นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัล แอนติ-เอ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

อุดม ติ่งต้อย สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร์ อัจฉรา ศิริพงษ์ษานุสิทธิ์ สาริกา เมฆฉาย และ ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ : *วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A โดยใช้เทคนิคการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์จากม้ามของหนู Balb/C ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย เม็ดเลือดแดงหมู่ A เข้มข้น 20% กับเซลล์มะเร็งของสายพันธุ์เดียวกัน (653) ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทนในการสร้าง anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนใหม่ ($3C_4$) ได้เป็นผลสำเร็จ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากโคลน $3C_4$ ที่สร้างแอนติบอดี มาทดลองผสมเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A ($3C_4$) ศึกษาประสิทธิภาพของความเร็ว ความแรง และความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตต่างๆ เปรียบเทียบกับ anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนเดิม (ศูนย์ฯ) และ commercial monoclonal anti-A ตลอดจนศึกษาเปรียบเทียบความคงทนและต้นทุนการผลิต anti-A (ศูนย์ฯ) ผลการทดลองพบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) ที่พัฒนาผลิตขึ้นใหม่มีความแรงดีกว่าน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A (ศูนย์ฯ) และเทียบเท่าหรือดีกว่า commercial monoclonal anti-A ของต่างประเทศ มีความเร็วเฉลี่ย 1-2 วินาที ในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2 A_1B และ A_2B บนสไลด์ไม่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะสูงร้อยละ 100 โดยให้ผลบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2 A_3 A_1B A_2B A_3B และให้ผลลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ B และ O การพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A ในครั้งนี้สามารถลดต้นทุนในการผลิตลงร้อยละ 26.49 และ มีความคงทนของแอนติบอดีมากกว่า 18 เดือนโดยความแรงไม่ลดลง ดีกว่า anti-A (ศูนย์ฯ) ดังนั้นการพัฒนาการผลิตแอนติบอดีนี้จึงเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A เพื่อใช้ในงานทางธนาคารเลือดต่อไป*

Key Words : ● *Monoclonal anti-A*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551;18:11-9.

นับตั้งแต่มีรายงานผลความสำเร็จของการใช้วิธีไฮบริโดมา (Hybridomas technique) ผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตเมื่อปี พ.ศ. 2523[1-4] เป็นต้นมา ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงได้พัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธีไฮบริโดมา[5-7] ได้แก่ anti-A anti-B anti-AB anti-D และ anti-A_1[8] ได้สำเร็จ แต่ anti-A ในปัจจุบัน มีโคลนที่นำมาผสมรวมกัน (cocktail) มีความแรง (titer) และความ

ได้รับต้นฉบับ 15 ธันวาคม 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 10 มกราคม 2551
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายอุดม ติ่งต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

ไว (avidity) ลดลงทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ anti-A ด้วยวิธี dialysis ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุน ดังนั้นจากความรู้และประสบการณ์ที่ผ่านมาจึงได้เริ่มโครงการทดลองพัฒนาควบคุมคุณภาพและมาตรฐานให้ดียิ่งขึ้น โดยมีเป้าหมายที่จะเพิ่มการผลิตและลดต้นทุนการใช้จ่าย จากการคัดเลือกใช้เลือดครบส่วน (whole blood) เม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 ฉีดกระตุ้นหนู Balb/C แล้วนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีในม้าม (immunized spleen cells) ของหนู มาเชื่อมกับเซลล์ mouse myeloma (653) จำนวน 14 ครั้ง (14 fusions) เมื่อได้โคลนที่สร้าง anti-A คือ $3C_4$ และ $10D_6$ นำมาศึกษาเปรียบเทียบในข้างต้นพบว่า โคลน $3C_4$ ให้ผลดีกว่าจึงได้นำโคลน $3C_4$ มาศึกษาและคัดเลือกโคลนเพื่อใช้ผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับโคลนเดิม และ ของบริษัทต่างประเทศ

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. หนู Balb/C อายุ 2 เดือน เพศเมีย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เซลล์มะเร็ง ชื่อ P3-X63-Ag-653 (653) จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
3. Polyethylene glycol 4,000 จาก Merck (Darmstadt, Germany)
4. Tissue culture plastic ware จาก NUNC™ (Roskilde, Denmark)
5. Hypoxanthine Aminoptherine Thymidine (HAT) จาก Sigma chemical Co (MO, USA)
6. เม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2 A_3 A_1B A_2B A_3B B และ O จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ
7. Monoclonal anti-A Seraclone (Biotest) Lot 1211203 (comercial monoclonal anti-A)
8. Monoclonal anti-A ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ Lot 48011 anti-A (ศูนย์ฯ)
9. Monoclonal anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนใหม่ anti-A ($3C_4$)

วิธีการ

1. การผลิตเซลล์สายพันธุ์ ที่สร้าง anti-A (Production of anti-A hybridoma cell line)[5,6]

1.1 ฉีดกระตุ้นหนู Balb/C ด้วยสารละลายเม็ดเลือดแดงหมู่ A (20% ในน้ำเกลือ) จำนวน 0.2 มล. เข้าทางหางในครั้งแรก และฉีดอีก 3 ครั้งเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneum) ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ หลังฉีดกระตุ้นหนูครั้งสุดท้าย 3 วัน ทำการเชื่อมเซลล์ (fusion) โดยนำ immunized spleen cells จากหนูมาเชื่อมต่อกับเซลล์มะเร็ง (653) ในอัตราส่วน 5:1 โดยใช้ 50% polyetylene glycol เป็น fusogen เลี้ยงเซลล์ภายหลัง fusion ในถาดหลุม 96 หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Hypoxanthine Aminoptherine Thymidine โดยมี macrophage จากหนู Balb/C เป็น feeder cells ภายหลังเชื่อมเซลล์ 10-14 วัน เมื่อเกิดมีเซลล์ลูกผสม (hybridoma) และโคลนโต 1 ใน 3 ของหลุม เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture supernate) มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีโดยการทำ screening test ด้วยวิธีตกตะกอน (hemagglutination) ในถาดหลุมรูปตัววี กับ เม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2B B และ O ความเข้มข้น 2% คัดเลือกหลุมที่สร้าง anti-A ที่ต้องการ นำเซลล์ hybridoma มาทำ limiting dilution 3 ครั้ง โดยเจือจางหลุมที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวที่จะเจริญเป็นโคลนเดี่ยวที่มีความคงทนและสร้าง anti-A (เซลล์สายพันธุ์) ตามต้องการ แช่แข็งเซลล์สายพันธุ์ของโคลนเดี่ยวนี้ไว้เพื่อนำมาเลี้ยงขยายผลิตแอนติบอดีต่อไป

1.2 ผลิตน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A นำเซลล์สายพันธุ์ hybridoma ที่สร้าง anti-A มาเลี้ยงขยายใน tissue culture flasks จนได้ประมาณ 5 ลิตร ปล่อยให้เซลล์ตาย นำไปปั่นแยกเซลล์ debris ทิ้งไป เก็บน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติม NaN_3 ทำให้เป็นสารละลาย 0.1% เติม

NaCl 8 กรัม/ลิตร Na_2EDTA 704 กรัม/ลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 7± 0.1 นำไปกรองให้ปราศจากเชื้อ เก็บในตู้เย็น 2-8 °ซ.

2. การศึกษาคุณภาพของน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนใหม่ ($3C_4$) กับ anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนเดิม (ศูนย์ฯ) Lot 48011 ($16G_4$ และ $6G_4$) และ commercials monoclonal anti-A

2.1 ความแรง (potency)[9] ทำการศึกษาเปรียบเทียบหาไตเตอร์ของน้ำยาแอนติซีรัมต่างๆ โดยการเจือจางแอนติซีรัมแบบ two-fold serial dilution in NSS และให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 และ A_2B อ่านส่วนกลับของ dilution สุดท้ายที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่า

2.2 ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (avidity)[10] โดยให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_1B A_2 และ A_2B ที่มีความเข้มข้น 30-50% บนแผ่น Slide อ่านระยะเวลาที่เริ่มเห็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และรออ่านความแรงที่มองเห็นเมื่อครบ 2 นาที

2.3 ความจำเพาะ (specificity) ในการเกิดปฏิกิริยา

2.3.1 ใช้แอนติบอดีที่จะทดสอบ 2 หยดทำปฏิกิริยากับ 1 หยดเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้น 3% ของผู้บริจาค ที่ทราบหมู่โลหิต A_1 A_2 A_1B A_2B A_3 B และ O รวมทั้งหมดจำนวน 967 ราย

2.3.2 ทดสอบกับ papainized cells[11] เม็ดเลือดแดงหมู่ A B O และ AB โดยทำการ treat cells ด้วย papain และเตรียมเป็นเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้น 3% ในน้ำเกลือ แล้วจึงนำมาทดสอบกับแอนติบอดีที่จะทดสอบ

3. ศึกษาความคงทน (stability)

ที่ 4 °ซ. อุณหภูมิห้อง (20-25 °ซ.) และ 37 °ซ.

4. ศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตกับวิธีเดิม

ผลการทดลอง

1. การผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-A

จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ของม้ามของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 กับเซลล์มะเร็งในครั้งนี้มีโคลนเกิดขึ้น ทั้งหมด 613 โคลน ผลการทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วย เม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2B B และ O พบว่ามีโคลนที่ไม่สร้างแอนติบอดีมี 537 โคลน โคลนที่สร้าง non-specific antibody ซึ่งให้ผลบวกกับเม็ดเลือดแดงทุกหมู่มี 36 โคลน สร้าง anti-A โดยให้ผลบวกเฉพาะกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 และ A_2B 40 โคลน แต่เมื่อนำมาเลี้ยงขยายต่อพบว่ามี 2 โคลน ที่เซลล์สวยเจริญเติบโตดี มีรูปร่างสม่ำเสมอ มีความแรงผ่านเกณฑ์มาตรฐานสากลคือ มากกว่า 256 ได้แก่ โคลน $3C_4$ และ $10D_6$ แต่ในการพัฒนางานในครั้งนี้เลือกโคลน $3C_4$ มาเลี้ยงขยายทำ limiting dilution ทำให้ได้โคลนที่เจริญมาจากเซลล์เดี่ยวเป็นโมโนโคลนและยังสร้าง anti-A อยู่ จึงได้นำมาเลี้ยงขยายและเก็บน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดลองผสมทำเป็นน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$)

2. การศึกษาคุณภาพของน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ที่พัฒนาขึ้นใหม่

2.1 เมื่อนำ anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนใหม่ ($3C_4$) มาทดลองผสมเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบความแรงกับ anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ โคลนเดิม (ศูนย์ฯ) และ commercial monoclonal anti-A พบว่าให้ความแรงกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 เท่ากับ 1024 ไม่แตกต่างกัน ส่วนความแรงเมื่อทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_2B พบว่า anti-A ($3C_4$) ให้ความแรงสูงสุด รองลงมาคือ commercial monoclonal anti-A และ anti-A (ศูนย์ฯ) คือ 1024 512 และ 128 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_3 พบว่า anti-A ($3C_4$) และ commercial monoclonal anti-A มีความแรงไม่แตกต่างกันคือ 128

แต่มากกว่า anti-A (ศูนย์ฯ) ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบความเร็วในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_1B A_2 และ A_2B ระหว่าง anti-A ($3C_4$) กับ anti-A (ศูนย์ฯ) และ commercial monoclonal anti-A พบว่าให้ความเร็วโดยเฉลี่ย 1-2 วินาที ไม่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 2

2.3 การศึกษาทดสอบความจำเพาะ (specificity) ในการเกิดปฏิกิริยา

2.3.1 ผลการทดลองใช้ตรวจหมู่โลหิตในผู้บริจาคโลหิต รวมทั้งทดสอบกับหมู่ย่อยต่างๆ ของหมู่โลหิต A เปรียบเทียบกับ anti-A (ศูนย์ฯ) พบว่า anti-A ($3C_4$) ให้ปฏิกิริยาบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_1B A_2 A_2B A_3 และ A_3B เท่ากับ 100% และให้ผลลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ B และ O เท่ากับ 100% ดังแสดงในตารางที่ 3

2.3.2 การศึกษาทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ต่างๆที่ treated ด้วย เอนไซม์ พบว่าน้ำยา anti-A ($3C_4$) ให้ผลไม่แตกต่างกับ anti-A (ศูนย์ฯ) คือจะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะโดยให้ผลบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 และ A_1B เท่ากับ 100% และให้ผลลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ B และ O เท่ากับ 100% ดังแสดงในตารางที่ 4

3. ผลการศึกษาความคงทน (stability)

ผลการศึกษาทดสอบ stability ของ anti-A ($3C_4$) เปรียบเทียบกับ anti-A (ศูนย์ฯ) ที่ 4 °ซ อุณหภูมิห้อง (20-25 °ซ) และ 37 °ซ พบว่า เมื่อทำการทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A ให้ผลไม่แตกต่างกันทั้ง activity ใน titer และ total reaction score เมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละสภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 5 แต่เมื่อทำการ

ตารางที่ 1 Comparison of specificity and potency between monoclonal anti-A anti-A ($3C_4$), monoclonal anti-A anti-A (NBC) and commercial monoclonal anti-A

Monoclonal anti-A	With 3% red cells in saline					
	A_1		A_2B		A_3	
	Titer	score	Titer	score	Titer	score
Clone $3C_4$	1024	113	1024	108	128	68
NBC*	1024	113	256	76	64	42
Commercial	1024	113	512	96	128	70

*NBC = National Blood Centre, Thai Red Cross Society

ตารางที่ 2 Comparison of avidity test (second) between monoclonal anti-A ($3C_4$), monoclonal anti-A (NBC) and commercial monoclonal anti-A

30-50% red cells in own serum	Avidity anti-A (Second)		
	Clone $3C_4$	NBC	Commercial
A_1 (6 samples)	1.06 (1.0-1.2)	1.13 (1.1-1.2)	1.01 (1.0-1.1)
A_1B (6 samples)	1.03 (1.0-1.1)	1.13 (1.1-1.2)	1.01 (1.0-1.1)
A_2 (6 samples)	1.23 (1.0-2.0)	1.35 (1.0-2.2)	1.16 (1.0-1.4)
A_2B (6 samples)	1.02 (1.0-1.1)	1.18 (1.0-1.4)	1.06 (1.0-1.2)

Averrage of reaction time (second) from 6 blood samples

ตารางที่ 3 Comparison of specificity between monoclonal anti-A ($3C_4$) and monoclonal anti-A (NBC)

Antigen	No. of total cells tested	No. of positive		No. of negative	
		Mono.anti-A ($3C_4$)	Mono.anti-A (NBC)	Mono.anti-A ($3C_4$)	Mono.anti-A (NBC)
A_1	233	233	233	0	0
A_1B	62	62	62	0	0
A_2	7	7	7	0	0
A_2B	6	6	6	0	0
A_3	14	14	14	0	0
A_3B	21	21	21	0	0
B	305	0	0	305	305
O	329	0	0	329	329
Total	967	333	333	634	634

Mono = Monoclonal

ตารางที่ 4 Comparison of reaction between monoclonal anti-A ($3C_4$) and monoclonal anti-A (NBC) with enzyme treated red blood cells (RBC)

3% enzyme treated RBC	No. of total cells tested	Mono.anti-A ($3C_4$)		Mono.anti-A (NBC)	
		Macro	Micro	Macro	Micro
A_1	19	4+	NT	4+	NT
A_1B	15	4+	NT	4+	NT
B	11	0	0	0	0
O	10	0	0	0	0

Macro = Macroscopic reading, Micro = Microscopic reading, NT = Not tested

ทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_2B จะเห็นว่า anti-A (ศูนย์ฯ) จะมีการสูญเสียทั้ง activity ใน titer และ total reaction score มากกว่า anti-A ($3C_4$) ภายใน 6 เดือน ส่วนที่อุณหภูมิห้อง activity อยู่ได้ไม่ถึง 6 เดือน และที่อุณหภูมิ 37 °ซ หลังจาก 1 เดือนจะมีการสูญเสีย activity เท่าๆ กับที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 12 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 6

4. ผลศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตจากวิธีเดิม

เนื่องจากวิธีเดิมถ้าต้องการเตรียม anti-A จำนวน 3 ลิตร จะต้องเลี้ยงขยายเซลล์ให้ได้ 5 ลิตร เพราะโคลนที่จะใช้เตรียมมีความแรงไม่พอต้องเพิ่มความเข้มข้น (concentration) โดยดึงเอาน้ำออก 2 ลิตร จึงจะได้ความแรง 256-512 ตามที่ต้องการ วิธีใหม่นี้เมื่อได้โคลน $3C_4$ มาผลิตจะได้ anti-A มีความแรง 512-1024 จึงไม่ต้องเพิ่มความแรง ต้องการเตรียมปริมาตรเท่าใดก็เลี้ยงเท่านั้น ทำให้ลดค่าใช้จ่ายลงไป 3 ใน 5 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 Comparison of stability between monoclonal anti-A ($3C_4$) and monoclonal anti-A (NBC) with 3% A_2B cell suspension at different temperature

Storage Temp.	Testing with A_2B cells															
	Mono. Anti-A ($3C_4$) Period of storage (months)								Mono. Anti-A (NBC) Period of storage (months)							
	1		6		12		18		1		6		12		18	
	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
4°C	512	103	512	104	512	104	512	104	256	85	256	63	128	63	64	63
20°C	512	102	512	91	256	87	256	83	128	84	128	39	64	39	8	39
37°C	512	99	256	33	8	33	8	33	128	83	2	13	2	13	2	13

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

ตารางที่ 7 Comparison of product in cost between monoclonal anti-A ($3C_4$) and monoclonal anti-A (NBC)

	Cost (Baht)	
	Anti-A(NBC)	Anti-A ($3C_4$)
Reagent/Chemical	30,564.42	18,338.65
Matherial	18,459.00	11,075.40
Control anti-A	180.00	180.00
Sterile filter	480.00	480.00
Sticker	2,000.00	2,000.00
Containers	22,000.00	22,000.00
Packing	300.00	300.00
Cost / 20 Liters	73,983.42	54,374.05
Cost / 10 mL.	36.99	27.19

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาพัฒนาหาโคลนใหม่เพื่อแทนโคลนเก่า ($16G_4$) เนื่องจากโคลนเก่าสร้างแอนติบอดีอ่อน จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดีขึ้นด้วยการทำให้เข้มข้นมากขึ้น ด้วยวิธี dialysis ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นจึงได้เริ่มศึกษาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยใช้วิธีไฮบริโดมา พบว่าในการศึกษาได้คัดเลือกโคลน $3C_4$ มาทำ limiting dilution 3 ครั้ง ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทนสามารถผลิตแอนติบอดีได้จำนวนมากแล้วนำมาทดสอบผลิตเป็นน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) พบว่าโคลน $3C_4$ เหมาะสมที่จะนำมาใช้แทน โคลนเก่า ($16G_4$) ได้อย่างดียิ่งเนื่องมาจาก

1. ด้านความแรง น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) ได้ผลความแรงในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบ น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A (ศูนย์ฯ) และ commercial monoclonal anti-A คือ 1024 และพบว่ามีความแรงในการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_2B ดีกว่า commercial monoclonal

anti-A และ น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A (ศูนย์ฯ) คือ 1024 512 และ 256 ตามลำดับ และมีความแรงในการปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_3 เท่ากับ commercial monoclonal anti-A คือ 128 แต่มีความแรงกว่า น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A (ศูนย์ฯ) ดังแสดงในตารางที่ 1

2. ด้านความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา เมื่อทำการทดสอบบนสไลด์พบว่า น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) ได้ผลความเร็วโดยเฉลี่ยประมาณ 1-2 วินาที ไม่แตกต่างจาก commercial monoclonal anti-A และ น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A (ศูนย์ฯ) ดังแสดงในตารางที่ 2

3. ด้านความจำเพาะ น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) มีความจำเพาะสูง โดยจะให้ปฏิกิริยาบวกกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2 A_3 A_1B A_2B และ A_3B เท่ากับ 100% และให้ปฏิกิริยาลบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ B และ O เท่ากับ 100% ดังแสดงในตารางที่ 3

4. ด้านความคงทน น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ 4 °ซ สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 18 เดือน แต่ถ้าเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ 37 °ซ พบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้จะเป็นตัวเร่งให้เกิดการสูญเสีย activity ได้เร็วขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับรายงานของ Mcgowan และคณะ[12] กล่าวไว้ว่า ภายใน 1 เดือนที่อุณหภูมิ 37 °ซ จะมีการสูญเสีย activity เท่ากับเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน โดยไม่เสื่อมคุณภาพ ด้านความแรง ความไว ในการเกิดปฏิกิริยา แต่จะต้องทดลองศึกษาต่อไปว่าจะเก็บคงทนได้นานเท่าใด ถ้าเปรียบเทียบกับ commercial monoclonal anti-A

5. ด้านต้นทุนการผลิต น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) สามารถลดต้นทุนการผลิตลง เนื่องจากไม่ต้องเพิ่มความแรง โดยการทำให้เข้มขึ้น เมื่อต้องการเตรียมเท่าไรก็เลี้ยงเท่านั้น จึงลดค่าใช้จ่ายลงไป 3 ใน 5 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7 หมายความว่า เดิม น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A (ศูนย์ฯ) มีต้นทุนในการผลิต 36.99 บาทต่อ 10 มิลลิลิตร แต่เมื่อมาเตรียม น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) มีต้นทุนในการผลิต 27.19 บาทต่อ 10 มิลลิลิตร ทำให้ลดต้นทุนลงไป 9.8 บาทต่อ 10 มิลลิลิตร ดังนั้น 36.99 บาท ลดลง 9.8 บาท เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซนต์ จึงลดต้นทุนการผลิตลงไปร้อยละ 26.49

จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ได้ทดสอบแล้วของโคลน $3C_4$ ได้เตรียมเป็นน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A ($3C_4$) แล้วศึกษา specificity และ potency (ตารางที่ 3) ด้วยเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_1B A_2 A_2B A_3 A_3B B และ O พบว่าให้ผลถูกต้องแม่นยำทั้งหมด และให้ปฏิกิริยาดีกว่าโมโนโคลนัล anti-A ของ ศูนย์ฯ Lot 48011 โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_2 A_2B A_3 และ A_3B ซึ่งเป็นข้อดีของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A ($3C_4$) เนื่องจากเคยมีผู้รายงานไว้ว่า การเตรียม monoclonal anti-A จะมีปัญหาการจับกับเซลล์ A_2B ได้อ่อนจนไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต[13] ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าความสามารถของ anti-A ที่จะจับกับ A epitope ที่มี terminal group A trisaccharide ของเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 A_2 และ A_2B ส่วนใหญ่ร้อยละ 60-80 อยู่ในตำแหน่งที่จับยาก[14,15]

ผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงแสดงให้เห็นว่า Monoclonal anti-A ($3C_4$) เหมาะที่จะนำมาแทนโคลนเก่าเพื่อผลิตจำหน่ายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. *Majdic O, Knapp W, Vetterlein M, et al. Hybridomas secreting monoclonal antibodies to human group A erythrocytes. Immunobiology 1979;156:226-7.*
2. *Voak D, Sack S, Alderson T, et al. Monoclonal anti-A from a hybrid myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. Vox sang 1980;39:134-40.*
3. *Sack S, Lennox E. Monoclonal anti-B as a new blood typing reagent. Vox sang 1981;40;99-104.*
4. *Voak D, Lennox E, Sack S, Milstien C, Darnborough J. Monoclonal anti-A and anti-B: development as cost-effective reagent. Med Lab Sci 1982;329:109-22.*
5. *สร้อยสอางค์ พิกุลสด รัชนี พลเขียร กัญญ์ชลา อุทิศ ประภาศรี แก้วกิติโรจน์ อุดม ติ่งต้อย จินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดย*

การใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: II การศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บี ชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีเปรียบเทียบกับน้ำยาชนิดโมโนโคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัลของศูนย์ฯ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1992;2: 295-302.

6. *สร้อยสอางค์ พิกุลสด รัชนี พลเฑียร ประภาศรี แก้วกิติโรจน์ กัญญ์ชลา อุทิศ อุดม ติ่งต้อย จินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอ โดยการใช้เทคนิคไฮบริโดมาของศูนย์บริการโลหิตฯ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1992;2:373-81.*
7. *สร้อยสอางค์ พิกุลสด รัชนี พลเฑียร กัญญ์ชลา อุทิศ จินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: I การเปรียบเทียบการกระตุ้นหนูทดลองในการผลิตแอนติ-บี ด้วยปริมาณและชนิดของแอนติเจนต่างๆ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1991;1:299-307.*
8. *อุดม ติ่งต้อย ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช รัชนี พลเฑียร การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัล Anti-A1 ของศูนย์บริการโลหิตฯ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2001;11:21-8.*
9. *Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2005: 761-4.*
10. *Oriol R, Samuelsson BE, Messeter L. ABO Antibodies serological behaviour and Immnuno-chemical characterization. J Immunogenetics 1990;17;279-99.*
11. *Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2005:752-3.*
12. *Mcgowan A, Tod A, Chirnside A, etal. Stability of murine monoclonal anti-A, anti-B, anti-AB ABO grouping reagent and a muti-centre evaluation of their performance in routine use. Vox Sang. 1989;56:122-30.*
13. *Messeter L, Brodin T, Chester MA, Low B, Lundblad A. Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities; some superior to human polyclonal ABO reagents. Vox sag 1984;46:185-94.*
14. *Lubenko A, Ivanyi J. Epitope specificity of blood-group-A-reactive murine monoclonal antibodies. Vox Sang 1986;51:136-42.*
15. *Lubenko A, Savage J. Analysis of the heterogeneity of the binding site specificities of hyperimmune human anti-A and -A, B sera: the application of competition assays using murine monoclonal antibodies. Vox Sang 1989;57:254-60.*

Development of Monoclonal anti-A Production of National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Udom Tingtoy, Suwit Phonimit, Atchara Siripongsanusit,

Sarika Makechay and Tasanee Sakuldamrongpanich

Antiserum and Standard Cells Preparation Section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok

---

Abstract : *The objective of this study is to develop anti-A by using hybridoma technique. The mouse myeloma cells (653) and spleen cells from Balb/C were immunized with 20% A cells, obtaining clone* $3C_4$ *secreting monoclonal anti-A mixture. Reaction comparison using old monoclonal anti-A (NBC), and commercial monoclonal anti-A in terms of potency, specificity, avidity and stability were established. It was found that new monoclonal anti-A (*$3C_4$*) was better than the old monoclonal anti-A (NBC) and was competitive with commercial monoclonal anti-A in terms of efficacy of avidity about 1-2 second, and 100% in specificity. It was no significant difference with* A_1, A_2, A_1B *and* A_2B *cells test in avidity. The results showed positive to* A_1, A_2, A_3, A_1B, A_2B *and* A_3B *cells test but negative to blood group B and blood group O test. Inclusively, the manufacturing cost was lower than that of monoclonal anti-A (NBC) of about 26.49 percent, and monoclonal anti-A (*$3C_4$*) reagent is stable for over 18 month at* $4^{\circ}C$*. Therefore, the products could be utilized as a routine use in blood group testing.*

Key Words : ● *Monoclonal anti-A*

Thai J Hematol Transf Med 2008;18:11-9.