

Original article

Production of anti-D human monoclonal antibody (IgM) using human monoclonal hybridoma technique

Siriporn Ponsen* Suwit Phonimit

Nootchanat Premprayoon Udom Tingtoy

Abstract

Background: At a present, the National Blood Centre, Thai Red Cross Society and Japanese Red Cross Society are co-operating in researches about rare blood group reagent production by using human monoclonal hybridoma technique.

Objective: To produce human hybridoma secreting anti-D monoclonal antibody from human B lymphocytes.

Methods: Human B lymphocytes secreting anti-D were isolated from buffy coated or whole blood by ficoll- hypaque and were transformed with Epstein-Barr virus (EBV). EBV-transformed secreting cell lines were fused with human myelomas (JMS-3) by using 50% polyethylene glycol (PEG). Cultured supernatants were tested for their ability to agglutinate Rh (D) antigen red blood cells. In order to select secreting clones, the limiting dilution was performed. After cell proliferation, culture supernatants were tested again for their specificity with panel cells, tested with different Rh (D) phenotypes and antibody titer measurement was done by testing two flow dilutions that all step must be tested both of room temperature and indirect antiglobulin technique. However, thoroughly serologytesting would be done.

Results: The production 1 stable cell line secreted anti-D (1B97C9) is achieved with antibody titer tested with R1r cells is 1:128. Different Rh (D) phenotypes testing results are 100% reacted with D positive cells and 100% non-reacted with D negative cells in parallel with a present lot monoclonal anti-D.

Conclusion: The cell line secrete anti-D reagent is isolated partial D antigen specificity.

Keywords: Anti-D, human hybridoma technique.

*Correspondence to: Siriporn Ponsen, Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

Received: August 5, 2018

Revised: September 18, 2018

Accepted: September 24, 2018

นิพนธ์ฉบับ

การสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน D ชนิด IgM โดยใช้เทคนิค Human Monoclonal Hybridoma

ศิริพร พลเสน* สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร

นุชนาฏ เปรมประยูร อุดม ตั้งต้อย

บทคัดย่อ

เหตุผลของการทำวิจัย: ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ร่วมมือกับสภากาชาดญี่ปุ่นในการศึกษาความทดลองการสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีชนิดหายาก เพื่อพัฒนาและผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดหายากด้วยวิธี human monoclonal hybridoma technique

วัตถุประสงค์: เพื่อสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน D จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B cells

วิธีการทำวิจัย: แยก B cells ที่สร้าง anti-D จาก whole blood หรือ packed red cells หรือ buffy coated เพื่อนำมา transform กับ Epstein-Barr Virus (EBV) หลังจากนั้นทดสอบน้ำเลี้ยง transformed cells ด้วย เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D บวก และนำ transformed cells ที่ให้ผลบวกมาทำการเชื่อมเซลล์ (fusion) กับ Human myeloma cells (JMS-3) โดยใช้ Polyethylene Glycol (PEG) จากนั้นทดสอบน้ำเลี้ยง Hybridoma cells ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D บวก อีกครั้ง และแยกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่แข็งแรงเจริญเติบโตได้ดี และสามารถสร้างแอนติบอดีได้ปริมาณมาก หลังจากนั้นเลี้ยงขยายเซลล์เดี่ยว (mono clone) ที่ถูกเลือกแล้วให้ได้ปริมาณเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ตามความต้องการ และเก็บรักษาเซลล์สายพันธุ์ที่ได้นี้ไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเป็นเซลล์ต้นกำเนิด พร้อมทั้งนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบทาง serology ที่สภากาชาดไทย และสภากาชาดญี่ปุ่น

ผลการศึกษา: จากการศึกษาสามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน D ชนิด IgM จำนวน 1 โคลน คือ 1B97C9 โดยมีความแรง (titer) กับเซลล์ R1r เท่ากับ 1:128 ให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D บวก จำนวน 1,253 ราย จากทั้งหมด 1,253 ราย และให้ผลลบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D ลบ จำนวน 384 ราย จากทั้งหมด 384 ราย โดยใช้ น้ำยา anti-D (IgM) lot ปัจจุบัน (Lot.59010 Exp. 23 MAY 2018) เป็น positive control และผลการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง partial D ให้ปฏิกิริยาทั้งบวกและลบ

สรุป: น้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ 1B97C9 ให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดเลือดแดง partial D phenotype DIVa DIVb DVa (kou) DVa (Hus) DVa (type 4) DVa (type 8) DVa (TO) และ DBT แต่ให้ผลลบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง partial D phenotype DYO (DHK) DVI DFR DCS1 และ DCS2 จากผลการทดลองทาง serology แสดงให้เห็นว่าเซลล์สายพันธุ์นี้ยังไม่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน partial D ได้ครบทุก subcategories จึงต้องมีการพัฒนาต่อไป ทั้งนี้ต้องทำการทดสอบทางด้าน serology ให้ละเอียดต่อไป

คำสำคัญ: แอนติเจน D, Human hybridoma technique.

หมู่เลือดระบบ Rh เป็นหมู่เลือดที่มีความซับซ้อนระบบหนึ่ง⁽¹⁾ โดยถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2482⁽²⁾ โดย Levine P. และ คณะ เป็นหมู่เลือดที่มีความสำคัญเป็นลำดับสองรองจากหมู่เลือดระบบ ABO ในด้านของเวชศาสตร์การธนาคารเลือด (transfusion medicine) และยังมีความสำคัญในลำดับแรกในด้านสูติศาสตร์ (obstetrics) เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักของอาการตัวเหลืองในเด็กแรกคลอด (hemolytic disease of the newborn, HDN) ความซับซ้อนของแอนติเจนในหมู่เลือดระบบ Rh เกิดจากรูปแบบของยีนที่มีความหลากหลายและการแปรหัสของยีนที่หลากหลายเหล่านั้น หมู่เลือดระบบ Rh ประกอบด้วยยีน RHD และ RHCE ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ชิดกันมาก และมีการจัดเรียงตัวระหว่างยีนที่มากมาย ทำให้เกิดยีน Rh ลูกผสมที่นำไปสู่การแปรหัสเป็นแอนติเจนที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมากมาย ปัจจุบันแอนติเจนในระบบ Rh ที่ถูกค้นพบมีมากถึง 61 ชนิด⁽³⁾ แอนติเจนที่มีความสำคัญประกอบด้วยแอนติเจน D C E c และ e โดยที่แอนติเจน D ถูกสร้างโดยโปรตีน RhD ที่อยู่บนยีน RHD⁽⁴⁾ และความถี่ของแอนติเจน D สามารถพบในคนผิวขาว ร้อยละ 85 คนผิวดำ ร้อยละ 92 และคนเอเชีย ร้อยละ 99

ในปี พ.ศ. 2483 Karl Landsteiner⁽⁵⁾ ได้ร่วมมือกับ Alexander Wiener ค้นพบหมู่เลือดใหม่ ๆ อีกหลายระบบจากการทดลองฉีดกระต่ายและหนูด้วยเม็ดเลือดแดงของลิง Macacus "rhesus" ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีโดยแอนติบอดีนี้ได้ชื่อว่า anti-rhesus ซึ่งทำปฏิกิริยากับกลุ่มกับเม็ดโลหิตแดงของมนุษย์ได้ ซึ่งแอนติเจนดังกล่าวเรียกว่า Rh factor ต่อมา มีการตั้งชื่อมีการตั้งชื่อเป็นหมู่โลหิตระบบ Rh โดยพบว่าแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีซึ่งได้จากการกระตุ้นด้วยเม็ดโลหิตแดงของลิง Rhesus (anti-Rhesus) และ anti-D ที่ได้จากซีรัมมนุษย์ (human anti-D) นั้นไม่เหมือนกัน โดยเรียกแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมมนุษย์ยังคงเรียกว่า anti-Rh ในขณะที่แอนติบอดีจากสัตว์ทดลองเรียกว่า anti-LW เพื่อเป็นเกียรติแก่ Landsteiner และ Wiener

หมู่เลือดระบบ Rh ถึงแม้จะมีความสำคัญรองลงมาจากหมู่เลือดระบบ ABO แต่มีความซับซ้อนมากกว่า

เนื่องจากมียีนทั้งหมด 3 คู่ คือ Cc, Dd, Ee และมีแอนติเจนที่ตรวจได้ 5 ตัว คือ Cc, D และ Ee สำหรับ D แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงอาจจะมีแรงแตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-D โดย weak D⁽⁶⁾ คือ การแสดงออกของแอนติเจน D ที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งเกิดจากคุณภาพหรือปริมาณโดยแบ่งเป็น 3 แบบดังนี้ genetic weak D, C-trans effect และ partial D

ในส่วนของ partial D คือ weak D ที่มีองค์ประกอบของแอนติเจน D ไม่สมบูรณ์ โดยปกติแล้วแอนติเจน D จะประกอบด้วยแอนติเจนส่วนย่อยมากกว่า 30 epitopes (epD) โดยแบ่งรายละเอียดเป็นกลุ่มของ epD 1 ถึง epD 9 รายที่เป็น partial D จะมีแอนติเจน D ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีบางส่วนที่ขาดหายไปทำให้การตรวจหาชนิดของ partial D ต้องใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ epitopes ต่าง ๆ ของแอนติเจน D ซึ่งปัจจุบันนี้ทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้มีความพยายามที่จะผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-D ที่ได้จาก monoclonal antibody ให้สามารถตรวจแอนติเจน D ให้ครอบคลุมทุก epitopes โดยได้นำเข้าน้ำเลี้ยงเซลล์ anti-D ชนิด monoclonal IgM จากต่างประเทศ ซึ่งมีต้นทุนค่อนข้างสูง ปัญหาดังกล่าวข้างต้นนี้จึงทำให้มีการคิดค้นวิธีการสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-D ใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อลดต้นทุนการนำเข้าน้ำเลี้ยงเซลล์โดยใช้เทคนิค human hybridoma

วิธีการทดลอง

การ transform cells^(7 - 10)

แยกเม็ดเลือดขาวชนิด B cell จาก buffy coates ที่สร้าง anti-D โดยเจือจาง ให้มีความเข้มข้น ร้อยละ 50 ด้วย phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นดูดมาใส่ลงบน ficoll hypaque 15 มิลลิลิตรที่อยู่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตรแบบเบามือ นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที แยก lymphocytes ออกมาด้วย dropper ปลายยาที่ผ่านการล้างเชื้อ ล้าง 3 รอบด้วย PBS ปั่นล้างโดยใช้ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเติม

PBS ลงไป 30 มิลลิลิตรและนำไปผสมกับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะเข้มข้น ร้อยละ 2 ใน PBS ที่ treat ด้วย 2-amino-ethyl-thio-isouronium bromide hydrobromide (AET) ในอัตราส่วนที่เท่ากัน นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีเพื่อแยก B cells ออกจาก T cells โดยการดูดลงบน ficoll hypaque 20 มิลลิลิตรในหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตรแบบเบามือ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 35 นาที แยก B cells ออกมาด้วย dropper ปลายยาวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พร้อมทั้งย้อมเซลล์ด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer และนำ B cells ที่ได้ผสมกับน้ำเลี้ยง Epstein-Barr virus (EBV) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เติม 20 % bovine serum เพื่อปรับความหนาแน่นเซลล์ให้ได้ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดลงใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เข้มข้น ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 2 - 3 วัน จึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เติม 20% bovine serum และทุก ๆ 4 วันให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก 100 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร จนกว่าเซลล์จะโตเต็มหลุมจึงดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมา 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 2 ในน้ำเกลือโดยหยดสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r หลุมละ 25 ไมโครลิตร นำเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวกมาเชื่อม (fusion) กับเซลล์ human myeloma cells (JMS-3)

การเชื่อมเซลล์ (fusion)

นำ transform cells และ human myeloma cells (JMS-3) มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่ไม่เติม bovine serum 3 รอบ โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว

รอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และย้อมเซลล์ด้วย trypan blue และนับจำนวนโดยใช้ hemacytometer หลังจากนั้นดูด transform cells และ human myeloma cells (JMS-3) มารวมกันใน centrifuge tube ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส่ออกแล้วหยด polyethylene glycol molecular weight 1,540 g/mol (PEG) 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเจือจางด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ชนิดที่ไม่เติม bovine serum เพื่อให้มีความเข้มข้น ร้อยละ 50 ภายในเวลา 30 วินาที จากนั้นหยดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่ไม่เติม bovine serum 1 มิลลิลิตรภายในเวลา 30 วินาที และอีก 10 มิลลิลิตร ภายในเวลา 30 วินาทีเช่นกัน จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส่ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20 % bovine serum + HAT- Ouabain เพื่อเจือจางให้เซลล์มีความหนาแน่น 1.25×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดใส่ 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เข้มข้น ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 10 - 14 วัน สังเกตเห็นกลุ่มไฮบริโดมาเซลล์ (hybridoma cells) เมื่อไฮบริโดมาเซลล์มีขนาดโคโลนีโตพอสมควร (สังเกตด้วยสายตา) ให้ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมา 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 2 ในน้ำเกลือ 25 ไมโครลิตร นำไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีและให้ผลบวกมาเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution)

การเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution)

นำไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีมาแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยว เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่แข็งแรงและสร้างแอนติบอดีได้ดีด้วยวิธีการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) โดยนำไฮบริโดมาเซลล์มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20 % bovine serum + Interleukin 6 ด้วยการกะประมาณโดยสายตาวามีจำนวน

เซลล์เท่าไร (ขั้นตอนนี้ไม่ได้นับเซลล์เนื่องจากการนับเซลล์ทำให้สูญเสียเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีไปบางส่วน) จากนั้นดูดใส่ 96 well plate ชนิด half well หลุมละ 150 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เข้มข้น ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 - 14 วันสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์ (colony) เมื่อสังเกตเห็นว่าขนาดโคโลนีโตประมาณ 1 ใน 3 ของพื้นที่ทั้งหมดแล้วจึงดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมมาทดสอบกับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 2 ในน้ำเกลือ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและแปลผล เลือกเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวกแรงเพื่อเลี้ยงขยายลงใน 24 well plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดที่เติม 20 % bovine serum + Interleukin 6 เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์สายพันธุ์ที่ดี

การคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์

เมื่อเซลล์สายพันธุ์โตจนเต็มพื้นที่ก้นหลุมของ 24 well plate ต้องคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่แข็งแรงและสร้างแอนติบอดี D แรงโดยการดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์มา identification และทดสอบความแรง มีวิธีการดังนี้

Identification ด้วย panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ลงใน 96 well plate จำนวน 11 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นหยด panel cells ลงในแต่ละหลุมโดยให้หมายเลขของ panel cells ตรงกับหมายเลขของหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แปลผลจดบันทึกผลการทดลอง

ทดสอบความแรง (titer) โดยดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ลงใน 96 well plate หลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดน้ำเกลือใส่หลุมที่ 2 - 12 หลุมละ 50 ไมโครลิตร และดูดน้ำเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์จากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดต่อไปจนถึงหลุมที่ 12 และหยดสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 2 ในน้ำเกลือหลุมละ 25 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แปลผลจดบันทึกผลการทดลอง

คัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่ดีจากความแรงของแอนติบอดีที่สูงและสามารถแปลผลจาก identification แล้วว่าเป็น anti-D โดยไม่มีผลบวกหรือลบปลอมกับ panel cells เพื่อนำไปเลี้ยงขยายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตรเพื่อเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวไว้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดและอีกส่วนหนึ่งเลี้ยงจนกระทั่งได้ปริมาณน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์เพียงพอและปล่อยให้เซลล์ตาย (ประมาณ 15 วัน) เพื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มาทดสอบทาง serology ต่อไป

การทดสอบทาง serology ⁽¹¹⁾

1. Identification ด้วย panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59080 Exp. 13 SEP 2016) เรียงหลอดทดลองขนาด 75 × 150 มิลลิตร จำนวน 11 หลอด หยดน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ลงในแต่ละหลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นหยด panel cells ลงในแต่ละหลอดโดยให้หมายเลขของ panel cells ตรงกับหมายเลขหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นอ่านและแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018) เป็น positive control
2. ทดสอบความแรง (titer) ด้วยวิธี two-flow dilution กับสารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 2 ในน้ำเกลือ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นอ่านและแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018) เป็น positive control
3. ทดสอบความจำเพาะ เก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A B O และ AB ที่มีแอนติเจน D บวก และลบนำมาทดสอบกับน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นอ่านและแปลผลจดบันทึกผลการทดลอง โดยใช้น้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018) เป็น positive control

ผลการศึกษา

จากการศึกษาทดลองครั้งนี้สามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-D ชนิด IgM คือ 1B97C9 และจากการตรวจบ่งชี้ด้วย panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 59080 Exp. 13 Sep 2016 สามารถแปลผลเป็น anti-D ได้อย่างถูกต้อง และมีความแรงของแอนติบอดี (titer) กับเซลล์ R1r เท่ากับ 1:128 สำหรับผลความจำเพาะให้ผลบวกกับตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A B O และ AB ที่มีแอนติเจน D บวก จำนวน

1,253 รายจากทั้งหมด 1,253 ราย และให้ผลลบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A B O และ AB ที่มีแอนติเจน D ลบ จำนวน 384 ราย จากทั้งหมด 384 ราย โดยใช้น้ำยา anti-D Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018 เป็น positive control ส่วนผลการทดสอบความจำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด partial D ที่ส่งไปทดสอบที่สภากาชาดญี่ปุ่นให้ปฏิกิริยาทั้งบวกและลบไม่สามารถตรวจได้ครบทุก subcategories

ตารางที่ 1. การตรวจบ่งชี้ว่าเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-D โดยใช้ panel cells

Panel cells Number (Lot. 59080 Exp. 13 SEP 2016)												
Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	conclusion
1B97C9	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	0	anti-D
Control	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	0	anti-D

Remark: Positive control is anti-D reagent Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018 product of National Blood Centre, Thai Red Cross Society

ตารางที่ 2. การเปรียบเทียบความแรงของแอนติบอดี (titer) จากน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ 2 ชนิดกับน้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

Clone	Cells	Temp.	Incubate Time	Neat	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	Titer
1B97C9	R1r	RT.	5 mins	10	10 ^w	8-10	8 ^s	5 ^s	5 ^s	5	5	1-3	0	0	0	128
RUM-1	R1r	RT.	5 mins	12	12	12	12	12	12	12	12 ^w	10	8-10	8 ^s	5	2048
Control	R1r	RT.	5 mins	12	12	12	10 ^s	10	8-10	5-8	5 ^s	5 ^s	5 ^w	3-5	1-3	512 ^w

Remark: W stand for weak reaction and S stand for strong reaction

ตารางที่ 3. ความจำเพาะของ anti-D ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D บวก และลบ

Group	D positive cells				D negative cells			
	A	B	O	AB	A	B	O	AB
Sample No.	258	388	516	91	80	119	141	44
Positive result	258	388	516	91	0	0	0	0
Negative result	0	0	0	0	80	119	141	44

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดง partial D (ผลการทดลองจากสมาคมชาตญี่ปุ่น)

Partial D red cells	DIVa	DIVb	DVa (kou)	DVa (Hus)	DVa (type 4)	DVa (type 8)	DVa (TO)	DYO (DHK)	DVI	DBT	DFR	DCS1	DCS2	R1r	rr
Reaction grade	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	3+ ^s	0	0	0	4+	0

อภิปรายผล

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์สายพันธุ์ anti-D เมื่อตรวจบ่งชี้กับ panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สามารถแปลผลเป็น anti-D

จากตารางที่ 2 การทดสอบความแรงของแอนติบอดีเซลล์สายพันธุ์ anti-D ที่ได้จากวิจัยนี้กับเซลล์เม็ดเลือดแดง R1r มีความแรงเท่ากับ 1:128 ถือว่าเป็นความแรงที่น้อยอยู่หากเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์ LDM2 ที่มีความแรงเท่ากับ 1:512 และเซลล์สายพันธุ์ RUM-1 ที่มีความแรงเท่ากับ 1:2048 ตามลำดับ

จากตารางที่ 3 การทดสอบความจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A B O และ AB ที่มีแอนติเจน D บวกและลบ ให้ผลตรงกันกับน้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot. 59010 Exp. 23 MAY 2018)

จากตารางที่ 4 การส่งน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ 1B97C9 ไปทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง partial D ชนิดต่าง ๆ ที่สมาคมชาตญี่ปุ่น โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเซลล์สายพันธุ์นี้ยังไม่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน partial D ได้ครบทุก subcategories

สรุป

เซลล์สายพันธุ์โคลน 1B97C9 สามารถตรวจบ่งชี้โดย panel cells ว่าเป็น anti-D ชนิด IgM ที่มีความแรงต่อเซลล์ R1r เท่ากับ 1:128 และให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D บวก ร้อยละ 100 และให้ผลลบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D ลบร้อยละ 100 เช่นกัน แต่มีความจำเพาะต่อ partial D ไม่ครบทุก

subcategories จึงต้องทำการศึกษาค้นคว้าสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-D โคลนใหม่เพิ่มขึ้นต่อไป และงานวิจัยนี้แสดงถึงการประสบความสำเร็จครั้งแรกในประเทศไทยในการสร้างเซลล์สายพันธุ์ anti-D ชนิด IgM

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษารั้วนี้สำเร็จลงได้ในครั้งนี้ด้วยความอนุเคราะห์จาก แพทย์หญิง สร้อยสรวงศ์ พิภูลสด ที่ปรึกษาศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผู้ริเริ่มโครงการ Murine and Human Monoclonal Hybridoma Technique for Rare Blood Group reagent และขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Mrs. Chizu Toyoda และ Miss Sayaka Kaito จาก Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Centre, Japan ที่ถ่ายทอดความรู้

เอกสารอ้างอิง

- Dean L. Chapter 7: The Rh blood group. In: Blood groups and red cell antigens [Internet]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information (US); 2005 [cited 2018 Jul 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>
- Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. JAMA 1939;113:126-7.
- Denomme GA, Westhoff CM. The Rh system. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. Technical manual. 18th ed. Bethesda, MD: American Association of

- Blood Banks; 2014. p. 317-36.
4. 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.
 5. 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.
 6. ศรีวิไล ต้นประเสริฐ, พิมล เขียวศิลป์. Rh blood groups. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต 2542;9:3-6.
 7. Goossens D, Champomier F, Rouger P, Salmon C. Human monoclonal antibodies against blood group antigens. Preparation of a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of antibody of different isotypes and specificities. J Immunol Methods 1987; 101:193-200.
 8. Thompson K, Barden G, Sutherland J, Beldon I, Melamed M. Human monoclonal antibodies to C, c, E, e and G antigens of the Rh system. Immunology 1990;71:323-7.
 9. อุดม ตั้งต้อย, สารีกา เมฆฉาย, ปาจารย์ ดีสิน, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต Human Monoclonal Anti-P1 ด้วยวิธี hybridoma technique. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต 2560;28:11-8.
 10. สมพงศ์ บุญให้, กาญจนา เอี่ยมอัมพร, อุดม ตั้งต้อย. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M ด้วยวิธี human hybridoma technology. จุฬาลงกรณ์ เวชสาร 2559;60:101-3.
 11. อรุณี ชันติสิทธิพร. เทคนิคการตรวจแอนติเจน D ของหมู่โลหิตระบบ Rh Techniques for Rh (D) Antigen Typingวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต 2558;25:73-7.