

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต Human Monoclonal Anti-P1 ด้วยวิธี

## Hybridoma Technique

อุดม ตั้งต้อย สาริกา เมฆฉาย ปาจารย์ ดีสิน และ จินตนา ทับรอด

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

### บทคัดย่อ

การผลิตน้ำยาชนิด human monoclonal anti-P1 ด้วยวิธี hybridoma technique เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจน P1 บนเม็ดเลือดแดง โดยการเชื่อมเซลล์ระหว่าง B-lymphocytes ที่สร้าง anti-P1 กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-P1 (1C9) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากสายพันธุ์ 1C9 ที่สร้าง anti-P1 มาทดสอบหาระดับความแรง ความจำเพาะและความคงทน เปรียบเทียบกับ monoclonal anti-P1 (HIRO-59) จากสภากาชาดญี่ปุ่น และ polyclonal anti-P1 จากซีรัมผู้บริจาคโลหิต พบว่าน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) มีความจำเพาะ 100% ในด้านความแรง monoclonal anti-P1 (1C9) มีไตเตอร์เท่ากับ 64 ซึ่งสูงกว่า monoclonal anti-P1 (HIRO-59) ที่มีไตเตอร์เท่ากับ 32 และสูงกว่า polyclonal anti-P1 จากผู้บริจาคโลหิตที่มีไตเตอร์เท่ากับ 8 ผลการทดสอบความคงทน monoclonal anti-P1 (1C9) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าสามารถเก็บได้นานอย่างน้อย 12 เดือน และที่ RT (22-24°C) สามารถเก็บได้นาน 8 เดือน โดยไม่เสื่อมคุณภาพ จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ได้ทำการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าน้ำยา human monoclonal anti-P1 (1C9) นี้ เหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยา human monoclonal anti-P1 เพื่อใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจน P1 ในงานธนาคารเลือดต่อไป

คำสำคัญ : ● Anti-P1 ● Human monoclonal antibody ● Hybridoma technique

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2560;27:11-8.

ได้รับต้นฉบับ 16 ธันวาคม 2559 รับลงตีพิมพ์ 9 กุมภาพันธ์ 2560

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายอุดม ตั้งต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

E-mail: udom529@gmail.com

## Original Article

# Production of Human Monoclonal Anti-P1 by using Hybridoma Technique

Tingtoy U, Makechay S, Deesin P and Tubrod J

National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Thailand

---

### Abstract:

*The production of human monoclonal anti-P1 by hybridoma technique is for P1 antigen testing on red blood cells. Fusing B-lymphocytes which produced anti-P1 with human myeloma cells (JMS-3) enable the transformed cells to grow. The fusion cells that secreted antibody were selected for monoclonal by limiting method. After selected the anti-P1 (1C9) cell line, we tested extensively for potency, specificity and stability to compare with monoclonal anti-P1 (HIRO-59) from Japanese Red Cross Society and polyclonal anti-P1 serum from donated blood. For potency testing, we found that monoclonal anti-P1 (1C9) has 100% specificity in titer of 64 which is not only better than monoclonal anti-P1 (HIRO-59) which has a titer of 32 but also polyclonal anti-P1 from serum of donated blood which has a titer of 8. For stability testing, monoclonal anti-P1 (1C9) can be stored at 4°C and be kept for at least 12 months and at RT (22-24°C) can be kept for 8 months. In conclusion, human monoclonal anti-P1 (1C9) is capable for producing monoclonal anti-P1 (1C9) which is used for P1 antigen typing.*

**Keywords :** ● Anti-P1 ● Human monoclonal antibody ● Hybridoma technique

**J Hematol Transfus Med 2017;27:11-8.**

## บทนำ

ในปี 1975 Kohler และ Milstein ได้ค้นพบวิธีการผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะและสามารถเลี้ยงได้ในหลอดทดลองให้มีชีวิตยืนยาว โดยอาศัยหลักการ hybridization หรือ fusion ของเซลล์<sup>1</sup> ซึ่งเป็นพื้นฐานของงานการผลิตเซลล์สายพันธุ์ของงานโมโนโคลนัลในปัจจุบัน

ส่วนการผลิตแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตด้วยวิธีโมโนโคลนัล เริ่มขึ้นในปี 1980 โดย Voak<sup>2</sup> และคณะ ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตเอ รวมทั้งในปี 1987 Sacks<sup>3</sup> และคณะสามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตบีได้สำเร็จ ต่อมาได้มีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตในระบบ ABO ในระบบ Rh และในระบบอื่นๆ อีกมากมาย

ส่วนการค้นพบหมู่โลหิตเริ่มต้นตั้งแต่ทศวรรษที่ 20 โดย Landsteiner<sup>4</sup> ได้ค้นพบหมู่โลหิต A, B และ O ต่อมาอีก 2 ปี ได้ค้นพบหมู่โลหิต AB หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้มีการศึกษาทางด้านหมู่โลหิตพบหมู่โลหิตจำนวนมาก ครั้งล่าสุดมีการรายงานในที่ประชุม ครั้งที่ 34 International Society of Blood Transfusion เมื่อปี 2016 ที่ Dubai, United Arab Emirates<sup>5,6</sup> สามารถจัดแบ่งหมู่โลหิตออกได้ 36 ระบบ ซึ่งพบว่าบนเม็ดเลือดแดง มีแอนติเจน 346 ชนิด และแอนติเจนที่อยู่บนเกล็ดเลือดมี 33 ชนิด ในจำนวนนี้หมู่โลหิต ABO เป็นระบบที่สำคัญที่สุด รองลงมาคือหมู่โลหิตระบบ Rh นอกจากระบบ ABO และ Rh แล้วยังมีหมู่โลหิตอีกกลุ่มที่มีแอนติบอดีเกิดเองตามธรรมชาติอาจทำให้เกิดปัญหาจากการที่เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ (short survival) หมู่โลหิตเหล่านี้ได้แก่ หมู่โลหิตระบบ Lewis, P1PK และ MNS

หมู่โลหิตระบบ P1PK ค้นพบในปี 1927 โดย Landsteiner และ Levine มีหลาย phenotype แต่ที่พบโดยทั่วไปมี 2 phenotypes ได้แก่  $P_1$  และ  $P_2$  อีก 3 phenotypes ที่พบได้น้อยมาก ได้แก่  $P_1^k$ ,  $P_2^k$  และ  $p^{7-9}$  โดยความถี่ของ  $P_1$  phenotype แตกต่างกันตามเชื้อชาติ กล่าวคือพบในคนผิวขาวร้อยละ 79 คนผิวดำร้อยละ 94 และคนไทยร้อยละ 27 ส่วน  $P_2$  phenotype พบในคนผิวขาวร้อยละ 21 คนผิวดำร้อยละ 6 และคนไทยร้อยละ 73<sup>10,11</sup> ซึ่งผู้ที่มี  $P_2$  phenotype สามารถสร้าง anti-P1 ได้ มีทั้งเป็น natural occurring และ immune antibody

นอกจากเม็ดเลือดแดงแล้ว ยังพบแอนติเจน P1 กระจายอยู่ตามธรรมชาติได้หลากหลาย คือสามารถพบ แอนติเจน P1 ในพยาธิใบไม้ในตับ (liver flukes) และในไข่ขาวของนกพิราบ (pigeon egg white) ซึ่งมีแอนติเจน P1 เป็นที่รับ (receptor) ของจุลินทรีย์ (microorganisms) เช่น สายพันธุ์ *P.fimbriated* ของ *E.coli* ตรงตำแหน่ง Pap G และ *Streptococcus suis*<sup>12</sup>

Anti-P1 เป็นแอนติบอดีที่เกิดตามธรรมชาติ มีความแรงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแต่ละคน มีความสำคัญทางคลินิกน้อย เนื่องจาก anti-P1 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิที่ 4-25°C โดยทั่วไป anti-P1 พบบ่อยในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็น hydatid disease, liver fluke disease และ acute hepatic fascioliasis แต่ถ้ามเกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน P1 โดยตรง anti-P1 จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 37°C สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (hemolysis) ในผู้ป่วยโรคพยาธิตัวตืด (Echinococcosis) สามารถสร้าง anti-P1 ได้แรงมาก ดังนั้นปฏิกิริยา anti-P1 ที่มีไตเตอร์สูง ควรจะนำมาพิจารณาเพราะอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด hemolytic transfusion reaction ได้ จากการรายงานของ Moureau<sup>13</sup> ในปี 1945 พบว่ามี haemolytic transfusion reaction หลังการให้เลือดที่เกิดจาก anti-P1 และในปี 1955 Mollison กับ Cutbush<sup>14</sup> ได้กล่าวถึงความไวของการทำลายเม็ดเลือดแดงแตกประมาณ ร้อยละ 50 ในผู้ป่วยที่มี anti-P1 ไตเตอร์สูง ดังนั้นแม้ว่า anti-P1 ส่วนใหญ่จะไม่มีผลทางคลินิก แต่อย่างไรก็ตามควรพิจารณาในการให้เลือดที่มีแอนติเจนเป็นลบด้วย เพราะถ้าเกิดปฏิกิริยา acute hemolytic transfusion reaction อาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยได้รับอันตรายที่ร้ายแรงได้

## วัตถุประสงค์

เนื่องจากฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์จำเป็นต้องใช้ anti-P1 ในการตรวจหาแอนติเจนจากผู้ป่วยโรคโลหิตหมู่โอ สำหรับผลิตชุดตรวจกรองแอนติบอดี (screening cells) และชุดตรวจหาความจำเพาะของแอนติบอดี (panel cells) ทุกสาย ซึ่งปัจจุบัน anti-P1 ที่ใช้ต้องซื้อจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการลดต้นทุนในการจัดซื้อ anti-P1 และมุ่งหวังให้ธนาคารเลือดในประเทศไทยได้ใช้น้ำยาราคาถูกและมีคุณภาพดี

## วัสดุและวิธีการ

### วัสดุและน้ำยา

1. เซลล์เม็ดเลือดขาว (Buffy coat) ในเลือดผู้ป่วยโรคโลหิตหมู่โอ anti-P1 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
2. เซลล์มะเร็ง (JMS-3) (Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society)
3. Epstein-Barr Virus (EBV) สายพันธุ์ B-958 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
4. Polyethylene glycol (PEG) M.W.1540 (Sigma. St. Louis. MO, USA)

5. Isoprep for isolation human lymphocyte (Robbins Scientific, Norway)
6. Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (HAT), 2-deoxycytidine, Ouabain, AET (2-amino-ethyl-thio-isouronium bromide hydrobromide) (Sigma. St. Louis. MO, USA)
7. Interleukin-6, human(hIL-6) (Roche Diagnostics, GmbH, Germany)
8. Sheep Red Blood Cells (SRBC) (โรงพยาบาลสัตว์บ้านศาลายา นครปฐม)
9. Monoclonal anti-P1 (HIRO-59) (Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society)
10. Polyclonal anti-P1 (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
11. เม็ดโลหิตแดงชนิด  $P_1$ ,  $P_2$  และ  $P_1^k$  phenotypes (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
12. Tissue culture plastic ware (Corning, NY, USA)
13. Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone Laboratories, GE Healthcare life Science, USA)
14. RPMI-1640 Medium (Hyclone Laboratories, GE Healthcare life Science, USA)
15. Bovine Serum Albumin (BSA) (Capricorn Scientific, GmbH, Germany)

## วิธีการ

### 1. การสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-P1 (Establishment of human anti-P1 hybridoma cell line)

1.1 นำ buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตที่สร้าง anti-P1 มาแยกเอาเฉพาะเม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocytes โดยวิธี Ficoll Hypaque gradient centrifugation (Isoprep, Norway) กับ sheep red blood cells ที่ treatment ด้วย 2-amino-ethyl-thio-isouronium bromide hydrobromide (AET)

1.2 Transformation เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocytes ด้วย Epstein-Barr Virus (EBV) เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง<sup>15,16</sup> และเจริญเติบโตได้ดี เลี้ยงขยาย transformed cells จำนวน  $2.5 \times 10^4$  cells / well ใน 96 well tissue culture plates ใน 5% CO<sub>2</sub> incubator ที่ 37°C หลังจากนั้นประมาณ 3-4 สัปดาห์

1.3 ทดสอบ คัดเลือกเซลล์หลุมที่สร้างแอนติบอดี ด้วยวิธี hemagglutination โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ O P1+ ความเข้มข้น 2% นำเซลล์จากหลุมที่ให้ออกฤทธิ์ ผลบวกมารวมกัน

1.4 เชื่อม (fusion) กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ 50% polyethylene glycol M.W. 1540 ตามวิธีการพื้นฐานของ Galfre และคณะ<sup>15</sup> เลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมแล้วใน tissue culture plates 96 หลุมโดยใช้เซลล์จำนวน  $2.5 \times 10^4$  cells/100 ไมโครลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FBS + RPMI 1640 หลังจากเชื่อมเซลล์แล้ว วันต่อมาเติม 20% FBS + RPMI 1640 + HAT-Ouabain เพื่อเป็นตัวคัดแยกเซลล์ลูกผสม หลังจากนั้นประมาณ 10-14 วัน

1.5 เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture supernatants) มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีและคัดเลือกเฉพาะหลุมที่สร้าง anti-P1 มาทำ single cell cloning ด้วยวิธี limiting dilution โดยใช้ 96 well half area เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า เซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดี นั้นเป็นเซลล์เดียวและยังเป็นการกำจัดเซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดีออกไปด้วย

1.6 นำเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-P1 ดังกล่าวเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เพื่อเก็บเป็นเซลล์ต้นแบบ (master cells bank) ต่อไป

1.7 ผลิตน้ำยา monoclonal anti-P1 โดยนำเซลล์สายพันธุ์ hybridoma ที่สร้าง anti-P1 มาเลี้ยง ขยายใน tissue culture flasks จนได้ปริมาตรประมาณ 5 ลิตร ปล่อยให้เซลล์ตาย นำน้ำเลี้ยงไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3,500 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ debris ทิ้งไปแล้วเก็บเอาเฉพาะน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี monoclonal anti-P1 (1C9) เติม 0.1% NaNO<sub>3</sub> จำนวน 25 มิลลิลิตร (20% NaNO<sub>3</sub>) เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

### 2. การศึกษาคุณภาพของน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) ที่ผลิตขึ้น

2.1 ทำการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) ที่ผลิตขึ้นกับ monoclonal anti-P1 (HIRO-59) จากสภากาชาดญี่ปุ่น และ polyclonal anti-P1 จากผู้บริจาคโลหิต

2.2 ศึกษาหาความจำเพาะ (antibody identification) ของน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) ที่ผลิตขึ้นกับ panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติจำนวน 5 Lot ได้แก่ Lot 59060 Exp. 13 JUL 16, Lot 59050 Exp. 13 JUN 16, Lot 59040 Exp. 13 MAY 16, Lot 59030 Exp. 13 APR 16 และ Lot 59020 Exp. 13 MAR 16 โดยเตรียมหลอดทดสอบ 11 หลอด เขียนข้างหลอดหมายเลข 1 ถึง หมายเลข 11 ดูดน้ำยา monoclonal anti-P<sub>1</sub> (1C9) ใส่หลอดละ 100 ไมโครลิตร จนครบ 11 หลอด แล้วเติม panel cells หมายเลข 1 ถึง หมายเลข 11 ใส่หลอดละ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิห้อง (RT) นาน 5 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล

2.3 ทดสอบความแรง (potency) ด้วยการหาไตเตอร์ของน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) โดยการเจือจาง monoclonal anti-P1 (1C9) แบบ two-fold serial dilution ในน้ำยา 1% Bovine Serum Albumin (BSA) ใช้ 100 ไมโครลิตรของน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) เติม 3% P1 + cells หมู่ O จำนวน 100 ไมโครลิตร อุณหภูมิห้อง (RT) นาน 5 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล อ่านผลเป็นคะแนน (score)

2.4 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) กับเซลล์ P1+ และ P1- โดยใช้ monoclonal anti-P1 (1C9) จำนวน 1 หยด ทำปฏิกิริยากับ 3% P1+ และ P1- cells (หมู่ A, B, O และ AB) จำนวน 1 หยด และอุณหภูมิห้อง (RT) นาน 5 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาและบันทึกผล อ่านผลเป็นความแรงของการจับกลุ่ม

2.5 ทดสอบความจำเพาะกับเซลล์ที่มีหมู่โลหิตหายาก (rare cells) ในระบบ P1PK ได้แก่  $P_1$ ,  $P_2$ , p,  $P_1^k$ , และ  $P_2^k$  phenotypes วิธีการทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3

2.6 ทดสอบความคงทนของแอนติบอดี โดยนำ monoclonal anti-P1 (1C9) ที่ผลิตขึ้นแบ่งตัวอย่างตรวจออกเป็น 3 ชุด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C, RT (22-24°C) และ 37°C และนำตัวอย่างแต่ละชุดมาทดสอบหาไตเตอร์ของแอนติบอดี ใช้วิธีเดียวกับข้อ 2.2 ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชุด ทุกๆ 4 เดือนเป็นเวลา 12 เดือน

**3. ส่งน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) ที่ผลิตได้ไปตรวจหาความจำเพาะ ที่สภากาชาดญี่ปุ่น** (Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society)

### ผลการศึกษา

การศึกษการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธี human monoclonal hybridoma technique ในครั้งนี้ได้เซลล์สายพันธุ์ monoclonal anti-P1 (1C9) และจากการทดสอบต่างๆ ทางด้าน serology พบว่าน้ำยานี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ เนื่องจาก

1 น้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) มีความจำเพาะสูง โดยให้ปฏิกิริยาผลบวกกับเซลล์  $P_1$  และ  $P_1^k$  เท่านั้น และให้ปฏิกิริยาผลลบกับเซลล์  $P_2$  และ p แต่ไม่สามารถทดสอบได้กับเซลล์  $P_2^k$  เนื่องจากไม่มีเซลล์ดังกล่าว (Table 1) และทดสอบความจำเพาะกับเซลล์  $P_1$  ในเม็ดเลือดแดงหมู่ ABO กับเซลล์ต่างๆ ที่มีและไม่มี  $P_1$  แอนติเจน ร่วมทั้งการทดสอบกับเซลล์  $P_1$  และ  $P_2$  ที่มี phenotype และ genotype ต่างๆ เปรียบเทียบกันระหว่างน้ำยา monoclonal anti-P1 (1C9) และ monoclonal anti-P1 (HIRO-59) จากสภากาชาดญี่ปุ่น ให้ผลจำเพาะตรงกัน 100% ดังแสดงใน Table 2 และ Table 3 ตามลำดับ

2. ด้านความแรง monoclonal anti-P1 (1C9) ให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาดี โดยทำปฏิกิริยากับเซลล์ P1 ได้ไตเตอร์เท่ากับ 64 ซึ่งสูงกว่า monoclonal anti-P1 (HIRO-59) จากสภากาชาดญี่ปุ่น มีไตเตอร์เท่ากับ 32 และสูงกว่า polyclonal anti-P1 จากผู้บริจาคโลหิตที่มีไตเตอร์เท่ากับ 8 (Table 4)

3. ด้านความคงทน monoclonal anti-P1 (1C9) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สามารถเก็บได้นานกว่า 12 เดือน และที่ RT (22-24°C) สามารถเก็บได้นาน 8 เดือน โดยไม่เสื่อมคุณภาพ ซึ่งจะต้องทดสอบต่อไปว่าสามารถเก็บได้คงทนนานเท่าใด (Table 5)

### วิจารณ์

ปัจจุบันการผลิต monoclonal antibody ได้ถูกนำมาพัฒนาใช้งานทางด้านการแพทย์ได้หลายสาขา ได้แก่ โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย ไวรัส พาราไซต์ เอนไซม์ และหมู่เลือด สำหรับด้านหมู่เลือด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตด้วยวิธี monoclonal antibodies<sup>17</sup> มีข้อดีที่สำคัญกว่า polyclonal antibodies คือ สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความคงที่ ทั้งความแรง ความจำเพาะ ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา และสามารถผลิตแอนติบอดีได้ปริมาณมากตามความต้องการ

**Table 1** The reactivity testing of monoclonal anti-P1 (1C9) with  $P_1$ ,  $P_2$ , p,  $P_1^k$  and  $P_2^k$  phenotypes as compared with monoclonal anti-P1 (HIRO-59)

| Phenotype | Monoclonal anti-P1(1C9) | Monoclonal anti-P1(HIRO-59) |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| $P_1$     | 4+                      | 4+                          |
| $P_2$     | 0                       | 0                           |
| p         | 0                       | 0                           |
| $P_1^k$   | 4+                      | 4+                          |
| $P_2^k$   | ND                      | ND                          |

ND = not done

**Table 2** Comparison of specificity of monoclonal anti-P1 (1C9) and monoclonal anti-P1 (HIRO-59) testing with P1 positive cells and P1 negative cells

| ABO grouping | No. of cells tested | No. of P1 positive cells |                             | No. of P1 negative cells |                             | Specificity (%) |
|--------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------|
|              |                     | Monoclonal anti-P1(1C9)  | Monoclonal anti-P1(HIRO-59) | Monoclonal anti-P1(1C9)  | Monoclonal anti-P1(HIRO-59) |                 |
| A            | 153                 | 46                       | 46                          | 107                      | 107                         | 100             |
| B            | 157                 | 47                       | 47                          | 110                      | 110                         | 100             |
| O            | 173                 | 52                       | 52                          | 121                      | 121                         | 100             |
| A,B          | 46                  | 12                       | 12                          | 34                       | 34                          | 100             |
| <b>Total</b> | <b>527</b>          | <b>157</b>               | <b>157</b>                  | <b>370</b>               | <b>370</b>                  |                 |

**Table 3** Comparison of the specificity of monoclonal anti-P1 (1C9) with monoclonal anti-P1 (HIRO-59) by different phenotypes and genotypes

| Phenotype      | Genotype                       | No. of cells tested | Monoclonal anti-P1 (1C9) | Monoclonal anti-P1 (HIRO-59) |
|----------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|
| P <sub>1</sub> | P <sup>1</sup> /P <sup>1</sup> | 4                   | 4+                       | 4+                           |
| P <sub>1</sub> | P <sup>1</sup> /P <sup>2</sup> | 4                   | 4+                       | 4+                           |
| P <sub>2</sub> | P <sup>2</sup> /P <sup>2</sup> | 4                   | 0                        | 0                            |

**Table 4** Comparison of the potency of monoclonal anti-P1 (1C9), monoclonal anti-P1 (HIRO-59) and polyclonal anti-P1 testing by tube method

| 3% red cells in saline | Monoclonal anti-P1 (1C9) | Monoclonal anti-P1 (HIRO-59) | Polyclonal anti-P1 (Donor) |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| P1                     | 64                       | 32                           | 8                          |

**Table 5** The stability testing of monoclonal anti-P1 (1C9) at various storage intervals

| Storage intervals | Titer of monoclonal anti-P1 (1C9) against P1 antigen at different temperature phases |              |      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------|
|                   | 4°C                                                                                  | RT (22-24°C) | 37°C |
| Day 0             | 64                                                                                   | 64           | 64   |
| 4 months          | 64                                                                                   | 64           | 32   |
| 8 months          | 64                                                                                   | 64           | 16   |
| 12 months         | 64                                                                                   | 32           | 0    |

หลังจาก George Kohler และ Caesar Milstein ได้ตีพิมพ์วิธีการผลิต monoclonal antibody ลงในวารสาร Nature เรื่อง เซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะสามารถเลี้ยงให้มีอายุยืนยาวในหลอดทดลอง ในปี 1975<sup>18</sup> ตั้งแต่นั้นมานักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้นำเอาหลักการ การผลิต monoclonal antibody ไปดัดแปลงและสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีต่างๆ เช่น ฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดี ซึ่งอยู่ในม้ามนำมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งที่เรียกว่า myeloma cells เพื่อให้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีนี้ไม่ตายและสามารถเจริญเติบโต เรียกเซลล์ที่เชื่อมกันนี้ว่า murine monoclonal hybridoma cells อย่างไรก็ตามการ

ผลิต monoclonal antibodies มีข้อจำกัดและความแปรปรวนเสมอไม่ตรงไปตรงมา เช่น การผลิต monoclonal antibodies โดยใช้หนูเหมาะสำหรับการผลิต monoclonal anti-A, anti-B, anti-H, anti-M, anti-N, anti-Le<sup>a</sup> และ anti-Le<sup>b</sup> แต่สำหรับ monoclonal anti-D การฉีดกระตุ้นหนูยังไม่ประสบความสำเร็จต้องใช้ B-lymphocytes ที่สร้าง anti-D จากคนมาทำ transformation แล้ว fusion กับเซลล์มะเร็งจากคนจะได้ผลดีกว่า fusion กับเซลล์มะเร็งของหนู เป็นต้น

นอกจากนี้ monoclonal antibodies ยังสามารถผลิตได้โดยการแยกเม็ดเลือดขาว B-lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดีมาทำ

transformation ด้วย Epstein - Barr virus (EBV) เพื่อให้ B-lymphocytes กลายเป็นเซลล์มะเร็ง แล้วนำไปเชื่อมกับเซลล์มะเร็งอีกครั้ง เพื่อให้เซลล์สร้างแอนติบอดีคงทน เรียกเซลล์ที่เชื่อมกันแบบนี้ว่า human monoclonal hybridoma cells

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีผลิต monoclonal antibodies โดยคัดเลือกเซลล์ของผู้ที่สร้าง anti-P1 จากผู้บริจาคโลหิตที่มีผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีพบว่าได้ผลบวกตั้งแต่ 2-3 บวกขึ้นไป เมื่อนำมาตรวจหาความจำเพาะของแอนติบอดีพบว่าเป็น anti-P1 จึงได้นำ buffy coat มาทำการแยกเอาเฉพาะ B-lymphocytes เพื่อทำ transformation และต่อด้วย fusion กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ JMS-3 ในอัตราส่วน 1:1 ด้วย 50% polyethylene glycol M.W. 1540 เป็นตัวเชื่อมเซลล์ เลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมด้วย 20% FCS + RPMI 1640+HAT-Ouabain คัดเลือกเฉพาะหลุมที่สร้าง anti-P1 ซึ่งให้ความแรง 4 บวก มาทำการ cloning ด้วยวิธี limiting dilution จนได้เซลล์สายพันธุ์ human monoclonal anti-P1 (1C9) การดำเนินการที่จะประสบความสำเร็จได้ ต้องปฏิบัติภายใต้ระบบสภาวะปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อต่างๆ ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้เมื่อได้เซลล์สายพันธุ์ human monoclonal antibodies ทุกครั้งก่อนที่จะเลี้ยงขยาย จะต้องทำ limiting dilution เพราะจากประสบการณ์พบว่า หลุมที่เป็น monoclonal ไม่ได้สร้างแอนติบอดีทุกหลุม และบางหลุมที่สร้างแอนติบอดี ก็มีไตเตอร์ไม่เท่ากัน ดังนั้นตอนเลี้ยงขยาย ต้องเลือก monoclonal ที่ดีที่สุด เพราะหากไม่ทำ limiting dilution เลี้ยงขยายทันที เซลล์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแอนติบอดี จะโตเร็ว กินอาหารหมด ในขณะที่เซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีโตช้า กินอาหารไม่ทัน จึงได้นำเลี้ยงเซลล์ ที่มีแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำ หรืออาจไม่สร้างแอนติบอดีเลย

### สรุป

จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น น้ำยา monoclonal anti-P1 ที่ผลิตจากเซลล์สายพันธุ์ 1C9 จึงเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหาแอนติเจน P1 บนเม็ดเลือดแดงเพื่อให้โรงพยาบาลในประเทศไทยได้ใช้ของที่มีคุณภาพดี ให้ผลเชื่อถือได้ และมีราคาที่เหมาะสม สำหรับการตรวจหาแอนติเจนในผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อน้ำยา anti-P1 จากต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สำหรับศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ต้องใช้น้ำยาดังกล่าวในการตรวจหาแอนติเจนในผู้บริจาคโลหิตเป็นจำนวนมากในแต่ละปี เพื่อเตรียม screening cells และ panel cells ในการตรวจหาแอนติบอดี

### กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบคุณ แพทย์หญิงสร้อยสอางค์ พิกุลสด อดีตผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ประสานงานและให้โอกาสได้ไปฝึก อบรมดูงานที่ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองโครงการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสโครงการที่ 3/2559 วันที่รับรอง 15 กรกฎาคม 2559 วันหมดอายุ 15 กรกฎาคม 2560

### เอกสารอ้างอิง

1. Peters JH. Principles of Cell Hybridization. In: Peters JH, Baumgarten H, eds. Monoclonal antibodies. Germany : Springer-Verlag Bertin Heidelberg, 1992:1-4.
2. Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, et al. Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluating as a blood grouping reagent. Vox Sang 1980;39:134-40.
3. Sacks SH, Lennox ES. Monoclonal anti-B as a new blood-typing reagent. Vox Sang 1981;40:99-104.
4. Daniels G. Human blood groups. 3<sup>rd</sup> ed. Singapore : Markono Print Media Pte Ltd, 2013.
5. Storry JR, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, Flegel WA, et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. ISBT Science Series 2016;11:118-22.
6. Wiley Online Library. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings [Internet]. 2016. [Cited 2017 Feb 6]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.12280/abstract>.
7. Cooling L. ABO, H, and Lewis blood groups and structurally related antigens. In: John DR, Martha RC, Brenda JG, Christopher DH, eds. Technical Manual. 16<sup>th</sup> ed. Bethesda MD : American Association of Blood Banks, 2008:361-85.
8. Landsteiner K, Levine P. Further observations on individual differences of human blood. Proc Soc Exp Biol NY 1927;24: 941-2.
9. Sanger R. An association between the P and Jay systems of blood groups. Nature 1955;176:1163-4.
10. Reid ME, Francis CL, Olsson ML. The blood group antigen : factsbook. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam : Elsevier/Academic Press, 2012.

11. Bejrachandra S. Blood groups. In: Bejrachandra S, ed. *Blood bank*. Bangkok : Faculty of Medicine Siriraj Hospital, 2003:15-37.
12. Moulds JM, Nowicki S, Moulds JJ, Nowicki BJ. Human blood groups: incidental receptors for viruses and bacteria. *Transfusion* 1996;36:362-74
13. Moureau P. Les reactions post-transfusion cells. *Revue Belge Sci Med* 1945;16:258-300.
14. Mollison PL, Cutbush M. The use of isotope-labelled red cells to demonstrate incompatibility in vivo. *Lancet* 1955;1:1290-5.
15. Baron D. Human Hybridoma technique. In: JH Peters, H Baumgarten, eds. *Monoclonal antibodies*. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992:157-63.
16. Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977;266:550-2.
17. Udom Tingtoy. A review : monoclonal antisera for blood group serology. *Thai J Hematol Transf Med* 2011;21:103-12.
18. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.