

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาคุณสมบัติของ anti-I clone 1G6 ที่ผลิตด้วย human hybridoma technique

อุดม ตั้งต้อย กาญจนา เอี่ยมอัมพร และ จินตนา ทับรอด
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางซีโรโลยีของ anti-I clone 1G6 ที่ผลิตด้วย human hybridoma technique **วัสดุและวิธีการ** นำน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 มาทำการทดสอบตรวจหาชนิดของแอนติบอดีด้วย panel cells และ milk inhibition test ทดสอบความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงหมู่เลือด A, B, O, AB, Oh, Oi adults, Oi cords และหมู่เลือด A, B, O, AB ของ I adults และ i cords รวมทั้งทดสอบความแรง แบบ two fold dilution ที่อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้อง และ 37°C **ผลการศึกษา** การตรวจหาชนิดของแอนติบอดีกับ panel cells พบว่าให้ผลบวกทั้ง 11 เบอร์ ทั้งที่อุณหภูมิห้อง 37°C และ IAT ยังไม่สามารถสรุปได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี milk inhibition test พบว่า ในน้ำนมสามารถ neutralize anti-I ทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงต่างๆ ได้ผลบวกแรง 4+ กับเซลล์ A, B, O, AB และ Oh แต่ให้ผลลบกับ Oi adults และ Oi cords ทดสอบความจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดง A, B, O และ AB ของ I adults จำนวน 12, 28, 29 และ 5 ราย ตามลำดับ ให้ผลบวกทั้งหมด และทดสอบความจำเพาะกับเซลล์ A, B, O และ AB ของ i cords จำนวน 6, 6 และ 1 ราย ตามลำดับ ให้ผลลบทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อศึกษาความแรงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า มีความแรง 512 ที่อุณหภูมิ 4°C **สรุป** จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำยา human monoclonal anti-I clone 1G6 พบว่าสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ต่อไป

คำสำคัญ : ● แอนติ-I ● ฮิวแมนโมโนโคลนัลแอนติบอดี

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2562;29:289-96.

ได้รับต้นฉบับ 12 กันยายน 2562 แก้ไขบทความ 13 ตุลาคม 2562 รับลงตีพิมพ์ 25 พฤศจิกายน 2562

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายอุดม ตั้งต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 E-mail: udom529@gmail.com

Original Article

Characteristics of anti-I clone 1G6 properties produced by human hybridoma technique

Udom Tingtoy, Kanjana Aiemumporn and Jintana Tubrod

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Objective: To study characteristics of the serological properties of anti-I clone 1G6 produced by human hybridoma technique. **Materials and Methods:** Supernatant of clone 1G6 was assayed for antibody specificity by using panel cells and milk inhibition test. Furthermore, specific tests with red blood cells A, B, O, AB, Oh, Oi adults, Oi cords, including A, B, O, AB blood group of I adults and i cords were performed. Antibody titration tests by serial two fold dilution at 4 °C, room temperature and 37 °C. **Results:** Antibody specification could not be concluded due to the results of antibody identification with all 11 numbers of panel cells were positive at room temperature, 37 °C and IAT. When tested with milk inhibition test, we found that milk could neutralize anti-I. Tests with various red blood cells gave a strong positive results 4+ with cells A, B, O, AB and Oh but gave negative results with Oi adults and Oi cords. Specific tests with red blood cells A, B, O and AB of I adults, with the amount of 12, 28, 29 and 5 cases, respectively, all gave positive results. And the specific test with cells A, B, O and AB of i cords with the amount of 6, 6, 6 and 1 cases, respectively, all gave negative results. Furthermore, when antibody titration performed at different temperature, it was found that the titer of anti-I (1G6) at 4 °C was 512. **Conclusion:** From the study characteristics of human monoclonal anti-I clone 1G6 found that it can be able to be used in research and knowledge development.

Keywords : ● Anti-I ● Human monoclonal antibodies

J Hematol Transfus Med. 2019;29:289-96.

บทนำ

หมู่เลือด ระบบ I และ Ii collection สามารถจำแนกได้จาก การแสดงออกของแอนติเจน I และ i บนผิวของเม็ดเลือดแดง anti-I เกี่ยวข้องกับ cold antibodies (แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิในร่างกายปกติ) และโรคเลือดบางโรค^{1,2} แอนติเจน I และ i มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตเป็น glycolipids และ glycoproteins ที่ต่อเป็น glycochains แบบสายตรง (straight) หรือแบบแตกแขนง (branch) ประกอบด้วยชุด N-acetylactosamine (LacNAc) ตามลำดับ จากการจัดระบบหมู่เลือดตาม International Society of Blood Transfusion (ISBT) แอนติเจน I จัดอยู่ในหมู่เลือด I (No. 027) ในขณะที่แอนติเจน I จัดอยู่ใน Ii collection (No. 207) ด้วย โครงสร้างแอนติเจน i เชื่อมต่อกันเป็นสายตรง มีน้ำตาล galactose เชื่อมต่อที่ส่วนปลาย [Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1-R] ส่วน แอนติเจน I เกิดจากยีน *I* (*GCNT2*) ที่อยู่บนโครโมโซมแซนสันคู่ ที่ 6 ตรงตำแหน่ง 6p24³ ยีน *I* ทำหน้าที่สร้างเอ็นไซม์ β1→6-N-acetylglucosaminyltransferase ทำให้เกิดการเติมน้ำตาล N-acetylglucosamine⁴ บนเส้นสายตรงของ poly-LacNAc เกิดเป็น branch chain ของแอนติเจน I

แอนติเจน I และ i บนผิวเม็ดเลือดแดง มีขบวนการพัฒนา และมีการควบคุมซึ่งกันและกัน แอนติเจน I พบบนผิวของเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ทุกคน ในขณะที่แอนติเจน i พบเฉพาะในเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์และทารกแรกเกิด หลังจากคลอดแล้ว ระดับของแอนติเจน I จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนระดับแอนติเจน i ลดลง โดยปกติระดับแอนติเจน I และ i จะเป็นปกติเมื่ออายุ 13 ถึง 20 เดือน^{4,8} การผ่าเหล่าหรือการกลายพันธุ์ของยีน *I* ที่เรียกว่า *GCNT2* เกิดจากการถดถอยใน I-branching enzyme ผิดปกติ ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน i ไปเป็นแอนติเจน I ได้ กลายเป็น *i*_{adult}⁹ จะแสดงลักษณะออกมาได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่หนึ่ง บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ตรวจพบ i โทไป์ i จำนวนน้อย รูปแบบที่สอง บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ตรวจพบแอนติเจน i มีจำนวนมาก และรูปแบบที่สาม บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ ตรวจพบแอนติเจน I อยู่ในระดับต่ำ⁴

แอนติเจน I และ i เป็นส่วนหนึ่งของสารตั้งต้นของ oligosaccharide ที่ใช้สร้างแอนติเจน ABH และ Lewis แอนติเจน I ที่พบ

บนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด เป็น glycolipid ส่วนแอนติเจน I ที่พบในสารคัดหลั่ง เช่น น้ำนม น้ำลาย พลาสมา และ ovarian cyst fluid เป็น glycoprotein⁹⁻¹³

Anti-I พบได้ในน้ำเหลืองของคนปกติทั่วไป เป็นชนิด isotype IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 4°C มักมีความแรงน้อยกว่า 64 ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงผู้ใหญ่ แต่ทำปฏิกิริยาอ่อน (weak) หรือไม่ทำปฏิกิริยา (no agglutination) กับเม็ดเลือดแดงจากสายสะดือ (cord blood) anti I ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ การติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* หรือมะเร็ง lymphomas และ leukemia บางชนิดทำให้เกิด anti-I แรงขึ้น โดยทั่วไปแอนติบอดีนี้ไม่มีความสำคัญทางคลินิก แต่ถ้าเป็น autoanti-I จะมีความสำคัญในผู้ป่วย cold agglutinin disease (CAD) ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงเนื่องจากการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ทาง classical pathway ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างรุนแรงได้¹⁴ ถึงแม้ว่า anti-I จะไม่มีความสำคัญทางคลินิก แต่ถ้ามีความแรงมาก จะรบกวนการทดสอบทางซีโรโลยี (serological testing)¹⁵ เช่น การตรวจหาหมู่เลือด ABO และ Rh เมื่อทำการทดสอบ direct grouping โดยเกิดจากเม็ดเลือดแดงจับกลุ่มกันก่อนแล้วเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูก coated ด้วย IgM autoantibody ทำให้แปลผลเป็นหมู่เลือด AB, Rh+ และเมื่อทดสอบ reverse grouping กับเม็ดเลือดแดง A เม็ดเลือดแดง B จะจับกลุ่มกับ anti-I ในน้ำเหลือง ผลจะออกมาเป็นหมู่เลือด O ดังแสดงใน Table 1 การแก้ไขปัญหานี้ ทำโดยล้างเซลล์ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 37°C (warm saline) แล้วทำการทดสอบ direct grouping ใหม่ ส่วน reverse grouping ควรอุ่นน้ำเหลือง ก่อนการทดสอบ หรือทำการดูดซับ (adsorbing) cold autoantibody ออกให้หมดก่อนการทดสอบ รวมทั้งปัญหาในการ crossmatching ในผู้ป่วยที่มี anti-I ควรทำการอุ่นเลือดผู้บริจาค (donor cells) และน้ำเหลืองผู้ป่วย (patient) ก่อนการ crossmatching และไม่ควรรีดแรงปฏิกิริยา (enhancing reagent) เช่น low ionic strength saline (LISS) ส่วนขั้นตอน antihuman globulin test ควรใช้ monospecific anti-IgG เท่านั้น¹²

การศึกษานี้ได้นำเซลล์สายพันธุ์ที่ได้มาจากวิธี human monoclonal antibodies¹⁶⁻¹⁸ โดยการคัดเลือกเซลล์ที่สร้าง anti-Le^b จากผู้บริจาคโลหิต ซึ่งคาดว่าจะได้ anti-Le^b มาใช้ในศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงได้นำ buffy coat มาทำการแยก

Table 1 High titers of autoanti-I can interfere with serological testing²⁶

	Anti-					Cells-			Interpretation
	A	B	AB	D		A	B	O	
Patient cells	4+	4+	4+	4+	Patient Serum	4+	4+	4+	Unknown ABO group
Interpretation		AB, Rh+			Interpretation		O		

เอา B-lymphocytes มาทำให้เป็นเซลล์มะเร็งด้วย Epstein-Barr virus (EBV) ทดสอบความจำเพาะด้วยเซลล์ Le^b นำกลุ่มที่ให้ผลบวกกับเซลล์ Le^b มาทำ fusion กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 คัดเลือกกลุ่มที่ทดสอบกับเซลล์ Le^b ให้ผลบวก นำมาเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดแอนติบอดีกับ panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผลการทดสอบได้ผลบวกแรง 3+ ถึง 4+ กับ panel cells ทุกเบอร์ จึงได้ทำการ cloning ด้วยวิธี limiting dilution จนได้เซลล์สายพันธุ์ที่เป็น human monoclonal เมื่อทำการตรวจหาชนิดแอนติบอดีไม่สามารถสรุปชนิดของแอนติบอดีได้ จึงได้ส่งน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ไปยัง Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society, เพื่อให้ Dr.Makoto Uchikawa และ Ms.Chizu Toyoda ช่วยตรวจและทดสอบเพิ่มเติมในการหาชนิดแอนติบอดีสรุปว่าเป็น anti-I ชนิด IgM (k) [k คือ kappa เป็นอิมมูโนโกลบูลินสายเบ (light chain)]

ต่อมาทางผู้วิจัยและคณะมีความเห็นว่าในเมื่อมีเซลล์สายพันธุ์ human monoclonal anti-I แล้วควรจะทำการศึกษาต่อ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางซีโรโลยีของ anti-I clone 1G6 ที่ผลิตด้วย human hybridoma technique เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทาง red cell serology ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและน้ำยา

น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) panel cells Lot. 61040 Exp. 13 May 2018 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) เม็ดโลหิตแดงชนิด A, B, O, AB, Oh, Oi adult, Oi cord (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) น้ำนมจากหญิงหมูโลหิต O (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) bovine serum albumin, BSA (Capricorn Scientific, GmbH, Germany), phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) และ Anti-human globulin serum (AHG) (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)

วิธีการศึกษา

1. การตรวจหาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification)¹⁹

1.1 ทดสอบน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 กับ panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 61040 Exp. 13 May 2018 โดยเตรียมหลอดทดสอบ 11 หลอด เขียนกำกับหลอดหมายเลข 1 ถึง 11 ดูตุน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone

1G6 ใส่หลอดๆ ละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 11 หลอด จากนั้นเติม panel cells ให้ตรงตามหมายเลขกำกับบนหลอดจาก 1 ถึง 11 โดยใส่หลอดละ 100 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง (22-24°C) นาน 30 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล จากนั้นนำไป incubate ต่อที่ 37°C นาน 30 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล และนำมาทดสอบ indirect antiglobulin test (IAT) ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล²⁰

1.2 ทำการทดสอบ Milk inhibition test^{21,22} นำน้ำนม (human milk) ของหญิงให้นมบุตรหมู่เลือด O มาปั่นแยกที่ 3,600 รอบ นาน 10 นาที เพื่อเอาส่วนครีมชั้นออกทิ้ง แล้วตม้น้ำนมในน้ำเดือด นาน 10 นาที เพื่อ inactivate เอนไซม์ นำน้ำนมที่ต้มแล้วซึ่งมีสาร I (I substance) มาเจือจาง 1 เท่าด้วย PBS pH 7.2 จากนั้นเจือจาง น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 แบบ two fold dilution ทดสอบกับน้ำนมที่มีสาร I เจือจางแล้ว ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เพื่อ inhibit anti-I ต่อจากนั้นนำน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ที่ neutralize ด้วย สาร I จากน้ำนมแล้ว มาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่เลือด O I adult (indicator red cells) เปรียบเทียบกับ control ซึ่งใช้ 0.9% normal saline solution (NSS) แทน น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6

2. การศึกษาหาความจำเพาะ (specificity)

2.1 ทำการศึกษาหาความจำเพาะโดยทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่เลือด A, B, O, AB, Oh, Oi adults และ Oi cords โดยใช้ น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง A, B, O, AB, Oh, Oi adults, Oi cords ความเข้มข้น 2-5% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นอ่านผลปฏิกิริยาและบันทึกผล รายงานผลเป็นความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

2.2 ทดสอบความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงหมู่เลือด A, B, O และ AB ของ I adults และ i cords โดยใช้ น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง A, B, O และ AB ความเข้มข้น 2-5% ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล รายงานผลเป็นความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

3. การทดสอบความแรง (potency)²³ ด้วยการตรวจหาระดับความแรงของน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 โดยการเจือจางน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 แบบ two fold dilution ในน้ำยา 1% BSA โดยใช้ น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมด้วย 2-5% OI adult cells ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการทดสอบ 3 ชุด incubate ที่อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้อง และ 37°C นาน 30 นาที และปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล

ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาความจำเพาะของน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 พบว่า เป็นน้ำยา monoclonal anti-I ชนิด IgM (k) สามารถนำมาใช้ตรวจกรองของแอนติเจน I ของผู้บริจาคโลหิต ในงานวิจัย และพัฒนาองค์ความรู้ต่อไป

สำหรับการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 กับ panel cells พบว่าให้ผลบวกทั้ง 11 เบอร์ ทั้งที่อุณหภูมิห้อง 37 °C และ IAT ทำให้อย่างไม่สามารถสรุปชนิดแอนติบอดีได้ ดังแสดงใน Table 2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี milk inhibition test กับน้ำนมของหญิงให้นมบุตร โดยใช้ 0.9% NSS เป็นตัว control พบว่า ในน้ำนมซึ่งมีสาร I สามารถ neutralize anti-I ได้ ดังแสดงใน Table 3

เมื่อศึกษาหาความจำเพาะของน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 โดยทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงต่างๆ ได้แก่ เซลล์ A, B, O, AB, Oh, Oi adults และ Oi cords ผลการทดสอบได้ผลบวกแรง 4+ กับเซลล์ A, B, O, AB และ Oh และให้ผลลบกับ Oi adults และ Oi cords จึงสรุปได้ว่าเป็น anti-I ดังแสดงใน Table 4 อีกทั้งเมื่อทดสอบความจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดง A, B, O และ AB ของ I adults จำนวน 12, 28, 29 และ 5 ราย ตามลำดับ ให้ผลบวกทั้งหมด และทดสอบความจำเพาะกับเซลล์ A, B, O และ AB ของ i cords จำนวน 6, 6, 6 และ 1 ราย ตามลำดับ ให้ผลลบทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าเป็น anti-I ดังแสดงใน Table 5

นอกจากนี้เมื่อศึกษาความแรงของน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า มีความแรงสูงมากที่อุณหภูมิ 4°C

Table 2 Antibody Identification

Panel cells No.												Interpretation
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Anti-I(1G6)												
RT (22-24°C)	4+	3+	3+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	
37°C	1+ ^s	1+	1+	1+ ^s	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	Unidentified
IAT	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	w	

Table 3 Milk inhibition test

Test	Dilution of supernatant from clone 1G6							Interpretation
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32		
Supernatant from clone 1G6 + 0.9% NSS	3+	2+	1+ ^s	1+	w	0		Anti-I (1G6), titer 8
Supernatant from clone 1G6 + Human milk	0	0	0	0	0	0		Human milk have I-substance, neutralized anti-I.

Table 4 Reaction of anti-I (1G6) tested with various red blood cell phenotypes in saline suspension at room temperature

	Reaction of antibody with red cells							Interpretation
	A cells	B cells	O cells	AB cells	Oh	Oi adults	Oi cords	
Anti-I(1G6)	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	Anti-I (IgM)

Table 5 Reactions of anti-I (1G6) tested with I adults and i cords blood of different ABO types

Phenotype	I adults		i cords	
	No. tested	Results	No. tested	Results
A	12	4+	6	0
B	28	4+	6	0
O	29	4+	6	0
AB	5	4+	1	0

Table 6 Antibody titration of anti-I (1G6) at different phases, tested with OI adult cells

Phase	Serial two fold dilution of anti-I											Interpretation
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1,024	
4°C	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4 ^w	3+	2+	1+	w	512
RT	4+	4+	4 ^w	3+	2+	1+	0	0	0	0	0	32
37°C	w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
IAT	w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

ความแรงเท่ากับ 512 ดังแสดงใน Table 6 และที่อุณหภูมิห้อง มีความแรง 32 เหมาะสมที่จะนำไปเตรียมเป็นน้ำยาตรวจกรองหาแอนติเจน I ในงานวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ต่อไป

วิจารณ์

การสร้าง autoanti-I ต่อแอนติเจน I บนเม็ดเลือดแดงของตัวเอง (autoantibody) เป็นสาเหตุของ autoimmune hemolytic anemia (AIHA)² ทำให้เกิดโรค CAD เนื่องจาก anti-I เป็นแอนติบอดีชนิด IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง โดยในปี ค.ศ. 2012 Win N, และคณะ²⁴ ได้รายงานการเกิด acute HTR ในการให้เลือดเด็ก 2 คน ที่เก็บในตู้เย็นและนำออกมาให้ผู้ป่วยเด็กที่มี autoanti-I ทันที และพบว่าสาเหตุจาก autoanti-I ทั้งนี้ autoanti-I ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวเอง พบได้บ่อยในน้ำเหลืองของผู้ใหญ่ ที่เม็ดเลือดแดงมีแอนติเจน i

การตรวจกรองแอนติบอดีที่อ่านผลปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องจะพบ anti-I บ่อยเนื่องจากเป็นแอนติบอดีชนิด IgM ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ และพบได้ในภาวะติดเชื้อบางชนิดหรือโรคเมเรง¹⁶

การศึกษา human monoclonal anti-I ครั้งนี้ ได้ศึกษาคุณสมบัติทางซีโรโลยี ของน้ำเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 เพื่อบอกชนิดแอนติบอดีที่แท้จริง โดยเริ่มจากการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์กับ panel cells 11 เบอร์ ให้ผลบวกทั้ง 11 เบอร์ ดังแสดงใน Table 2 ทำให้ยังไม่สามารถสรุปชนิดแอนติบอดีได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ส่งตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ไปยัง Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society เพื่อให้ Dr. Makoto Uchikawa และ Ms. Chizu Toyoda ซึ่งเป็นผู้ร่วมศึกษา ช่วยตรวจและทดสอบเพิ่มเติมในการบอกชนิดของแอนติบอดี ผลการทดสอบพบว่า ให้ผลบวกกับเซลล์ A, B, O, AB และ Oh รวมทั้งให้ผลลบกับ Oi adults และ Oi cords จึงสรุปว่าเป็น anti-I ชนิด IgM (k) [k คือ kappa ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินสายเบา (light chain)] ดังแสดงใน Table 4 ต่อจากนั้นคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าเป็นเมื่อเป็นเซลล์สายพันธุ์ human monoclonal anti-I แล้วควรจะ

ทำการศึกษาต่อเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทาง red cell serology ต่อไป จึงได้ทำการศึกษาโดยทำ milk inhibition test ต่อเพื่อพิสูจน์ว่าถ้า เป็น anti-I จริง จะต้องถูกล้างฤทธิ์ได้ด้วยน้ำนม เพราะในน้ำนมจะมี I substance ผลการทดสอบเป็นจริงตามสมมติฐานคือในน้ำนมซึ่งมีสาร I สามารถ neutralize anti-I ได้ ดังแสดงใน Table 3 หลังจากได้ผลเป็นที่น่าพอใจแล้ว เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ทดสอบแล้วอีกครั้ง จึงทดสอบความจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดง A, B, O และ AB ของ I adults ให้ผลบวกทั้งหมด และทดสอบความจำเพาะกับเซลล์ A, B, O และ AB ของ i cords ให้ผลลบทั้งหมด สรุปได้ว่าเป็น anti-I ดังแสดงใน Table 5 ซึ่งคล้ายกับบทวิจารณ์ผู้ป่วยเรื่อง anti-I autoimmune hemolytic anemia ในปี ค.ศ. 1995 ที่ สุนิ สภานิสวัสดิการ และคณะ²⁵ ได้รายงานไว้ในวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ซึ่งผลการตรวจทาง blood group serology ของผู้ป่วยพบว่า cells grouping ให้ผล 4+ กับ anti-A, anti-B และ anti-AB, serum grouping ให้ผล 4+ กับ A cells และ B cells รวมทั้ง O cells ด้วย เมื่อทำ indirect และ direct antiglobulin test พบว่าให้ผล 4+ เมื่อล้างเซลล์ด้วย 0.9%NSS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปฏิกิริยากับ anti-A ไม่หายไป แต่ปฏิกิริยาหายไปเมื่อล้างเซลล์ด้วย 0.9% NSS ที่ 37°C เมื่อใช้ cord blood หมู่เลือด A และ B มาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย พบว่าให้ผลบวกกับ A cord cells เท่านั้น จึงสรุปว่าผู้ป่วยรายนี้มีหมู่เลือด B และได้ investigate ต่อไปโดยทดสอบกับ panel cells และ cord O cells พบว่าให้ผล 4+ กับ adult panel cells ทั้งหมด ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง 37°C และ IAT แต่ให้ผลลบกับ 3 cord cells และให้ผล 1+ กับ 1 cord cells ที่อุณหภูมิห้อง รวมถึงให้ผลลบทั้งหมดที่ 37°C และ IAT จึงได้ทำ milk inhibition test พบว่าแอนติบอดีนี้ถูกล้างฤทธิ์ด้วยน้ำนมจนจากรายงานนี้พบว่าผู้ป่วยรายนี้เป็น autoimmune hemolytic anemia (AIHA) จาก anti-I ซึ่งขึ้นตอนและผลจากการ investigate ได้ anti-I เหมือนกัน รวมทั้งในปี ค.ศ. 2010 เรืองรอง ชีพลัทยาการ และคณะ²⁶ ได้รายงานไว้ในวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต เรื่อง anti-I as a cause

of autoimmune hemolytic anemia โดยรายงานการตรวจหมู่เลือด ABO ด้วยวิธีมาตรฐาน tube test ที่แปลผลไม่ได้ การตรวจ direct antiglobulin test พบ C3d เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดง autocontrol ให้ผลบวก ทดสอบซีรัมผู้ป่วยด้วย dithiothreitol และทำ milk inhibition test พบว่าน้ำนมสามารถยับยั้ง anti-I ในซีรัมได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาหาความแรงของน้ำเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า มีความแรงที่อุณหภูมิ 4°C เท่ากับ 512 และที่อุณหภูมิห้อง เท่ากับ 32 ดังแสดงใน Table 6 จากรายงานเปรียบเทียบ anti-I ของทั้งสองคณะ กับการศึกษาคุณสมบัติทางซีโรโลยีของน้ำเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ครั้งนี้ เชื่อมั่นได้ว่าน้ำเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 เป็น anti-I สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการงานวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ต่อไปได้

สรุป

จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำเลี้ยงเซลล์จาก clone 1G6 ที่ผลิตด้วย human hybridoma technique คือ human monoclonal anti-I clone 1G6 พบว่าเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการงานวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ต่อไปได้ และเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อน้ำยา anti-I จากต่างประเทศ รวมทั้งสามารถผลิตเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือดที่ต้องการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Ms. Chizu Toyoda และคณะ ของ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society ที่ตรวจผลยืนยัน anti-I ว่าเป็น IgM ชนิด k

เอกสารอ้างอิง

1. Tippett P, Noades J, Sanger R, Race RR, Sausais L, Holman CA, et al. Further studies of the I antigen and antibody. *Vox Sang.* 1960;5:107-21.
2. Wiener AS, Unger LT, Cohen L, Feldman J. Type specific cold autoantibodies as a cause of acquired hemolytic anemia and hemolytic transfusion reactions: biologic test with bovine red cells. *Ann. Intern. Med.* 1956;44:221-40.
3. Olavesen MG, Bentley E, Mason RVF, Stephens RJ, Ragoussis J. Fine mapping of 39 ESTs on human chromosome 6p23-p25. *Genomics.* 1997;46:303-6.
4. Bierhuizen MFA, Mattei MG, Fukuda M. Expression of the developmental I antigen by a cloned human cDNA encoding a member of a beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family. *Genes Dev.* 1993;7:468-78.
5. Yu LC, Lin M. Molecular genetics of the blood group I system and the regulation of I antigen expression during erythropoiesis and granulopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2011;18:421-6.
6. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. Molecular basis of the adult i phenotype and the gene responsible for the expression of the human blood group I antigen. *Blood.* 2001;98:3840-5.
7. Yu LC, Twu YC, Chou ML, Reid ME, Gray AR, Moulds JM, Chang CY, Lin M. The molecular genetics of the human I locus and molecular background explain the partial association of the adult i phenotype with congenital cataracts. *Blood.* 2003;101:2081-8.
8. Yeh JC, Ong E, Fukuda M. Molecular cloning and expression of a novel beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches. *J Biol Chem.* 1999;274:3215-21.
9. Cooling L. ABO, H, and Lewis blood groups and structurally related antigens. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. *Technical manual.* 18th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2014. p. 291-315.
10. Daniels G. *Human blood groups.* 3rd ed. Singapore: Markono Print Media Pte Ltd; 2013.
11. Hakomori S. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin Hematol.* 1981;18:39-62.
12. Marsh WL. Anti-I: a cold antibody defining the Ii relationship in human red cells. *Brit J Haematol.* 1961;7:200-9.
13. Marsh WL, Jenkins WJ. Anti-I: a new cold antibody. *Nature.* 1960;188:753.
14. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al. *Hematology: basic principles and practice.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p. 645-57.
15. Life's Blood. Class notes: I and P blood group systems. [Internet]. 2018. [Cited 2018 May 15]; Available from: http://faculty.madisoncollege.edu/mljensen/BloodBank/lectures/i_and_p_blood_group_systems.htmArticle.
16. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-7.
17. Tingtoy U. Production of monoclonal anti-P1 by using hybridoma technique. *J Hematol Transf Med.* 2017;27:11-8.
18. Tingtoy U. A review: monoclonal antisera for blood group serology. *J Hematol Transf Med.* 2011;21:103-12.
19. Walker PS, Hamilton JR. Identification of antibodies to red cell antigen. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. *Technical manual.* 18th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2014. p. 391-424.
20. Regina ML. Method 3-6. Performing a direct antiglobulin test. In: Roback JD, Combs MR, Grossman, Hillyer CD, editors. *Technical manual.* 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008. p. 908-9.
21. Marsh WL, Nichols ME, Allen FH. Inhibition of anti-I sera by human milk. *Vox Sang.* 1970;18:149-54.

22. Marilyn KM. Inhibition of Anti-I. In: Wallance ME, editor. *Selection of procedures for problem solving*. Arlington Virginia: American Association of Blood Banks; 1983. p. 115-6.
23. Regina ML. Method 3-7. Antibody titration procedure. In: Ro-back JD, Combs MR, Grossman, Hillyer CD, editors. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008. p. 909-11.
24. Win N, Needs M, Rahman S, Gold P, Wards S. An unusual case of acute hemolytic transfusion reaction caused by an autoanti-I. *Immunohematology*. 2012;27:101-3.
25. Sthabonsawasdikan S, Suebsang C, Kumaim B, Hattirat P, Cheiwslip P. Anti-I autoimmune hemolytic anemia. *Thai J Hematol Transf Med*. 1995;5:267-8.
26. Cheepsattayakorn R, Chaimongkol B, Sakulwattana M, Fongsa-titkul L. Anti-I as a cause of autoimmune hemolytic anemia. *J Hematol Transf Med*. 2010;20:263-71.