รายงานปริทัศน์ (Review Articles)

การพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ของประเทศไทย : ความก้าวหน้า ปัญหา และโอกาส

รศ.นพ.ดร.สุธี ยกส้าน
ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน,
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล,
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

Assoc. Prof. Sutee Yoksan
Center for Vaccine Development,
Institute of Molecular Biosciences,
Mahidol University at Salaya, Thailand

Abstract

A live attenuated tetravalent dengue vaccine development in Thailand : progress, problem and opportunity

The discovery at the University of Hawaii that dengue viruses could be propagated serially in primary dog kidney (PDK) cells offered an initial step for development of live dengue vaccines. At Mahidol University, dengue 1, 2 and 4 viruses could successfully propagate in PDK cells, whereas dengue 3 virus could not and was to serially passaged in primary green monkey kidney (PGMK) cells. Certain biological attributes were used for selection of candidate dengue vaccince viruses. Progeny viruses in PDK and PGMK cells revealed progressive modification in phenotypic markers of all 4 dengue serotypes.

Seven monovalent dengue vaccine candidates were selected and used in phase 1 clinical trials in flavivirus non-immune subjects. Monovalent dengue 1, 2 and 4 candidate vaccines were proved to be safe and immunogenic. These 3 acceptably attenuated dengue vaccines could be used for immunization in one injection resulted in strong neutralizing antibodies against dengue 1, 2 and 4 serotypes in all vaccinees. This marked an important milestone in using products based on PDK cell passage. Using underattenuated dengue 3 progeny adapted in PGMK revealed viral interference in the tetravalent combination. After fixing the dengue 3 problem, opportunity of having an ideal tetravalent dengue vaccine with balanced immunogenicity is now opened.

บทนำ

ไวรัสวัคซีนเด็งกี่และประวัติความเป็นมาและการระบาดของโรค

เชื้อไวรัสเด็งกี่เป็น RNA viruses, family Flaviviridae, genus Flavivirus แบ่งได้เป็น 4 serotypes จากการศึกษาเรียงลำดับสารพันธุกรรมพบว่ามีความหลากหลายของสายพันธุ์ต่างของไวรัสเด็งกี่มาก ทำให้มีการจำแนกเชื้อไวรัสแต่ละ serotypes ออกไปอีก 3-5 subtypes ความสำคัญของโรคเด็งกี่เริ่มในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 (ค.ศ. 1945) เมื่อมีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง ในจังหวัดนางาซากิและพื้นที่ใกล้เคียง ปัจจุบันไวรัสเด็งกี่ได้แพร่กระจายในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนทั้งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แปซิฟิกตะวันออก บางส่วนของอัฟริกา อเมริกากลางและใต้ โดยมียุง *Aedes* เป็นพาหะสำคัญในการนำโรค

สำหรับประเทศไทย มีรายงานของโรคไข้เด็งกี่ครั้งแรกใน ค.ศ. 1949 บัดนี้เป็นเวลากว่า 60 ปีแล้วที่โรคเด็งกี่ได้แพร่ในประเทศของเราทั้งแบบ Endemic และ Epidemic ทำให้มีผู้ป่วยรวมกันนับล้านคน และมีจำนวนหนึ่งที่เสียชีวิตก่อนวัยอันสมควร ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีผู้ป่วยราว 50,000-100,000 คน เป็นประจำทุกปี การกระจายของโรคเคยพบอัตราป่วยสูงสุดในเด็กอายุ 5-9 ปี ปัจจุบันอัตราป่วยสูงสุดพบในเด็กอายุสูงขึ้น และมีผู้ใหญ่เป็นโรคเด็งกี่เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ทุกๆ ปีจะพบมีไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 serotypes หมุนเวียนอยู่ในธรรมชาติเป็นประจำ อัตราส่วนของแต่ละ serotype อาจแปรเปลี่ยนไปได้บ้างในแต่ละปี ทำให้สถานการณ์ของโรคมีความยืดเยื้อ และเป็นภาระด้านเศรษฐกิจ (Economic Burden) ของประเทศเป็นอย่างมาก

รายงานฉบับนี้เป็นการรวบรวมประสบการณ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดลในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ซึ่งดำเนินการมาเป็นเวลากว่า 25 ปี ประสบการณ์ที่ได้รับจากการทำวิจัยทำให้มีการตั้งเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ชนิดรวมเข็มเดียว ในขณะเดียวกันก็สามารถสร้างสมดุลของภูมิคุ้มกันต่อต้านไวรัสเด็งกี่ได้ทั้ง 4 ชนิดในผู้ที่ได้รับวัคซีน

วัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์เพาะเลี้ยงในสมองหนู

ในระยะเริ่มต้นมีการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นชนิดแรกใช้สมองหนูเป็นฐานกล่าวคือ ใน ค.ศ. 1945 Sabin และ Schlesinger[1] ทำการพัฒนาวัคซีน Dengue 1 (Hawaii strain) จากนั้นได้ทำการทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพภูมิคุ้มกันในอาสาสมัคร 36 คน ในจำนวนนี้มี 16 คน ที่ได้รับการทำ challenged study โดยฉีดด้วย wild type Dengue 1 virus ให้แก่ผู้เคยได้รับวัคซีน ต่อมาใน ค.ศ. 1950 Schlesinger ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสเด็งกี่ใน chick embryo[2] พบว่าหากให้วัคซีนเด็งกี่ผสมกับวัคซีนไข้เหลือง (Yellow Fever) จะมี interference phenomenon เกิดขึ้นใน ค.ศ. 1952 มีการพัฒนา Dengue 2 (New Guinea C strain) ในสมองหนู[3, 4] เมื่อฉีดเชื้อเข้าไปในสมองลิงเพื่อตรวจสอบความปลอดภัย พบว่าไวรัสทำให้มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นในเนื้อสมองลิง ส่งผลให้ต้องยุติการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่โดยใช้สมองหนูไปในที่สุด

วัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์พัฒนาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

ใน ค.ศ. 1936 Lloyd, Theiler และ Nicci รายงานเชื้อไวรัส Yellow Fever มีคุณสมบัติคลาย

ความรุนแรงลง เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง[5] ต่อมาทำให้มีการค้นพบ Yellow Fever 17D vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่ดีและมีความปลอดภัยมาก ใน ค.ศ. 1949 Enders, Weller และ Robbin ค้นพบเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ[6] ส่งผลให้มีการค้นพบวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์อีกหลายชนิดในเวลาต่อมา รวมทั้งการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ความปลอดภัยสูงกว่าในการพัฒนางานวัคซีนแทนการใช้สมองหนู ใน ค.ศ. 1971 สถาบันวอลเตอร์รีด กองทัพบกสหรัฐฯ ทำการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด โดยทำให้เชื้อไวรัสเกิด mutation ด้วยสารเคมี ต่อจากนั้นจึงทำการคัดเลือก clone ชนิด small plaque สถาบันดังกล่าวใช้เวลาร่วม 10 ปี (ค.ศ. 1975-1985) ในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นโดยใช้เทคนิคนี้รวมทั้งทำการทดสอบในคน[7-14] พบว่าวัคซีนเด็งกี่ ชนิดที่ 1 และ 3 ยังอ่อนฤทธิ์ (attenuate) ไม่พอและสามารถก่อให้เกิดโรคไข้เด็งกี่ได้ วัคซีนเด็งกี่ ชนิดที่ 2 มีความปลอดภัยแต่สร้างภูมิคุ้มกันได้ในระดับต่ำๆ สำหรับวัคซีนเด็งกี่ ชนิดที่ 4 นั้น เชื้อไวรัสไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนได้ สถาบันวอลเตอร์รีดจึงได้ข้อสรุปและยุติการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์โดยวิธีนี้ไปในที่สุด

งานพัฒนาวัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล

จากการประชุม Research Study Group ขององค์การอนามัยโลกที่กรุงนิวเดลฮี ใน ค.ศ. 1977 ที่ประชุมได้แนะนำให้พัฒนาวัคซีนเด็งกี่ขึ้นมาสำหรับใช้ยับยั้งการแพร่กระจายและควบคุมโรค ในการนี้มหาวิทยาลัยฮาวาย (Dr.Scott B. Halstead) รับผิดชอบในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ในระยะแรกเริ่ม โดยใช้ primary dog kidney (PDK) cells มีการฝึกอบรมบุคลากรและส่งมอบไวรัสเด็งกี่ PDK passage ที่ 5-10 ให้แก่นักวิจัยของมหาวิทยาลัยมหิดลซึ่งมี ศ.ดร.ณัฐ ภมรประวัติเป็นผู้วิจัยหลักเพื่อทำการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อไวรัสรุ่นต่างๆ ใน PDK และคัดเลือกวัคซีนเด็งกี่ชนิดต้นแบบ เพื่อใช้ในการทดสอบในคน (ดูตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ศูนย์วัคซีนได้รับจากมหาวิทยาลัยฮาวาย และวัคซีนเด็งกี่ตัวเลือกที่หน่วยงานพัฒนาในเวลาต่อมา

ไวรัส	Cell ที่ใช้เพาะเลี้ยง	ไวรัสเด็งกี่ที่พัฒนาที่ ม. ฮาวาย		ไวรัสเด็งกี่ซึ่งพัฒนาที่ศูนย์วัคซีน ม.มหิดล		ไวรัสเด็งกี่ที่ ม. มหิดลคัดเลือกศึกษาในคน	
DENV-1 (16007)	PDK	PDK	1-10	PDK	11-43	PDK	13, 20, 30 และ 43
DENV-2 (16681)	PDK	PDK	1-10	PDK	11-60	PDK	53
DENV-3 (16562)	PGMK*	PGMK	1-5	PGMK	6-50	PGMK	30 FRhL-3**
DENV-4 (1036)	PDK	PDK	1-10	PDK	11-60	PDK	48

* PGMK = Primary Green Monkey Kidney cells, ** FRhL = Fetal Rhesus Lung cells

ในช่วงสมัยนั้นพบว่า PDK เป็นเซลล์ที่เหมาะสำหรับการผลิตวัคซีนหัด และหัดเยอรมันในประเทศสหรัฐอเมริกา โครงการนี้จึงนำ PDK cells มาใช้ attenuateไวรัสเด็งกี่ การทำ serial passage ใน PDK หรือ PGMK cells ขบวนการนี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่เพาะเลี้ยงแต่ละรุ่นแบบค่อยเป็นค่อยไป โดย PDK cells จะคัดกรองเลือกเฉพาะบาง subpopulation ของไวรัสเด็งกี่เท่านั้นให้เติบโตต่อไปได้ จากการตรวจลำดับสายพันธุกรรมของเชื้อเด็งกี่พบว่า หลังจากการเพาะเชื้ออย่างต่อเนื่องใน PDK cells มีการเปลี่ยนแปลงของไวรัสที่ระดับพันธุกรรมเกิดขึ้นหลายจุด รวมทั้งแสดงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพให้เห็นชัดเจน เช่น การเปลี่ยนขนาดของ plaque การลดศักยภาพในการเจริญเติบโตในยุงจาก 100% เหลือเพียง 1% เป็นต้น[15]

เมื่อมหาวิทยาลัยมหิดลคัดเลือกไวรัสเด็งกี่ตัวเลือก (candidate dengue virus) ทั้ง 4 serotypes ได้แล้ว คณะผู้วิจัยได้ใช้ระบบการเตรียมวัคซีนชนิด Seed Lot system มีการทำ general safety tests และ monkey neurovirulence safety tests (โดย ศ.ดร.ศุภกิจ อังศุภากร) มีคณะกรรมการ Peer Review ขององค์การอนามัยโลก (WHO/SEARO) ประชุมพิจารณาความก้าวหน้าของงานวิจัยเป็นประจำทุกปีรวม 12 ปี มหาวิทยาลัยมหิดลได้ทำการตรวจสอบ safety และ immunogenicity ของ candidate dengue vaccines ในอาสาสมัครผู้ใหญ่และอาสาสมัครผู้เยาว์จำนวนหลายร้อยคน (ดูบัญชีวัคซีนในตารางที่ 2)

สรุปผลของการทดสอบในอาสาสมัครพบว่าวัคซีน DENV-1 PDK 13 มีประสิทธิภาพดี DENV-2 PDK 53 มีประสิทธิภาพดีมาก DENV-3 PGMK30/F3 ยังมีความสามารถก่อโรคได้ จำต้องปรับปรุงแก้ไข และ DENV-4 PDK 48 มีประสิทธิภาพ ดี[16] ทำให้คณะผู้วิจัยต้องปรับปรุงแก้ไขวัคซีนเด็งกี่ชนิดที่ 3 ให้สำเร็จก่อนนำมารวมกับวัคซีนเด็งกี่ ชนิดอื่น

ตารางที่ 2 บัญชีวัคซีนเด็งกี่ชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่มหาวิทยาลัยมหิดลนำไปทดสอบในอาสาสมัครผู้ใหญ่และเด็ก

	Virus
I	Monovalent DENV-1 PDK 13, 20, 30 และ 43
	Monovalent DENV-2 PDK 53
	Monovalent DENV-3 PGMK 30/FRhL-3
	Monovalent DENV-4 PDK 48
II	Bivalent DENV-1 PDK 13 + DENV-2 PDK 53
	Bivalent DENV-1 PDK 13 + DENV-4 PDK 48
	Bivalent DENV-2 + 4
III	Trivalent DENV-1 PDK 13 + DENV-2 PDK 53 + DENV-4 PDK 48
IV	Tetravalent DENV-1 PDK 13 + DENV-2 PDK 53 + DENV-3 PGMK30/F3 + DENV-4 PDK 48

ศักยภาพ ปัญหา อุปสรรค ของวัคซีนเด็งกี่เชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์

จากรายงานการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ทั้ง 4 serotypes ในประเทศไทย ซึ่งผ่านขบวนการพัฒนาไวรัสจนอ่อนฤทธิ์ มีการฉีดทดสอบในอาสาสมัครทั้งผู้ใหญ่และอาสาสมัครเด็ก (อายุ 5-12 ปี) พบว่า วัคซีนมีความปลอดภัยและสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี 3 serotypes เมื่อนำวัคซีนทั้ง 3 ชนิดมารวมฉีดในเข็มเดียวกันก็ยังมีความปลอดภัย และสามารถสร้างภูมิคุ้มกันในอาสาสมัครครบทั้ง 3 serotypes ที่ฉีดเข้าไปเช่นกัน หลักการนี้เป็นการค้นพบและรายงานให้เห็นเป็นครั้งแรกของโลกว่า**มีความเป็นไปได้ที่จะฉีดวัคซีนเด็งกี่รวมกันได้อย่างน้อย 3 ชนิดในเข็มเดียวกัน**[17] ขณะนี้คณะผู้วิจัยของมหาวิทยาลัยมหิดลสามารถพัฒนาไวรัสเด็งกี่ serotype 3 ให้อ่อนฤทธิ์เช่นเดียวกับไวรัสเด็งกี่ serotype อื่นๆ เป็นผลสำเร็จแล้ว จากการติดตามอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนเด็งกี่ของมหาวิทยาลัยมหิดลชุดแรกๆ ทั้ง 4 ชนิด จำนวน 150 คน เป็นระยะเวลานาน 8-10 ปี ก็พบว่าอาสาสมัครทุกคนมีความปลอดภัย[18] ไม่มีผู้ได้รับวัคซีนรายใดป่วยเป็นโรคไข้เลือดออกเลย **ทำให้ได้ข้อสรุปเบื้องต้นว่า ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการใช้วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์จะอยู่ในร่างกายได้นาน** และอาจป้องกันโรคไข้เลือดออกได้

เมื่อพิจารณาโดยภาพรวม ประเทศไทยมีศักยภาพในการคิดค้นนวัตกรรมวัคซีนเด็งกี่ มีการร่วมงานอย่างใกล้ชิดระหว่างหน่วยงานของมหาวิทยาลัยและหน่วยงานของกระทรวงสาธารณสุขในการทดสอบวัคซีนภาคสนามระยะที่ 1 และ 2 องค์ความรู้ที่เกิดขึ้นในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ที่ผ่านมา สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพัฒนาวัคซีนรุ่นต่อๆ มาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ส่งผลให้ทีมงานของประเทศไทยมีศักยภาพในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ตัวเลือกทั้ง 4 serotype ให้สำเร็จภายในระยะเวลาอันสั้น เชื่อว่าวัคซีนเด็งกี่อ่อนฤทธิ์ที่ใช้หลักการนี้ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านเชื้อไวรัสเด็งกี่หลากหลายสายพันธุกรรมมากกว่าวัคซีนเด็งกี่ที่พัฒนา โดยวิธีอื่น เพราะมี neutralizing antibody ที่จำเพาะต่อไวรัสเด็งกี่ครบทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งภูมิคุ้มกันชนิดย่อยอื่นๆ ที่เกิดจากส่วนอื่นๆ ของไวรัสเด็งกี่ (นอกเหนือจากส่วน envelop) ตามความยาวเต็มเส้นพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกี่

อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังมีปัญหาและอุปสรรคในการพัฒนาวัคซีนให้ครบวงจรอีกมาก เช่น เรายังไม่มีโรงงานวัคซีนต้นแบบมาตรฐาน GMP เป็นต้นสิ่งต่างๆ เหล่านี้ยังคงเป็นปัญหาและอุปสรรคทำให้ศักยภาพด้านวัคซีนของไทย ไม่ก้าวไปข้างหน้าตรงตามเป้าหมายที่วางไว้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของท่านที่มีรายนามต่อไปนี้ ในการช่วยดำเนินงานทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้

- นพ.ธวัช จายะนียะโยธิน
  กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข
- นพ.สุชาติ เจตนเสน
  กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข
- คุณองอาจเจริญสุข
  กองกีฏวิทยา กรมควบคุมโรค
- ส.ส.จ. จังหวัดลำพูน และทีมงาน
- ส.ส.จ. จังหวัดเลย และทีมงาน
- คณะกรรมการจริยธรรม กรมการแพทย์
- WHO Peer Review Committee
  และ

- ทีมงานวิจัยของศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน
  - ดร.ณรงค์ นิทัศน์พัฒนา
  - ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ
  - คุณกมลชนก ทับทอง
  - คุณวันชัย คณิตวิทยานันท์
  - คุณสุรัตน์ ปุณยหทัยกุล
  - คุณสมนึก พลาบดีวัฒน

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก WHO/SEARO

เอกสารอ้างอิง

1. Sabin, A.B. and Schlesinger R.W., 1945, Science 101: 640-642.
2. Schlesinger, R.W., 1950. Am J Hyg 51: 248.
3. Schlesinger, R.W. and Frankel, J.W., 1952. Am J Trop Med 1: 66.
4. Meiklejohn, G., England, B. and Lennette, E. H., 1952. Am J Trop Med 1: 51.
5. Lloyd W., Theiler M., Nicci N.I., Trans R., Soc., 1936. Trop Med Hyg 29: 481.
6. Enders, J.F., Weller, T.H. and Robbin, F.C., 1949. Science 109: 85-8.,
7. Eckels K.H., Brandt W.E., Harrison V.R., McCown J.M., Russell P.K. 1976. Infect Immun 14: 1221-1227.
8. Eckels K.H., Harrioson V.R., Summers P.L., Russell P.K. 1980. Infect Immun 27: 175-180.
9. Bancroft W.H., Top F.H., Eckels K.H., Anderson J.H., McCown J.M., Russell P.K. 1981. Infect Immun 31: 698-703.
10. Scott R.M., Eckels K.H., Bancroft W.H., Summers P.L., McCown J.M., Anderson J.H., Russell P.K. 1983. J Infect Dis 148: 1055-1060.
11. Bancroft W.H., Scott R.M., Eckels K.H., Hoke C.H., Simms T.E., Jesrani K.D., Summers P.L., Dubois D.R., Tsoulos D., Russell P.K. 1984. J Infect Dis 149: 1005-1010.
12. Eckels K.H., Scott R.M., Bancroft W.H., Brown J., Dubois D.R., Summers P.L., Russell P.K., Halstead S.B. 1984. Am J Trop Med Hyg 33: 684-689.
13. McKee K.T. Jr, Bancroft W.H., Eckels K.H., Redfield R.R., Summers P.L., Russell P.K. 1987. Am J Trop Med Hyg 36: 435-442.
14. Innis B.L., Eckels K.H., Kraiselburd E., Dubois D.R., Meadors G.F., Gubler D.J., Burke D.S., Bancroft W.H. 1988. J Infect Dis 158: 876-880.
15. Yoksan S., Bhamarapravati N. and Halstead S.B., 1986. Proceeding Fourth Symposium, Brisbane, Austratia P. 35-37. Editors: George T.D., Kay B.H. and Blok, J.
16. Yoksan S., 2008. Dengue Bulletin Volume 32: 1-16.
17. Bhamarapravati, N., and Yoksan, S., 1989. The Lancet: 13 May P. 1077.
18. Chanthavanich P., Luxemburger C., Sirivichayakul C., Lapphra K., Pengsaa K., Yoksan S., Sabchareon A., and Lang J. 2006. Am J Trop Med Hyg. 75(1): 26-28.