

การเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ แบบซัสเพนชันด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% เพื่อการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

The BHK₂₁C₁₃ Suspension Cells Culture in 5% PEG Treated Serum for FMD Virus and Vaccine Production

พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์ และ เชิงชาย จันทรัมย์¹
Payont Sinsuwonkwat and Chongchai Chuntarusmi

ABSTRACT

These experiments were to decrease the amount of PEG treated serum (Bovine serum collecting from slaughter house and treated with 8% PEG 6000.) in the medium without changing the character of cultured cells in order to produce high yield of FMD virus and good quality of FMD vaccine.

The BHK₂₁C₁₃ suspension cell cultured in the medium containing 5% poly ethylene glycol (PEG) treated serum for 3 days at 37°C. pH 7.2 The cells were subcultured in the same medium and condition until the 7th passage. The 7th passage cells were inoculated by type 0 cattle (O_{BKK}/S₁) FMD virus by cell sedimentation method. The inoculated cells were culture in the medium containing 1% PEG treated serum at 37°C. pH 7.4 and harvested at 18 hours for preparing the vaccines.

The results showed that the BHK₂₁C₁₃ suspension cells could grow in the medium containing 5% PEG treated serum, and could produce high yield of FMD virus and good quality of FMD vaccine.

บทคัดย่อ

การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อลดปริมาณซีรัมในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ลง จากปกติเคยใช้ 10% โดยเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะ สามารถนำเซลล์นั้นมาเพาะเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ดี และนำไวรัสที่ได้ไปผลิตเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยได้คุณภาพสูงอีกด้วย

การทดลองเริ่มต้นโดยการนำเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension (ซึ่งปกติเคยเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% และเก็บเป็นสต็อกไว้ที่ -80°

เซลเซียส) มาเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ในถังเพาะเซลล์ขนาด 30 ลิตร ควบคุม pH ที่ 7.2 อุณหภูมิ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 3 วันต่อ 1 passage การเพาะจะทำติดต่อกันไปเรื่อย ๆ (Subculture) จนถึง passage ที่ 7 จึงนำเซลล์ใน passage ที่ 7 มาเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โค-กระบือ (OBkk/S₁) โดยวิธีการตกตะกอนเซลล์ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 1% pH 7.4, 37° เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้ CPE 80-100% จึงนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมวัคซีนโรคปาก

¹ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ปากช่อง นครราชสีมา 30130
Foot and Mouth Disease Center Pakchong · Nakhon Ratchasima, 30130, Thailand.

และทำเปื่อยต่อไป การทดลองในครั้งนี้จะทำการทดลองเป็น 3 ชุด แล้วจึงทำการสรุปผล

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% โดยไม่เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะและคุณภาพ ในการที่จะนำไปผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยให้ได้คุณภาพดี

คำนำ

การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา ใช้วิธีเพาะเซลล์แขวนลอย (suspension cell culture) (Makarasen, *et al.*, 1982) โดยต้องผลิตเซลล์ BHK₂₁C₁₃ ให้ได้จำนวนมากก่อนแล้วจึงทำการ inoculate seed virus หลังจากนั้น นำไวรัสที่ผลิตได้ไปทำการผลิตเป็นวัคซีน น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเซลล์ต้องมีส่วนผสมของซีรัม 10% (PEG treated serum) จึงจะเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ให้เจริญเติบโตและมีคุณภาพดีได้ (Makarasen and Sinsuwonkwat, 1986) เมื่อนำเซลล์นั้นไปผลิต FMD virus และนำไวรัสไปผลิตเป็นวัคซีน ในขั้นต่อไปก็จะได้อัตราวัคซีนที่มีคุณภาพดีเช่นกัน (Makarasen *et al.*, 1982, Makarasen and Sinsuwonkwat 1986)

เนื่องจากปัจจุบันศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ปากช่อง นครราชสีมา มีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณซีรัมไม่เพียงพอต่อความต้องการ จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมากและแพงกว่าซีรัมที่ได้รับจากโรงงานฆ่าสัตว์ 50-100 เท่า ทำให้ต้นทุนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูงขึ้น

จากรายงานการทดลองของต่างประเทศพบว่า เซลล์ BHK₂₁C₁₃ monolayer สามารถเพาะบน DEAE Sephadex A 50 beads ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกโค 5% ได้ (White-side and Spier, 1977 ; Meignier *et al.*, 1980) ซึ่งการเพาะเซลล์แบบนี้เป็นการเพาะแบบกึ่งแขวน

ลอย (semi-suspension)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 น้ำยาเลี้ยงเซลล์ ที่มีชื่อว่า Modified Eagle's medium (Merchant *et al.*, 1964) มีอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม คือ 0.25% lactalbumin hydrolysate, 0.1% peptone (Makarasen *et al.*, 1982) และซีรัม 5% (PEG treated serum)

1.2 เซลล์ BHK₂₁C₁₃suspension ซึ่งเพาะได้จากน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% แล้วเก็บเป็นสต็อกที่ -80° เซลเซียส

1.3 ถังเพาะเซลล์ (fermentor) ขนาด 30 ลิตร สามารถควบคุม pH, ออกซิเจนและอุณหภูมิได้อัตโนมัติ โดยก่อนการใช้เพาะเซลล์ทุกครั้งจะทำการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง ความดัน 1.5 กก./ซม.³ (sterilization)

1.4 เครื่องกรอง membrane filter ขนาด 0.45 μ และ 0.2 μ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ใช้กรองน้ำยาเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ปราศจากเชื้อโรคก่อนนำไปใช้เพาะเซลล์ โดยเก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่กรองแล้วไว้ในแก้วขนาด 20 ลิตร ที่นั่งฆ่าเชื้อโรคแล้ว

1.5 ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โคกระบือ (O_{BKK}/S₁) ใช้ inoculate ลงในเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ซึ่งเพาะได้จากการใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5%

1.6 โคร่นอายุ 1 ปีที่ไม่มีภูมิคุ้มโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เพื่อใช้ในการทดสอบวัคซีน

2. วิธีการทดลอง

2.1 นำเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ซึ่งปกติเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% มาทำการเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ในถังเพาะเซลล์ขนาด 30 ลิตร (fermentor) ด้วยวิธีสเปนชัน เซลล์กัลเจอร์ (Makarasen *et al.*, 1982) อุณหภูมิ

37° เซลเซียส pH 7.2 และป้อนอากาศบริสุทธิ์ เข้าได้ใบพัดของถังเพาะเซลล์ (sparger) ขนาด 5 ลิตร/นาที ทุก ๆ 45 วินาที นาน 5 วินาที โดยเพาะ 3 วัน ต่อ 1 passage เก็บตัวอย่างเซลล์จากถังเพาะเซลล์มาทำการนับ และตรวจดูการเจริญเติบโตด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง

ทำการ subculture เซลล์นี้ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึง passage ที่ 7

2.2 นำเซลล์ passage ที่ 7 มาทำการเพาะไวรัสโดยวิธี Cell Sedimentation method (Linholm new production cycle) (Makarasen, 1983) โดยใช้ยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 1% ในถังเพาะเซลล์ขนาด 30 ลิตร อุณหภูมิ 37° เซลเซียส pH 7.4 และป้อนอากาศบริสุทธิ์เข้าได้ถึงในขนาดเดียวกับข้อ 2.1 หลังจากเพาะแล้ว 18 ชั่วโมงจึง Harvest ไวรัสที่ได้ ซึ่งจะเกิด CPE 80-100% นำไวรัสไปทดสอบหาปริมาณ และคุณภาพ โดยวิธี Complement fixation, plaque assay method (Merchant *et al.*, 1964) และ Single Radial Immunodiffusion (SRID) (สุทธิพจน์ และนิลฉวี 2530)

2.3 นำไวรัสที่เพาะได้ ไปเตรียมเป็นวัคซีน

โรคปากและเท้าเปื่อย แล้วนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพของวัคซีน โดยการทำ safety test และ potency test ในโค (Kongthon, 1983)

2.4 ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 2.1-2.3 ใหม่ อีก 2 ครั้ง แล้วจึงทำการสรุปผล

ผล

ผลการทดลองพบว่าเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ที่นำมาจาก -80° เซลเซียส ซึ่งเป็นเซลล์ที่เคยเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% นั้น เมื่อนำมาเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ใน passage ต้น ๆ เซลล์จะเจริญเติบโตไม่ค่อยดีนัก ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ปรับสภาพให้เข้ากับน้ำยาที่มีซีรัมน้อยลงกว่าปกติยังไม่ได้ แต่เมื่อทำการย้ายเชื้อ (subculture) ต่อไป จนถึง passage ที่ 3 เซลล์จะเริ่มปรับตัวได้ และเจริญเติบโตดีขึ้นไปเรื่อย ๆ จนถึง passage ที่สูง ๆ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control (คือเซลล์ที่เพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10%) แล้วจะเห็นว่าค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ตั้งแต่ passage ที่ 4-7 จะใกล้เคียงกับ control ซึ่งแสดงไว้ใน Table 1 และ Figure 1

Table 1 The amount of cells cultured in the 5% PEG treated serum containing medium and in the 10% PEG treated serum containing medium as control .

Treatment	Day after passage	Amount of cells ($\times 10^5$ cells/ml) at the passage no.							Average
		1	2	3	4	5	6	7	
Medium + 5% PEG	0	5.15	1.35	1.33	3.49	4.45	5.44	5.57	3.82
Treated	1	2.92	3.62	4.25	10.13	13.67	16.47	15.89	9.56
Serum	2	4.59	9.41	15.07	22.85	35.42	34.20	35.55	22.44
Medium + 10% PEG	0	5.10	-	-	5.70	-	-	5.40	5.40
Treated	1	16.45	-	-	12.20	-	-	15.85	14.83
Serum (Control)	2	31.80	-	-	30.25	-	-	29.45	30.50

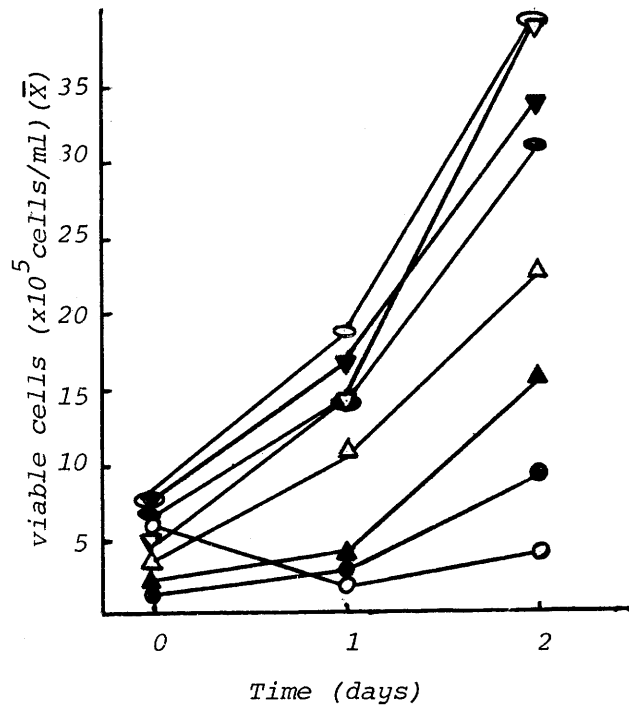


Figure 1 Growth rate of the BHK₂₁C₁₃ suspension cells which cultured in the medium containing 5% PEG treated serum ($\bar{X}$) 0 = 1st, ● = 2nd, ▲ = 3rd, △ = 4th, ▽ = 5th, ▼ = 6th, ○ = 7th passages and ● = control ($\bar{X}$).

เมื่อสามารถเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ได้แล้ว นำเซลล์ที่ได้ใน passage ที่ 7 ไปทำการทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โค-กระบือ (O_{BKK}/S₁) โดยวิธี cell sedimentation method (Makarasen, 1983) ปรากฏว่าเมื่อเก็บเกี่ยว (harvest) ไวรัสที่ 18 ชั่วโมง จะได้ CPE 80-100% และได้

virus titer สูง คล้ายคลึงกับ control (ไวรัสซึ่งเพาะจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10%) และเมื่อนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมเป็นวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย แล้วนำวัคซีนนั้นไปทดสอบ safety test และ potency test ปรากฏว่าให้ผลคุ้มโรคได้ถึง 100% ดังแสดงใน Table 2

Table 2 The virus yield and the vaccine quality produced from the BHK₂₁ C₁₃ suspension cells which cultured in 5% PEG treated serum containing medium. $\bar{T}$ = no lesion on the foot pads after challenge (20 feet), $\bar{C}$ = have the lesion on the foot pads after challenge (8 feet).

NO	Viable cells α 10 ⁵ /ML	Harvest HRS.	CPE (%)	Virus titer			Dose	Vaccine controls					
				cfu ml (log)	pfu ml (log)	140S μ/ml		no. of cattle		Result after chall		Safety test	Protection rate (%)
								test	control	test (T̄)	control (C̄)		
1	21.75	18	97.00	40.0	7.47	1.93	5 cc	5	2	0%	100%	PASS	100.0
2	31.75	18	95.0	50.5	7.50	2.38	5 cc	5		0%		PASS	100.0
3	22.33	18	98.6	33.5	8.10	1.66	5 cc	5		0%		PASS	100.0
cont	26.40	18	98.0	36.7	7.79	1.84	5 cc	5		0%		PASS	100.0

สรุปและวิจารณ์

การทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension สามารถเพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% (5% PEG treated serum) ได้ ถ้าทำการ subculture ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึง passage สูง ๆ เซลล์ก็จะเจริญเติบโตได้ดี และคงที่เช่นเดียวกับการเพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% (Makarasen *et al.*, 1982) และนอกจากนี้เซลล์ในแต่ละ passage ที่ทำการเพาะได้ก็สามารถเก็บใน deep freezer ไว้ได้เป็นเวลานาน (Merchant *et al.*, 1964) เพื่อเก็บเป็น stock ไว้ใช้ในการผลิตเซลล์ เพื่อการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โดยไม่ต้องเริ่มเพาะตั้งแต่ passage ต้น ๆ

หลังจากสามารถเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ได้แล้ว นำเซลล์ที่ได้ไปทดลองเพาะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ โค-กระบือ (O_{BKK}/S₁) แล้วนำไวรัสที่ได้ไปเตรียมเป็นวัคซีน ก็ปรากฏว่าให้จำนวนไวรัสสูง และวัคซีนก็ให้ความคุ้มโรคสูงเช่นเดียวกันกับการเตรียมวัคซีนจากไวรัสที่ได้จากการเพาะเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension ที่เพาะด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% (Makarasen and Sinsuwonkwat 1986) ดังนั้นจึงสามารถทำการสรุปได้ว่าเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension สามารถเพาะในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5% ได้โดยไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะและคุณภาพ ในการที่จะนำไปผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยต่อไป

เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เห็นสมควรสนับสนุนให้นำวิธีการนี้ไปใช้ในการผลิตเซลล์ BHK₂₁C₁₃ suspension เพื่อผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยแบบอุตสาหกรรมต่อไป (Large scale production)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในหน่วยควบคุมคุณภาพวัคซีนที่ช่วยในการทดสอบวัคซีน และนายสัตวแพทย์ พิจิตร มกรเสน หัวหน้าฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย ที่ช่วยให้คำแนะนำปรึกษาและจัดทำข้อมูล งานงานวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- สุทธิพงษ์ ชมเฟื่องแก้ว และ นิลฉวี สินสมุทร.
2530. วงแหวนของการตกตะกอนทางภูมิ
คุ้มกันชนิดทางเดียว สัตวแพทย์สาร 38, (3) :
53-65.
- Makarasen, P., P. Sinsuwonkwat, W. Chinsawadpun, T. Tokui, T. Motohashi. 1982. Large scale production of FMD vaccine using BHK cells in Thailand. XVIth Conferences of Foot and Mouth Disease Commission Paris, 175 p.
- Makarasen, P. and P. Sinsuwonkwat. 1986. Vaccine and Vaccine Production. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok. 259 p.
- Merchant J. D., H. R. Kahn and H. W. Murphy. 1964. Hand Book of Cell and Organ Culture. Burgess Publ. Co., U.S.A. 163 p.
- Meignier, B., H. Mougeot, and H. Favre. 1980. Foot and Mouth Disease virus Production on Microcarrier. Grown Cells. Biol. Standard 46 : 249-256.
- Kongthon, S. 1983. Quality Control of FMD Vaccine. The Report of Third Country Training Programme on Foot and Mouth Disease Control, Bangkok, 242 p.
- Whiteside, J.P. and R.E. Spier. 1977. The cultivation of BHK monolayer cells on DEAE Sephadex A 50 Beads Maintained in suspension. Biol. Standard. 35 : 67-72