นิพนธ์ต้นฉบับ

การสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-E โดยใช้เทคนิค human monoclonal hybridoma

ศิริพร พลเสน สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร์ นุชนาฎ เปรมประยูร กัลยา เกิดแก้วงาม และ อุดม ติ่งต้อย
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

ความเป็นมา: *ปัจจุบันน้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผลิตจากน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งอาจมีความยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการขนส่ง* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-E จากเซลล์เม็ดโลหิตขาวชนิด B cells* ***วิธีการศึกษา*** *แยก B cells จาก buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตที่สร้าง anti-E เพื่อนำมา transformed กับ Epstein-Barr virus (EBV) หลังจากนั้น screen น้ำเลี้ยง transformed cells ด้วย เซลล์เม็ดโลหิตแดงที่มีแอนติเจน E และนำ transformed cells ที่ให้ผลบวกมาทำการเชื่อมเซลล์ (fusion) กับเซลล์ human myeloma cells (JMS-3) โดยใช้ 50% polyethylene glycol จากนั้น screen น้ำเลี้ยง hybridoma cells ด้วยเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่มีแอนติเจน E อีกครั้งและแยกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีได้ดี แข็งแรงและเจริญเติบโตดี หลังจากนั้นเลี้ยงขยายเซลล์เดี่ยว (monoclone) ที่ถูกเลือกแล้วให้ได้ปริมาณเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ตามความต้องการและเก็บรักษาเซลล์สายพันธุ์ที่ดีไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเป็นเซลล์แม่ พร้อมทั้งนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบทางซีโรโลยีต่อไป* ***ผลการศึกษา*** *สามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-E ชนิด IgM จำนวน 4 โคลน ได้แก่ 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 โดยมีความแรงกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 เท่ากับ 512, 256, 256 และ 512 ตามลำดับ ให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่มีแอนติเจน E จำนวน 82 ราย (ร้อยละ 100) และให้ผลลบกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่ไม่มีแอนติเจน E จำนวน 87 ราย (ร้อยละ 100)* ***สรุป*** *เซลล์สายพันธุ์ anti-E ที่ได้สามารถนำน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มาผลิตเป็นน้ำยา anti-E ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อทดแทนและลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งน้ำเลี้ยงเซลล์จากต่างประเทศ*

คำสำคัญ : ● *แอนติ-E* ● *ไฮบริโดมาจากเซลล์มนุษย์* ● *ต่อต้านแอนติเจน Rh(E)*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2562;29:83-90.

ได้รับต้นฉบับ 22 มีนาคม 2562 แก้ไขบทความ 1 พฤษภาคม 2562 รับลงตีพิมพ์ 16 พฤษภาคม 2562

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวศิริพร พลเสน ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10300 E-mail: phasai_nang@hotmail.com

Original article

Production of human hybridoma secreting monoclonal antibody against Rh(E) antigen

Siriporn Ponsen, Suwit Phonimit, Nootchanat Premprayoon, Kallaya Kerdkaewngam and Udom Tingtoy
National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: *Recently, anti-E reagents produced by National Blood Centre, Thai Red Cross Society, have high cost due to the expensive imported supernatant raw material.* ***Objective:*** *To produce human hybridoma secreting anti-E monoclonal antibody from human B lymphocytes.* ***Materials and Methods:*** *Human B lymphocytes from buffy coat of blood donor who had anti-E were isolated and subsequently transformed them with Epstein - Barr virus (EBV). Next, we fused the transformed secreting cell lines with human myelomas (JMS-3) using 50% polyethylene glycol (PEG) to produce hybridoma. We also investigated whether the hybridoma-secreting molecules could aggregate Rh(E) antigen on red blood cells. After that, we saved secreting clones by limiting dilution method. Following expansion of these hybridomas, we assessed the quality of supernatant in detail using serologic tests.* ***Results:*** *We established 4 different IgM cell lines stably expressing anti-E, namely 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 and 4C91G5, respectively. The titers of their antibodies with R1R2 cells were 512, 256, 256 and 512, respectively. These anti-E reagents reacted perfectly with E positive cells, whereas they did not react with E negative cells at all.* ***Conclusion:*** *This result indicates the fulfill quality of the current anti-E reagent. Although further serologic testing is required, our 4 different cell lines could stably produce anti-E reagent. This will substitute the use of supernatant raw material imported from oversea and will reduce financial cost in medical services in the future.*

Keywords : ● *Anti-E* ● *Human hybridoma* ● *Against Rh(E) antigen*

J Hematol Transfus Med. 2019;29:83-90.

บทนำ

หมู่โลหิต A, B และ O ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1900 โดย Landsteiner และต่อมาในปี ค.ศ. 1902 Sturle และ Von Descatello ได้ค้นพบหมู่โลหิต AB และหลังจากนั้นได้มีการค้นพบหมู่โลหิตต่างๆ เพิ่มขึ้น เช่น ในปี ค.ศ. 1927 ได้ค้นพบหมู่โลหิตระบบ MN และ P[1] และปี ค.ศ. 1939 Levine และ Stetson[2,3] ได้ค้นพบหมู่โลหิตระบบ Rh ซึ่งเป็นหมู่โลหิตที่มีความซับซ้อน ต่อมาในปี ค.ศ. 1940 Landsteiner และ Wiener[4] ได้รายงานการทดลองผลิตแอนติบอดีโดยฉีดกระต่ายและหนูด้วยเม็ดโลหิตแดงของลิง Macacus "Rhesus" ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีที่เรียกว่า anti-Rhesus ซึ่งทำปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเม็ดโลหิตแดงของมนุษย์ได้ แอนติเจนดังกล่าวเรียกว่า Rh factor ต่อมามีการตั้งชื่อเป็นหมู่โลหิตระบบ Rh และพบว่าแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเม็ดโลหิตแดงของลิง Rhesus และ anti-D ที่ได้จากซีรัมมนุษย์ (human anti-D) นั้นไม่เหมือนกัน โดยเรียกแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมมนุษย์ว่า anti-Rh ในขณะที่แอนติบอดีจากสัตว์ทดลองเรียกว่า anti-LW เพื่อเป็นเกียรติแก่ Landsteiner และ Wiener

หมู่โลหิตระบบ Rh มีความสำคัญเป็นอันดับสองรองจากหมู่โลหิตระบบ ABO ในด้านของเวชศาสตร์การธนาคารเลือด (transfusion medicine)[5] แต่มีความสำคัญเป็นลำดับแรกในด้านสูติศาสตร์ (obstetrics) เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักของอาการตัวเหลืองในเด็กแรกคลอด (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN) ปัจจุบันแอนติเจนในระบบ Rh ที่ถูกค้นพบมีมากถึง 55 ชนิด[6] แต่แอนติเจนที่มีความสำคัญประกอบด้วย แอนติเจน D, C, E, c และ e ความถี่ของแอนติเจนดังกล่าวในระบบ Rh ดังนี้ แอนติเจน D ในคนผิวขาว คนผิวดำและคนเอเชียพบได้ร้อยละ 68, 27 และ 93 ตามลำดับ ส่วนแอนติเจน C ในคนผิวขาว คนผิวดำและคนเอเชียพบได้ร้อยละ 85, 92 และ 99 ตามลำดับ ส่วนแอนติเจน E ในคนผิวขาว คนผิวดำและคนเอเชียพบได้ร้อยละ 29, 22 และ 39 ตามลำดับ ส่วนแอนติเจน c ในคนผิวขาว คนผิวดำและคนเอเชียพบได้ร้อยละ 80, 96 และ 47 ตามลำดับ และแอนติเจน e ในคนผิวขาว คนผิวดำและคนเอเชียพบได้ร้อยละ 98, 98 และ 96 ตามลำดับ[7]

จากการศึกษาความถี่แอนติเจนหมู่โลหิตระบบ Rh ของผู้บริจาคโลหิตคนไทยของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในปี ค.ศ. 2002 จำนวน 1,381,221 ราย พบว่าส่วนใหญ่เป็น Rh positive ร้อยละ 99.69 และ เป็น Rh negative เพียงร้อยละ 0.31 ในกลุ่ม Rh positive มี phenotype ชนิด D+C+e+ (R1R1) สูงที่สุดคือร้อยละ 49.38 และในกลุ่ม Rh negative มี phenotype ชนิด D-c+e+ (rr) มากที่สุดคือร้อยละ 58.5 [8]

ในการเตรียมโลหิตที่เหมาะสมและปลอดภัยให้ผู้ป่วยต้องทำการทดสอบก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing) ประกอบด้วยการตรวจหมู่โลหิต ABO และ Rh(D) การตรวจกรองแอนติบอดี (red cell antibody screening) ในซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต และการตรวจความเข้ากันได้ของโลหิต หากผลตรวจกรองแอนติบอดีในผู้ป่วยให้ผลบวก ต้องตรวจหาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) และคัดเลือกโลหิตผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วย (antigen-negative blood) จากการศึกษาที่ผ่านมาการจำแนกชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วยพบว่า anti-E เป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยเป็นอันดับต้น[9] ในขั้นตอนนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการใช้น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-E ที่มีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาแอนติเจน E ในโลหิตผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต เพื่อไม่ให้มีแอนติเจนตรงกันกับแอนติบอดีที่พบในผู้ป่วย ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ยังคงนำเข้าน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-E จากต่างประเทศซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง ด้วยสาเหตุนี้จึงเกิดความร่วมมือระหว่างศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยกับสภากาชาดญี่ปุ่นในการศึกษาค้นคว้าและทดลองสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีเพื่อพัฒนาและผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดหายากด้วยวิธี human monoclonal hybridoma technique การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-E ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-E ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย การศึกษานี้ได้รับการรับรองโครงการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากากาชาดไทย รหัสโครงการที่ 3/2559

วัสดุและวิธีการ[10-15]

การ transform cell

แยกเม็ดโลหิตขาวชนิด B cells จาก buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตที่สร้าง anti-E ออกมาผสมกับน้ำเลี้ยง Epstein-Barr virus (EBV) นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator ที่มีความเข้มข้นของ CO_2 ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20% bovine serum ทุกๆ 4 วัน เมื่อเซลล์โตเต็มที่ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่มี phenotype D+C+c+E+e+ (R1R2) นำเซลล์ที่ให้ผลบวกมาเชื่อม (fusion) กับเซลล์ human myeloma cell (JMS-3)

การเชื่อมเซลล์ (fusion)

นำ transformed cells และ human myeloma cells (JMS-3) มาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วหยด 50% polyethylene glycol (PEG) molecular weight 1540 g/mol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่ไม่เติม

bovine serum นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20% bovine serum + HAT-Ouabain นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator ที่มีความเข้มข้นของ CO_2 ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อไฮบริโดมาเซลล์มีขนาดโคโลนีโตพอสมควรให้ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 นำไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่ให้ผลบวกมาเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution)

การเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution)

นำไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีมาแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่แข็งแรงและสร้างแอนติบอดีได้ดีด้วยวิธีการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) โดยนำไฮบริโดมาเซลล์มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20% bovine serum + Interleukin 6 ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator ที่มีความเข้มข้นของ CO_2 ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 ถึง 14 วันให้ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 เลือกเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวกแรงและมีเพียง 1 โคโลนีต่อ 1 หลุมเพื่อเลี้ยงขยายต่อโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20% bovine serum + Interleukin 6 เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์สายพันธุ์ที่ดี

การคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์

เมื่อเซลล์สายพันธุ์โตจนเต็มพื้นที่ก้นหลุม ต้องคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่แข็งแรงและสร้าง anti-E แรงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน โดยการดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์มาทำ antibody identification และทดสอบความแรง ตามวิธีการดังนี้

ทำ antibody identification ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ indirect antiglobulin test (IAT) โดยใช้ panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59080 Exp. 13 SEP 2016) ใช้น้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็น positive control และแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง

ทดสอบความแรง (titer) โดยดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี two-fold serial dilution ในน้ำเกลือ โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และ indirect antiglobulin test (IAT) โดยใช้ anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็น positive control ใช้เซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R1 และ phenotype D+C+c+e+ (R1r) เป็น negative control และแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง

คัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่ดีจากความแรงของแอนติบอดีที่สูงและสามารถแปลผลจากการทำ antibody identification แล้วว่าเป็น anti-E โดยต้องไม่มีผลบวกหรือลบปลอมกับ panel cells เพื่อนำไปเลี้ยงขยายเพื่อเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวไว้เป็นเซลล์แม่และละลาย (thaw) ออกมาเลี้ยงแล้วแช่แข็งกลับอีกครั้งโดยทำซ้ำ 3 รุ่นเพื่อทดสอบความเสถียร (stable) ของเซลล์สายพันธุ์และอีกส่วนเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์ตาย (ประมาณ 15 วัน) เพื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มาทดสอบทางซีโรโลยีต่อไป

การทดสอบทางซีโรโลยี

ทำ antibody identification ด้วย panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59080 Exp. 13 SEP 2016) และแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) เป็น positive control

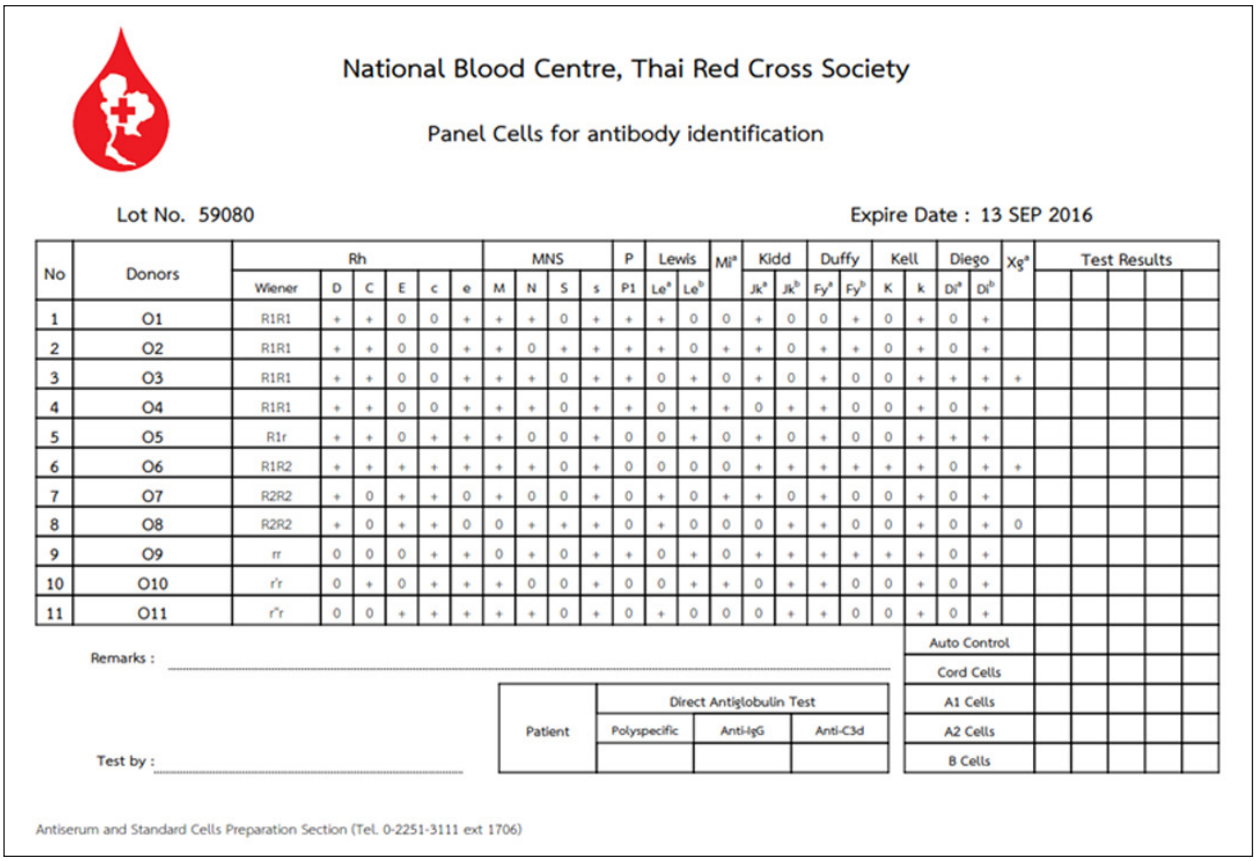
ทดสอบความแรง (titer) ด้วยวิธี two-fold serial dilution กับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 แปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) เป็น positive control และใช้เซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R1 และ R1r เป็น negative control

ทดสอบ specificity ของน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์กับตัวอย่างเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โลหิต A, B, O และ AB ที่มีแอนติเจน E+e+, E+e- และ E-e+ อย่างน้อยหมู่โลหิตละ 5 ราย แปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) เป็น positive control

ทดสอบความคงทน (stability) ของแอนติบอดีกับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 22 ถึง 24 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 เดือนและนำมาทดสอบความแรงของแอนติบอดีทุกๆ 3 เดือน

ผลการศึกษา

จากการศึกษาทดลองครั้งนี้สามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-E ชนิด IgM ได้ทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 จากการทำ antibody identification ด้วย panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 59080 Exp. 13 SEP 2016 (Figure 1) สามารถแปลผลว่ามีความจำเพาะและคือ anti-E ได้ทั้งหมดทุกโคลน (Table 1)



National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Panel Cells for antibody identification

Lot No. 59080 Expire Date : 13 SEP 2016

No	Donors	Rh						MNS				P	Lewis		Mi^a	Kidd		Duffy		Kell		Diego		Xg^a	Test Results				
		Wiener	D	C	E	c	e	M	N	S	s	P1	Le^a	Le^b		Jk^a	Jk^b	Fy^a	Fy^b	K	k	Di^a	Di^b							
1	O1	R1R1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+							
2	O2	R1R1	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+							
3	O3	R1R1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+						
4	O4	R1R1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+							
5	O5	R1r	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+							
6	O6	R1R2	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+						
7	O7	R2R2	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+							
8	O8	R2R2	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0						
9	O9	rr	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+							
10	O10	r'r	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+							
11	O11	r"r	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+							

Remarks :

Test by :

Patient	Direct Antiglobulin Test		
	Polyspecific	Anti-IgG	Anti-C3d

Auto Control					
Cord Cells					
A1 Cells					
A2 Cells					
B Cells					

Antiserum and Standard Cells Preparation Section (Tel. 0-2251-3111 ext 1706)

Figure 1 Panel cells for antibody identification (Lot. 59080 Exp.13 SEP 2016)

Table1 Antibody identification of supernatant from 4 clones of human monoclonal hybridoma anti-E, compared with anti-E from NBC, TRCS

			Antibodies Identification Results											
	Anti-E	**Temp.**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**Specificity**
Clone	4C91A2	RT	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	anti-E
	4C91B9	RT	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	anti-E
	4C91F9	RT	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	anti-E
	4C91G5	RT	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	anti-E
	NBC	RT	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	anti-E

RT = room temperature

สำหรับความแรงของแอนติบอดี (titer) เมื่อทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 ได้ผลดังนี้ โคลน 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 เท่ากับ 512 , 256, 256 และ 512 ตามลำดับ (Table 2)

ผล specificity แสดงว่าน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-E ทั้งหมด 4 โคลนให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โลหิต A, B, O และ AB ที่มีแอนติเจน E+e+ จำนวน 41 ราย (ร้อยละ 100) E+e- จำนวน 41 ราย (ร้อยละ 100) และ E-e+ จำนวน 87 ราย (ร้อยละ 100) ซึ่งให้ผลตรงกับน้ำยา anti-E Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018 ที่เป็น positive control (Table 3) และผลการส่งน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์โคลน 4C91F93F9 ซึ่งเป็นเซลล์ลูกรุ่นที่ 1 ของโคลน 4C91F9 ไปทดสอบ specificity กับเซลล์เม็ดโลหิตแดง E variant ที่สภากาชาดญี่ปุ่นให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดโลหิตแดง E variant ทุกเซลล์ (Table 4)

แอนติบอดีมีความคงทน (stability) โดยมีความแรงมากกว่าหรือเท่ากับ 32 เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นเวลานาน 24 เดือน ซึ่งสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 24 เดือน เก็บที่อุณหภูมิ 22 ถึง 24 องศาเซลเซียสได้นานถึง 24 เดือน เช่นกัน และสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้นานถึง 15 เดือน รวมถึงเซลล์สายพันธุ์มีความเสถียรเหมือนเซลล์แม่ทุกประการเมื่อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและละลายออกมาเลี้ยงขยายซ้ำ 3 รุ่น

Table 2 Comparison of anti-E titer from 4 different stable cell lines supernatant and anti-E reagent of NBC, TRCS (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018)

	Anti-E	Cells	Temp.	Agglutination strength of each dilution											Titer
				Neat	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
Clone	4C91A2	R1R2	RT	4+	4+	4+	4+	$4+^{W}$	3+	2+	$1+^{S}$	$1+^{S}$	1+	W	**512**
	4C91B9	R1R2	RT	4+	4+	$4+^{W}$	$4+^{W}$	$4+^{W}$	$2+^{S}$	$1+^{S}$	$1+^{S}$	1+	0	0	**256**
	4C91F9	R1R2	RT	4+	4+	$4+^{W}$	$4+^{W}$	$3+^{S}$	2+	$2+^{S}$	$1+^{S}$	1+	W	W	**256**
	4C91G5	R1R2	RT	4+	4+	$4+^{W}$	$4+^{W}$	$4+^{W}$	3+	$1+^{S}$	$1+^{S}$	1+	1+	W	**512**
	NBC	R1R2	RT	4+	4+	$4+^{W}$	$3+^{S}$	$2+^{W}$	$1+^{S}$	1+	1+	0	0	0	**128**

S = strong; W = weak; RT = room temperature; Neat = undiluted anti-E

Table 3 Specificity of anti-E from human monoclonal hybridoma with E positive and E negative red blood cells from different ABO groups

	Positive cells (E+e+)				Positive cells(E+e-)				Negative cells (E-e+)			
Groups	**A**	**B**	**O**	**AB**	**A**	**B**	**O**	**AB**	**A**	**B**	**O**	**AB**
Number of sample	10	13	7	11	12	11	11	7	26	18	17	26
Number of positive result	10	13	7	11	12	11	11	7	0	0	0	0
Number of negative result	0	0	0	0	0	0	0	0	26	18	17	26

Table 4 Comparison of anti-E specificity (4C91F93F9) with Japanese anti-E cell lines using R1R2, R1R1 and E variant red cells

	Name of anti-E cell lines				
Red cells	**4C91F93F9**	**HIRO-18**	**HIRO-124**	**HIRO-78**	**HIRO-25**
EKK	W^{+}	W^{+}	0	$3+^{S}$	$3+^{S}$
EKH	4+	4+	4+	$3+^{S}$	4+
EFM	4+	4+	0	0	4+
R1R2	4+	4+	4+	4+	4+
R1R1	0	0	0	0	0

HIRO-18, HIRO-124, HIRO-78 and HIRO-25 = Japanese anti-E cell lines; EKK, EKH, EFM = Japanese E variant red cells; 4C91F93F9 = 1st offspring of 4C91F9 cell line

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้รายงานการสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-E จาก buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตที่สร้าง anti-E พบว่าเซลล์สายพันธุ์ที่ได้ทั้ง 4 โคลน คือ 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำ antibody identification กับ panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สามารถแปลผลเป็น anti-E ทุกโคลนและเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับน้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) ที่ผลิตจากน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศให้ผลตรงกันอีกทั้งไม่มีผลบวกและผลลบปลอม

การทดสอบความแรงของแอนติบอดีแสดงให้เห็นว่าเซลล์สายพันธุ์ anti-E ที่ได้มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความแรงแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยโดยที่โคลน 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 สามารถสร้างแอนติบอดีต่อเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 ในช่วง 256 ถึง 512 ซึ่งมีความแรงตามเกณฑ์มาตรฐานเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) มาตรฐานน้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยต้องมีความแรงของแอนติบอดีต่อเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 มากกว่าหรือเท่ากับ 32 ทั้งนี้อ้างอิงจากมาตรฐานการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของสหราชอาณาจักรที่ความแรงของแอนติบอดีต่อเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 4[16]

การทดสอบ specificity กับเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โลหิต A, B, O และ AB ที่มีแอนติเจน E+e+, E+e- และ E-e+ ให้ผลตรงกันกับน้ำยา anti-E ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59020 Exp. 10 FEB 2018) ซึ่งให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่มีแอนติเจน E และให้ผลลบกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่ไม่มีแอนติเจน E ร้อยละ 100 (Table 3) นอกจากนี้ยังได้ส่งน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์โคลน 4C91F93F9 (ลูกรุ่นที่ 1 ของโคลน 4C91F9) ไปทดสอบกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2, R1R1 และ E variant (EKK, EKH, EFM) ของประเทศญี่ปุ่นโดยเปรียบเทียบกับโคลน anti-E ของญี่ปุ่น (HIRO-18, HIRO-124, HIRO-78 และ HIRO-25) จำนวน 4 โคลน พบว่าให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดโลหิตแดง E variant ทุกเซลล์แต่จะให้ผลบวกอ่อนกับเซลล์ E variant EKK (Table 4)

ความคงทนของแอนติบอดีกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงชนิด R1R2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดียังคงมีความแรงมากกว่าหรือเท่ากับ 32 ตามมาตรฐานของน้ำยา anti-E ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยทดสอบความแรงของแอนติบอดีทุก 3 เดือน ตามเกณฑ์มาตรฐานอายุน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้กำหนดความคงทนของแอนติบอดีไว้มากกว่าหรือเท่ากับ 18 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบความเสถียรของเซลล์สายพันธุ์พบว่าเซลล์สายพันธุ์มีความเสถียรเมื่อละลาย (thaw) มาเลี้ยงขยายซ้ำและแช่แข็งกลับรุ่นต่อรุ่น จากการเลี้ยงขยาย 3 รุ่นก็ยังคงสร้างแอนติบอดีที่มีความแรง 256 ถึง 512 เหมือนเซลล์สายพันธุ์รุ่นแม่ บางครั้งหากเซลล์สายพันธุ์ไม่มีความเสถียรจะทำให้ความแรงแอนติบอดีลดลงหรือหายไปเมื่อมีการแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงขยายรอบถัดไป ดังนั้นจึงควรทำการคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ด้วยวิธีเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) ทุกครั้งก่อนเลี้ยงขยายจำนวนมากเพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์สายพันธุ์ที่แข็งแรงและสร้างแอนติบอดีเท่านั้น ข้อสังเกตหากเซลล์สายพันธุ์ไม่มีความแข็งแรงเพียงพอเมื่อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วละลายออกมาเลี้ยงขยายจะพบว่ามีเซลล์บางส่วนตาย โตช้าและความสามารถในสร้างแอนติบอดีลดลงหรือหายไปอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น บางครั้งในขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ไม่ได้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีเป็นเซลล์เดี่ยว (monoclone) เมื่อเลี้ยงขยายต่อทำให้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีโตช้ากว่าเซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดี หรือเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีตายเหลือแค่เซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดี เป็นต้น

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-E จากเซลล์สายพันธุ์ทั้ง 4 โคลน ได้แก่ 4C91A2, 4C91B9, 4C91F9 และ 4C91G5 เป็นชนิด IgM มีความแรงเหมาะสมและมีความจำเพาะต่อแอนติเจน E ร้อยละ 100 โดยไม่มีผลบวกและผลลบปลอม อีกทั้งมีความคงทนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นเวลานาน ตามมาตรฐานน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-E ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมไปถึงความเสถียรของเซลล์สายพันธุ์เมื่อละลาย แล้วนำมาเลี้ยงขยายรุ่นต่อรุ่น จึงเหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-E เพื่อทดแทนและลดต้นทุนการนำเข้าน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์จากต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแพทย์หญิง สร้อยสอางค์ พิกุลสด ผู้ริเริ่มโครงการ Murine and human monoclonal hybridoma technique for rare blood group reagent ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Mrs. Chizu Toyoda และ Miss Sayaka Kaito จาก Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Centre ประเทศญี่ปุ่นที่ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์เทคนิคการผลิตและคุณสาริกา เมฆฉาย ที่ปรึกษาในการทดสอบทางซีโรโลยีและเขียนนิพนธ์ต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. *Saipin J. Blood group antigens and antibodies. J Hematol Transfus Med. 2008;18:3-5.*
2. *Wiler M. The Rh blood group system. In: Harmening DM, editor. Modern blood banking and transfusion practices. 5th ed. Philadelphia: F.A.Davis; 2005. p. 134-47.*
3. *Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. JAMA. 1939;113:126-7.*
4. *Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol NY. 1940;43:223.*
5. *Joy SD, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. Obstet Gynecol. 2005;105:24-8.*
6. *Storry JR, Clausen BF, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and blood group terminology: report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. Vox Sang. 2019;114:95-102.*
7. *Dean L. Blood groups and red cell antigens: the Rh blood group. [Internet]. 2005 [cited 2019 Apr 25]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269.*

8. *Fongsarun J, Nuchprayoon I, Yod-in S, Kupatawintu P and Kidprasirt C. Blood groups in Thai blood donors. J Hematol Transfus Med. 2002;12:277-86.*
9. *Nathalang O. Laboratory indications and applications of antibody detection. J Hematol Transfus Med. 2018;28:115-8.*
10. *Goossens D, Champomier F, Rouger P, Salmon C. Human monoclonal antibodies against blood group antigens. J Immunol Methods. 1987;101:193-200.*
11. *Thompson K, Barden G, Sutherland J, Bel-don I, Melamed M. Human monoclonal antibodies to C, c, E, e, and G antigens of the Rh system. Immunology.1990;71:323-7.*
12. *Tingtoy U, Mekechay S, Deesin P, Tubrod J. Production of monoclonal anti-P1 by using hybridoma technique. J Hematol Transfus Med. 2017;27:11-8.*
13. *Boonhai S, Aiemumporn K, Tingtoy U. Production of a new anti-M monoclonal reagent using human hybridoma technology. Chula Med J. 2016;60:101-13.*
14. *Kerdkaewngam K, Posen S, Phonimit S, Tingtoy U, Phikulsod S. Generating the hybridoma cell line by murine monoclonal hybridoma technology for production anti-M and anti-N blood group phenotyping reagent. J Hematol Transfus Med. 2014;24:361-9.*
15. *Ponsen S, Phonimit S, Premprayoon N, Tingtoy U. Production of anti-D human monoclonal antibody (IgM) using human monoclonal hybridoma technique. Chula Med Bull. 2019;1:147-54.*
16. *Guidelines for the blood transfusion service in the United Kingdom. 8th ed. Reagent manufacture [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 25]. Available from: https://www.transfusionguidelines.org/red-book/ chapter-11-reagent-manufacture/11-2-specifications-performance-evaluation-and-quality-control-of-blood-grouping-reagents.*