



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนเมมเบรนผิวนอก
ของเชื้อ พาสเจอเรลล่า มัลโตซิดา
โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน”

โดย

ศาสตราจารย์ ดร.สมพล ประคองพันธ์
นายอรรถชัย หอมหวล

มิถุนายน 2547
เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนเมมเบรนผิวนอก
ของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา
โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน”

ศาสตราจารย์ ดร.สมพล ประคองพันธ์

นายอรรถชัย หอมหวล

สังกัด ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนเมมเบรนผิวนอกของเชื้อพาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน” ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ฝ่ายวิชาการ) Grant number: BGJ4680021 โดยมีระยะเวลาดำเนินการหนึ่งปี (วันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2546 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2547) นักวิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย มา ณ โอกาสนี้

ระยะเวลาเพียงหนึ่งปีกับการวิจัย อาจดูไม่ใช่เวลายาวนานนัก แต่ในช่วงเวลาดังกล่าว เป็นโอกาสที่ดี และเป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัย ไม่เพียงการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างมีระบบ แต่ยังรวมไปถึงการได้พบกับนักวิจัยพี่เลี้ยง (mentors) ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณบุคคลเหล่านั้น และ องค์กร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือการวิจัย ได้แก่

- Prof.Daan J.A. Crommelin และ Dr.Wim Jiskoot จาก Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutics, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands ขอขอบคุณอาจารย์ทั้งสอง นอกเหนือจากการเป็น mentor ที่ดีแล้ว ยังเป็นต้นแบบ (model) ที่ข้าพเจ้าใฝ่ฝันจะเป็นอีกด้วย
- Dr.Gideon F.A. Kersten จาก Research and Development Unit, Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, The Netherlands ผู้ซึ่งให้ความเมตตา และ ทำให้ผู้วิจัยรู้จักประยุกต์ใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานมาใช้กับงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์
- สพ.ญ.ดร.พรเพ็ญ พัฒนโสภณ จาก หน่วยแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ผู้ซึ่งให้ลูกศิษย์ทั้งความรู้ การทำงานวิจัยด้านจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ และ จริยธรรมในการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง
- ศ.ดร.สมพล ประคองพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ขอขอบคุณสำหรับโอกาส และความปรารถนาดีที่อาจารย์มีให้ต่อศิษย์เสมอมา
- ขอขอบคุณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และ สถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้ง พี่ ๆ น้อง ๆ ในหน่วยแบคทีเรียทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณ บุคคลอันเป็นที่รักยิ่งของข้าพเจ้า ได้แก่ บิดา มารดา และ สมาชิกในครอบครัว “หอมหวล” ขอขอบคุณสำหรับการเป็นที่พึ่งพิงทั้งกาย และ ใจ ช่วยให้ข้าพเจ้าสามารถเอาชนะต่ออุปสรรค และความย่อท้อในชีวิต จวบจนทุกวันนี้

นายอรรถชัย หอมหวล

นักศึกษาผู้ทำวิจัย

30 มิถุนายน 2547

ABSTRACT

Project Code: BGJ4680021

Project Title: Immunogenicity of Outer Membrane proteins of *Pasteurella multocida* using Reconstituted Newcastle Disease Viral Envelope as Vaccine Delivery System

Investigator: Prof.Dr.SOMPOL PRAKONGPAN, and Mr.ATTACHAI HOMHUAN
Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

E-mail Address: pyspk@mahidol.ac.th

Project Period: 1 year (Since July 1, 2003 until June 30, 2004)

Fowl cholera is an infectious disease affecting poultry and is caused by *Pasteurella multocida*. The search for vaccine candidates against fowl cholera, most attention has been focused on outer membrane proteins, which are considered as immunodominant antigens. The objective of the work described in this report was to develop a subunit vaccine against *P. multocida* based on OMPs that are incorporated in lipid-based multimeric vehicles. OMPs from *P. multocida* serotype A:1 strain NIAH DU1551/97 were isolated and then characterized by using SDS-PAGE analysis. The OMPs were solubilized in non-ionic detergent or associated in virosomes made from Newcastle disease (ND) virus, and immunostimulating complexes (ISCOMs). A detailed study of physicochemical characteristics of ND-virosomes and ISCOMs containing OMPs were described. To evaluate the formulations as possible vaccine, their potency was evaluated in ICR mice. SDS-PAGE analysis revealed that OMP fraction contained eleven proteins that range in size from 30 to 80 kDa. The most prominent bands were 30, 33, and 45 kDa. ND-virosomes and ISCOMs, which are associated by OMP fraction, showed an average diameter of 180 and 30 nm, respectively. OMPs incorporated in the ND-virosomal membrane inhibited the capability of virosomes to agglutinate chicken red blood cells. Animals were challenged after two immunizations. All vaccines fully protected mice against a low dose challenge. In the case of a high dose challenge, micellar OMPs provided 80% protection, whereas OMPs incorporated in virosomes or ISCOMs gave 100% protection, which is comparable to that of inactivated whole cell vaccines. In conclusion, antigen loaded virosomes and ISCOMs are potential *pasteurella* subunit vaccines.

KEYWORDS: ISCOMs; Newcastle disease-virosomes; Outer membrane proteins; *Pasteurella multocida*; subunit vaccine

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BGJ4680021

ชื่อโครงการ: คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนผิวนอกของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน

ชื่อนักวิจัย: ศ.ดร.สมพล ประคองพันธ์ และ นายอรรถชัย หอมหวล
ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: pyspk@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 ปี (ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2546 ถึง วันที่ 30 มิถุนายน 2547)

อหิวาต์สัตว์ปีกเป็นโรคติดเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา การวิจัยค้นหาวัคซีนเพื่อต่อต้านโรคอหิวาต์สัตว์ปีก โดยมากมุ่งเน้นไปที่โปรตีนผิวนอกของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเป็นแอนติเจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สำคัญของโรคนี้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้ คือเพื่อพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยต่อต้านเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา โดยใช้โปรตีนผิวนอกของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาผสมรวมอยู่ในระบบนำส่งแอนติเจนหลายหน่วยแอนติเจนพร้อมกันในสารสื่อขนส่งไขมัน โปรตีนผิวนอกของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา ซีโรทัยป์ เอ:หนึ่ง สเตรน NIAH DU1551/97 ถูกนำมาสกัดแยก และศึกษาแถบโปรตีนองค์ประกอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส สูตรตำรับวัคซีนที่ศึกษาได้แก่ โปรตีนผิวนอกที่ถูกละลายในสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ โปรตีนผิวนอกที่สกัดแทรกตัวอยู่ในไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสก่อโรคนิวคาสเซิล และ โปรตีนผิวนอกที่ผสมอยู่ในอนุภาคสารประกอบเชิงซ้อนที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (อิสคอม) ในรายงานการศึกษาฉบับนี้ได้อธิบายคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของสูตรตำรับวัคซีนที่เตรียมขึ้น และ ประเมินประสิทธิภาพของสูตรวัคซีนในหนูสายพันธุ์ ICR การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าส่วนสกัดโปรตีนผิวนอกมีแถบโปรตีนรวม 11 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30 ถึง 80 กิโลดัลตัน เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยแถบโปรตีนเข้มอยู่ที่น้ำหนักโมเลกุล 30, 33 และ 45 กิโลดัลตัน ไวโรโซมและอิสคอมที่มีโปรตีนผิวนอกสอดผสมอยู่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 180 และ 30 นาโนเมตร ตามลำดับ การสอดผสมโปรตีนผิวนอกกับไวโรโซมมีผลยับยั้งการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไวโรโซม หนูทดลองจะได้รับพิษทับลหลังการให้วัคซีนซ้ำสองครั้ง ในกรณีการให้พิษทับลในขนาดต่ำพบว่าวัคซีนทุกสูตรตำรับให้ผลการคุ้มครองโรคได้ 100% ในกรณีการให้พิษทับลในขนาดสูงพบว่าสูตรโปรตีนผิวนอกในรูปไมเซลล์ให้ผลคุ้มครองโรค 80% ในขณะที่สูตรตำรับไวโรโซม และ อิสคอม ซึ่งมีโปรตีนผิวนอกผสมรวมอยู่ให้ความคุ้มครองโรค 100% เช่นเดียวกันกับวัคซีนชนิดเชื้อตายทั้งตัว สรุปได้ว่าโปรตีนแอนติเจนที่บรรจุในไวโรโซม และ อิสคอม มีศักยภาพต่อการพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยป้องกันโรคพาสเจอร์ลล่า

คำหลัก: อิสคอม; ไวโรโซม; โปรตีนผิวนอก; พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา; วัคซีนหน่วยย่อย

เนื้อหางานวิจัย

“คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนเมมเบรนผิวนอก
ของเชื้อพาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา
โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน”

บทนำ

โรคอหิวาต์สัตว์ปีก (Fowl Cholera) เป็นโรคติดเชื้อร้ายแรง ส่งผลเสียอย่างมหาศาลต่อเศรษฐกิจของเกษตรกร และประเทศชาติ โดยมีเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* เป็นเชื้อก่อโรค⁽¹⁾ โดยทั่วไปแล้วการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในสัตว์ป่วยมักไม่ทันที่ ทั้งนี้เพราะเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการติดเชื้อชนิดเฉียบพลัน และมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วไปทั่วทั้งฝูงสัตว์ปีก อาการทางคลินิกที่สำคัญคือ การติดเชื้อในกระแสเลือด การทำงานของระบบทางเดินหายใจผิดปกติ และทำให้สัตว์ป่วยตายได้ในที่สุด⁽²⁾ การป้องกันโรคติดเชื้อชนิดนี้ยังคงพึ่งพิงวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเป็นอาวุธสำคัญ การให้วัคซีนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน สามารถป้องกันโรคเมื่อเกิดการบุกรุกจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ย้อนหลังกลับไปกว่าร้อยปี Louis Pasteur ได้พัฒนาวัคซีนป้องกันโรคชนิดนี้ ซึ่งได้ผลดีในการป้องกันโรคในขณะนั้น และถือว่าเป็นตัวอย่างของความสำเร็จของวัคซีนในทางการแพทย์ วัคซีนที่ใช้ป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกมีทั้งชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live Attenuated Vaccines) และชนิดเชื้อตาย (Inactivated Vaccines)^(1, 3)

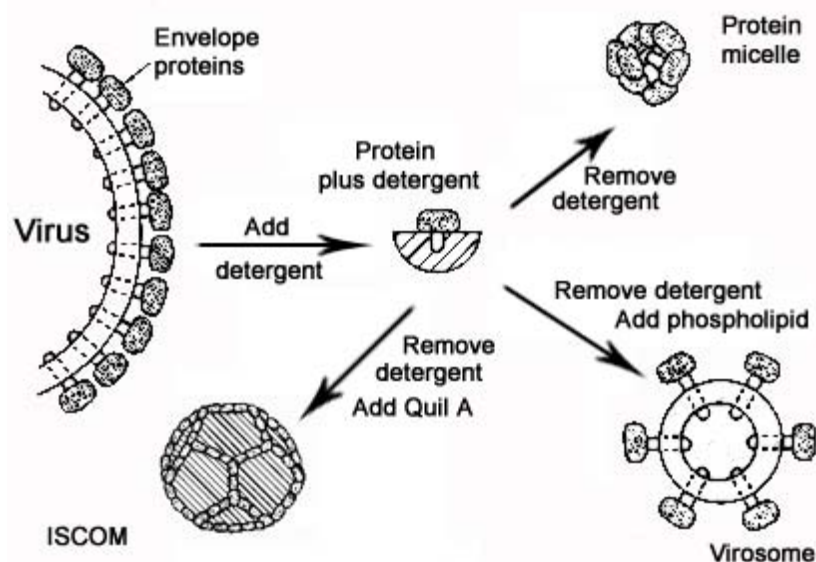
วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์โดยทั่วไปแล้วไม่ได้รับความนิยมในการใช้ ยกเว้นในประเทศแถบอเมริกาเหนือ ทั้งนี้เพราะเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์มีโอกาสดึงดูดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงได้⁽³⁾ วัคซีนอีกชนิดหนึ่งคือ วัคซีนชนิดเชื้อตาย สำหรับประเทศไทยวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีกผลิตโดยกรมปศุสัตว์ที่ใช้ในปัจจุบัน เตรียมจากการทำลายตัวเชื้อแบคทีเรียทั้งตัวด้วยฟอร์มาลิน (formalinized-killed whole cell vaccine) และเตรียมอยู่ในรูปวัคซีนอิมัลชัน (Emulsion) โดยใช้น้ำมันแร่ (Mineral Oil) เป็นตัวภาคน้ำมัน ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Adjuvant) วัคซีนชนิดเชื้อตายนี้มักทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณที่ฉีด ความกังวลด้านการเป็นสารก่อมะเร็งของอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) ที่หลงเหลือในตำรับ และความหนืดของตำรับอิมัลชันยังเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการบริหารจัดการ และการฉีดวัคซีนอีกด้วย

การพัฒนาวิทยาการด้านต่าง ๆ ได้แก่ ชีวเคมีเชิงโมเลกุล (molecular biochemistry), ภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) และเทคโนโลยีเภสัชกรรม (pharmaceutical technology) เป็นเครื่องมือที่สำคัญทำให้วิทยาการวัคซีนก้าวหน้า และเป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่มีระเบียบแบบแผนมากขึ้น โดยเฉพาะ การผลิตวัคซีนที่ไม่ได้ใช้จุลินทรีย์ทั้งตัวแบบแต่ก่อน ดังเช่น วัคซีนหน่วยย่อย (subunit vaccine) และ วัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccine) อาจกล่าวได้ว่าในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา และอนาคตอันใกล้นี้ เป็นยุคของ วัคซีนหน่วยย่อย ทั้งนี้เพราะวัคซีนดังกล่าวสามารถตรวจสอบคุณลักษณะได้สะดวก น่าเชื่อถือมากขึ้น มีความปลอดภัย และลดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ลงได้อย่างมาก รวมทั้งยังลดความกังวลเรื่องการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมจากเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาเตรียมวัคซีน (Genetic Pollution) ส่วนประกอบของวัคซีนหน่วยย่อยนี้มีเพียงเฉพาะ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนเท่านั้น (Antigenic determinant) อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่มักพบเสมอ ๆ กับวัคซีนหน่วยย่อย คือ ประสิทธิภาพของวัคซีนมักด้อยกว่าวัคซีน

ชนิดดั้งเดิม ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาระบบนำส่งวัคซีน (Vaccine delivery vehicle) ซึ่งทำหน้าที่นำส่งแอนติเจนสู่เซลล์ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และ กระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น (Adjuvant)

โปรตีนผิวนอก (Outer Membrane Proteins; OMPs) ของเชื้อ *P. multocida* สามารถทำหน้าที่เป็นแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ได้⁽³⁻⁶⁾ และอาจมีการพัฒนาใช้เป็นวัคซีนหน่วยย่อยได้ในอนาคต นอกเหนือจากการค้นพบชิ้นส่วนแอนติเจนที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว การนำส่งแอนติเจนเหล่านั้นด้วยระบบนำส่งวัคซีนที่เหมาะสม (Proper Vaccine Delivery System) ยังเป็นกุญแจสำคัญอีกประการหนึ่ง ต่อความสำเร็จของวัคซีน⁽⁷⁾ ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยกล่าวถึงบทบาทของระบบนำส่งวัคซีนสำหรับ OMPs ที่สกัดแยกจากเชื้อ *P. multocida* ต่อประสิทธิภาพของวัคซีน ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงตั้งคำถามการวิจัยในครั้งนี้ คือ ผลของสูตรตำรับวัคซีนหลาย ๆ ชนิดซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ OMPs ของเชื้อ *P. multocida* ต่อประสิทธิภาพการป้องกันโรคในหนูทดลอง และเป็นที่มาของงานวิจัยฉบับนี้

หนทางที่แอนติเจนถูกนำเสนอต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญ เพื่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม โปรตีนเมมเบรน (Membrane proteins)^(7, 8) เช่น โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza envelope protein) หรือ OMPs ของเชื้อแบคทีเรียสามารถถูกนำเสนอได้ในรูปของ โปรตีนไมเซลล์ (protein micelles), ลิโปโซม (Liposomes), และ อีสคอม (Immuno-Stimulating Complexes; ISCOMs) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1: การนำเสนอโปรตีนผิวหน้าของเชื้อไวรัส (หรือแบคทีเรีย) ในรูปแบบที่มีการจัดเรียงตัวสามมิติ (Conformation) คล้ายคลึงกันกับตัวเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิม เชื่อว่าจะมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เสมือนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งตัว โดยมีรูปแบบการนำเสนอได้แก่ ไมเซลล์, ไวโรโซม (ลิโปโซมประเภทหนึ่ง) และ อีสคอม

ลิโปโซม (Liposomes) คือถุงหุ้มไขมันขนาดเล็กมากซึ่งได้มีการรายงานถึงการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งแอนติเจน อย่างไรก็ตามนักวิจัยมักรายงานว่าลิโปโซมไม่ได้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากนัก (Low adjuvant activity)^(7, 8) และจำเป็นต้องเติมสารกระตุ้นตัวอื่น ๆ ลงไปในลิโปโซมด้วยถึงจะมีประสิทธิภาพดีขึ้น Almeida และคณะได้สร้างลิโปโซมวัคซีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Liposomal influenza vaccine) ซึ่งเตรียมจากการนำเอาโปรตีนเปลือกหุ้มชนิด Hemagglutinin (HA) มาสอดแทรกเข้าไปในชั้นไขมันของลิโปโซม และได้ตั้งชื่อระบบลิโปโซมใหม่นี้ว่า “ไวโรโซม” (Virosomes)⁽⁹⁾

ไวโรโซมเป็นถุงไขมันขนาดเล็กชนิดมีเยื่อหุ้มชั้นเดียว (Small Unilamellar Vesicles; SUVs) โดยมีโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส (Viral envelope proteins) เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ในวารสารวิทยาศาสตร์บางฉบับอาจเรียกไวโรโซมนี้ว่า อิมมิวโนโซม (Immunosomes) อนุภาคไวโรโซมมีความคล้ายคลึงกับตัวไวรัสดั้งเดิมมาก แต่ไวโรโซมจะไม่มี RNA และ องค์ประกอบอื่น ๆ ที่ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัส นอกจากนี้โปรตีนเปลือกหุ้มไวรัส เช่น โปรตีน HA ของ Influenza virus ยังสามารถจับกับ sialic acid ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์โมเลกุล (receptor) บนผิวหน้าของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย รวมทั้งเซลล์ตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย หลังจากเกิดการจับตัวระหว่างไวโรโซมกับเซลล์ แล้วจะเกิดกระบวนการเชื่อมอนุภาค (Fusion) ทำให้เมมเบรนของไวโรโซมและเมมเบรนของ host cell รวมเป็นเมมเบรนเดียวกัน ด้วยเหตุนี้นักวิจัยทางด้านเภสัชศาสตร์จึงพยายามนำไวโรโซมมาใช้เป็นระบบนำส่งยา แอนติเจน หรือ สารชีวภาพโมเลกุลใหญ่ และคาดว่าระบบไวโรโซมสามารถเปลี่ยนแปลง การจราจรของสารนำส่งภายในเซลล์ได้ (Intracellular Trafficking) ในวงการวัคซีนเองก็มีความพยายามสอดผสมแอนติเจนชนิดอื่น ๆ เข้าไปภายในอนุภาคเดียวกันกับไวโรโซม ซึ่งมีรายงานว่ามียผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่สอดแทรกเข้าไปได้ดีขึ้นกว่าวัคซีนแบบเดิม^(10, 11)

โรคติดเชื้อไวรัสที่ส่งผลเสียต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ปีกทั่วโลกอย่างมหาศาลคือโรคนิวคาสเซิล (Newcastle Disease; ND) โดยมีไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle Disease Virus; NDV) เป็นเชื้อก่อโรค ไวรัส NDV มีโปรตีนเปลือกหุ้มสองชนิด ได้แก่ Hemagglutinin-neuraminidase (HN) และ Fusion (F) โปรตีนดังกล่าวไม่เพียงแต่เป็นแอนติเจนของโรค ND แต่ยังมีความสำคัญต่อการบุกรุกของเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์อีกด้วย กล่าวคือ HN จะจับกับ receptor บนผิวเซลล์ จากนั้น F โปรตีนจะเชื่อมต่อนิวคาสเซิลไวรัสกับผิวเซลล์^(12, 13) หรืออาจกล่าวโดยสรุปว่าโปรตีนเปลือกหุ้มสองชนิดนี้ (HN and F) ทำหน้าที่เหมือนกันกับ โปรตีน HA ของ Influenza virus จากหลักการดังกล่าวข้างต้น ไวโรโซมซึ่งมีโปรตีน HN และ F เป็นองค์ประกอบอาจเป็นระบบนำส่งแอนติเจนอื่น ๆ (เช่น OMPs) สำหรับวัคซีนป้องกันโรคสัตว์ปีกก็เป็นได้ เหมือน ๆ กับการนำไวโรโซมผลิตจากเชื้อไวรัส Influenza มาใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนในมนุษย์

อิสคอม (ISCOMs) เป็นอนุภาคทรงกลมขนาดซูเปอร์จิว (30-40 นาโนเมตร) ประกอบด้วย ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) คอล레스เตอรอล (Cholesterol) สารผสมซาโปนิน (Saponin mixture) ชื่อว่า Quil A และโปรตีนแอนติเจน อนุภาคอิสคอมมีคุณสมบัติโดดเด่นประการสำคัญ

คือ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงเมื่อเทียบกับ adjuvants ชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เชื่อว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์ของ Quil A ซึ่งมีรายงานการใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในทางสัตวแพทยมานานกว่า 30 ปี^(7, 8)

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาในระบบนำส่งแอนติเจนสำหรับ OMPs ที่แยกได้จากเชื้อ *P. multocida* การศึกษานี้จึงออกแบบมาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนหน่วยย่อย ซึ่งมี OMPs เป็นแอนติเจน และเตรียมอยู่ในรูปสูตรวัคซีนต่าง ๆ กัน ได้แก่ ไมเซลล์, ไวโรโซม และ อีซคอม นอกจากประสิทธิภาพของวัคซีนแล้ว ผู้วิจัยยังได้ประเมินคุณสมบัติของวัคซีนที่เตรียมได้ โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางเคมี-กายภาพอีกด้วย

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียในการเตรียมวัคซีน

การทดลองเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้คัดเลือก *Pasteurella multocida* strain NIAH DU1551/97 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากเป็ดป่วย (Duck) ซึ่งส่งมาตรวจวินิจฉัยโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (National Institute of Animal Health; NIAH Thailand) โดยพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ให้ความคุ้มครองสูงสุดต่อในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้คัดเลือกมา โดยก่อนการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* strain NIAH DU1551/97 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะฉีดแบคทีเรียเข้าในช่องท้องของหนู mouse เพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อโรคก่อน (virulence)

2. การเตรียมวัคซีนแบคทีเรียชนิดเชื้อตาย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีนหน่วยย่อยที่มี OMPs เป็นแอนติเจนหลัก วัคซีนชนิดเชื้อตายซึ่งเตรียมโดยการทำลายเชื้อด้วยฟอร์มาลินจึงใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัคซีน การทดลองได้ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันอหิวาต์สัตว์ปีกในปัจจุบัน, FC-Pakchong, ซึ่งผลิตโดยกรมปศุสัตว์ และ สายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจากคณะผู้วิจัย NIAH DU1551/97

แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAB (Tryptic Soy Agar with 5% defibrinated sheep blood) จากนั้นย้ายแบคทีเรีย หนึ่งถึงสอง โคโลนี ลงใน 100 มิลลิลิตรของ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI (Brain Heart Infusion Media, Difco[®]) พร้อมทั้งเขย่า และบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้เชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 1.15×10^{10} cfu/ml และ 8.5×10^9 cfu/ml ของสายพันธุ์ FC-Pakchong และ NIAH DU1551/97 ตามลำดับ ทดสอบเอกลักษณ์ และความบริสุทธิ์ ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคการย้อมสีแกรม และการทดสอบทางชีวเคมี⁽¹⁴⁾ จากนั้นเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะถูกนำมาทำลายฆ่าเชื้อ โดยการเติมสารละลายฟอร์มาลิน ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟอร์มาลินเป็น 0.3 % (v/v) และบ่มผสมกับฟอร์มาลินที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่าเบา ๆ เป็นช่วง ๆ ข้ามคืน เจลอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Aluminium hydroxide gel, ได้รับความอนุเคราะห์

จากศูนย์ชีวภาพทางสัตวแพทย์ กรมปศุสัตว์) จะถูกเติมลงไปเพื่อดูดซับแบคทีเรียเชื้อตาย โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เป็น 25% (v/v)

3. การสกัดแยกโปรตีนผิวนอก (OMPs) จากเชื้อ *P. multocida*

OMPs ถูกสกัดแยกออกจากเชื้อแบคทีเรียโดยใช้หลักการของ Choi-Kim และคณะ⁽¹⁵⁾ โดยมีการปรับเปลี่ยนวิธีการบางอย่างตามเพื่อความเหมาะสมต่อสารเคมีและ เครื่องมือที่คณะผู้วิจัยมีอยู่ โดยมีวิธีการอธิบายได้ดังนี้ เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* เซตรอน NIAH DU1551/97 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAB เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสองโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไปผสมลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ปริมาตร 12 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อโดยไม่เขย่าเป็นเวลาอีก 18 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ขั้นต่อไป BHI ซึ่งมีแบคทีเรียเจริญอยู่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะถูกนำไปเปิดลงใน BHI medium ปริมาตร 1 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในตุ่มหมั่นเขย่าได้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เซลล์แบคทีเรียจะถูกแยกโดยใช้เทคนิคการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) ที่ความเร็ว 12,000 x g (Tomy Seiko) เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้างเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งด้วย sterile saline (0.15 M NaCl) แล้วจึงแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียในสารละลาย Tris-EDTA (50 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 7.2) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำเซลล์แบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย Tris-EDTA ข้างต้นผ่าน French Pressure Cell ที่แรงดัน 1,160 kg/cm² (40 K Spectronic) รวมสามครั้ง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตก เศษซากเซลล์ (cell debris) ถูกกำจัดออกไปโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g (Tomy Seiko) เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารแขวนลอยที่กำจัดเศษเซลล์ออกไปแล้วมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ความเร็ว 180,000 x g, fixed angle rotor 50 Ti เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส (Beckman) ตะกอนโปรตีนที่ข้างหลอดปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาแขวนลอยในสารละลาย Tris-EDTA ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร และทำการละลายโดยการเติมสารละลาย Triton X-100 20% (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปเขย่าผสมเป็นช่วง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารผสมที่ได้นี้คือ OMPs ที่ถูกละลายอยู่ใน Triton X-100 (ความเข้มข้นสุดท้าย 2% w/v) หรือเรียกว่า สารละลายโปรตีนไมเซลล์ (OMPs micellar solution)

4. การเตรียมไวรัสนิวคาสเซิล

ไวรัสก่อโรคนิวคาสเซิล เซตรอน ลาโซต้า (NDV strain La Sota, ได้รับความอนุเคราะห์จาก Fort Dodge Animal Health, The Netherlands) ถูกนำมาเพาะเชื้อเพิ่มจำนวนโดยการฉีดสารละลายไวรัส NDV ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ลงในช่องอะลันโตอิก (allantoic sac) ของไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน หลังจากการเพาะบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส ไข่ไก่ฟักจะถูกนำไปเข้าห้องเย็นเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นจะทำการดูดน้ำใส allantoic fluid โดยการเจาะไข่ไก่ฟักและใช้ไปเปิดขนาดเล็กดูดน้ำใสขึ้นมา นำส่วน Allantoic fluid มาทำให้ใสโดยการปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (Tomy Seiko) ไวรัส NDV ในน้ำ allantoic fluid จะถูกปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่ความเร็ว 100,000 x g เป็นเวลา 150 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (Beckman, fixed angle 50 Ti) ตะกอนไวรัสที่ข้างหลอดปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยเทคนิค Discontinuous sucrose gradient centrifugation กล่าวคือ แขนงตะกอนไวรัสด้วยสารละลาย Tris-EDTA ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ นำสารแขวนตะกอนไวรัสวางบนชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยกันหลอดปั่นเหวี่ยงมีสารละลายซูโครสความเข้มข้น 60% (w/w) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วย 1.5 มิลลิลิตรของสารละลายซูโครสความเข้มข้น 50%, 40%, 30, 20, และ 10% ตามลำดับ แล้วตามด้วยสารแขวนตะกอนไวรัส NDV

หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่ความเร็ว 140,000 x g เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส (Beckman, SW 40 Ti) จะเห็นคอลลอยด์ของไวรัสที่ผิวประจันระหว่างสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 และ 40% นำไปเปิดขนาดเล็กดูดเอาสารแขวนลอยไวรัสดังกล่าวออกมา แล้วแบ่งบรรจุใส่ในหลอดเก็บเชื้อปริมาตรเล็ก เก็บไวรัสไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

5. การเตรียมไวโรโซมเปล่า (Blank virosomes) และการสอดผสมโปรตีนผิวนอก-OMPs ในไวโรโซม

เตรียมไวโรโซมจากเชื้อไวรัส NDV โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการเตรียม Influenza virosomes⁽¹⁶⁾ โดยเปลี่ยนแปลงวิธีการเล็กน้อยตามความเหมาะสมของเครื่องมือและสารเคมีที่มีเริ่มต้นโดยการปั่นเหวี่ยงสารแขวนตะกอนไวรัสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่ความเร็ว 100,000 x g เป็นเวลา 150 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (Beckman, fixed angle rotor 50 Ti) นำตะกอนไวรัสที่ได้มาแขวนลอยในสารละลาย Tris-EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมี Triton X-100 ความเข้มข้น 2% (w/v) อยู่ด้วย ทำการบ่มผสมที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งเขย่าเป็นช่วง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะเป็นการทำลายไวรัส ซึ่งทำให้เปลือกไวรัสละลายอยู่ในสารละลาย Triton X-100 ในขณะที่ RNA segments และโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ที่เปลือกหุ้มจะไม่สามารถละลายได้ จากนั้นทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายทิ้งไปโดยค่อย ๆ ไปเปิดสารผสมไวรัสลงบนหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีสารละลายซูโครสความเข้มข้น 20% (v/v) อยู่ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่ความเร็ว 140,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยสารที่ไม่ละลายจะตกตะกอนแน่นอยู่ที่ก้นหลอด ส่วนเปลือกหุ้มไวรัสในสารละลาย Triton X-100 จะลอยอยู่บนสารละลายซูโครส ใช้ไปเปิดดูดสารละลายส่วนใสออกมา

สารละลายส่วนใสที่แยกออกมานี้ ประกอบด้วยเปลือกหุ้มไวรัส (ซึ่งมีทั้งโปรตีนและไขมันเป็นองค์ประกอบ) ละลายอยู่ในโครงสร้างไมเซลล์ (micellar structure) ของ Triton X-100 เพื่อทำการเตรียมไวโรโซมเปล่า ขั้นแรก เตรียมฟิล์มไขมันแห้งของ egg phosphatidylcholine (EPC), phosphatidylethanolamine (PE), และ cholesterol (Chol) อัตราส่วนผสมโดยโมล

2:1:2 จากนั้นนำสารละลายเปลือกหุ้มไวรัสใน Triton X-100 ลงไปละลายฟิล์มไขมัน จนกระทั่งได้สารละลายใส (ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้อัตราส่วนโดยโมลของไขมันเปลือกหุ้มไวรัส ต่อ ฟิล์มไขมัน เป็น 3:7) หลังจากนั้นจะกำจัด Triton X-100 ออกไป โดยใช้เทคนิค Polymer Adsorption กล่าวคือ เติมโพลิเมอร์ชนิด Biobeads SM-2 จำนวน 80 มิลลิกรัมลงไปเขย่าผสมอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (IKA Schuttler MTS-2, $1,400 \text{ min}^{-1}$) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และพักไว้ไม่เขย่าสารผสมเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม Biobeads SM-2 ลงไปอีก 35 มิลลิกรัม เขย่าอย่างแรงต่อเนื่องอีก 1 ชั่วโมง ตามด้วยการพักไม่เขย่าสารผสมอีก 30 นาที และขั้นสุดท้ายเติม Biobeads ส่วนสุดท้าย 35 มิลลิกรัม ตามด้วยการเขย่าอย่างแรงอีก 30 นาที ในขั้นตอนการดูดซับด้วยโพลิเมอร์นี้จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย จากสารละลายใส กลายเป็นคอลลอยด์ ซึ่งแสดงว่า Triton X-100 ถูกดูดซับไว้โดยโพลิเมอร์ และเป็นสภาวะบ่งชี้ว่าอนุภาคไวรัสสามารถเกิดขึ้นได้เองตามขั้นตอนการเตรียมดังกล่าว และไวรัสที่เตรียมได้นี้จะถูกเรียกว่าไวรัสโซมเปล่า (blank virosomes)

สำหรับการสอดผสม OMPs ที่สกัดแยกจาก *P. multocida* NIAH DU1551/97 ลงในอนุภาคไวรัสโซมทำได้โดยนำสารละลายไขมันเปลือกหุ้มไวรัสใน Triton X-100 (2% w/v) ที่ละลายฟิล์มไขมัน (EPC:PE:Chol, 2:1:2) มาผสมกับสารละลาย OMPs (มีปริมาณโปรตีน 1.5 มิลลิกรัมละลายอยู่ใน Triton X-100 2% w/v) โดยการเขย่าผสมเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกำจัด Triton X-100 ออกไปโดยทำตามกระบวนการเตรียมไวรัสโซมเปล่าที่อธิบายไว้ข้างต้น (polymer adsorption) ในที่สุดจะได้ไวรัสโซมซึ่งมี OMPs สอดแทรกอยู่ในอนุภาค

ขั้นตอนต่อไป เป็นการทำให้ไวรัสโซมเปล่า และ ไวรัสโซมที่มี OMPs สอดผสมอยู่บริสุทธิ์มากขึ้นกำจัดองค์ประกอบส่วนเกินที่ไม่ถูกผสมรวมในอนุภาคออกไป (non-incorporated components) ซึ่งทำได้โดยใช้เทคนิคการปั่นเหวี่ยงชนิด discontinuous sucrose gradient centrifugation กล่าวคือ ไปเปิดสารละลายซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในส่วนก้นหลอดปั่นเหวี่ยง ตามด้วยชั้นของสารละลายซูโครสความเข้มข้น 40 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชั้นของสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10 % (w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ ชั้นของสารละลายซูโครสความเข้มข้น 5 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วจึงใช้ไปเปิดขนาดเล็กค่อย ๆ วางชั้นของไวรัสโซม (หรือ ไวรัสโซมที่มี OMPs สอดผสมอยู่) ลงไป และเติมส่วนที่เหลือของหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลาย Tris-EDTA หลังจากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงไปปั่นด้วยเครื่อง Ultracentrifugation ที่ความเร็ว $140,000 \times g$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส (Beckman, SW 40 Ti) เมื่อเสร็จสิ้นการปั่นเหวี่ยงจะมองเห็นคอลลอยด์ของ ไวรัสโซม (หรือ ไวรัสโซมที่มี OMPs สอดผสมอยู่) ใช้ไปเปิดขนาดเล็กดูดเอาชั้นคอลลอยด์ออกมา จากนั้นนำไปบรรจุในถุงไดอะไลซิส (Dialysis sac) ซึ่งมี Molecular Weight Cut Off (MWCO) 10,000 แล้วทำการไดอะไลซิสโดยเปลี่ยนสารละลาย Tris-EDTA หลาย ๆ ครั้ง ไวรัสโซม

(หรือ ไวโรโซมที่มี OMPs สอดผสมอยู่) ที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้วจะถูกแบ่งบรรจุในหลอดเก็บเชื้อปริมาตรเล็ก แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมอิสคอมซึ่งมีโปรตีนผิวนอก-OMPs-สอดผสมอยู่

อิสคอม (ISCOMs) ซึ่งมีโปรตีนแอนติเจน OMPs เตรียมได้โดยเทคนิคพื้นฐานการเตรียมอิสคอมชนิด Classical Centrifugation Method⁽¹⁷⁾ ขั้นแรก เตรียมฟิล์มไขมันซึ่งมี PE และ Chol อย่างละ 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นทำการละลายฟิล์มไขมันด้วยสารละลาย 2% (w/v) Triton X-100 ใน Tris-EDTA buffer ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร หลังจากละลายฟิล์มไขมันจนได้สารละลายใสแล้ว จึงเติมสารละลาย 10% (w/v) Quil A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และตามด้วยสารละลาย OMPs (มีปริมาณโปรตีน 1.5 มิลลิกรัม) ลงผสมเข้าด้วยกัน ผสมเบา ๆ ด้วยการเขย่าเบา ๆ เป็นช่วง ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้อัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่าง Quil A: PE: Chol: OMPs เป็น 2:1:1:3

กำจัด Triton X-100 ออกจากสารละลายผสมโดยการเขย่ากับ Biobeads SM-2 ตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในส่วน “การเตรียมไวโรโซม (5)” หลังจากนั้นทำให้อิสคอมที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น กำจัด non-incorporated components ออกไป โดยใช้เทคนิคปั่นเหวี่ยงชนิด discontinuous sucrose gradient centrifugation กล่าวคือ นำสารละลายซูโครสความเข้มข้นจากมากไปน้อยวางลงในหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นชั้น ๆ ชั้นละ 1.5 มิลลิลิตร เริ่มจาก 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, และ 10% แล้วจึงค่อย ๆ ไปเปิดอิสคอมลงบนชั้นบนสุด จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยง ไปปั่นด้วยเครื่อง Ultracentrifugation ที่ความเร็ว 140,000 x g เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Beckman, SW 40 Ti) หลังการปั่นเหวี่ยงใช้ไปเปิดขนาดเล็กดูดเอาส่วน คอลลอยด์ซึ่งเป็นส่วนที่มีอนุภาคอิสคอมอยู่ จากนั้นนำสารคอลลอยด์ไปบรรจุใน dialysis sac (MWCO 10,000) ทำการ dialysis โดยเปลี่ยน Tris-EDTA buffer หลาย ๆ ครั้ง หลังจากนั้นเก็บและแบ่งบรรจุ สารคอลลอยด์อิสคอมในหลอดเก็บเชื้อปริมาตรเล็ก แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

7. การศึกษาคุณลักษณะของสูตรตำรับ OMPs

7.1. การหาขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค

เนื่องจากสูตรตำรับ OMPs ที่เตรียมขึ้นอยู่ในลักษณะอนุภาคคอลลอยด์ และ วิธีการฉีดเป็นการบริหารวัคซีนเข้าร่างกาย ดังนั้นขนาดของอนุภาค และการกระจายขนาดอนุภาคจึงเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญอย่างยิ่งต่อสูตรตำรับวัคซีน กล่าวคือ ควรมีขนาดอนุภาคเล็กสามารถกรองปราศจากเชื้อได้ และมีการกระจายขนาดอยู่ในช่วงแคบ เทคนิคที่ใช้ในการวัดขนาดอนุภาคเรียกว่า “Dynamic Light Scattering” โดยตั้งข้อสมมุติฐานว่า อนุภาคที่ทำการวัดเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเฉลี่ยของอนุภาค (mean hydrodynamic diameter) ถูกวัดและประมวลผลด้วย Malvern 4700 system โดยใช้ DLS software (Malvern, UK) เมื่อเติมสารแขวนลอยไวโรโซมชนิดที่มี

OMPs ผสมอยู่ หรือ สูตรอิสคอม ใน cuvette รูปทรงกระบอก และนำ cuvette ไปวางไว้ในตำแหน่งซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิเป็น 25 ± 1 องศาเซลเซียสแล้ว แหล่งกำเนิดแสง (75-mW argon laser) จะโฟกัสไปที่สารที่บรรจุใน cuvette แสงที่กระจายออกไปจากสารตัวอย่าง (scattered light) จะถูกตรวจจับด้วย photomultiplier sensor ที่ทำมุม 90 องศา กับแหล่งกำเนิดแสง สัญญาณที่ได้จะถูกประมวลผล และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค หน่วยนาโนเมตร (Z-averaged diameter, nm) และการกระจายขนาดอนุภาคจะบ่งบอกเป็นค่าดัชนี PD (polydispersity index) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.0 สำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดของสารแขวนลอยเท่ากันหมด (entirely monodisperse dispersion) ถึง 1.0 สำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดของสารแขวนลอยแตกต่างกันอย่างมาก (heterodisperse dispersion)

1.2. การศึกษารูปลักษณะของสูตรตำรับ OMPs

รูปลักษณะของไวโรโซม และอิสคอมที่มี OMPs ผสมรวมอยู่ด้วย ได้ถูกทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) โดยเจือจางสารตัวอย่าง (ไวโรโซม และ อิสคอม) ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หยดสารตัวอย่างที่เจือจางหนึ่งหยดลงบนแผ่นพาราฟิน (paraffin film) จากนั้นนำ copper grids ขนาด 300 mesh ซึ่งเคลือบด้วย Formvar วางลงบนหยดสารละลาย โดยใช้ด้านเคลือบสารวางคว่ำลงสัมผัสกับสารละลายตัวอย่าง เป็นเวลาประมาณ 2 นาที จากนั้นใช้กระดาษกรองซับสารละลายส่วนเกินออก หยดสารละลายสารทึบแสง (contrast solution) ซึ่งในที่นี้ใช้สารละลาย 2% uranyl acetate ในน้ำปราศจากเชื้อ ลงบน copper grids ใช้กระดาษกรองซับของเหลวส่วนเกินออก หลังจากปล่อยให้ grid แห้งดีแล้ว นำ grid ไปส่องภายใต้ TEM (H-7500 Hitachi, Japan)

1.3. การหาปริมาณโปรตีน และฟอสโฟลิปิดสัมพัทธ์ในสูตรตำรับ OMPs

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสูตรตำรับใช้วิธีของ Peterson ซึ่งเหมาะกับโปรตีนเมมเบรน โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสารมาตรฐานสัมพัทธ์⁽¹⁸⁾ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสโฟลิปิดทำตามขั้นตอนของ Rouser และคณะ⁽¹⁹⁾

1.4. การตรวจหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชนิด SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบโปรตีนในสูตรตำรับวัคซีน OMPs ที่เตรียมขึ้น โดยใช้เครื่อง Bio-Rad Mini-Protean III gel Plate Assembly

เจลที่ใช้มีสูตรตำรับดังแสดงในตารางที่ 1 โดยหลังจากปล่อยให้เจลเกิดการจับตัวอย่างสมบูรณ์แล้ว (gel polymerization) สูตรตำรับ OMPs ต่าง ๆ พร้อมทั้งโปรตีนมาตรฐานแสดงน้ำหนักโมเลกุล (reference proteins) จะถูกเติมลงไปในช่วงของเจล แต่ละช่อง หลังจากให้กระแส

ไฟฟ้าคงที่ที่ความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาทีแล้ว จึงแยกเอาชิ้นเจลออกมาและย้อมสีเจลนั้นด้วย Coomassie Blue Staining Method ซึ่งจะเห็นแถบโปรตีนเป็นสีน้ำเงิน-ม่วง

ตาราง 1: แสดงสูตรตำรับสารละลาย separating gel และ stacking gel เพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนในสูตรตำรับ

Stock solution	12.5% Separating gel	4% Stacking gel
30% acrylamide	3.20 ml	0.53 ml
Separating gel buffer*	2.50 ml	-
Stacking gel buffer**	-	1.0 ml
Distilled water	3.33 ml	2.47 ml
10% APS ^a	50 µl	30 µl
TEMED ^b	10 µl	5 µl
Total Volume	10.055 ml	4.035 ml

* Separating gel buffer, 100 ml composed of 75 ml of 2 M Tris-HCl pH 8.8, 4 ml of 10% SDS and 21 ml of distilled water

** Stacking gel buffer, 100 ml composed of 50 ml of 1 M Tris-HCl pH 6.8, 4 ml of 10% SDS and 46 ml of distilled water

^a ammonium persulfate

^b N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine

1.1. การศึกษาฤทธิ์การตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไวโรโซมเปล่า และ ไวโรโซมผสมโปรตีนผิวนอก OMPs

เนื่องจากโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส NDV ชนิด HN สามารถจับกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ทำให้เกิดการตกกลุ่มของเม็ดเลือด (hemagglutination; HA) ดังนั้นไวโรโซมที่เตรียมจากเปลือกหุ้มไวรัส NDV ก็น่าจะยังคงมีฤทธิ์ HA นี้เช่นกัน การทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาการทำงานทางชีวภาพของไวโรโซมเปล่า และไวโรโซมที่ผสม OMPs ในการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไก่⁽²⁰⁾ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้ ไปเปิดคอลลอยด์ของไวรัส NDV, หรือไวโรโซมเปล่า หรือ ไวโรโซมผสมโปรตีน OMPs ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของ U-shaped 96-wells plate จากนั้นทำการเจือจางคอลลอยด์เป็นอนุกรมอันดับสองไปเรื่อย ๆ จนสุดคอลัมน์สุดท้ายของแถวเดียวกัน เติมเม็ดเลือดแดงของไก่ (ความเข้มข้น 1% v/v) ลงไปในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่า plate ซ้าย-ขวาไปมาเบา ๆ เพื่อให้สารผสมแต่ละหลุมเข้ากัน หลังจากนั้นปล่อยให้ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วจึงสังเกตผล หากมีการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงจะมองเห็นเหมือนแผ่นพรหมอยู่ก้นหลุม (ผลบวก) แต่หากเกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (sedimentation) จะมองเห็นเป็นรูปกระดุมอยู่ก้นหลุมแทน (ผลลบ)

8. การศึกษาประสิทธิภาพของสูตรตำรับวัคซีนในหนูทดลอง

8.1. การหาค่า LD₅₀ ของ *P. multocida* ที่ใช้เป็นเชื้อพิษทาบ (Challenge)

หนูทดลองปราศจากเชื้อสายพันธุ์ ICR อายุ 4 สัปดาห์ ถูกนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสูตรตำรับวัคซีน โดยรูปแบบการทดลองในสัตว์ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

แบคทีเรีย *P. multocida* เซตรน NIAH DU1551/97 ถูกนำมาเลี้ยงใน BHI media อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถูกนำมาเจือจางเป็นอนุกรมอันดับสิบ (serial ten fold dilution) ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเป็น $1/10^{\text{th}}$, $1/100^{\text{th}}$, $1/10^{10\text{th}}$ จากนั้นแบ่งหนูทดลองออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว หนูแต่ละกลุ่มจะถูกฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (อนุกรมอันดับสิบ) เข้าทางช่องท้องหนู หลังจากนั้นสังเกตอาการ และ นับจำนวนหนูทดลองในแต่ละกลุ่มที่เสียชีวิตในแต่ละวัน คำนวณหาค่า LD₅₀ ตามวิธีการของ Reed and Muench⁽²¹⁾ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ค่า LD₅₀ เท่ากับ 6 cfu/ml

8.2. การให้วัคซีน และประสิทธิภาพของวัคซีนภายหลังการให้พิษทาบ

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มละ 60 ตัว ได้แก่งroup A และ กลุ่ม B จากนั้นภายในกลุ่ม A และ B แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 10 ตัว หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีดวัคซีนสูตรตำรับต่าง ๆ กันไปเข้าทางช่องท้องเมื่อมีอายุได้ 4 สัปดาห์ สูตรตำรับที่ใช้ทดลอง ได้แก่ โปรตีนผิวนอกในรูปไมเซลล์ (micellar OMPs, 60 µg protein), ไวโรโซมสอดผสมโปรตีนผิวนอก (virosomal OMPs, 60 µg protein), อีสกอม (ISCOMs containing OMPs, 60 µg protein), วัคซีนแขวนลอยในอลูมิเนียม ไฮดรอกไซด์เจลสองสูตร ซึ่งมีแบคทีเรีย *P. multocida* เซตรน FC-Pakchong (2.3×10^9 cfu/dose) และ เซตรน NIAH DU1551/97 (1.7×10^9 cfu/dose) ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมจะไม่ได้รับวัคซีนใด ๆ เลย

หลังจากนั้นอีกสองสัปดาห์ หนูทดลองจะได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีนสูตรตำรับเดิมอีกครั้ง เมื่อหนูอายุได้เจ็ดสัปดาห์ (หนึ่งสัปดาห์หลังจากกระตุ้นด้วยวัคซีน) หนูทั้งหมดจะได้รับเชื้อพิษทาบ (Bacterial challenge) ด้วยการฉีด subcutaneous โดยหนูในกลุ่ม A (รวม 6 กลุ่มย่อย) จะถูกฉีดแบคทีเรียพิษทาบในขนาด 100 เท่าของ LD₅₀ (low dose challenge) และ หนูในกลุ่ม B (รวม 6 กลุ่มย่อย) จะถูกฉีดแบคทีเรียพิษทาบในขนาด 1000 เท่าของ LD₅₀ (high dose challenge) การให้วัคซีนและการฉีดพิษทาบแสดงดังตารางที่ 2

เมื่อให้พิษทาบเรียบร้อยแล้ว สังเกตหนูทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน และนับจำนวนหนูที่เสียชีวิต คำนวณหาค่าดัชนีการป้องกันโรค (protective index; PI) ตามสูตรที่แสดงดังนี้

$$PI = \frac{\% \text{Mortality in controls} - \% \text{Mortality in vaccinates}}{\% \text{Mortality in controls}} \times 100$$

ตารางที่ 2: หนูทดลองสายพันธุ์ ICR แต่ละกลุ่มได้รับวัคซีนสูตรตำรับต่างกันไป และได้รับเชื้อพิษทาบหลังการให้วัคซีนครั้งที่สองแล้วเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์

กลุ่ม	สูตรตำรับ ^ก	ปริมาณพิษทาบที่ได้รับ
A	1A	Micellar OMPs
	2A	OMPs Virosomes
	3A	OMPs ISCOMs
	4A	WC-FC Pakchong ^ข
	5A	WC-NIAH DU1551/97 ^ข
	6A	Negative Control
B	1B	Micellar OMPs
	2B	OMPs Virosomes
	3B	OMPs ISCOMs
	4B	WC-FC Pakchong ^ข
	5B	WC-NIAH DU1551/97 ^ข
	6B	Negative Control

^กสูตรตำรับวัคซีนหน่วยย่อยซึ่งมี OMPs เป็นแอนติเจนหลัก ทุกสูตรประกอบด้วย OMPs ในปริมาณ 60 ไมโครกรัมต่อหนึ่งขนาดการฉีด

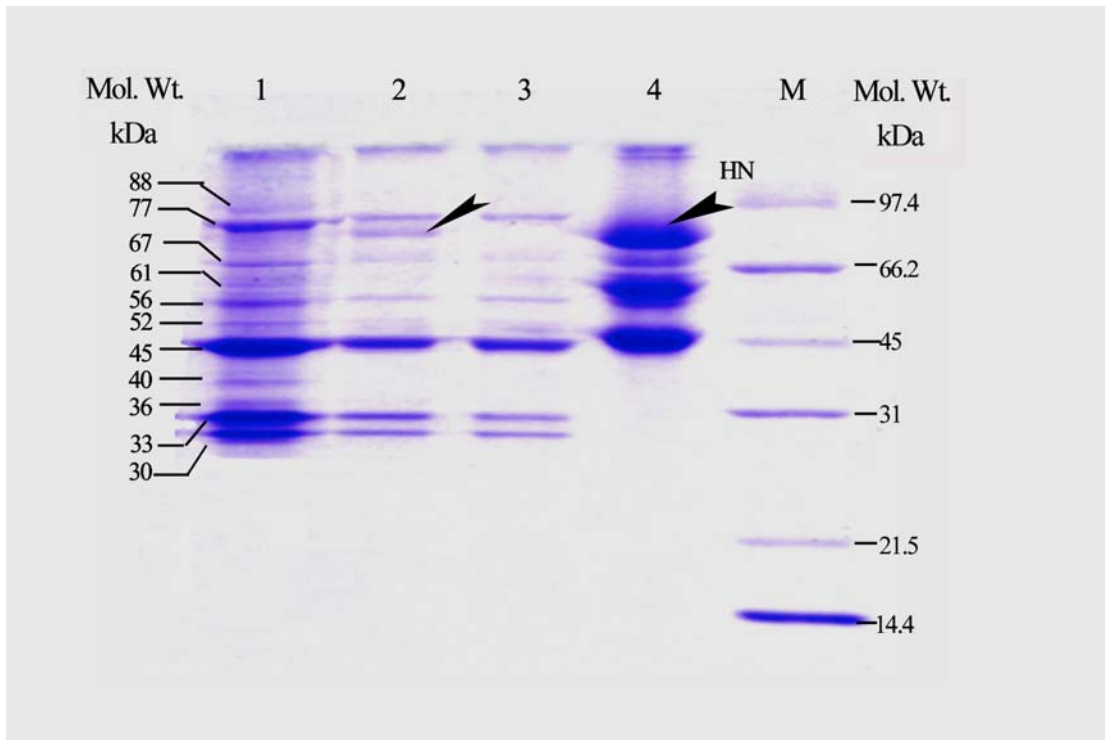
^ขสูตรตำรับวัคซีนดั้งเดิม เตรียมจากแบคทีเรียทั้งตัวเติบโตอยู่ใน BHI media และถูกทำลายเชื้อด้วยฟอร์มาลิน และดูดซับบนเจลอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์

ผลการทดลอง

การสกัดแยกโปรตีนผิวนอก (OMPs) ของ *P. multocida*

P. multocida เซตรอน NIAH DU1551/97 ถูกคัดเลือกมาใช้ เนื่องจากให้ผลในการป้องกันหลังจากให้พิษทาบในหนูทดลองได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเซตรอนอื่น ๆ ที่นำเลือกมาใช้ทดลองเบื้องต้น (ข้อมูลไม่ตีพิมพ์) โดยมี serotype ชนิด A:1 ซึ่งเป็น serotype ที่มีรายงานการระบาดในสัตว์ปีกของประเทศไทย⁽²⁾ เซลล์แบคทีเรียเซตรอนดังกล่าวถูกนำมาทำลายเชื้อ และทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิค French Pressure Cell ซึ่งเป็นกระบวนการทำให้เซลล์แตกชนิดไม่ก่อให้เกิดความร้อน ทั้งนี้ความร้อนจะเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้โปรตีนชีวภาพ หรือ แม้แต่แอนติเจนสูญเสียคุณสมบัติที่พึงจะเป็นได้ เมื่อทำให้เซลล์แตกแล้วจึงแยกเอาโปรตีนผิวนอก (OMPs) และทำให้ละลายในสารลดแรงตึงผิว Triton X-100

ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะมองเห็นแถบโปรตีนผิวนอก (OMPs) ของ *P. multocida* (ดังแสดงในรูปที่ 2 ช่องที่ 1) รวมทั้งสิ้น 11 แถบโปรตีน และเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดโมเลกุลมาตรฐานของ reference proteins พบว่าขนาดของโปรตีนผิวนอก (OMPs) อยู่ในช่วง 30 ถึง 80 กิโลดัลตัน (kDa) โดยมีแถบโปรตีนที่มองเห็นได้อย่างชัดเจนสามแถบ ได้แก่ 30, 33 และ 45 kDa



รูปที่ 2: เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสของตำรับโปรตีนผิวนอก (OMPs) ซึ่งสกัดจากเชื้อ *P. multocida* โปรตีนอ้างอิงมวลโมเลกุลแสดงในช่องอักษร M ช่องหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 แสดง OMP fraction, OMPs ที่สอดคล้องอยู่ในไวโรโซม, OMPs สอดคล้องอยู่ในอิสคอม, และ ไวรัสนิวคาสเซิล ตามลำดับ OMP fraction ประกอบด้วยแถบโปรตีน 11 แถบ ซึ่งมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 30 ถึง 88 กิโลดัลตัน ลูกศรแสดงแถบโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัส NDV ที่ชื่อว่า HN (Hemagglutination-neuraminidase)

คุณลักษณะของไวโรโซม และ อีสกอมซึ่งมี OMPs สอดผสมอยู่

OMP_s ซึ่งสอดผสมอยู่ในอนุภาคคอลลอยด์ของไวโรโซม และ อีสกอม สามารถเตรียมขึ้นโดยการจัดสารลดแรงตึงผิว Triton X-100 ด้วยการเขย่าพร้อมกับบีดส์ขนาดเล็ก ๆ ของโพลิเมอร์ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเทคนิค Discontinuous Sucrose Gradient Centrifugation พบว่าอนุภาคคอลลอยด์ของไวโรโซม และ อีสกอมที่เตรียมขึ้นมีขนาดในช่วงนาโนเมตร (ขนาดซูปเปอร์จิว) การทดลองวัดขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจาแสง (DLS) พบว่า ไวโรโซมที่สอดแทรก OMP_s มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 180 นาโนเมตร และมีค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index; PD) เท่ากับ 0.35 ในขณะที่ อีสกอม มีขนาดที่เล็กจิ๋วเพียง 30 นาโนเมตร และมี PD เท่ากับ 0.42

ความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิด และ โปรตีน ในสูตรไวโรโซมซึ่งมี OMP_s สอดผสมอยู่ (0.35 nmole/ml และ 288 µg/ml ตามลำดับ) สูงกว่า สูตรตำรับอีสกอม (0.22 nmole/ml และ 273 µg/ml ตามลำดับ) ทั้งนี้เพราะในสูตรไวโรโซมจะมีโปรตีน และ ฟอสโฟลิปิดจากเปลือกหุ้มไวรัส NDV อยู่ด้วย คุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของไวโรโซมและ อีสกอมซึ่งมี OMP_s สอดผสมอยู่แสดงดังตารางที่ 3

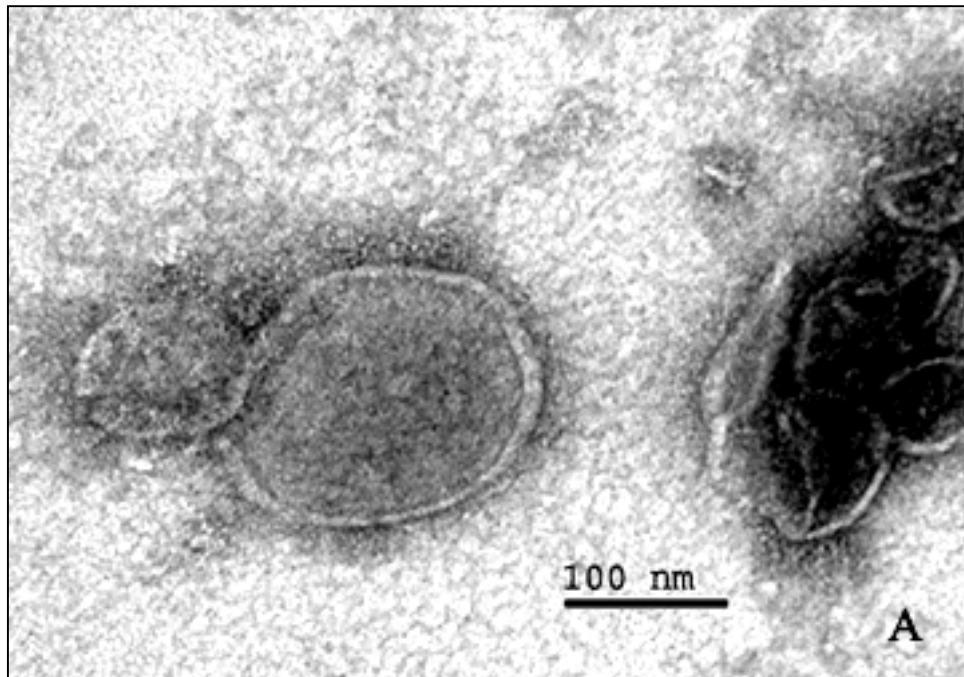
ตารางที่ 3: การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี-กายภาพของไวโรโซม และ อีสกอมซึ่งมีการสอดผสม OMP_s ที่สกัดแยกจาก *P. multocida* เซตรน NIAH DU1551/97

สูตรตำรับ	ฟอสโฟลิปิด (nmole/ml)	โปรตีน (µg/ml)	ขนาดอนุภาค (nm)	PD ^a
ไวโรโซม-OMP _s	0.35 ± 0.07	288 ± 11	183 ± 4	0.35
อีสกอม-OMP _s	0.22 ± 0.05	273 ± 22	30 ± 3	0.42

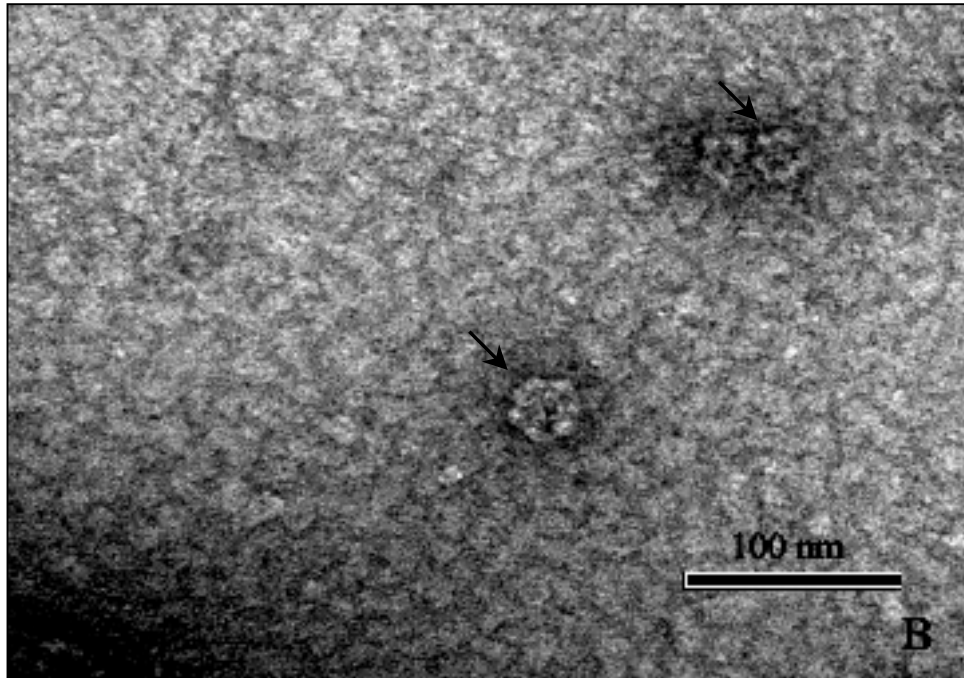
^aPolydispersity index (PD) บ่งถึงการกระจายขนาดอนุภาค โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.0 (สำหรับระบบกระจายตัวที่มีขนาดอนุภาคสม่ำเสมอเท่ากันหมดทั้งระบบ) ถึง 1.0 (สำหรับระบบกระจายตัวที่มีขนาดแตกต่างกันโดยสิ้นเชิงทั้งระบบ)

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารตัวอย่าง 3 batches แตกต่างกัน

รูปที่ 3 และ 4 แสดงขนาดและรูปร่างของไวโรโซม และ อีสกอมซึ่งมี OMP_s สอดผสมอยู่ตามลำดับ ซึ่งเป็นรูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ไวโรโซมมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มไขมันชั้นเดียว (unilamellar lipid vesicle) และมีขนาดอยู่ในช่วง 180-200 นาโนเมตร (รูปที่ 3) ในขณะที่อีสกอมจะเห็นเป็นทรงกลมรูปร่างเหมือนลูกกอล์ฟ (cage-like structure) โดยที่ภายในมีหน่วยย่อยเหมือนวงแหวนต่อเชื่อมกันอยู่ (ring subunits) และมีขนาดอยู่ในช่วง 30-40 นาโนเมตร (รูปที่ 4)



รูปที่ 3: ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ของไวรัสโซมที่ถูกสอดผสมด้วยโปรตีนผิวนอก (OMPs) ซึ่งผ่านการทำให้เชื้อด้วยการกรองผ่านรูกรอง 0.2 นาโนเมตรแล้ว (terminal sterilization) จากรูปจะเห็นลักษณะของ unilamellar vesicle ซึ่งมีช่องว่างภายในอยู่ โดยมีขนาดประมาณ 200 นาโนเมตร (กำลังขยาย x150 000, Bar แสดงขนาดความยาว 100 นาโนเมตร)



รูปที่ 4: ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ของอิสคอมที่ถูกสอดผสมด้วยโปรตีนผิวนอก (OMPs) ซึ่งผ่านการทำให้เชื้อด้วยการกรองผ่านรูกรอง 0.2 นาโนเมตรแล้ว (terminal sterilization) จากรูปจะเห็นลักษณะของทรงกลมขนาดเล็ก (ขนาดจีวประมาณ 30 นาโนเมตร) รูปร่างเหมือนลูกกอล์ฟขนาดเล็ก (กำลังขยาย x150 000, Bar แสดงขนาดความยาว 100 นาโนเมตร)

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนของสูตรตำรับไวโรโซมและ อีสกอมซึ่งมี OMPs สอดผลสมอยู่ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 2 ช่องที่ 2 และ 3) แสดงให้เห็นว่ามีลักษณะเหมือนแถบ OMPs โดยแถบโปรตีนดังกล่าวมีความเข้มข้นสูงที่ 30, 33 และ 45 kDa อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในสูตรตำรับ ไวโรโซมซึ่งมี OMPs สอดผลสมอยู่ จะเห็นแถบโปรตีนอีกหนึ่งแถบที่ 70 kDa เพิ่มขึ้นมาอย่างชัดเจน แถบโปรตีนนี้ตรงกันกับโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัส NDV ชนิด hemagglutinin-neuraminidase (HN) (เปรียบเทียบระหว่างช่องที่ 2 และ 4 ในรูปที่ 2)

ไวรัส NDV และ ไวโรโซมเปล่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ (Hemagglutination; HA) โดยมี HA end point เท่ากับ 1:4,096 และ 1:2,048 ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการสอดผลสม OMPs ในอนุภาคไวโรโซมนั้นกลับทำให้ฤทธิ์ HA นั้นหมดไป ดังแสดงในตารางที่ 4 จึงดูเหมือนว่าการมีโปรตีนผิวนอก (OMP) อยู่บนผิวของไวโรโซมจะยับยั้งฤทธิ์การตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงของโปรตีน HN อย่างสิ้นเชิง

ตารางที่ 4: ผลของการสอดผลสม OMPs ลงในไวโรโซม ต่อฤทธิ์การตกกลุ่มเม็ดเลือดแดง

สูตรตำรับ	ความเข้มข้นโปรตีน (µg/ml)	Hemagglutination end point
ไวรัสนิวคาสเซิล	656	1:4,096
ไวโรโซมเปล่า	160	1:2,048
ไวโรโซม-OMP	288	<1:2
บัฟเฟอร์	0	<1:2

ประสิทธิภาพของสูตรตำรับวัคซีนโปรตีนผิวนอกในหนูทดลอง

เพื่อประเมินคุณสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไวโรโซม และ อีสกอมซึ่งมี OMPs สอดผลสมอยู่ หนูทดลอง ICR ได้ถูกนำมาให้วัคซีนโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องด้วยสูตรตำรับ OMPs ต่าง ๆ กัน หลังจากนั้นจึงให้พิษทัยในขนาดต่ำ ($100 \times LD_{50}$) และ ขนาดสูง ($1000 \times LD_{50}$) ด้วยเซตรอนที่นำมาทำวัคซีน (NIAH DU1551/97) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 เมื่อให้พิษทัยในขนาดต่ำ (A) หนูที่ได้รับวัคซีนชนิดหน่วยย่อย (สูตรตำรับ OMPs) และ วัคซีนชนิดดั้งเดิม (วัคซีนเชื้อตายดูดซับด้วยอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล) มีดัชนีการป้องกันโรค (PI) 100% ในขณะที่กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับวัคซีน) มีค่า PI เพียง 20% (กลุ่ม 6A)

การให้พิษทัยในขนาดสูง (B) พบว่าหนูในกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับวัคซีน) ตายทั้งหมด กลุ่มที่ได้รับวัคซีนชนิดโปรตีนไมเซลล์ (micellar OMPs, กลุ่ม 1B) มีค่า PI เท่ากับ 80% ส่วนสูตรตำรับ OMPs ที่สอดผลสมใน ไวโรโซม และ อีสกอม (กลุ่ม 2B และ 3B) มีค่า PI เท่ากันกับวัคซีนชนิดดั้งเดิม (กลุ่ม 4B และ 5B) คือ 100%

ตารางที่ 5: ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคหลังการให้พิษทั้ง^a ในขนาดต่ำ (A) และสูง (B) ในกลุ่มหนูทดลอง ICR ซึ่งได้รับสูตรตำรับวัคซีนแตกต่างกันไป

ปริมาณพิษทั้ง (กลุ่ม)	สูตรตำรับ ^b	จำนวนหนูตาย/หนูทั้งหมด	Protective index (%)
100 x LD ₅₀ (A)	1A Micellar OMPs	0/10	100
	2A OMPs Virosomes	0/10	100
	3A OMPs ISCOMs	0/10	100
	4A WC-FC Pakchong ^c	0/10	100
	5A WC-NIAH DU1551/97 ^c	0/10	100
	6A Negative Control	8/10	20
1,000 x LD ₅₀ (B)	1B Micellar OMPs	2/10	80
	2B OMPs Virosomes	0/10	100
	3B OMPs ISCOMs	0/10	100
	4B WC-FC Pakchong ^c	0/10	100
	5B WC-NIAH DU1551/97 ^c	0/10	100
	6B Negative Control	10/10	0

^a หนูทดลอง ICR ได้รับพิษทั้ง *P. multocida* เซตรน NIAH DU1551/97 ที่เลี้ยงใน BHI media

^b วัคซีนหน่วยย่อย OMPs มีปริมาณโปรตีน OMPs เท่ากับ 60 ไมโครกรัมต่อหนึ่งขนาดวัคซีน

^c วัคซีนเชื้อตายทั้งตัว (whole cell inactivated vaccines) จากเชื้อ *P. multocida* เซตรน FC-Pakchong และ NIAH DU1551/97 ซึ่งถูกดูดซับอยู่บนอนุภาคน้ำมันไฮดรอกไซด์เจล (25% v/v)

บทวิจารณ์

การพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องรู้คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของแอนติเจน และระบบนำส่งวัคซีน (Vaccine delivery system) หรือ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (adjuvant) แต่ละชนิดอย่างละเอียด วัคซีนแบบดั้งเดิม เตรียมจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งตัว จึงมีทั้งส่วนที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์เป็นแอนติเจน และ ส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์เป็นวัคซีน ซึ่งบ่อยครั้งทำให้เกิดปัญหาเรื่องความปลอดภัย ความกังวลด้านการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมจากเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ (genetic pollution) และ ยังเป็นการยากต่อการควบคุมคุณภาพของวัคซีนที่ผลิตในแต่ละครั้ง การผลิต (batch) อีกด้วย การคิดค้นวัคซีนชนิดหน่วยย่อย (subunit vaccines) สามารถลดปัญหา และ สร้างความเชื่อมั่นต่อผู้ใช้วัคซีน ทั้งในแง่ความปลอดภัย ปราศจากกลไกการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ การเกิดการกลายพันธุ์ และ ยังควบคุมคุณภาพด้วยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบันได้ดีกว่า การใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาอีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น ในกรณีที่แอนติเจนเป็นสารจำพวกโปรตีน นักเคมีสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสูตรตำรับวัคซีน ควบคุมคุณภาพในแต่ละ batch ได้ง่ายขึ้น ด้วยเครื่องมือที่มีอยู่ เช่น การใช้เทคนิคทาง Spectroscopy แทนการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งผิดพลาดได้ง่าย เพราะการนับจำนวนเชื้อขึ้นกับผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น และยังสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ต้องการให้วัคซีน ไม่ให้มากเกินไป เช่น 30 ไมโครกรัมโปรตีน, 100 ไมโครกรัมโปรตีน เป็นต้น ในขณะที่วัคซีนแบบดั้งเดิม ใช้หน่วยแสดงการออกฤทธิ์ เป็น cfu/ml เช่น 2×10^{10} cfu/ml หรือ 2×10^9 cfu/ml เป็นต้น ซึ่งเป็นหน่วยที่หยาบกว่า และเกิดความคลาดเคลื่อนในการควบคุมคุณภาพได้สูงมาก

โปรตีนผิวนอกของแบคทีเรียแกรมลบ (outer membrane proteins; OMPs) เช่น *Pasteurella* spp. ได้มีการรายงานการวิจัยว่าเป็นแอนติเจนที่มีศักยภาพ และให้ฤทธิ์ในการป้องกันโรคได้ดี^(22, 23) ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาและพัฒนาอย่างจริงจัง เพื่อนำเอาเฉพาะโปรตีนผิวนอกนี้มาใช้เป็นวัคซีนแทนเชื้อแบคทีเรียทั้งตัว อย่างไรก็ตามวัคซีนจะมีประสิทธิภาพหรือไม่ นอกจากจะขึ้นกับแอนติเจนที่เหมาะสมแล้ว ยังต้องมีระบบนำส่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพอีกด้วย⁽⁷⁾ จวบจนปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยชิ้นใดที่กล่าวถึง บทบาทระบบนำส่งวัคซีนสำหรับโปรตีนผิวนอกของเชื้อ *P. multocida* ต่อประสิทธิภาพของวัคซีน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายหลักในการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ และ ประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ของ OMPs ซึ่งถูกตั้งตำรับอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีนไมเซลล์, ไวโรโซม และ อีซคอม

ในการศึกษานี้ เชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* serogroup A:1 เซตรอน NIAH DU1551/97 ซึ่งแยกมาจากเป็ดที่ตายด้วยโรคอหิวาต์สัตว์ปีก ถูกนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิค French Press แล้วจึงนำเอาเซลล์ที่แตกตัวแล้วมาสกัดแยกเอาโปรตีนผิวนอก (OMPs) ออกด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ Triton X-100 สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ มีรายงานว่าไม่ทำลายฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน แต่มีข้อเสียคือ มีค่า critical micelle concentration (CMC) ต่ำ จึงไม่สามารถกำจัดออกด้วยวิธีการไดอะไลซิสแบบธรรมดา (simple dialysis technique) ต้องใช้พอลิเมอร์ (polymer beads) ดูดซับเอาโมเลกุล Triton X-100 ออกไปแทน

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีน OMPs ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าได้รูปแบบแถบโปรตีน (protein pattern) เหมือนกับที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย Pati และคณะ ซึ่งพวกเขาได้รายงานไว้ว่าโปรตีนผิวนอก (OMPs) ของ *P. multocida* serogroup B:2 มีอยู่ 10 แถบโปรตีน⁽⁵⁾ โดยมีมวลโมเลกุลระหว่าง 25 ถึง 88 kDa ส่วนในการศึกษานี้พบว่ามี *P. multocida* serogroup A:1 มีแถบโปรตีน 11 แถบ และมีแถบโปรตีนหลักที่ 30, 33 และ 45 kDa ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาองค์ประกอบโปรตีน OMPs ของ *P. multocida* X-73 (เสตรนมาตรฐาน serogroup A) ว่ามีแถบโปรตีนหลักที่ 29, 34.5 และ 45 ตามลำดับ^(1, 4)

ถุงหุ้มไขมันที่เตรียมจากเปลือกหุ้มไวรัส (reconstituted viral envelope) หรือ ที่เรียกว่า “ไวโรโซม” (virosomes) ไม่เพียงแต่มีประโยชน์ต่อการศึกษาทางชีวเคมี และจุลชีววิทยาพื้นฐาน แต่ยังมีบทบาทประยุกต์ใช้ทางอายุรศาสตร์การแพทย์ และเภสัชศาสตร์อีกด้วย^(8, 10, 11) ตัวอย่างเช่น การนำเอาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัส NDV ชนิด HN และ F ในการนำส่งโมเลกุลชีวภาพ เช่น โปรตีน หรือ แอนติเจน ทั้งนี้เพราะ โปรตีน HN สามารถจับกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ และ F โปรตีนจะเชื่อมต่อเซลล์กับอนุภาคไวโรโซมได้^(12, 13) ดังนั้นสารที่ผสมรวมอยู่ใน ไวโรโซมก็จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปได้ ซึ่งก็เป็นการเปลี่ยนโฉมหน้าการผ่านเข้าเซลล์และการเดินทางในเซลล์ (intracellular trafficking) ของสารชีวภาพ หรือ แอนติเจนนั้นๆ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้กลับพบว่าคุณสมบัติการจับกับรีเซพเตอร์ของโปรตีน HN กลับหมดไป เมื่อมี OMPs เกาะอยู่ที่ผิวหน้าไวโรโซม กล่าวคือ ไวโรโซมซึ่งผสม OMPs อยู่ด้วยไม่สามารถตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้เลย ต่างจากไวโรโซมเปล่าที่มีฤทธิ์ตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ดี คำอธิบายที่เป็นไปได้ต่อปรากฏการณ์นี้ ได้แก่ โปรตีน HN ถูกปิดบังด้วย OMPs จึงไม่สามารถเข้าถึงรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ได้ Mastrobattista และคณะ ก็เคยรายงานปรากฏการณ์อย่างเดียวกันเมื่อ นำ Polyethylene glycol (PEG) มาเกาะอยู่บนผิวของ influenza virosomes ก็ทำให้ฤทธิ์การตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงหายไป⁽²⁴⁾ อีกคำอธิบายหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้ คือ เมื่อเติม OMPs ลงในอนุภาคไวโรโซมก็เปรียบเสมือนการเจือจาง (dilution) โปรตีน HN ที่กระจายบนผิวของไวโรโซม ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถจับกับรีเซพเตอร์บนผิวเม็ดเลือดแดงได้

การศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก ยังคงใช้วิธีการให้วัคซีนและ ตามด้วยพิษทับในสัตว์ทดลอง^(1, 3) เนื่องจากโรคติดเชื้อ Pasteurellosis มี host ที่ไวต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อย่างกว้างขวาง เช่น ไก่ กระต่าย หนู โค-กระบือ สุกร แม้กระทั่ง มนุษย์ เพื่อความสะดวกในการวิจัย จึงใช้หนูทดลองสายพันธุ์ ICR แทน ประกอบกับการระบาดอย่างร้ายแรงของ “ไข้หวัดนก” นับแต่ปลายปี 2546 ต่อเนื่องมาถึง ไตรมาสที่สองของ ปี 2547 ทำให้การทดลองในไก่ หรือ ในสัตว์ปีก เป็นไปด้วยความยากลำบาก รวมทั้งมีความเสี่ยงต่อชีวิตผู้วิจัยอย่างสูง จึงเล็งมาทำการทดลองในหนูทดลองแทน โดยสรุปแล้ววัคซีนหน่วยย่อยให้ความคุ้มโรคได้ดีเทียบเท่ากับวัคซีนแบคทีเรียทั้งตัวชนิดดั้งเดิม และการเตรียมวัคซีน OMPs ในรูปไวโรโซม และ อิสคอม ให้ความคุ้มครองโรคได้ดีกว่าในรูปโปรตีนไม่เซลล์

ในวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก ของผู้วิจัย (นายอรรถชัย หอมหวล) ได้พบว่าไวโรโซม NDV (reconstituted Newcastle Disease envelope) สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี และ ป้องกันโรค ND ได้⁽²⁵⁾ ในขณะที่งานวิจัยฉบับนี้ได้นำเอาไวโรโซม NDV เป็นระบบนำส่ง OMPs แอนติเจน ซึ่งหากจะกล่าวไปแล้วก็เหมือนกับวัคซีนผสม (combination vaccine) ทั้งนี้เพราะ เป็นการนำเอาแอนติเจน ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกัน (เปลือกหุ้มไวรัส NDV และ โปรตีนผิวนอก ของ *Pasteurella* spp.) มารวมเข้าด้วยกันเสมือนหนึ่ง single vaccine ซึ่งข้อดีของวัคซีนผสม มี อยู่ด้วยกันหลายประการ ได้แก่ การลดจำนวนครั้งในการฉีด, ลดการใช้เวชภัณฑ์ที่ไม่จำเป็น (เช่น syringe, needles) ซึ่งจะช่วยลดโอกาสเกิดการติดเชื้อจากเข็มฉีดยาบ่อยครั้งอีกด้วย พร้อมทั้งอาจช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำวัคซีน อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวัคซีนผสมจำเป็นต้องศึกษาความเข้ากันได้ของแอนติเจนที่นำมาผสม (antigen compatibility) ความเข้ากันได้ของ ระบบนำส่งวัคซีน หรือ adjuvant กับแอนติเจน ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด เช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ เจลอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตวัคซีนผสม เพราะปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้การปลดปล่อย แอนติเจนไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในขณะที่ระบบลิโปโซม (ไวโรโซม) หรือแม้แต่อิสคอม เป็นระบบที่เลียนแบบการจัดเรียงตัวของโปรตีนเมมเบรน (conformation)^(26, 27) ตามธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ จึงไม่น่าจะมีปัญหาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน นั้น ๆ จึงนับว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างมาก หากจะศึกษาต่อไปว่า ไวโรโซมที่มี OMPs สอด ผสมอยู่ด้วยสามารถป้องกันโรคทั้ง ND และ pasteurellosis ในคราวเดียวกันได้หรือไม่

จากการวิจัยฉบับนี้สรุปได้ว่า OMPs ที่แยกได้จากเชื้อ *P. multocida* A:1 เป็นแอนติเจนที่ดี การสอดผสม OMPs ในอนุภาคคอลลอยด์ชนิดไวโรโซม และ อิสคอม เป็นหนทางที่ดีทางหนึ่ง ในการนำส่งโปรตีนแอนติเจน อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยเสนอว่าควรมีการศึกษาในสัตว์กลุ่มเป้าหมาย (ไก่ หรือ สัตว์ปีก) และทำการศึกษาในเชิงลึกมากขึ้น เช่น สามารถป้องกันโรคจาก serotype อื่น ๆ ได้หรือไม่ (heterologous challenge) ระยะเวลาในการป้องกันโรค และ regimen ที่แนะนำในการใช้วัคซีนหน่วยย่อย รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีน และ adjuvants ในแง่ภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นต้น

หนังสืออ้างอิง

1. Confer AW (1993) Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol* **37**, 353-68.
2. Tanticharoenyos T, Pathanasophon P, and Sawada T (1993) Certain serotypes of *Pasteurella multocida* in poultry. *Thai J Health Res* **7**, 21-6.
3. Adler B, Chancellor R, Homchampa P, Hunt M, Ruffolo C, Strugnell R, and Wapling D (1996) Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. *J Biotech* **44**, 139-44.
4. Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, and van Zanden A, et al (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotech* **73**, 83-90.
5. Pati US, Srivastana SK, Roy SC, and More T (1996) Immunogenicity of outer membrane protein of *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Vet Microbiol* **36**, 301-11.
6. Lu YS, Lai WC, Pakes SP, and Stefance C (1991) The outer membrane of *Pasteurella multocida* 3:A protects rabbits against homologous challenge. *Infect Immun* **59**, 4517-23.
7. Bowersock TL and Martin S (1999) Vaccine delivery to animals. *Adv Drug Deliv Rev* **38**, 167-94.
8. Kersten GFA and Crommelin DJA (2003) Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* **21**, 915-20.
9. Almeida JD, Edwards DC, Brand CM, and Heath TD (1975) Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* **2**, 899-901.
10. Glück R and Metcalfe IC (2003) Novel approaches in the development of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes as efficient antigen carrier systems. *Vaccine* **21**, 611-5.
11. Bungener L, Serre K, Bijl L, Leserman L, Wilschut J, Daemen T, and Machy P (2002) Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* **20**, 2287-95.
12. García-Sastre A, Cabezas JA, Villar E (1989) Protein of Newcastle Disease Virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **999**, 171-5.
13. Kapczynski DR and Tumpey TM (2003) Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis* **47**, 578-87.

14. *Pasteurella* spp. (1978) In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed (Edited by Buchanan RE and Gibbons NE), pp 371-3. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
15. Choi KH, Maheswaran SK, and Felice LJ (1989) Characterization of outer membrane protein-enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* **50**, 676-83.
16. Bron R, Ortiz A, Dijkstra J, Stegmann T, and Wilschut J (1993) Preparation, properties and applications of reconstituted influenza virus envelopes (virosomes). *Methods Enzymol* **220**, 313-31.
17. Barr IG and Mitchell GF (1996) ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunol Cell Biol* **74**, 8-25.
18. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-56.
19. Rouser G, Fleischer S, and Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-6.
20. Alexander DJ (1980) Newcastle disease diagnosis. In: *Newcastle Disease* (Edited by Alexander DJ), pp 147-60. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
21. Reed LJ and Muench H (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-7.
22. Confer AW, Suckow MA, Montelongo M, Dabo SM, Miloscio LJ, Gillespie AJ, and Meredith GL (2001) Intranasal vaccination of rabbits with *Pasteurella multocida* A:3 outer membranes that express iron-regulated proteins. *Am J Vet Res* **62**, 697-703.
23. Sabri MY, Zamiri-Saad M, Mutalib AR, Israf DA, and Muniandy N (2000) Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol* **73**, 13-23.
24. Mastrobattista E, Schoen P, Wilschut J, Crommelin DJA, and Storm G (2001) Targeting influenza virosomes to ovarian carcinoma cells. *FEBS Letters* **509**, 71-6.

25. Homhuan A (2004) Virosomes and ISCOMs as subunit Newcastle disease vaccine candidates: preparation, physicochemical characterization and immunological responses. *Ph.D. Thesis (Pharmaceutics)*, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Thailand.
26. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, and Zinkernagel RM (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* **262**, 1448-51.
27. Bachmann MF, and Zinkernagel RM (1996) The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today* **17**, 553-558.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

ชื่อผู้แต่ง: Atthachai Homhuan, Pornpen Pathanasophon, Daan J.A. Crommelin, Wim Jiskoot, Gideon F.A. Kersten, and Sompol Prakongpan

ชื่อเรื่อง: Characterization and Protection in Mice of Outer Membrane Proteins from *Pasteurella multocida* A:1 incorporated in Lipid Vaccine Delivery Systems

ชื่อวารสาร: ScienceAsia Vol.30 No.3 (2004)

- การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Atthachai Homhuan, Pornpen Pathanasophon and Sompol Prakongpan. Nanolipid Vesicles: A Strategy for Delivery Outer Membrane Proteins of *Pasteurella multocida* 1st EUFEPS Conference on Optimizing Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, 29 September-1 October 2003, Paris, France (Poster Presentation)

ภาคผนวก

Manuscript entitled:

**Characterization and Protection in Mice of Outer Membrane Proteins from
Pasteurella multocida A:1 incorporated in Lipid Vaccine Delivery System**

(accepted for publication in ScienceAsia)

บทความสำหรับการเผยแพร่

Characterization and Protection in Mice of Outer Membrane Proteins from *Pasteurella multocida* A:1 incorporated in Lipid Vaccine Delivery Systems

Atthachai Homhuan^{a*}, Pornpen Pathanasophon^b, Daan JA Crommelin^c, Wim Jiskoot^c, Gideon FA Kersten^d, and Sompol Prakongpan^a

^a Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

^b Bacteriology Section, National Institute of Animal Health, Bangkok 10900, Thailand.

^c Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, P.O. Box 80082, 3508 TB Utrecht, The Netherlands.

^d Research and Development Unit, Netherlands Vaccine Institute, P.O. Box 457, 3750 AL Bilthoven, The Netherlands.

* To whom correspondence should be addressed at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-Ayudhaya Road, Bangkok 10400, Thailand.

E-mail: g4138458@yahoo.com, phone: +66 2427 9545; fax: +66 2428 4772.

KEYWORDS: ISCOMs; Newcastle disease-virosomes; Outer membrane proteins; *Pasteurella multocida*; subunit vaccine

ABSTRACT

Fowl cholera is an infectious disease affecting poultry and is caused by *Pasteurella multocida*. To develop a subunit vaccine, outer membrane proteins (OMPs) from *P. multocida* serotype A:1 strain NIAH DU1551/97 were extracted and characterized using SDS-PAGE. The OMPs were solubilized in detergent or incorporated in lipid-based antigen delivery systems, namely virosomes made from Newcastle disease (ND) virus and immunostimulating complexes (ISCOMs). The formulations were characterized by several physicochemical methods. To evaluate the formulations as possible vaccine, their potency was tested in mice. Eleven proteins that range in size from 30 to 80 kDa were detected in the OMP fraction. The most prominent protein bands were 30, 33, and 45 kDa. Virosomes and ISCOMs showed an average diameter of 180 and 30 nm, respectively. OMPs incorporated in the virosomal membrane inhibited the capability of virosomes to agglutinate chicken red blood cells. Animals were challenged after two immunizations. All vaccines fully protected mice against a low dose challenge. In the case of a high dose challenge, micellar OMPs provided 80% protection, whereas OMPs incorporated in virosomes or ISCOMs gave 100% protection, which is comparable to that of inactivated whole cell vaccines. In conclusion, antigen loaded virosomes and ISCOMs are potential pasteurella subunit vaccines.

List of abbreviations: BHI, brain heart infusion; CFU, colony forming units; Chol, cholesterol; DLS, dynamic light scattering; EPC, egg phosphatidyl choline; F protein, fusion protein; HA, hemagglutination activity; HN, hemagglutinin-neuraminidase; ISCOMs, immunostimulating complexes; MW, molecular weight; ND, Newcastle disease; OMPs, outer membrane proteins; PE, phosphatidyl ethanolamine; PBS, phosphate buffered saline; PI, protective index; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TEM, transmission electron microscopy; TSAB, tryptic soy agar with 5% defibrinated sheep blood; WC, whole broth culture.

INTRODUCTION

Pasteurella multocida, a gram-negative bacterium, is the causative agent of fowl cholera and other diseases of wild and production animals.¹ Based on epidemiological information collected in Thailand, strains of serogroup A are recognized as the primary cause of fowl cholera, whereas isolates of serogroups B, D and F are less frequently associated with disease.² Vaccination is the most attractive approach for controlling the disease. Two types of vaccine against *P. multocida* are currently being used for immunization of poultry: attenuated and inactivated vaccines. Recently, the development of subunit vaccines comprising purified subunits of this microorganism has been promoted. Outer membrane proteins (OMPs) from *P. multocida* have been isolated. They provided various degrees of protection against a challenge.³⁻⁶

Apart from the discovery and selection of potent immunogens, a key factor to the success of vaccine development is proper delivery of the immunogens to the immune system.⁷ To date, there are no data available in the literature on the role of antigen delivery systems for OMPs of *P. multocida* on vaccine efficacy. This prompted us to prepare several formulations of OMPs of *P. multocida* and to test their protective efficacy in mice. Membrane proteins, such as OMPs, generally can be presented as protein micelles, liposomes, or immunostimulating complexes (ISCOMs). Liposomes are phospholipid vesicles, which have been evaluated as antigen delivery systems. However, they frequently show relatively low adjuvant activity and need co-incorporation of adjuvants.⁸ Almeida *et al.* produced a liposomal influenza vaccine with influenza hemagglutinin proteins intercalated in the lipid bilayer.⁹ These new liposomes are termed “viroosomes”. Viroosomes offer the

opportunity to exploit the targeting and fusogenic properties of the native viral membrane proteins, which may result in effective delivery of antigens into the immuno-responsive cells.^{8, 10, 11}

Newcastle disease (ND) virus is an avian paramyxovirus that also causes an economically important and highly contagious disease of poultry. Two surface membrane proteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion protein (F), of the ND virus are the important immunogenic antigens. These two proteins play a role in viral infection by HN mediating the attachment of virus to the host cell receptor followed by F facilitating the fusion between viral particle and the host cell membrane.¹² For poultry vaccination, therefore, virosomes containing HN and F proteins of ND virus might offer the potential for delivery of co-incorporated antigens analogous to influenza virosomes for human vaccines.¹³

Immunostimulating Complexes (ISCOMs) are another lipid particulate system that has been studied for the delivery of subunit antigens. ISCOMs are small colloidal (30-40 nm) structures composed of phospholipid, cholesterol, a saponin mixture (Quil A), and the antigens to be incorporated. In particular, ISCOMs are potent enhancers of the immune response against membrane proteins.^{7, 8}

Since no studies reported the employment of antigen delivery systems for OMPs isolated from *P. multocida*, the present study was designed to evaluate the protective efficacy of pasteurella subunit vaccines, based on OMPs formulated as protein micelles, virosomes, and ISCOMs against a bacterial challenge in a mouse model.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Egg phosphatidyl choline (EPC) and phosphatidyl ethanolamine (PE) were purchased from Avanti Polar Lipids Co. (Birmingham, AL). Cholesterol (Chol) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Quil A was supplied by Iscotec (Lulea, Sweden). All other chemicals were analytical grade and used as received without further purification.

Animals

Specific pathogen-free ICR mice, 4 weeks of age, were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. They were housed in cages (10 per cage) and supplied with food and water *ad libitum*.

Bacterial Strain

P. multocida strain NIAH DU1551/97 of serotype A:1 was selected as a representative strain of local isolates for extraction of outer membrane proteins (OMPs). Before use, the bacterial culture was passaged in a mouse to enhance the virulence.

Preparation of Inactivated Bacterial Vaccine

P. multocida, FC-Pakchong, a commercial strain currently used in Thailand and *P. multocida*, strain NIAH DU1551/97, were grown in 100 ml brain heart infusion (BHI) media (Difco) for 18-20 h at 37°C with gentle aerated shaking. The final concentration of 1.15×10^{10} cfu/ml and 8.5×10^9 cfu/ml of *P. multocida* strain

FC-Pakchong and NIAH DU1551/97 as determined by standard plate count technique were recorded, respectively. Purity was checked by Gram-staining and biochemical testing.¹⁴ The broth culture was inactivated by addition of formalin to a final concentration of 0.3% (v/v) and overnight incubation at room temperature under stirring. The inactivated whole broth culture (WC) was finally adsorbed onto aluminum hydroxide gel (25% of Al(OH)₃ suspension, provided by the Veterinary Biologic Products Division, Department of Livestock Development, Thailand).

Isolation of Outer Membrane Proteins (OMP's) from *P. multocida*

The OMPs were extracted following the method of Choi-Kim *et al.* with some modifications.¹⁵ *P. multocida* strain NIAH DU1551/97 was grown on the surface of tryptic soy agar (Difco) with 5% defibrinated sheep blood (TSAB). The agar plates were incubated at 37°C for 18 h. Two colonies of the culture were inoculated into 12 ml of BHI broth and incubated without shaking at 37°C for 18 h. Next, 10 ml of broth culture was transferred into 1 liter of BHI medium and incubated in a shaker chamber at 37°C for 18 h. Bacterial cells were sedimented by centrifugation at 12,000 x g (Tomy Seiko), for 20 min at 4°C. The cells were then washed twice with sterile saline (0.15 M NaCl) and finally resuspended in 25 ml of Tris-EDTA (50 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 7.2). The suspension of cells was passed three times through French press cell at 1,160 kg/cm² (40K Spectronic). Cell debris was removed by centrifugation at 5,000 x g (Tomy Seiko) for 15 min at 4°C. The suspension containing OMPs was further pelleted by ultracentrifugation (180,000 x g fixed angle rotor 50 Ti at 4°C for 1 h). The pellet was re-suspended with 1.8 ml of Tris-EDTA buffer and solubilized by adding 200 µl of 20% w/v Triton X-100 (giving a final concentration of Triton X-100

of 2% w/v). The mixture was incubated at room temperature for 1 h and kept at -70°C until use.

Preparation of ND virus

The La Sota strain of ND virus was propagated by inoculation of diluted viral stocks in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) into the allantoic sac of 10-day-old embryonated chicken eggs. After 72 h of incubation at 37°C , the eggs were cooled overnight. All subsequent steps were carried out at 4°C . The allantoic fluid was harvested and clarified by centrifugation at $3000 \times g$ for 30 min (Tomy Seiko). ND virus in allantoic fluid was pelleted by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 150 min (Beckman, fixed angle 50Ti). The pelleted virus was suspended in $1/50^{\text{th}}$ of the original volume in Tris-EDTA buffer, pH 7.2. The virus suspension was layered on top of a discontinuous gradient of 1.5 ml each of 50%, 40%, 30%, 20%, and 10% (w/w) sucrose.¹² After ultracentrifugation at $140,000 \times g$ for 6 h (Beckman, SW40 Ti), virus at the interface was collected and disaggregated by passing the suspension up and down a pipette several times. The virus was stored at -70°C until needed.

Incorporation of OMPs in ND-Virosomes

Virosomes were produced as previously described for influenza virus with some modifications.¹⁶ The purified viral particles were ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 150 min at 4°C (fixed angle rotor 50Ti), and the pellet obtained was suspended in 1 ml Tris-EDTA buffer containing 2% w/v Triton X-100. After incubation at room temperature for 1 h, the suspension was layered on top of 20% sucrose in Tris-EDTA solution. Next the mixture was ultracentrifuged at $140,000 \times g$ for 1 h at 4°C to remove detergent-insoluble substances, which presumably contained nucleocapsid

proteins. The clear supernatant containing the phospholipids and glycoproteins of the ND virus in Triton X-100 was analyzed for phospholipid and protein contents, and hemagglutination activity as described below.

For the preparation of OMP-containing ND virosomes, firstly a lipid film composed of EPC:PE:Chol at a mol ratio of 2:1:2 was prepared by evaporating the organic solvent. Then a solution of purified viral envelope solution was added to the dried lipid film to give a mol ratio between viral lipid and external phospholipid of 3:7. Next a volume of 100 μ l solution of OMPs (1.5 mg solubilized in 2% w/v Triton X-100) was added to the viral envelopes/lipid mixture followed by incubation at room temperature for 1 h. OMP-containing ND virosomes were then formed by detergent removal using Bio-Beads SM-2. For each 20 mg of Triton X-100 present in the preparation, 80 mg of Bio-Beads SM-2 (previously washed with methanol and dried on Wattman filter paper) was added. After incubation for 2 h at room temperature with robustly shaking (IKA Schüttler MTS-2, 1400 min⁻¹), the mixture was incubated further for 30 min without shaking, as a resting period. Next, second portion of 35 mg Bio-Beads SM-2 was added and incubation was continued for 1 h at room temperature with vigorous shaking, followed by 30 min without shaking. The last portion, 35 mg of Bio-Beads SM-2, was added and the mixture was shaken for another 30 min. After incubation, the liquid phase containing formed OMP-containing ND virosomes was sucked out with a 1 ml tuberculin syringe into which SM-2 Biobeads cannot penetrate. To separate OMP-containing ND virosomes from non-incorporated components, the preparation was layered on top of a discontinuous sucrose gradient containing 1 ml each of 50% and 40%, 2 ml of 10%, 1 ml of 5% sucrose. The rest of the centrifuge tube was filled with Tris-EDTA buffer. The samples were ultracentrifuged at 140,000 x g for 2 h at 4°C (SW40 Ti). The virosomal band was then isolated and dialyzed

(10,000 molecular weight cut-off membrane) against several changes of Tris-EDTA buffer.

Incorporation of OMPs in ISCOMs

OMP containing ISCOMs were prepared by using the classical centrifugation method.¹⁷ Briefly, a lipid film containing PE and Chol (0.5 mg each) was prepared by evaporating the organic solvent under a nitrogen stream. The lipid film was solubilized with 0.8 ml of Tris-EDTA buffer containing 2% Triton X-100 (w/v). Next, 100 µl of 10% w/v Quil A and 100 µl of OMPs (containing 1.5 mg OMPs) were added to the lipid solution. The mixture was incubated for 1 h at room temperature. The weight ratio of Quil A: PE: Chol: protein antigens was 2:1:1:3. The Triton X-100 present in mixture was then removed by vigorously shaking the mixture with 150 mg Bio-Beads SM-2 at room temperature for 4 h as described in 'Incorporation of OMPs in ND virosomes'. To remove non-incorporated components from ISCOM particles, the mixture was then applied onto a discontinuous sucrose gradient comprising each of 1.5 ml of 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, and 60% w/v sucrose solution in 0.05 mM Tris-1 mM EDTA. After ultracentrifugation at 140,000 x g (SW40 Ti) for 18 h at 25°C, the ISCOMs band was collected and subjected to dialysis (10,000 molecular weight cut-off membrane) for 48 h against Tris-EDTA buffer. The resulting dispersion was collected.

Characterization of OMP formulations

The micellar OMPs and OMP-containing ND-virosomes and ISCOMs were assayed for protein composition by SDS-PAGE under non-reducing condition. Total protein concentration was determined by the method of Peterson using bovine serum

albumin as relative standard.¹⁸ Size and morphology of virosomes and ISCOMs were verified by negative-staining electron microscopy (H-7500 Hitachi, Japan) using 2% uranyl acetate. Size of virosomal vesicles and ISCOMs was measured by dynamic light scattering (DLS) (Malvern 4700, UK). Phospholipid content was measured according to Rouser's procedure.¹⁹

Hemagglutination Activity (HA)

The hemagglutination assay was performed as described.²⁰ In short, 50 μ l of dispersion of ND virus, empty virosomes, or virosomes containing OMPs were applied to the first well of each row in a U-shaped 96-wells plate and serial 2-fold dilutions were made until the last well of each row. A 1% suspension of freshly isolated chicken erythrocytes in PBS (pH 7.2) was prepared and 100 μ l of this suspension was applied to each well. Erythrocytes were allowed to sediment for 45 min. The agglutination was monitored visually.

Determination of LD₅₀ of the Challenge Strain in Mice

ICR mice, 4 weeks of age, were used throughout. The serial tenfold dilutions of exponential phase broth cultures grown at 37°C without shaking of *P. multocida* NIAH DU1551/97 were prepared in normal saline solution. Groups, each of 10 mice, were injected with serial dilutions. Mice which were moribund and deemed incapable of survival were euthanized. The LD₅₀ was determined to be 6 cfu/animal by the method of Reed and Muench.²¹

Immunization and Challenge Experiments in Mice

Each group of 10 mice was vaccinated intraperitoneally with 0.2 ml vaccine. Five formulations were tested: micellar OMPs (60 µg protein), virosomal OMPs (60 µg protein), ISCOMs containing OMPs (60 µg protein), vaccine containing 2.3×10^9 of *P. multocida* commercial strain (FC-Pakchong), and 1.7×10^9 cfu of *P. multocida* selected strain (NIAH DU1551/97) adsorbed onto Al(OH)₃ adjuvant, respectively. Two weeks later, a booster dose of the corresponding vaccine formulation was administered intraperitoneally as well. Mice of group 6 were the unvaccinated controls.

The challenge of vaccinated and unvaccinated control mice was done by subcutaneous administration of 100 x (low dose) and 1,000 x (high dose) LD₅₀ of a 18-h culture of *P. multocida* strain NIAH DU1551/97 in BHI one week after the booster vaccination. Challenged mice were observed for a period of 5 days and mortalities recorded. Moribund mice were euthanized and counted as mortality. The protective index (PI) was calculated for each group with the following formula:

$$PI = \frac{\% \text{Mortality in controls} - \% \text{Mortality in vaccinates}}{\% \text{Mortality in controls}} \times 100$$

RESULTS

Isolation of OMPs

P. multocida strain NIAH DU1551/97 serotype A:1 was disintegrated using a French press technique. The OMPs were extracted by incubation with Triton X-100. As shown in Fig. 1 (lane 1), the protein profile of OMPs in SDS-PAGE analysis revealed up to eleven protein bands. Estimated by comparison with standard molecular weight (MW) marker, the MW of the major polypeptide bands was in the range of 30 to 80 kDa. The most prominent polypeptide bands had a MW of 30, 33, and 45 kDa.

Characterization of OMP-Containing ND-Virosomes and ISCOMs

OMPs were reconstituted in the ND-virosomes and in ISCOMs. The average diameter of the OMP-containing ND-virosomes was about 180 nm with a polydispersity index of 0.35 as measured by DLS. The OMP-containing ISCOMs had an average size of about 30 nm with a relatively high polydispersity index of 0.42. The size of the virosomes and ISCOMs was confirmed by TEM, which also demonstrated the unilamellar nature of the virosomes and the cage-like structures of the ISCOMs (results not shown). Physicochemical characteristics of OMP-containing virosomes and ISCOMs are summarized in Table 1.

SDS-PAGE analysis of virosomes and ISCOMs (Fig. 1, lane 2 and 3) showed typical OMP patterns with prominent bands at MW 30, 33, and 45 kDa. An additional protein band of MW of 70 kDa was also apparent in the virosome sample. This band coincided with one of ND viral membrane protein, hemagglutinin-neuraminidase (HN) (of lane 2 and 4, Fig. 1). The influence of the presence of bacterial membrane

proteins on the surface of the virosomes on the capacity to agglutinate chicken red blood cells was studied by an hemagglutination assay. Co-reconstitution of ND viral membrane and OMPs affected the capacity to agglutinate red blood cells. As shown in Table 2, plain ND-virosomes had high HA, but ND-virosomes bearing OMPs did not show any agglutination. Apparently, the presence of OMPs on the surface of virosomes completely inhibited HN functionality.

Vaccination and Challenge Exposure

To assess the adjuvant potential of virosomes and ISCOMs containing OMPs, mice were immunized twice by intraperitoneal immunization with various OMP formulations followed by a challenge with 100x (low dose) or 1000x (high dose) of the LD₅₀ of *P. multocida* NIAH DU1551/97. The results of this study are presented in Table 3. For the low dose challenge, mice immunized with either subunit pasteurella vaccines (micellar OMPs, virosomes, and ISCOMs) or inactivated whole cell vaccines showed 100 percent survival, whereas the survival of non-immunized mice was low (20%). For the high dose challenge, none of the control mice survived. The protective index (PI) was 80% for the group receiving micellar OMPs. OMPs associated with virosomes and ISCOMs gave a PI of 100% like the inactivated whole cell vaccines.

DISCUSSION

OMPs of *Pasteurella* spp. have been studied as potential immunogens and antibodies against them demonstrate a strong protective activity.^{5, 6, 22, 23} Several authors demonstrated that OMPs of *P. multocida* may be used as the components of subunit vaccines.^{1, 3, 4, 22} Membrane proteins used as candidate vaccine components usually require a delivery system that preserves and stimulates the immunogenicity. To date, there is no study that investigates the role of the antigen delivery system for OMPs of *P. multocida* on vaccine efficacy. Hence, it was desirable to characterize and compare the efficacy of subunit vaccine candidates in the form of micellar OMPs, OMP-containing ND-virosomes and ISCOMs.

In this study, *P. multocida* serogroup A:1 strain NIAH DU1551/97 isolated from dying birds was disrupted by the French press technique. The disintegrated bacteria were treated with Triton X-100 to extract OMPs. The polypeptide bands from SDS-PAGE analysis of isolated OMPs in our study are similar to results obtained by Pati *et al.* They described ten major polypeptide bands of MW 25 to 88 kDa of OMPs isolated from *P. multocida* B:2.⁵ The 30, 33, and 45 kDa polypeptides were the three principal protein bands present in the OMPs isolated from *P. multocida* A:1 (Fig. 1). This finding is consistent with a previous study where three major protein bands of *P. multocida* reference strain X-73 (serogroup A) with approximate MW of 29, 34.5, and 45 were observed.¹⁵

Inspired by the hemagglutination and fusogenic activity of ND-virosomes, which might assist delivery of foreign antigens, OMPs were co-reconstituted in virosomal membranes.¹³ It was a disappointment that the capacity of the HN protein to agglutinate chicken red blood cells was totally inhibited in the presence of OMPs on

the surface of ND-virosomes. A possible explanation may be that HN is masked by the OMPs, which may therefore diminish the accessibility of HN protein to sialic acid-containing receptors present on red blood cells. A similar inhibition of hemagglutination was seen after anchoring polyethylene glycol (PEG) chains on the surface of influenza virosomes.²⁴ Alternatively, dilution of the HN with the OMPs on the virosomal surface might have reduced its hemagglutination activity.

An established potency test for *P. multocida* vaccine is vaccination and challenge in animals. A significant finding in this study was that mice immunized with OMPs formulations were protected against a subsequent challenge infection. OMPs associated with ND-virosomes and ISCOMs yielded higher PI than micellar OMPs at a high dose challenge. Based on these data, we conclude that OMPs extracted from *P. multocida* are potent immunogens. Moreover, antigen loaded virosomes and ISCOMs are potential pasteurella subunit vaccines. Nevertheless, there is still a number of empty information about OMP formulations that need to be answered. For example, a potential of OMP formulations for inducing cross-protection against heterologous serotypes as well as the vaccine potency in birds is warranted. Also the precise mechanism for inducing immunological responses by various OMP formulations must form the basis for future work. Additionally, the combination of Newcastle disease viral envelope and OMPs from *Pasteurella multocida* might serve as a multi-disease combination vaccine, which should be a subject of further study as well.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Thailand Research Fund grant BGJ4680021. We thank Fort Dodge Animal Health, The Netherlands, for providing seed virus La Sota strain.

REFERENCES

1. Confer AW (1993) Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol* **37**, 353-68.
2. Tanticharoenyos T, Pathanasophon P, and Sawada T (1993) Certain serotypes of *Pasteurella multocida* in poultry. *Thai J Health Res* **7**, 21-6.
3. Adler B, Chancellor R, Homchampa P, Hunt M, Ruffolo C, Strugnelli R, and Wapling D (1996) Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. *J Biotech* **44**, 139-44.
4. Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, van Zanden A, et al. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotech* **73**, 83-90.
5. Pati US, Srivastana SK, Roy SC, and More T (1996) Immunogenicity of outer membrane protein of *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Vet Microbiol* **36**, 301-11.
6. Lu YS, Lai WC, Pakes SP, and Stefance C (1991) The outer membrane of *Pasteurella multocida* 3:A protects rabbits against homologous challenge. *Infect Immun* **59**, 4517-23.
7. Bowersock TL and Martin S (1999) Vaccine delivery to animals. *Adv Drug Deliv Rev* **38**, 167-94.
8. Kersten GFA and Crommelin DJA (2003) Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* **21**, 915-20.
9. Almeida JD, Edwards DC, Brand CM, and Heath TD (1975) Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* **2**, 899-901.
10. Glück R and Metcalfe IC (2003) Novel approaches in the development of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes as efficient antigen

- carrier systems. *Vaccine* **21**, 611-5.
11. Bungener L, Serre K, Bijl L, Leserman L, Wilschut J, Daemen T, and Machy P (2002) Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* **20**, 2287-95.
12. García-Sastre A, Cabezas JA, Villar E (1989) Protein of Newcastle Disease Virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **999**, 171-5.
13. Kapczynski DR and Tumpey TM (2003) Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis* **47**, 578-87.
14. Pasteurella spp. (1978) In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed (Edited by Buchanan RE and Gibbons NE), pp 371-3. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
15. Choi KH, Maheswaran SK, and Felice LJ (1989) Characterization of outer membrane protein-enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* **50**, 676-83.
16. Bron R, Ortiz A, Dijkstra J, Stegmann T, and Wilschut J (1993) Preparation, properties and applications of reconstituted influenza virus envelopes (virosomes). *Methods Enzymol* **220**, 313-31.
17. Barr IG and Mitchell GF (1996) ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunol Cell Biol* **74**, 8-25.
18. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-56.
19. Rouser G, Fleischer S, and Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids

- by phosphorous analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-6.
20. Alexander DJ (1980) Newcastle disease diagnosis. In: *Newcastle Disease* (Edited by Alexander DJ), pp 147-60. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
 21. Reed LJ and Muench H (1983) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-7.
 22. Confer AW, Suckow MA, Montelongo M, Dabo SM, Miloscio LJ, Gillespie AJ, and Meredith GL (2001) Intranasal vaccination of rabbits with *Pasteurella multocida* A:3 outer membranes that express iron-regulated proteins. *Am J Vet Res* **62**, 697-703.
 23. Sabri MY, Zamiri-Saad M, Mutalib AR, Israf DA, and Muniandy N (2000) Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol* **73**, 13-23.
 24. Mastrobattista E, Schoen P, Wilschut J, Crommelin DJA, and Storm G (2001) Targeting influenza virosomes to ovarian carcinoma cells. *FEBS Letters* **509**, 71-6.

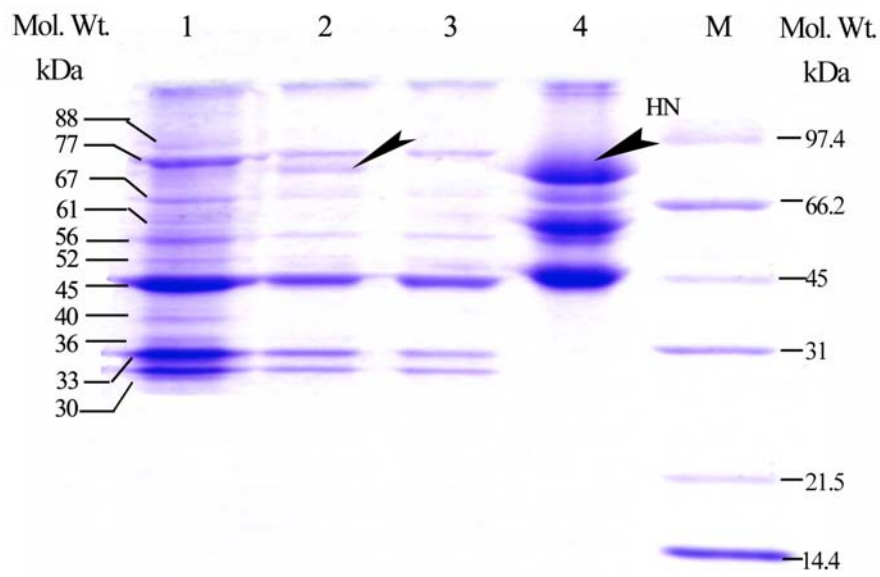


Fig 1. SDS-PAGE of micellar outer membrane proteins (OMPs) isolated from *P. multocida* (lane 1), virosomal OMPs (lane 2), ISCOMs containing OMPs (lane 3), NDV (lane 4), and molecular weight marker proteins (M)

Table 1

Physicochemical analysis of virosomes and ISCOMs containing OMPs of *P.*

multocida strain NIAH DU1551/97

Preparation	Phospholipid (nmole/ml)	Protein (μ g/ml)	Particle size (nm)	PD ^a
Virosomes	0.35 ± 0.07	288 ± 11	183 ± 4	0.35
ISCOMs	0.22 ± 0.05	273 ± 22	30 ± 3	0.42

^aPolydispersity index (PD) indicates particle size distribution, which ranges from 0.0

for a monodisperse to 1.0 for an entirely heterodisperse dispersion.

Data represent mean $\pm$ S.D. of 3 different samples for each preparation.

Table 2

Effect of OMPs associated with the virosomal bilayer on the hemagglutination capacity of virosomes

Preparation	Protein concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hemagglutination end point
ND virus ^a	656	1:4,096
Plain virosomes ^b	160	1:2,048
OMP-containing virosomes ^c	288	<1:2
No virosomes	0	<1:2

^aPurified Newcastle disease (ND) virus

^bVirosomes prepared from ND viral envelope bearing viral protein spikes.

^cVirosomes prepared from ND viral envelope bearing viral protein spikes and OMPs of *P. multocida* strain NIAH DU1551/97.

Table 3

Protection against low and high dose homologous challenge^a induced by various formulations containing OMPs extracted from *P. multocida* in ICR mice

Challenge Dose	Formulation ^b	Mortality	Protective Index (%)
100 x LD ₅₀	Micellar OMPs	0/10	100
	OMPs Virosomes	0/10	100
	OMPs ISCOMs	0/10	100
	WC-FC Pakchong ^c	0/10	100
	WC-NIAH DU1551/97 ^c	0/10	100
	Negative Control	8/10	
1,000 x LD ₅₀	Micellar OMPs	2/10	80
	OMPs Virosomes	0/10	100
	OMPs ISCOMs	0/10	100
	WC-FC Pakchong	0/10	100
	WC-NIAH DU1551/97	0/10	100
	Negative Control	10/10	

^aThe mice were challenged by injecting 0.2 ml brain-heart infusion broth containing live *P. multocida* NIAH DU1551/97 subcutaneously.

^bAll subunit vaccine formulations contained approximately 60 µg OMPs/dose.

^cInactivated whole broth culture of *P. multocida* strain FC-Pakchong and NIAH DU1551/97, respectively that were adsorbed onto aluminum hydroxide gel to 25% (v/v).

บทความสำหรับการเผยแพร่

โดย นายอรรถชัย หอมหวล

ภ.บ. เกียรตินิยมอันดับหนึ่งเหรียญทอง

ปร.ด. (เภสัชการ)

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และ โปรโตซัว เป็นศัตรูตัวสำคัญต่อการดำรงชีพของมนุษย์และสัตว์ การป้องกันโรคติดเชื้อด้วยการทำวัคซีนเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญที่ประสบผลสำเร็จมากที่สุดอย่างหนึ่งวงการแพทย์ ทั้งช่วยลดอัตราการเจ็บป่วย และการตายจากโรคติดเชื้อได้อย่างมหาศาล วัคซีนมีบทบาทในการกระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้พร้อมที่จะสู้รบกับเชื้อโรคที่อาจบุกรุกเข้ามาในอนาคต วัคซีนมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกับวิทยาการสาขาอื่น ๆ นักวิทยาศาสตร์วิจัยจนรู้ว่าส่วนประกอบใดของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรค และ ส่วนใดที่เหนี่ยวนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันมาต่อต้าน หรือ ที่เรียกว่า แอนติเจน (antigen) นอกจากนี้การใช้เทคนิคการเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตแอนติเจนเหล่านั้นในปริมาณมากได้เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนแบบใหม่ วัคซีนที่มีเฉพาะส่วนแอนติเจนที่จำเป็นต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันถูกเรียกว่า “วัคซีนหน่วยย่อย” (subunit vaccine) ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีความจำเพาะเจาะจง และ การควบคุมคุณภาพวัคซีนชนิดนี้ทำได้ดีกว่าวัคซีนชนิดดั้งเดิมที่มีใช้กันอยู่

การผลิตวัคซีนให้มีประสิทธิภาพดีนั้น ไม่ได้ขึ้นอยู่กับส่วนแอนติเจนเพียงอย่างเดียว แต่จำเป็นต้องมีสูตรตำรับ หรือ รูปแบบการนำส่งแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพเข้ามาประกอบด้วย หนทางที่แอนติเจนถูกนำเสนอต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นกลยุทธ์สำคัญที่นักออกแบบวัคซีน (vaccine designer) เลือกใช้ โดยทั่วไปแล้วหากสามารถสร้างระบบนำส่งแอนติเจนให้เหมือนกับธรรมชาติที่แอนติเจนหน่วยนั้น ๆ เคยอยู่ น่าจะเป็นการออกแบบที่ตรงไปตรงมา เป็นระบบที่ง่ายที่สุด และ มีความปลอดภัยมากกว่าระบบอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น การสร้างเมมเบรนเทียม (artificial membrane) สำหรับโปรตีนแอนติเจน ซึ่งตามธรรมชาติแล้ว มันจะเกาะติดอยู่ที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรีย การสร้างระบบนำส่งชนิดเมมเบรนเทียมนี้ก็เป็นการเล่นแบบธรรมชาติมากที่สุดนั่นเอง ซึ่งคาดหวังว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็จะเป็นลักษณะเลียนแบบการติดเชื้อโรคจากธรรมชาตินั่นเอง

โรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera) เป็นโรคติดต่อร้ายแรง ซึ่งส่งผลเสียร้ายแรงต่อเศรษฐกิจของเกษตรกร และประเทศชาติ โดยมีเชื้อแบคทีเรียชื่อว่า พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา (*Pasteurella multocida*) เป็นเชื้อก่อโรค เมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยหลายชิ้นพบว่า โปรตีนเมมเบรนซึ่งอยู่ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำหน้าที่เป็นแอนติเจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของระบบนำส่งโปรตีนแอนติเจนต่อประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้โปรตีนเมมเบรนชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ด้วยเหตุนี้คณะนักวิจัยจึงได้ตั้งคำถามงานวิจัยข้อนี้ พร้อมทั้งเสนอโครงการวิจัยนี้ต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้

ระบบนำส่งแอนติเจนที่ได้รับความสนใจในวงการแพทย์ และสัตวแพทย์ เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา ได้แก่ ระบบนำส่งแอนติเจนชนิดถุงหุ้มขนาดเล็กที่เตรียมจากไขมัน หรือที่เรียกกันว่า “ลิโปโซม” (lipid vesicles or called “liposomes”) ทั้งนี้เพราะไขมันเป็นสารที่มีอยู่ตามธรรมชาติทั้งในร่างกายมนุษย์ และสัตว์ จึงไม่มีปัญหาเรื่องความเข้ากันไม่ได้กับร่างกาย หรือ ทำปฏิกิริยากับสารชีวภาพในร่างกาย อย่างไรก็ตามลิโปโซมกลับไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ไม่ดีเท่าไรนัก จึงมีการเติมสารช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือ ที่เรียกว่า แอดจูแวนท์ (adjuvant) ลงไปช่วยด้วย ตัวอย่างเช่น มีการนำเอาเปลือกหุ้มไวรัสไข้หวัดใหญ่มาสอดแทรกที่ผิวของลิโปโซม พร้อมกันนั้นก็ผสมแอนติเจนที่ต้องการให้ออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันไวรัสตับอักเสบ (Hbs antigen) เข้าไปด้วย นักวิจัยได้พบว่าการมีเปลือกหุ้มไวรัสอยู่ด้วยจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันไวรัสตับอักเสบได้ดีมากกว่าเดิม การสอดแทรกเปลือกหุ้มไวรัสลงไปในลิโปโซมนี้จึงได้ชื่อใหม่ว่า ไวโรโซม (virosomes)

ในสัตว์ปีกมีไวรัสที่ก่อโรคร้ายแรงที่สำคัญที่สุดอยู่สองชนิด ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดนก และ ไวรัสนิวคาสเซิล ไวรัสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ก่อโรคในคนมาก ดังนั้นหากนำเอาเปลือกไวรัสเหล่านี้มาผสมกับลิโปโซม และเติมโปรตีนเมมเบรนชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย พาสเจอร์ลล่า ลงไปด้วย ก็อาจจะเป็นระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพต่อต้านโรคในสัตว์ปีก เหมือนกับ ไวโรโซมที่นำส่ง Hbs antigen ในกรณีของมนุษย์ดังที่อธิบายข้างต้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสกัดเอาเปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิล และเตรียมเป็นไวโรโซม พร้อมทั้งใส่โปรตีนเมมเบรนชั้นนอกของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า ลงไปด้วย ซึ่งพบว่าให้ผลในการป้องกันโรคได้ 100% เทียบเท่ากับวัคซีนชนิดดั้งเดิม ดังนั้นการนำเอาไวโรโซมมาใช้เป็นระบบนำส่งแอนติเจนน่าจะเป็นอีกหนทางหนึ่งในการพัฒนาวัคซีนในอนาคต และสามารถผลิตขึ้นใช้ได้เองภายในประเทศ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวัคซีนไม่ใช่เป็นเรื่องง่าย ความสำเร็จของงานวิจัยจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อนักวิจัยได้ประยุกต์องค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ทั้งแง่มุมทางเคมี และชีววิทยา เพื่อต่อยอดให้การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ประยุกต์ เช่น วัคซีน เป็นไปตามแนวทางที่ถูกต้อง และ เป็นการศึกษาที่มีระบบแบบแผน (Systematic Approach) ไม่ใช่เป็นการทดลองแบบเดาผิดเดาถูก (Trial and Error) อีกต่อไป