Chulalongkorn Medical Journal

Volume 60
Issue 1 *January 2016*

Article 8

1-1-2016

การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธีhuman hybridoma technology

สมพงศ์ บุญให้

กาญจนา เอี่ยมอัมพร

อุดม ตึ่งต้อย

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

บุญให้, สมพงศ์; เอี่ยมอัมพร, กาญจนา; and ตึ่งต้อย, อุดม (2016) "การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธีhuman hybridoma technology," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 60: Iss. 1, Article 8.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol60/iss1/8

This Modern Medicine is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

Chula Med J Vol. 60 No. 1 January-February 2016

การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology

สมพงศ์ บุญให้*
กาญจนา เอี่ยมอัมพร* อุดม ติ่งต้อย*

Boonhai S, Aiemumpron K, Tingtoy U. Production of a new anti-M monoclonal reagent using human hybridoma technology . Chula Med J 2016 Jan – Feb;60(1): 101 - 13

Background : *The standard reagent for M-antigen blood group testing form the National Blood Centre is currently ineffective as it is rabbit polyclonal antibodies which have low potency and specificity.*

Objectives : *To develop new high efficacy monoclonal anti-M antibodies.*

Materials and Methods : *By using a fusion technique, anti-M secreted B-lymphocytes were fused with the same species of myeloma cells (JMS-3) to generate anti-M secreted hybridoma cells. Subsequently, monoclonal anti-M antibodies were individually harvested from each hybridoma cell culture supernatant. In order to determine the antibodies' efficacy, compared with the standard polyclonal anti-M antibodies from the National Blood Centre and commercial monoclonal anti-M antibodies.*

Results : *The results showed that the newly-developed monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9) have higher potency than the standard polyclonal anti-M antibodies from the National Blood Centre, while it was equivalent to or having higher potency than the commercial ones. From slide avidity testing, new-developed monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9) reacted with M-antigen positive RBC within 1- 2 seconds, However, there is no difference*

*ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

among the newly developed monoclonal antibodies and other two of standard reagents. As for specificity testing, 800 M-antigen positive RBC samples and 400 M-antigen negative RBC samples were tested against monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9). The result showed that monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9) specifically reacted with M-antigen positive RBC (100%); concurrently, there was no detectable reaction in M-antigen negative RBC (100%) and papainized identification panel cells (Lot 58040). In term of antibodies stability, monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9) were stored at 4 ^{o}C for longer than 18 months and yet there was no reduction of the antibodies potency. An adequate pH range for antibodies reaction is very wide, from pH 5 to pH 9, which is similar to that of the standard reagents. Regarding the effect of temperature on there action of the antibodies, it was found that the human monoclonal anti-M (clone 1F9) can react well at low temperature, and the reaction occurs at 4 ^{o}C and 20 - 25 ^{o}C (room temperature), far better than the temperature of 37 ^{o}C.

Conclusion : *The newly developed monoclonal anti-M antibodies (Clone 1F9) show high potency, avidity, specificity, and stability with a wide range of pH and low temperature usages. Thus, this might suggestively be a new reagent for human blood group testing in laboratory.*

Keywords : *Anti-M, human monoclonal, hybridoma.*

Reprint request: Boonhai S. Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. October 30, 2015.

สมพงศ์ บุญให้, กาญจนา เอี่ยมอัมพร, อุดม ติ่งต้อย. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2559 ม.ค. –ก.พ.;60(1): 101 –13

เหตุผลของการทำวิจัย : *ปัจจุบันน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผลิตขึ้นมาจากการฉีดกระตุ้นกระต่าย (rabbit polyclonal antibody) แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะไม่คงที่และความแรงที่ได้ค่อนข้างต่ำ*

วัตถุประสงค์ : *เพื่อพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-M*

วัสดุและวิธีการ : *ใช้เทคนิคการเชื่อมเซลล์ระหว่าง B-lymphocyte ที่มีการสร้าง anti-M กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เดียวกัน (JMS-3) ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทนในการสร้าง anti-M จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากโคลนใหม่ (clone 1F9) มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับ rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิม และ monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ*

ผลการศึกษา : *พบว่าน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) ที่พัฒนาขึ้นใหม่มีความแรงของแอนติบอดี (potency) ดีกว่าน้ำยาตรวจหมู่โลหิต rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิมและเทียบเท่าหรือดีกว่า monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ ด้านความเร็วของแอนติบอดี (avidity) ในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตที่มี M-antigen positive บนสไลด์ พบว่ามีความเร็วเฉลี่ย 1 - 2 วินาที ซึ่งไม่แตกต่างกันในน้ำยาทั้ง 3 ชนิด ด้านความจำเพาะของแอนติบอดี (specificity) พบว่าให้ผลถูกต้องแม่นยำร้อยละ 100 โดยให้ปฏิกิริยาผลบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตที่มี M-antigen positive จำนวน 800 ราย ให้ปฏิกิริยาผลลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตที่มี M-antigen negative จำนวน 400 ราย และยังให้ปฏิกิริยาผลลบทั้งหมดกับ papainized identification panel cells (Lot 58040) ด้านความคงทนของแอนติบอดี (stability) พบว่าสามารถเก็บ human monoclonal anti-M (clone 1F9) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ได้มากกว่า 18 เดือน โดยที่ความแรงไม่ลดลง ด้านผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี พบว่าน้ำยาทั้ง 3 ชนิด สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่กว้างคือ pH 5 ถึง pH 9 ส่วนในด้านผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีพบว่าน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำคือเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 20 - 25 °C (อุณหภูมิห้อง) ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37 °C*

สรุป : *จากคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ได้ทำการทดสอบทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-M ในครั้งนี้เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต human monoclonal anti-M เพื่อใช้ในงานธนาคารเลือดต่อไป*

คำสำคัญ : *Anti-M, ฮิวแมน โมโนโคลนัล, ไฮบริโดมา.*

นับตั้งแต่มีรายงานผลสำเร็จของการใช้วิธีไฮบริโดมา (hybridoma technology) ผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตเมื่อปี พ.ศ. 2523 เป็นต้นมา[1-5] ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้พัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ซึ่งได้แก่ anti-A, anti-B, และ anti-A_1 จนประสบความสำเร็จ[6-8] ส่วน anti-M นั้นปัจจุบันยังคงใช้วิธีการผลิตด้วยวิธีโพลีโคลนัลโดยการฉีดกระตุ้นกระต่าย (rabbit polyclonal antibody) ซึ่งมีขั้นตอนการผลิตค่อนข้างยุ่งยาก แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะไม่คงที่ และความแรงที่ได้ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งการใช้เทคนิคการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีจากหนูนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ เหมือนน้ำยาตัวอื่น ๆ หลังจากที่ผู้วิจัยได้รับโอกาสจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ให้ไปศึกษาดูงานที่สภากาชาดญี่ปุ่น เรื่องการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธี human hybridoma technology ผู้วิจัยจึงได้นำความรู้และเทคนิคต่าง ๆ มาพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต จนสามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-M ได้ด้วยวิธีดังกล่าว จากนั้นนำน้ำยา human monoclonal anti-M ที่พัฒนาได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับ rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิม และ monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ

Anti-M เป็นแอนติบอดีในหมู่เลือดระบบ MNS[12] ซึ่งแอนติเจนในระบบนี้ ได้แก่ M, N, S และ s โดยแอนติเจน M และ N อยู่บนโมเลกุลของโปรตีน glycophorins A และแอนติเจน S และ s อยู่บนโมเลกุลของโปรตีน glycophorins B บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง แอนติเจน M แตกต่างจากแอนติเจน N ที่ amino acid ตัวที่ 1 และ 5 ทางปลาย amino ของสายโปรตีน โดยแอนติเจน M มี amino acid ตัวที่ 1 เป็น serine ตัวที่ 5 เป็น glycine ส่วนแอนติเจน N ตัวที่ 1 เป็น leucine ตัวที่ 5 เป็น glutamic acid ในคนไทยพบการกระจายของหมู่โลหิต MN มีดังนี้คือ MM 44%, MN 42% และ NN 14%[13, 14] ความสำคัญทางคลินิกของหมู่เลือดระบบ MNS มีดังนี้ การรับโลหิต (blood transfusion) แอนติบอดีของระบบนี้สามารถพบได้ทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และชนิดที่เกิดจากการกระตุ้น anti-M เป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยกว่าชนิดอื่น ๆ ในระบบนี้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เซลล์ และเทคนิคที่สามารถครอบคลุมการตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีในระบบนี้ ทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ และธนาคารเลือดของสถาบันใหญ่ จำเป็นต้องมีการตรวจและทำรายชื่อของผู้บริจาคโลหิตที่มี phenotype MM, MN และ NN ไว้เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการจัดหาโลหิตให้ผู้ป่วยเมื่อพบว่ามีแอนติบอดีในระบบนี้ เพื่อป้องกันdelayed hemolytic transfusion reaction ซึ่ง พบได้ในรายงานจากที่ต่าง ๆ ทางด้านภาวะ hemolytic disease of the newborn (HDN) เด็กที่มีเม็ดเลือดแดงแตกและตัวเหลือง เนื่องจากมีหมู่เลือด MNS เข้ากันไม่ได้ระหว่างมารดาและเด็ก ได้แก่ รายงานเรื่อง Anti-M antibodies in the pathogenesis of hemolytic disease of the newborn ซึ่ง Lenkiewicz B และคณะ[15]รายงานในปี พ.ศ. 2532 พบว่า anti-M สามารถทำให้เกิดภาวะ HDN ได้ทั้งแบบอ่อนและแบบรุนแรง และผลการตรวจ direct antiglobulin test อาจให้ผลลบแม้อาการรุนแรง ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นเหมือนกับที่พบในกรณี ABO-HDN นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการพิสูจน์บุตร (paternity testing) แอนติเจนในระบบ MNS มีอยู่ในเม็ดเลือดแดงเต็มที่แล้วในคนตั้งแต่แรกคลอด และคงอยู่ตลอดไป จึงสามารถนำมาใช้ตรวจร่วมกับระบบ ABO, Rh และ Fy ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อลูกได้ จะเห็นได้ว่าระบบหมู่เลือด MNS มีความสำคัญทางคลินิกและทางนิติเวชศาสตร์ การตรวจแยกชนิดของแอนติเจนได้ถูกต้องจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งต้องอาศัยน้ำยาแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งต้องใช้เทคนิคที่เหมาะสมอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้บริจาคโลหิต จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
2. เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 จากสภากาชาดญี่ปุ่น

(Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society)

3. Epstein-Barr Virus (EB virus) จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
4. Polyethylene glycol (PEG) M.W. 1500 จาก Merck (Darmstadt, Germany)
5. Isoprep for isolation human lymphocyte จาก Robbins Scientific (Norway)
6. Hypoxanthine aminoptherine thymidine (HAT) จาก Sigma chemical Co (MO, USA)
7. ตัวอย่างเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตต่าง ๆ จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
8. Rabbit polyclonal anti-M lot 58010 จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
9. Monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ (CE-Immundiagnostika lot OMM103, Germany)

วิธีการ

การสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology

นำ buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตที่มีการสร้าง anti-M มาแยกให้ได้เฉพาะเม็ดเลือดขาว โดยใช้ Isoprep for isolation human lymphocyte แล้วจึงนำไป transform ด้วย EB virus เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเจริญเติบโตได้ดี เลี้ยงขยาย transformed cells ใน 96 well tissue culture plates (2.5×10^4 cells / well) ประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ หลังจากนั้น ทำการคัดเลือกหลุมที่สร้างแอนติบอดี ด้วยวิธี hemagglutination โดยใช้เม็ดเลือดแดง Group O, M+N- ความเข้มข้น 2% นำ transformed cells เฉพาะหลุมที่ให้ปฏิกิริยาผลบวกมารวมกัน แล้วนำมาเชื่อม (fusion) กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ 50% polyethylene glycol M.W. 1500 เป็นตัวเชื่อมเซลล์ ตามวิธีการพื้นฐานของ Galfre และคณะ[16] เลี้ยงขยายเซลล์ที่เชื่อมแล้ว ใน 96 well tissue culture plates (2.5×10^4 cells / 200 ul.) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FCS + RPMI 1640 + hypoxanthine aminoptherine thymidine (HAT) เป็นตัวคัดแยกเซลล์ลูกผสม (hybridoma cells) ประมาณ 10 - 14 วัน เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture supernatants) มาทดสอบการสร้างแอนติบอดี คัดเลือกเฉพาะหลุมที่สร้าง anti-M มาทำการ cloning ด้วยวิธี limiting dilution เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าเซลล์สายพันธุ์ที่ได้มานั้นสร้างแอนติบอดีชนิดเดียว และยังเป็นการกำจัดเซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดีออกไปด้วย นำเซลล์สายพันธุ์ที่ได้เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เพื่อเก็บเป็นเซลล์ต้นแบบ (master cells bank) ต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติของน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ศึกษาคุณสมบัติของน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) ที่พัฒนาขึ้นใหม่ โดยเปรียบเทียบกับ rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิม (lot 58010) และ monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ (CE-Immundiagnostika lot OMM103, Germany) ในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ด้านความแรงของแอนติบอดี (potency) ทำการเจือจางแอนติบอดีแบบ two-fold serial dilution ในน้ำเกลือ และให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Group O, M+N- และ Group O, M+N+ ความเข้มข้น 3 % อ่านผลดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและให้เป็นคะแนนของปฏิกิริยา (hemagglutination score)[17] ดังนี้

Grade	Score	ลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
4+	12	ปฏิกิริยาแรงที่สุดมีการเกาะกลุ่มเป็นก้อนเดียวหลุดออกจากก้นหลอด
$3+^{S}$	11	
3+	10	มีการเกาะกลุ่มใหญ่ๆ หลายก้อน ส่วนน้ำใส
$2+^{S}$	9	
2+	8	มีการจับกลุ่มขนาดกลางหลายก้อน ส่วนน้ำใส
$1+^{S}$	6	
1+	5	มีการจับกลุ่มขนาดเล็กหลายก้อน ส่วนน้ำขุ่นเล็กน้อย มีสีชมพู
W(+)	1-3	มีการจับกลุ่มขนาดเล็กมาก ส่วนน้ำขุ่น มีสีชมพู
-	0	ไม่มีการจับกลุ่ม

ด้านความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี (avidity) โดยให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Group O, M+N- และ Group O, M+N+ ความเข้มข้น 30 - 50% บนแผ่นสไลด์ อ่านระยะเวลาที่เริ่มมองเห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า และอ่านความแรงอีกครั้งเมื่อครบเวลา 2 นาที ด้านความจำเพาะของแอนติบอดี (specificity) นำแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบ 2 หยด ทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตต่าง ๆ ที่มี M-antigen positive และ M-antigen negative ความเข้มข้น 3% 1 หยด จำนวน 1,200 ราย อ่านและบันทึกผลของปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำ papainized identification panel cells มาเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 3% ในน้ำเกลือ แล้วนำมาทดสอบกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ ด้านความคงทนของแอนติบอดี (stability) เก็บน้ำยาไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือที่อุณหภูมิ 4°C, 20 - 25°C (อุณหภูมิห้อง) และ 37°C แล้วนำมาทดสอบความแรงตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 1,6,12 และ 18 เดือน การทดสอบผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี ดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดี ที่มี pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยผสม 0.1 M Na_2HPO_4 กับ 0.1 M NaH_2PO_4 เจือจางเป็น 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น เตรียม buffer ที่ได้ให้เป็น working buffer ในอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำเกลือ ทำการเจือจางแอนติบอดีแบบ two-fold serial dilution ใน working buffer ต่าง ๆ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ 3% cells suspension มาตรฐาน (panel cells) อย่างละ 100 ul. เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ปั่น 3400 rpm 15 วินาที อ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และให้เป็นคะแนนของปฏิกิริยา (hemagglutination score) การทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี ดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับแอนติบอดีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือที่อุณหภูมิ 4°C, 20 - 25°C (อุณหภูมิห้อง) และ 37°C โดยการเจือจางแอนติบอดีแบบ two-fold serial dilution ในน้ำเกลือ และให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Group O, M+N- และ Group O, M+N+ ความเข้มข้น 3 % ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 30 นาที ปั่น 3400 rpm 15 วินาที อ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และให้เป็นคะแนนของปฏิกิริยา (hemagglutination score)

ผลการศึกษา

จากการทดลองการสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology โดยใช้เม็ดเลือดขาวของผู้บริจาคโลหิตที่มีการสร้าง anti-M นำมา transform แล้วเลี้ยงใน 96 well tissue culture plates ได้จำนวน 100 plates คิดเป็น 9600 หลุม ผลการทดสอบพบว่ามีเซลล์ที่สร้าง anti-M จำนวน 17 หลุม คิดเป็นร้อยละ 0.18 นำเซลล์ที่ได้มาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 แล้วนำไปเลี้ยงได้จำนวน 98 หลุม หลังจากนั้นทดสอบการสร้าง

anti-M ของเซลล์ลูกผสม (hybridoma cells) ที่เกิดขึ้น พบเซลล์ลูกผสม เพียง 2 โคลน ที่ให้ปฏิกิริยาผลบวก คิดเป็นร้อยละ 2.04 แต่เมื่อนำมาเลี้ยงขยายต่อพบว่ามีเพียง 1 โคลน (clone 1F9) ที่เซลล์เจริญเติบโตดี เลี้ยงขยายและเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาศึกษาคุณสมบัติของน้ำยา ผลการศึกษาความแรงของแอนติบอดี (potency) พบว่าน้ำยาทั้ง 3 ชนิดมีความแรงแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 1 ด้านความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี (avidity) พบว่าให้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา โดยเฉลี่ย 1 - 2 วินาที และให้ปฏิกิริยา 4+ เมื่อครบเวลา 2 นาที ซึ่งปฏิกิริยาที่ได้ไม่แตกต่างกันในแต่ละน้ำยา ดังแสดงใน Table 2 ด้านความจำเพาะของแอนติบอดี (specificity) ผลการทดลองการตรวจหมู่โลหิต จำนวน 1200 ราย เปรียบเทียบกับ rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ เดิม พบว่า human monoclonal anti-M (clone 1F9) ให้ปฏิกิริยาผลบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตที่มี M-antigen positive เท่ากับ 100% และให้ปฏิกิริยาผลลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตที่มี M-antigen negative เท่ากับ 100% ดังแสดงใน Table 3 ส่วนผลการทดสอบกับ papainized identification panel cells พบว่าให้ปฏิกิริยาผลลบทั้งหมด ไม่แตกต่างกันดังแสดงใน Table 4 ด้านความคงทนของแอนติบอดี (stability) เมื่อเก็บน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) ไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน แล้วนำมาทดสอบความแรงตามระยะเวลาที่ กำหนด พบว่าจะมีความแรงของน้ำยาแตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ ดังแสดงใน Table 5 ส่วนผลการศึกษาผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีพบว่าน้ำยาทั้ง 3 ชนิด สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง ดังแสดงใน Fig.1 และผลการทดสอบผลของอุณหภูมิ ต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีพบว่าน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ดังแสดงใน Fig.2

Table 1. Comparison of potency between human monoclonal anti-M (clone 1F9), rabbit polyclonal anti-M (NBC) and commercial monoclonal anti-M.

Anti-M	With 3% red cells in NSS			
	OMM		OMN	
	Titer	Score	Titer	Score
Human mono. anti-M (1F9)	1024	108	512	103
Rabbit poly. anti-M (NBC)	16	50	8	40
Commercial mono. anti-M	32	61	16	51

NBC = National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Mono = Monoclonal, Poly = Polyclonal
Score = hemagglutination score, OMM = Group O, M+N-, OMN = Group O, M+N+

Table 2. Comparison of avidity test (second) between human monoclonal anti-M (clone 1F9), rabbit polyclonal anti-M (NBC) and commercial monoclonal anti-M.

30 - 50% red cells in own serum	Avidity of anti-M (second)		
	Human mono. anti-M (1F9)	Rabbit poly. anti-M (NBC)	Commercial mono. anti-M
OMM (6 samples)	1.10 (1.0 - 1.2)	1.30 (1.2 - 1.4)	1.15 (1.1 - 1.2)
OMN (6 samples)	1.12 (1.0 - 1.2)	1.33 (1.2 - 1.4)	1.20 (1.1 - 1.3)

Average of reaction time (second) from 6 blood samples

Table 3. Comparison of specificity between human monoclonal anti-M (clone 1F9) and rabbit polyclonal anti-M (NBC).

Group	Phenotype	No. of total cells tested	No. of positive		No. of negative	
			Human mono. anti-M (1F9)	Rabbit poly. anti-M (NBC)	Human mono. anti-M (1F9)	Rabbit poly. anti-M (NBC)
O	M+N-	400	400	400	0	0
O	M+N+	400	400	400	0	0
O	M-N+	100	0	0	100	100
A	M-N+	100	0	0	100	100
B	M-N+	100	0	0	100	100
AB	M-N+	100	0	0	100	100
Total		1200	800	800	400	400

Table 4. Comparison of reaction between human monoclonal anti-M (clone 1F9), rabbit polyclonal anti-M (NBC) and commercial monoclonal anti-M with enzyme treated red blood cells.

Anti-M	Papainized identification panel cells Lot 58040 Exp. 13 May 2015										
	M-N+ O_1	M+N- O_2	M+N- O_3	M-N+ O_4	M+N- O_5	M+N- O_6	M+N- O_7	M+N- O_8	M+N+ O_9	M+N+ O_{10}	M+N- O_{11}
Human mono. anti-M (1F9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rabbit poly. anti-M (NBC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Commercial mono. anti-M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = no agglutination

Table 5. Stability of human monoclonal anti-M (clone 1F9) at different temperature with 3% OMM and OMN cells suspension.

Storage Temp.	3% OMM cells in NSS								3% OMN cells in NSS							
	Period of storage (months)								Period of storage (months)							
	1		6		12		18		1		6		12		18	
	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
4 °C	1024	108	1024	108	1024	108	1024	108	512	103	512	103	512	103	512	103
20 °C	1024	108	512	103	512	101	256	94	512	103	256	99	256	97	128	91
37 °C	1024	106	512	99	128	85	128	85	512	100	256	97	64	70	64	70

T = Titer, S = Score, Temp. = Temperature

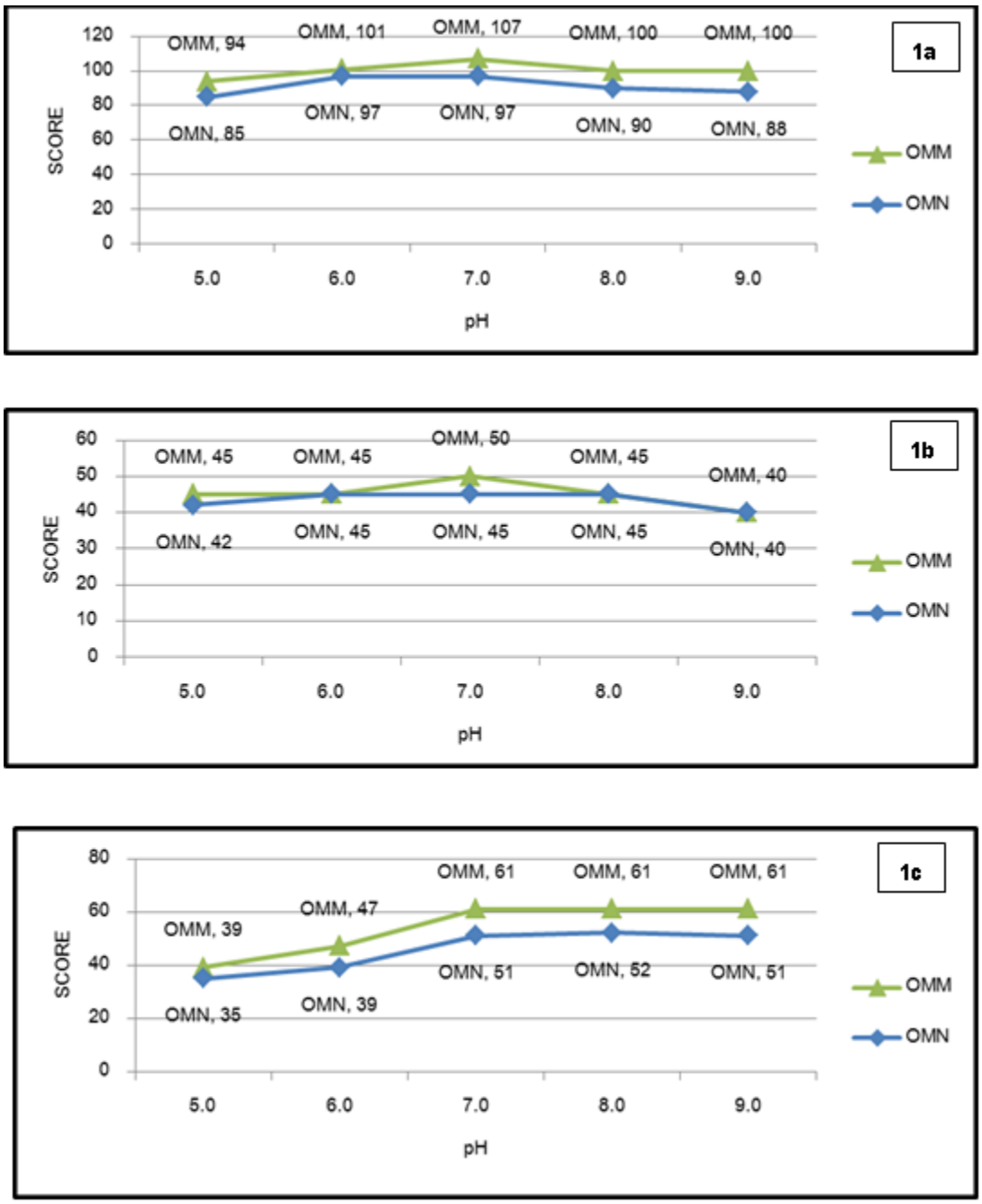

Figure 1. Reaction of reagents with 3% OMM and OMN cells suspension at different pH: 1a; human monoclonal anti-M (clone 1F9), 1b; rabbit polyclonal anti-M (NBC), 1c; commercial monoclonal anti-M.

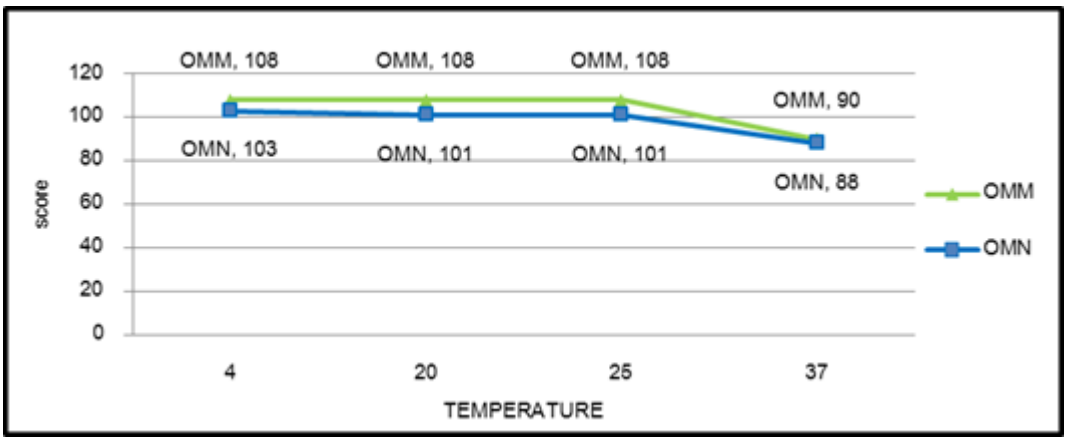

Figure 2. Reaction of human monoclonal anti-M (clone 1F9) with 3% OMM and OMN cells suspension at different temperature.

วิจารณ์และสรุป

ผลจากการศึกษาพัฒนาน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology นั้น ทำให้สามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-M ใหม่ ได้ 1 เซลล์สายพันธุ์ (clone 1F9) แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำยาพบว่า human monoclonal anti-M (clone 1F9) ที่ได้มีความแรงของแอนติบอดี (potency) ดีกว่า rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิม และ monoclonal anti-M ของบริษัทต่างประเทศ คือมีความแรงเท่ากับ 1024 (M+N-) และ 512 (M+N+) ด้านความเร็วของแอนติบอดีในการเกิดปฏิกิริยา (avidity) ของน้ำยาทั้ง 3 ชนิด พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน (1-2 วินาที) ด้านความจำเพาะ ของแอนติบอดี (specificity) พบว่าให้ผลถูกต้องแม่นยำ ร้อยละ 100 และยังให้ปฏิกิริยาผลลบทั้งหมดกับ papainized identification panel cells (Lot 58040) อีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์ papain ได้ทำลายแอนติเจน M บนผิวเม็ดเลือดแดงใน papainized identification panel cells ไปแล้ว[18] ด้านความคงทนของแอนติบอดี (stability) พบว่าเมื่อเก็บน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) ไว้ในสภาวะที่เหมาะสม คือที่อุณหภูมิ 4°C จะสามารถเก็บไว้ได้มากกว่า 18 เดือน โดยไม่สูญเสียความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา (activity) ทั้งในด้านความแรงและความไว แต่ถ้าเก็บไว้ที่ 20 - 25°C (อุณหภูมิห้อง)และ 37°C จะพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้จะเป็นตัวเร่งให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mcgowan และคณะ[19] กล่าวไว้ว่า การเก็บน้ำยาไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 1 เดือน จะมีการสูญเสียความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา เท่ากับเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6 เดือน ด้านผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีพบว่าน้ำยาทั้ง 3 ชนิด สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง คือ pH 5 ถึง pH 9 ส่วนในด้านผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีพบว่าน้ำยา human monoclonal anti-M (clone 1F9) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ คือเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C และ 20-25°C (อุณหภูมิห้อง) ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37°C

จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ได้ทดสอบทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่า human monoclonal anti-M (clone 1F9) สามารถนำมาเตรียมเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ได้ เพื่อใช้ในงานธนาคารเลือดแทน rabbit polyclonal anti-M ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเดิม และเนื่องจากมีความแรง (potency) ที่สูงมาก จึงสามารถนำมาเจือจางเพื่อเตรียมได้ครั้งละปริมาณมาก ๆ ทำให้ลดต้นทุนและทรัพยากร รวมทั้งยังลดขั้นตอนในการผลิต เมื่อเทียบกับการเตรียมโดยวิธีการฉีดกระตุ้นกระต่าย ซึ่งมีกระบวนการผลิตที่ค่อนข้างยุ่งยาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Ms. Chizu Toyoda และทีมงานของ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society ที่ให้การฝึกอบรมการสร้างเซลล์สายพันธุ์ด้วยวิธี human hybridoma technology

อ้างอิง

1. Voak D, Sacks S, Alderson I, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J. Monoclonalanti-A from a hybrid myeloma: evaluation as a blood grouping reagents. Vox Sang 1980 Sep;39(3):134-40
2. Sacks S, Lennox E. Monoclonal anti-B as a new blood group typing reagents. Vox Sang 1981 Feb;40(2):99-104
3. Voak D, Lennox E, Sacks S, Milstein C, Darnborough J. Monoclonal anti-A and anti-B: development as cost effective reagents. Med Lab Sci 1982 Apr ;39(2):109-22
4. Munro AC, Inglis G, Blue A, Sheridan R, Mitchell R. Mouse monoclonal anti-A and anti-B as routine blood grouping reagents. An evaluation. Med Lab Sci 1982 Apr;39(2): 123-7
5. Messeter L, Brodin I, Chester MA, Low B, Lundblad A. Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B specificities: some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox Sang 1984; 46(4):185-94
6. สร้อยสอางค์ พิกุลสด, รัชนี พลเทียร, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, กัญญ์ชลา อุทิศ, อุดม ติ่งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอ โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมาของศูนย์บริการโลหิตฯ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2535 ต.ค. – ธ.ค.;2(4): 373-81
7. สร้อยสอางค์ พิกุลสด, รัชนี พลเทียร, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ติ่งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: II การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บีชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีเปรียบเทียบกับน้ำยาชนิดโมโนโคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัลของศูนย์ฯ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2535 ก.ค. – ก.ย.;2(3): 295-302
8. อุดม ติ่งต้อย, สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร์, อัจฉรา ศิริพงษ์ษานุสิทธิ์, สาริกา เมฆฉาย, ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช. การพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551 ม.ค. – มี.ค.;18(1):11-9
9. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information US; 2005
10. กัลยา เกิดแก้วงาม, จินตนา ทับรอด, อุดม ติ่งต้อย, วัฒนา เติมชัยโรจน์, สิณีนาฏ อุทา. การทดสอบแอนติเจนสังเคราะห์ MUT/Mur Kodecytes กับ Anti-Mi[a] ในผู้บริจาคโลหิต. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554 ต.ค. – ธ.ค.; 21(4):229-33
11. กัลยา เกิดแก้วงาม. KODE™ Biosurface Engineering Technology กับการสร้างแอนติเจนสังเคราะห์บนผิวเม็ดเลือดแดง. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554 ต.ค. – ธ.ค.;21(4): 223-7
12. กัลยา เกิดแก้วงาม, จินตนา ทับรอด. ความแตกต่างของหมู่เลือดเก้าระบบในมนุษย์สามชาติพันธุ์หลัก. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2558 เม.ย.;43(1):

5127-40

13. Reid ME. MNS blood group system: a review. Immunohematology 2009; 25:95-101
14. จุฑาทิพย์ ฟองศรัณย์, อิศรางค์ นุชประยูร, ศุภวรรณ ยอดอินทร์, ภาวิณี คุปตวินทุ, จรัล คิดประเสริฐ. หมู่โลหิตในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ.วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545 ต.ค. – ธ.ค.;12(4):277-86
15. Lenkiewicz B, Kusnierz-Alejska G, Lukowska J, Klimaszewska A. Anti-M antibodies in the pathogenesis of hemolytic disease of the newborn. Acta Haematol Pol 1989 Jul-Dec; 20(2):229-34
16. Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature 1977 Apr;266(5602): 550-2
17. Walker, Richard H. AABB Technical Manual 10th Edition. Arlington Virginia 1990; 529
18. Reid ME, Lomas-Francis C. Section II: The blood group systems and antigens. In: The Blood Group Antigen: Facts Book. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004:47-50
19. Mcgowan A, Tod A, Chirnside A, Green C, McColl K, Moore S, Yap PL, McClelland DB, McCann MC, Micklem LR, et al. Stability of murine monoclonal anti- A, anti-B, anti-AB ABO grouping reagents and a multi-centre evaluation of their performance in routine use. Vox Sang 1989; 56(2):122-30