการทดลองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532-2534

วัตถุและวิธีการ

การเตรียมสายพันธุ์เชื้อ

นำเชื้อ rabies virus สายพันธุ์ Hep-flurry ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken) ประเทศญี่ปุ่น มาขยายพันธุ์ (propagate) ในเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟักที่ปลอดจากเชื้อจำเพาะ (SPF egg) แล้วนำไปเก็บไว้ที่ - 70°C สำหรับใช้เป็น working seed virus ในการผลิตวัคซีน

การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการ harvest

นำ working seed rabies virus มาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟักที่เพาะในข วด Roux bottle ขนาด 1.5 ลิตร แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อวันละครั้ง ครั้งละ 2 มล. นำไปตรวจ หา HA titre

การผลิตวัคซีน มีขั้นตอนในการผลิตดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ไก่ฟัก นำไข่ไก่ฟักอายุ 7 วันมาเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวด Roux bottle ขนาด 1.5 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ $2x10^6$ เซลล์/มล. จำนวน 100 มล. ของ growth medium (5% fetal bovine serum ใน MEM) อบที่ 37°C 24 ชั่วโมง เซลล์จะโตเต็มพื้นที่ของขวด Roux

2. การเพาะเชื้อ (Cultivation) จาก Working Seed Virus นำมา dilute ด้วย PBS buffer 1:20 และใส่ inoculum 4 มล./Roux bottle ที่มีเซลล์ไข่ไก่ฟักอายุ 24 ชั่วโมงกลิ้งขวดทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้ Virus เข้าสู่เซลล์ได้อย่างทั่วถึง เติม maintenance medium (M 199) ขวดละ 100 มล. อบที่ 34°C

3. การรวบรวมน้ำเลี้ยงไวรัส (Harvest) เมื่อถึงวันที่ 6 หลังจากการเพาะเชื้อไวรัสลงเซลล์ไข่ไก่ฟัก นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากขวดทั้งหมดมา pool รวมกัน แล้วเติม maintenance medium ลงไปในขวดเดิมอีกขวดละประมาณ 90 มล. แล้วนำไปอบต่อที่ 34°C จนถึงวันที่

Scanned by CamScanner

11 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมา pool รวมกัน แล้วเติม maintenance medium ลงไปอีกประมาณขวดละ 80 มล. แล้วอบต่อที่ 34°C จนถึงวันที่ 16 จึง harvest น้ำเลี้ยงเชื้อครั้งสุดท้าย และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ pool รวมกันในแต่ละครั้ง นำมากรองเพื่อแยกเอาเซลล์ออก แล้วฆ่าเชื้อไวรัสด้วย B-propiolactone 1:4000 ใน water bath ที่ 37°C 1 ชั่วโมง (inactivation)

4. การทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ (Concentration and Purification)

หลังจาก inactivation แล้วนำมาผ่านเครื่อง Ultrafiltration (ที่มี Molecular weight cut off 6000) จะได้ความเข้มข้น 25-30 เท่า จากนี้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการปั่นแยกในเครื่อง Ultracentrifugation นำ virus ที่ได้ละลายใน vaccine diluent (Lactose 7.5%, Gelatin 0.2%, Sodium Glutamate 1%) โดยให้ได้ค่าของ HA titer ไม่ต่ำกว่า 1:256 แล้วนำไปทำวัคซีนต่อไป

5. การทำวัคซีนสำเร็จรูป (finished vaccine) นำ virus suspension มาจ่ายลงขวด ๆ ละ 1 โด๊ส (1.2 มล.) นำไปทำแห้ง (Lyophilization) และตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานตามขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีน (Quality control of final product)

ตรวจสอบคุณภาพให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดของ WHO requirements for Rabies Vaccine for Human Use[4] ในหัวข้อดังต่อไปนี้

1. Identity test
2. Sterility test
3. Toxicity test
4. Potency test
5. Stability test
6. Inactivation test
7. Test for protein nitrogen content
8. Test for moisture content
9. Test for hydrogen ion concentration
10. Test for extraneous agent
11. Test for pyrogenic substances

ผลการศึกษา

จากการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการ harvest พบว่าเมื่อถึงวันที่ 6 หลังจากเพาะเชื้อไวรัสลงเซลล์จะได้ค่า HA titer สูงถึง 1:32 ซึ่งเป็นค่าที่เพียงพอสำหรับการ harvest แต่เมื่อส่องกล้องดูเซลล์แล้วพบว่ายังมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก และเมื่อลองเปลี่ยน maintenance medium แล้วอบต่ออีก 5 วัน พบว่าค่า HA titer ยังคงเป็น 1:32 อยู่ เมื่อเปลี่ยน maintenance medium เป็นครั้งที่ 2 และอบต่ออีก 5 วัน ยังคงได้ค่า HA titer อยู่ประมาณ 1:16 - 1:32 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่า HA Titer ในแต่ละช่วงเวลาของ incubation period

เวลาหลังจากเพาะเชื้อไวรัสลงเซลล์ (วัน)	HA-titer
1	<1:2
2	<1:2
3	<1:2
4	1:2
5	1:8
6	1:32
11*	1:32
16*	1:16 - 1:32

* เปลี่ยน maintenance media ใหม่

Scanned by CamScanner

จากการทดลองผลิตวัคซีน จำนวน 4 lots พบว่าสามารถผลิตวัคซีนที่มีค่า HA titer อยู่ระหว่าง 1:512-1:1024 และได้ freeze-dried vaccine รวมทั้งสิ้น 4450 vials (doses) (ตารางที่ 2) และวัคซีนทั้งหมดมีคุณภาพมาตรฐานผ่านทุกขั้นตอนตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

จากการทดลองผลิตวัคซีนครั้งนี้พบว่า หากเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ไก่ฟักได้ดีแล้วจะสามารถ harvest น้ำเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อนำไปผลิตวัคซีนได้ถึง 3 ครั้ง ซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น แต่ปัญหาอุปสรรคที่ทำให้ได้ผลผลิตน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนไข่ไก่ฟักที่ใช้คือ การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ในระหว่างขั้นตอนการผลิต หรือเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟักบางรุ่นไม่แข็งแรงพอ ทำให้ได้ virus suspension ที่มี HA titer น้อยกว่า 1:32 เป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถนำไปผลิตวัคซีนต่อไปได้ต้องทิ้งไป ทั้งนี้เนื่องจากคณะผู้วิจัยยังขาดความชำนาญ และไข่ไก่ฟักที่นำมาใช้ในการผลิตเป็นไข่ไก่ฟักชนิดธรรมดาไม่มีการควบคุมคุณภาพที่ดี หากใช้ไข่ไก่ฟักชนิด SPF (specific pathogen free egg) ซึ่งต่างประเทศใช้ในการผลิตวัคซีนโรค

ตารางที่ 2 แสดงค่า HA Titer และปริมาณวัคซีน

ขั้นตอนการผลิต	Vaccine lots							
	1		2		3		4	
	HA	ปริมาณ	HA	ปริมาณ	HA	ปริมาณ	HA	ปริมาณ
Harvestingandpool (Crude virus suspension)*	1:32	40 (ลิตร)	1:32	50 (ลิตร)	1:32	48 (ลิตร)	1:32	45 (ลิตร)
Concentrated/Purified Suspension	1:512	1.4 (ลิตร)	1:512	2.0 (ลิตร)	1:1024	1.6 (ลิตร)	1:512	1.5 (ลิตร)
Bulk Vaccine	1:1024	1.4 (ลิตร)	1:1024	2.0 (ลิตร)	1:512	1.6 (ลิตร)	1:512	1.5 (ลิตร)
Final lots	1:512	786 (Vial)	1:1024	1277 (Vial)	1:1024	1450 (Vial)	1:1024	937 (Vial)
Freezed dried vaccine	1:512	786 (Vial)	1:512	1277 (Vial)	1:1024	1450 (Vial)	1:1024	937 (Vial)

หมายเหตุ *Pool จาก crude virus suspension ที่มีค่า HA titer สูงกว่า 1:16

Scanned by CamScanner

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณภาพวัคซีน

การทดสอบ	WHO Minimum Requirements	Vaccine Lot			
		1	2	3	4
1. Identity	Rabies Vaccine	pass	pass	pass	pass
2. Sterility	ไม่พบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ	pass	pass	pass	pass
3. Toxicity	mice, guinea-pig อาการปกติ	pass	pass	pass	pass
4. Potency	> 2.5 IU/dose	5.7	6.3	4.8	4.9
5. Stability	> 2.5 IU/dose	4.6	5.9	4.9	3.4
6. Inactivation	mice ไม่มีอาการของโรคพิษสุนัขบ้า	pass	pass	pass	pass
7. Protein Nitrogen content	< 40 ug/ml	17.28	13.12	13.60	13.12
8. Moisture	< 3%	0.8	1.49	2.04	1.51
9. pH	6.8 – 7.4	7.09	7.11	7.11	7.18
10. Extraneous Agent (Avian leucosis Virus)	ไม่มีเชื้อขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ	pass	pass	pass	pass
11. Pyrogen		pass	pass	pass	pass
สรุปผลการทดสอบ		pass	pass	pass	pass

พิษสุนัขบ้าในระดับอุตสาหกรรมแล้วอาจได้ผลผลิตมากขึ้น แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการเพาะเลี้ยงไข่ ไก่ฟักชนิด SPF ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงมาก จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองผลิตได้ วัคซีนที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้ได้ส่งตรวจสอบหา avian leucosis virus ที่อาจติดมากับไข่ไก่ฟักที่ใช้และอาจปนเปื้อนในวัคซีนทำให้เป็นอันตรายต่อผู้ที่ได้รับวัคซีน ผลการตรวจสอบที่ Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute ประเทศญี่ปุ่น ไม่พบไวรัสดังกล่าวซึ่งเป็นไปได้ว่า ถ้ามี avian leucosis virus ปนเปื้อนอยู่ ก็อาจถูกทำลายด้วย B-propiolactone ในขั้นตอน inactivation แต่อย่างไรก็ตาม หากต้องการพัฒนาการผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าในระดับอุตสาหกรรมขึ้นในประเทศไทยแล้ว ควรใช้ไข่ไก่ฟัก SPF ในการผลิตเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีความปลอดภัยยิ่งขึ้นและได้มาตรฐานทัดเทียมต่างประเทศ

สรุป

การทดลองผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าจากเซลล์เพาะเลี้ยงไข่ไก่ฟักครั้งแรกในประเทศไทยประสบผลสำเร็จด้วยดี ได้วัคซีนที่มีความบริสุทธิ์และมีคุณภาพผ่านมาตรฐานตามข้อกำหนดขั้นต่ำขององค์การอนามัย

Scanned by CamScanner

โลก ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางพัฒนาไปสู่การผลิตวัคซีนชนิดนี้ ในระดับอุตสาหกรรมขึ้นในประเทศ รวมทั้งการพัฒนาการผลิตวัคซีนไวรัสชนิดอื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรัฐบาลญี่ปุ่นที่ให้ความช่วยเหลือในด้านผู้เชี่ยวชาญและวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตวัคซีน

ขอขอบคุณสถาบัน The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute และ Dr. Kuniaki Sakamoto ที่ได้ช่วยเหลือในเรื่อง Seed Virus ในการผลิตและแนะนำวิธีการผลิต

ขอขอบพระคุณอดีตอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นายแพทย์อุลิต ลียะวณิชย์ และคุณหญิงปรียา เกษมสันต์ ณ อยุธยา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในกองชีววัตถุและฝ่ายสัตว์ทดลองกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ช่วยเหลือให้การทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Epidemiology Division, Ministry of Public Health. Statistic Report, 1984-1989.
2. Wasi C, Chaiprasithikul P, Chavanich L, Puthavathana P, Thongcharoen P, Trishananonda M. Purified chicken embryo cell rabies vaccine. Lancet,1986;1:40.
3. Gluck R, Keller H, Mischler R, Wegmann A, Germanier R. New aspects concerning the immunogenicity of rabies vaccines produced in animal brain. In: Kuwert E, Merieux, C, Koprowski H, Bogel K, eds. Rabies in the tropics. New York: Springer-Verlog, 1985:181-8.
4. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series 658: Requirements for rabies vaccine for human use. Geneva: World Health Organization, 1981.

Scanned by CamScanner