J Med Biosci Vol. 3 No. 2 July - December 2021;89-96 DOI: 10.14456/J Med Biosci.2021.XX

Original article

Characteristics of murine monoclonal anti-H produced by hybridoma technique from 5A9 clone of the National Blood Center, Thai Red Cross Society

Kanjana Aiemumporn*, Sompong Boonhai, Patinya Haewpetch, Udom Tingtoy

Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, The National Blood Center, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: H substance is necessary for production of A and B antigens in A and B blood group. However, H antigen deficiency such as Bombay phenotype (O_h), no H antigen presented on red cell surface results in no A or B antigen. People who carry Bombay phenotype can produce natural occurring anti-H in their serum. Thus, O_h recipient can receive only O_h blood transfusion. Anti-H reagent was applied to discriminate O_h from common O blood group.

Objectives: To study the characteristics of murine monoclonal anti-H from cell line 5A9 produced by hybridoma technique of the National Blood Center, Thai Red Cross Society.

Methods: The NBC: anti-H (murine MoAb) produced from cell line 5A9 was tested for potency, specificity and antibody stability compared with 2 murine monoclonal anti-H {Japan: anti-H (murine MoAb), Alba: anti-H (murine MoAb)} and NBC: anti-H (lectin) of the National Blood Center, Thai Red Cross Society.

Results: The specificity of three murine monoclonal anti-H and one of anti-H (lectin) showed the similar results but it was found that the antibody potency of NBC: anti-H (murine MoAb) from cell line 5A9 showed the highest at a titer of 1,024 with a total score of 109.

Conclusion: NBC: anti-H (murine MoAb) from cell line 5A9 of the National Blood Center, Thai Red Cross Society is qualified to be used in the production of murine monoclonal anti-H for the detection of H antigen in both patients and blood donors.

Keywords: Murine monoclonal antibody, anti-H, MoAb.

***Correspondence to: Kanjana Aiemumporn,** Antiserum and standard cells preparation section, National Blood Center, The Thai Red Cross Society,
Bangkok 10330, Thailand.
Received: July 15, 2021
Revised: August 3, 2021
Accepted: September 21, 2021

นิพนธ์ต้นฉบับ

คุณลักษณะของ murine monoclonal anti-H จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ที่ผลิตโดย hybridoma technique ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

กาญจนา เอี่ยมอัมพร*, สมพงศ์ บุญให้, ปฏิญญา แห้วเพชร, อุดม ติ่งต้อย

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัม ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

เหตุผลของการทำวิจัย: สารหมู่เลือด H มีความสำคัญในการสร้าง แอนติเจน A และ B ในหมู่เลือด A และ B การขาดสารหมู่เลือด H เช่นใน Bombay phenotype (O) จะไม่แสดงแอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้ตรวจไม่พบแอนติเจน A และ B ด้วยเช่นกัน ผู้ที่มี O_h สามารถสร้าง anti-H ได้เองตามธรรมชาติ และเมื่อต้องการรับเลือด จะให้เลือดที่เป็น O_h เท่านั้น Anti-H ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อให้ใช้ตรวจแยกระหว่าง O_h และ O ปกติ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาคุณลักษณะของ anti-H จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ที่ผลิตโดย murine monoclonal hybridoma technique ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (NBC: anti-H (murine MoAb)

วิธีการทำวิจัย: นำ NBC: anti-H (murine MoAb) มาทดสอบความแรง ความจำเพาะ และความคงทนของแอนติบอดี เทียบกับ murine monoclonal anti-H จำนวน 2 ตัวอย่างได้แก่ Japan: anti-H (murine MoAb) และ Alba: anti-H (murine MoAb) รวมทั้ง NBC: anti-H (lectin) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ผลการศึกษา: ความจำเพาะของ anti-H (murine MoAb) จำนวน 3 ตัวอย่าง และ anti-H (lectin) จำนวน 1 ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่า NBC: anti-H (murine Moab) ที่ผลิตจากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 มีความแรงสูงสุดที่ 1,024 คะแนนรวม 109

สรุป: NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีคุณสมบัติเหมาะสมที่นำมาใช้ผลิตเป็น murine monoclonal anti-H เพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจน H ทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต

คำสำคัญ: Murine monoclonal antibody, anti-H, MoAb.

หมู่เลือด ABO เป็นระบบหมู่เลือดที่มีความสำคัญที่สุดถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2443 โดย Lansteiner K.[1] บนผิวเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A มีแอนติเจน A หมู่ B มีแอนติเจน B หมู่ AB มีแอนติเจน A และ B ส่วนหมู่ O ไม่มีแอนติเจน A และ B ในซีรัมของคนเหล่านี้จะมีแอนติบอดีที่ตนเองไม่มี ซึ่งแอนติบอดีในระบบ ABO เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (naturally occurring antibodies) โดยไม่ได้รับการกระตุ้น[2] แอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของหมู่เลือดระบบนี้มีแอนติเจนพื้นฐาน คือแอนติเจน H ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลเอ็นอะซิติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine; GlcNAc) จับอยู่กับน้ำตาลกาแล็คโตส (galactose) ด้วยพันธะ $\beta_{1,3}$ จากแอนติเจน h หากมีน้ำตาลฟูโคส (fucose) เพิ่มขึ้นมาจับกับน้ำตาลกาแล็คโตสที่ตำแหน่ง nonreducing end (พันธะ $\alpha_{1,2}$) เป็นการปรับเปลี่ยนแอนติเจน h เป็นแอนติเจน H เฉพาะหมู่เลือด O มีแอนติเจน H ส่วนหมู่เลือดอื่น ๆ นั้นมีการเติมหมู่น้ำตาลชนิดต่าง ๆ บนแอนติเจน H อีกทำให้ได้แอนติเจนบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป การแสดงออกของหมู่เลือด ABO มียีนที่ควบคุมการสร้างสาร ABO ประกอบด้วย ยีน 3 ชุดที่เป็นอิสระต่อกัน คือ ยีน ABO ที่อยู่บนโครโมโซม ยีน *9q34 FUT1* ยีน H และยีน Se (secretor) ซึ่งอยู่ใกล้กันบนโครโมโซม *19q13.3 FUT2* โดยมียีน *A, B, H* และ *Se* เป็นยีนเด่น (dominant gene) ส่วนยีน *oh* และ *se* เป็นยีนด้อย (recessive gene) ซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามกฎของ Mendel โดยมียีน *Hh* ควบคุมโดยยีน *FUT1* สร้างเอนไซม์ฟูโคซิลทรานสเฟอเรส (fucosyl transferase) ทำหน้าที่เติมน้ำตาลฟูโคสลง บนสายโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่ 2 (type 2 chain oligo saccharides) ที่อยู่บนไกลโคโปรตีน (glycoproteins) และไกลโคลิปิด (glycolipids) ซึ่งจะมีผลทำให้สร้างแอนติเจน H บนผิวเซลล์ ในขณะที่ยีน *Se* ที่ควบคุมโดยยีน *FUT2* ผลิตเอนไซม์ฟูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่เติมน้ำตาลในสายโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่ 1 (type 1 chain oligosaccharides) เกิดเป็นแอนติเจน H ในน้ำคัดหลั่งของร่างกาย แอนติเจนหรือสาร H นี้เป็นสารต้นกำเนิดของการสร้าง แอนติเจน A และ B โดยยีน *ABO* [3 - 5] และในสารคัดหลั่งจะถูกเปลี่ยนเป็นแอนติเจน A หรือ B ด้วยเอนไซม์ A หรือ B ทรานสเฟอเรส ขึ้นอยู่กับว่ามียีน A หรือ B [6 - 9] ปริมาณของแอนติเจน H ใน RBCs จะพบในหมู่เลือด O มากที่สุด และมีปริมาณน้อยกว่าในหมู่เลือด A และ B (O> A2> B> A2B> A1> A1B) เนื่องจากแอนติเจน H เปลี่ยนเป็นแอนติเจน A และ B สำหรับ Bombay Phenotype (O_h) เป็นเลือดที่หายากพบในปี พ.ศ. 2495 โดย Dipta TF. และคณะ ที่เมือง Bombay ประเทศอินเดีย ซึ่งพบได้ 1: 10,000 คนในอินเดีย และ 1: 250,000 คนในยุโรป [10] Bombay Phenotype (O_h) จะไม่มีแอนติเจน A, B และ H บนผิวเม็ดเลือดแดงและสารคัดหลั่ง ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดยีน *H (hh)* และ ยีน *Secretor (sese)*[1] เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *FUT1*, *FUT2* กลายเป็น homozygous nonfunctional H gene *(hh)* และ nonfunctional secretor gene *(sese)* จึงไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ fucosyltransferase ที่ใช้ในการผลิตแอนติเจน H ชนิดที่ 2 และ 1 ดังนั้นเม็ดเลือดแดงของ Bombay phenotype จึงไม่มีแอนติเจน A B H และมี natural occurring anti-A, anti-B และ anti-H ในซีรัม โดยที่ในสารคัดหลั่ง เช่น น้ำลายก็ตรวจไม่พบแอนติเจน A B H เช่นกัน [1, 12] ในซีรัมพบ anti-H ที่เป็นชนิด IgM+IgG มีปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 - 37°C ซึ่งสามารถกระตุ้น complement เมื่อทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O ปกติ ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย (acute hemolytic transfusion reaction) ซึ่งมีความรุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นจึงต้องรับเลือดหมู่ O_h เหมือนกันเท่านั้น[13] ส่วน Para-Bombay phenotype ลักษณะ คือ H deficient secretor หมายถึง ไม่พบการแสดงออกของ ยีน *H* จะ มียีน *hh* ซึ่งไม่สามารถสร้างเอนไซม์ L-fucosyltransferase ได้ จึงไม่สามารถสร้างแอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดงได้ ทำให้การตรวจ cell grouping ให้ผลเป็นลบ อย่างไรก็ตามในกรณีพบปฏิกิริยาแบบอ่อน ๆ กับ anti-A หรือ anti-B เกิดจากการมี passive adsorption ของแอนติเจน A หรือ แอนติเจน B ในสารคัดหลั่งมาเกาะอยู่ที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง [3, 4, 7] นอกจากนี้ยังอาจพบ para-Bombay phenotype ที่เป็น H-partially deficient non-secretor ซึ่งมีแอนติเจน H ชนิดที่ 2 ปริมาณน้อย ๆ บนเม็ดเลือดแดง แต่ไม่พบแอนติเจน H ชนิดที่ 1 ในสารคัดหลั่ง [4, 12] อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบแอนติเจน A หรือ B จำนวนเล็กน้อยบนผิวเม็ดเลือดแดง แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วย anti-H lectin *(Ulex europaeus)* และ monoclonal anti-H เนื่องจากไม่มี H antigen บน RBCs [4, 14] ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้มีการตรวจหาเลือดบริจาคที่เป็น Para-Bombay phenotype ให้แก่ผู้ป่วยที่ต้องการรับเลือดจึงได้มีการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-H (lectin) จากสารสกัดของเมล็ด *Ulex europaeus* [15] ใช้มาอย่างยาวนาน ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด

ซับซ้อน อีกทั้งไม่สามารถจัดหาเมล็ดพืชชนิดนี้ให้เพียงพอต่อปริมาณความต้องการ ดังนั้นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงได้พัฒนาการผลิต anti-H ด้วยวิธี hybridoma technique ชนิด murine monoclonal antibody เพื่อนำมาใช้ทดแทน anti-H ที่เตรียมจาก lectin

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของ anti-H จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ที่ผลิตโดย murine monoclonal hybridoma technique ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (เลขที่)

วัสดุ

1. Anti-H supernatant ของเซลล์สายพันธุ์ 5A9 (murine MoAb) ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนู Balb/c ด้วยเม็ดเลือดแดงหมู่ O เพื่อให้สร้างแอนติบอดี นำเซลล์ม้าม (spleen cells) ของหนู Balb/c มาเชื่อมกับเซลล์ myeloma ของหนู (X63.A9-8.653) และคัดเลือกเซลล์เซลล์เดี่ยว (monoclone) ที่สร้าง anti-H มาเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณ และเก็บ supernatant เตรียมเป็น NBC: anti-H (murine MoAb) เพื่อนำมาใช้ทดสอบ
2. Japan: anti-H (murine MoAb) จากสภากาชาดญี่ปุ่น
3. Alba: anti-H (murine MoAb) จากบริษัท Alba bioscience
4. NBC: anti-H (lectin) จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่เตรียมจาก *Ulex europaeus*

วิธีการ

1. การทดสอบความแรงของ NBC: anti-H (murine MoAb)

นำ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 มาทดสอบในหลอดทดลอง โดยเจือจาง NBC: Anti-H แบบ serial two-fold dilution ด้วย 1% bovine serum albumin (BSA)ใน Phosphate-buffered saline (PBS) นำแต่ละ dilution มา 100 ไมโครลิตรทดสอบกับเซลล์หมู่ O จำนวน 2 ราย ที่ล้างและ pool รวมกัน เตรียมเป็น 2% cell suspension ใน normal saline หลอดละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (22 - 24°C) นาน 5 นาที ปั่นอ่านผลที่ ความเร็วรอบ 1,000 x g นาน 15 วินาที บันทึกผลความแรงเป็นคะแนน (score) [15] ทำเปรียบเทียบกับ Japan: anti-H (murine MoAb) ของสภากาชาดญี่ปุ่น บริษัท Alba: anti-H (murine MoAb) และ NBC: anti-H (lectin) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

2. การทดสอบความจำเพาะ

2.1 ทดสอบความจำเพาะของ NBC: anti-H (murine MoAb)จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 กับแอนติเจน H โดย นำ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 มาดูดซับ ด้วย synthetic carbohydrate (synsorb) ที่มีความจำเพาะกับ H type 1,H type 2, 1H, 2H, 3H, 4H และ diH จากนั้นนำ NBC: anti-H (murine MoAb) ที่ถูกดูดซับแล้วมาทดสอบกับเม็ดเลือดแดงหมู่ O โดยมี anti-H จากเซลล์สายพันธ์ CBC-426 (anti-H type 2) เป็น control

2.2 ทดสอบความจำเพาะของ NBC: anti-H (murine MoAb)จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 กับเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

โดยเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 3% cell suspension นำมา 1 หยด ทดสอบกับ anti-H จำนวนชนิดละ 1 - 2 หยด ตามคำแนะนำของแต่ละบริษัท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (22 - 24°C) นาน 5 นาที ปั่นอ่านผลที่ความเร็วรอบ 1,000 x g นาน 15 วินาที บันทึกผลความแรงเป็นระดับปฏิกิริยา (0, 1+, 2+, 3+ และ 4+) ทำเปรียบเทียบกับ Japan: anti-H (murine MoAb) ของสภากาชาดญี่ปุ่น บริษัท Alba:anti-H (murine MoAb) และ NBC: anti-H (lectin) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ

3. การทดสอบน้ำลาย (saliva test)[16]

เจือจาง anti-H ที่ต้องการทดสอบและคัดลือก dilution ที่ให้ผล 2+ เมื่อทดสอบกับเซลล์ หมู่ O หยดลงในหลอดทดลองที่ label แล้ว จำนวน 3 หลอดหลอดละ 1 หยด จากนั้นเติมน้ำลายที่ทราบแล้วว่าเป็น secretor และ nonsecretor จำนวนหลอดละ 1 หยด ตามลำดับ หลอดสุดท้ายเติม น้ำเกลือ 1 หยด ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วเติม 3% O cells จำนวน 1 หยด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 - 60 นาที ปั่นอ่านผลที่ความเร็วรอบ 1,000 x g นาน 15 วินาที โดยดูปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

4. การทดสอบความคงทนของน้ำยา

โดยการนำ NBC: anti-H (murine MoAb) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ที่อุณหภูมิห้อง (22 - 24°C) และที่อุณหภูมิ 37°C มาทดสอบความแรงทุก ๆ 4 เดือนเป็นเวลา 24 เดือน โดยการเจือจางแบบ serial two-fold dilution ในสารละลาย

1% BSA ใน PBS pH 7.2 และเม็ดเลือดแดงหมู่ O ที่เตรียมเป็น 2% cell suspension ในน้ำเกลือ อย่างละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (22 - 24°C) นาน 5 นาที ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว รอบ 1000 x g นาน 15 วินาที บันทึกผลความแรงเป็นคะแนน (0 - 12)

ผลการศึกษา

NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 มีความแรงที่ 1,024 และคะแนนรวมสูงที่สุด 109 รองลงมา คือ Japan: anti-H (murine MoAb) ของสภากาชาดญี่ปุ่น บริษัท Alba: anti-H (murine MoAb) และ NBC: anti-H (lectin) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อถูกดูดซับด้วย synthetic carbohydrate (synsorb) แล้วจะให้ผลลบกับแอนติเจน H type 2 (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังตรวจพบแอนติเจน H ในหมู่โลหิต ABO ปกติเป็นบวกจำนวน 316 ราย และผลลบกับ para-bombay จำนวน 12 ราย ตรงกันกับ Japan: anti-H (murine MoAb), Alba: anti-H (murine MoAb) และ NBC: anti-H (lectin) (ตารางที่ 3) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H ในน้ำลาย เช่นเดียวกันกับ Japan: anti-H (murine MoAb) และ Alba: anti-H (murine MoAb) ส่วน NBC: Anti-H (lectin) ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H ในน้ำลาย (ตารางที่ 4) ความคงทนของ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9

เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8°C ในเดือนที่ 4 มีความแรงที่ 512 คะแนนรวม 96 และลดลงเหลือ 32 คะแนนรวม 46 ในเดือนที่ 24 และเมื่อเก็บที่ อุณหภูมิ 22 - 24°C ในเดือนที่ 4 มีความแรงที่ 256 คะแนนรวม 75 และลดลงเหลือ undiluted คะแนนรวม 6 ในเดือน ที่ 20 ขณะที่เมื่อเก็บที่ อุณหภูมิ 37 °C ในเดือน ที่ 4 มีความแรงที่ 16 คะแนนรวม 32 และลดลงเหลือ undiluted คะแนนรวม 4 ในเดือนที่ 12 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบความแรง (titer) ของ murine monoclonal anti-H และ anti-H (lectin)

Anti-H	Titer	Total score
NBC: anti-H (murine Mo Ab)	1,024	109
Japan: anti-H (murine Mo Ab)	128	86
Alba: anti-H (murine Mo Ab)	16	54
NBC: anti-H (lectin)	16	44

ตารางที่ 2. ปฏิกิริยาของ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 กับเซลล์หมู่ O หลังจากถูกดูดซับด้วย synthetic carbohydrate (synsorb)

Synthetic carbohydrate (Synsorb)		Anti-H	
Specificity	structure	5A9	CBC-426 (control)
Type 1	βGal (1 - 3) βGlcNAc-O-R	4+	4+
Type 2	βGal (1 - 4) βGlcNAc-O-R	4+	4+
1H	βGal (1 - 3) βGlcNAc-O-R (1 - 2) αFuc	4+	4+
2H	βGal (1 - 4) βGlcNAc-O-R (1 - 2) αFuc	0	0
3H	βGal (1 - 3) αGalNAc-O-R (1 - 2) αFuc	4+	4+
4H	βGal (1 - 3) βGalNAc-O-R (1 - 2) αFuc	4+	4+
diH	βGal-O-R (1 - 2) αFuc	W	W
Non-absorption	NBC: anti-H (murine Mo Ab)	4+	4+

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) ของ anti-H ระหว่าง NBC: anti-H (murine MoAb), Japan: anti-H (murine MoAb), Alba: anti-H (murine MoAb) และ NBC: anti-H (lectin) ในการตรวจ หาแอนติเจน H จากตัวอย่างเลือดหมู่ ABO และ para-bombay phenotype

Blood group	Number	NBC: anti-H (murine MoAb)	Japan: anti-H (murine MoAb)	Alba: anti-H (murine MoAb)	NBC: anti-H (lectin)
A_1	60	1 - 2+	W-1+	W-1+	W-2+
B	75	1 - 2^S+	W-1+	W-1+	W-2+
O	75	4+	4+	4+	4+
A_1B	30	1 - 2+	W-1+	W-1+	W-1+
A_2	8	2+	2+	1+	1+
A_3	23	4+	4+	4+	4+
A_2B	21	1 - 2+	W-1^S+	W-1+	W-1+
A_3B	24	1 - 3+	W-2+	W-1+	W-2+
A_{Hm}	5	0	0	0	0
B_{Hm}	3	0	0	0	0
O_{Hm}	4	0	0	0	0
Total	328	328	328	328	328

หมายเหตุ: A_{Hm} = A para-bombay, B_{Hm} = B para-bombay, O_{Hm} = O para-bombay
0 = Negative
S = Strong

ตารางที่ 4. เปรียบเทียบความสามารถในการตรวจหาสาร H ในน้ำลาย

Anti-H	Saliva		Normal Saline	Result
	Secretor	Nonsecretor		
NBC: anti-H (murine MoAb)	2+	2+	2+	ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H
Japan: anti-H (murine MoAb)	2+	2+	2+	ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H
Alba: anti-H (murine MoAb)	2+	2+	2+	ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H
NBC: anti-H (lectin)	0	2+	2+	ถูกยับยั้งด้วยสารหมู่เลือด H

ตารางที่ 5. ความคงทนของ NBC: anti-H (murine MoAb) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8°C, 22 - 24°C และ 37°C เป็นระยะเวลา 24 เดือน

Month	2 - 8°C		22 - 24°C		37 °C	
	Titer	Score	Titer	Score	Titer	Score
4	512	96	256	75	16	32
8	256	85	64	52	8	23
12	128	78	16	28	N	4
16	64	63	4	12	0	0
20	64	55	N	6	0	0
24	32	46	0	0	0	0

หมายเหตุ: N = undiluted
0 = no antibody titration

อภิปรายผล

จากการศึกษาความแรงของ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ที่ได้จาก murine monoclonal hybridoma technique พบว่ามีความแรงของแอนติบอดีที่ 1,024 มีคะแนนรวม 109 (ตารางที่ 1) ซึ่งแรงกว่าของ Japan: anti-H (murine MoAb) จากสภากาชาดญี่ปุ่น และ Alba: anti-H (murine MoAb) จากบริษัท Alba bioscience ที่ผลิตจากวิธีการเดียวกัน และแรงกว่า NBC: anti-H reagent (lectin) ที่ผลิตจากการสกัดเมล็ดพืช *Ulex europaeus* โดยมีผลความแรงที่ 128, 16 และ 16 มีคะแนนรวมเป็น 86, 54 และ 44 ตามลำดับ การผลิต NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ด้วยวิธี murine monoclonal hybridoma technique มีข้อดี คือ สามารถผลิตได้ปริมาณที่ไม่จำกัด และมีความแรงตามความต้องการได้ แต่การผลิต anti H จาก lectin มักพบว่ามีความแรงต่ำ ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดในแต่ละครั้ง และคุณภาพของเมล็ดพืชเอง ซึ่งไม่สามารถกำหนดให้มีความแรงตามความต้องการได้ อีกทั้งในปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติไม่สามารถจัดหา *Ulex europaeus* ในปริมาณมากได้ ทำให้ต้องค้นหาเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-H มาใช้ทดแทน ส่วนการศึกษาความจำเพาะ (specificity test) พบว่า anti-H ทั้ง 4 ตัวอย่างสามารถตรวจพบ แอนติเจน H ในตัวอย่างเลือด หมู่ ABO ปกติจำนวน 316 ตัวอย่าง แต่อาจมีความแรงแตกต่างกันไป ในแต่ละหมู่เลือด ซึ่งปริมาณของแอนติเจน H ใน เซลล์เม็ดเลือดแดงมีปริมาณมากที่สุดในหมู่เลือด O และรองลงมา คือ หมู่ A และ B (O> A2> B> A2B> A1> A1B) และตรวจไม่พบแอนติเจน H ใน para-bombay phenotype หมู่ ABO จำนวน 12 ตัวอย่างเช่นเดียวกัน จากการศึกษานี้ anti-H ทุกตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบหมู่เลือดที่ A B O ที่เป็น para-bombay henotype ได้ (ตารางที่ 3) เนื่องจาก Para-Bombay phenotype มียีน *hh* ซึ่งไม่สามารถสร้างแอนติเจน H ได้บนผิวเม็ดเลือดแดงได้เลย ทำให้การตรวจ cell grouping ให้ผลเป็นลบ และตรวจพบ anti-H ในซีรัมได้ แต่ปฏิกิริยาไม่แรงเท่า anti-H ในคน Bombay phenotype [17, 18] จากการตรวจหาสารหมู่เลือด H ในน้ำลายด้วยหลักการ hemagglutination inhibition [16] มีเพียง NBC: anti-H (lectin) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ เพียงตัวอย่างเดียวที่ถูกยับยั้ง (neutralized) จากสาร H ในน้ำลาย ที่เป็น secretor ได้ ในขณะที่ anti-H ที่เป็น murine MoAb ทั้ง 3 ตัวอย่างไม่ถูกยับยั้งจากสาร H ซึ่งในน้ำลาย ของคนหมู่ ABO นอกจากมียีน ABO และ ยีน *Hh* ยังมียีน *FUT2 (secretor gene)* ที่ควบคุมแสดงออกของสาร H ในสารคัดหลั่ง คนทั่วไปประมาณร้อยละ 80 จะหลั่งสาร ABH (secretor) และอีกร้อยละ 20 ไม่หลั่งสาร ABH (non-secretor) [17, 18] อีกทั้งการยืนยันผลการตรวจ จากโครงการความร่วมมือ ในการผลิต monoclonal antibody กับสภากาชาดญี่ปุ่น ที่ใช้ synthetic carbohydrate (synsorb) สรุปว่า NBC: anti-H (murine MoAb) เป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจน H type 2 ซึ่งเมื่อถูกดูดซับด้วย synsorb ที่ประกอบด้วยสารหมู่เลือด H ชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำ NBC: anti-H (murine MoAb) ที่ถูกดูดซับแล้วมาทำปฏิกิริยากับ เซลล์ O พบว่าหลอดที่ถูกดูดซับด้วยสารหมู่เลือด H type 2 ให้ผลลบเช่นเดียวกับเซลล์สายพันธุ์ CBC- 426 จากสภากาชาดญี่ปุ่น ซึ่งเป็น anti-H type 2 ที่เป็น control (ตารางที่ 2) แอนติเจน H type 2 ตรวจพบได้เฉพาะบนผิวเม็ดเลือดแดง ซึ่งควบคุมโดยยีน *FUT1* ในการผลิตเอนไซม์ฟูโคซิลทรานสเฟอเรส (fucosyl transferase) ซึ่งทำหน้าที่ เติมน้ำตาลฟูโคสลงบนสายโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่ 2 (type 2 chain oligosaccharides) ที่อยู่บนไกลโคโปรตีน (glycoproteins) และไกลโคลิปิด (glycolipids) ของเม็ดเลือดแดง สังเคราะห์เป็นแอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดง จึงแตกต่างจาก anti-H ที่เตรียมจาก lectin ซึ่งมีข้อดีที่สามารถใช้ตรวจได้ทั้งแอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดงและในสารคัดหลั่งเช่นน้ำลาย [19, 20] แต่อาจมีข้อจำกัดในการผลิต ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนการศึกษาความคงทนของ NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 พบว่ามีความคงทนของแอนติบอดี ยาวนาน ถึง 24 เดือนเมื่อเก็บที่ 2 - 8°C โดยมีความแรง (titer) 32 คะแนนรวม 46 ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานข้อกำหนดของน้ำยา anti-H (ความแรงของ anti-H กำหนดไว้ที่ 1: 8) ดังนั้น NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 เหมาะสมที่นำมาใช้ตรวจหาแอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกันกับ anti-H (murine MoAb) จากหลายแหล่งผลิต และสามารถกำหนดอายุของผลิตภัณฑ์ได้ยาวนานถึง 18 เดือนได้เช่นเดียวกันกับน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดอื่น ๆ ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย

สรุป

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต NBC: anti-H (murine MoAb) จากเซลล์สายพันธุ์ 5A9 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย มีคุณสมบัติดีกว่าและเทียบเท่า anti-H (murine MoAb) จากทั้งสองแหล่งผลิต จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหา แอนติเจน H บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Mrs. Chizu Toyoda และ Miss Sayaka Kaito จากสภากาชาดญี่ปุ่น ที่ถ่ายทอดเทคโนโลยี ในการผลิต murine and human monoclonal hybridoma technique for rare blood group reagent และขอขอบคุณคุณสาริกา เมฆฉาย ที่ให้คำปรึกษาในการทดสอบคุณสมบัติของ anti-H

เอกสารอ้างอิง

1. Westman JS, Olsson ML. ABO and other carbohydrate blood group systems. In: Funk MK, Eder AF, Spitalnik SL, Westhoff CM, editors. Technical manual 19th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks;2017.p.265-94.
2. Harmening DM, Forneris G, Tubby BJ. The ABO blood group system. In: Harmening DM, editor. Modern blood banking and transfusion practices. 6th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company;2012. p.119-48.
3. Cooling L. ABO, H, and Lewis's blood groups and structurally related antigens. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. Technical manual. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks;2014.p.291-315.
4. Daniels G. Human blood groups. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell;2013. p.11-95.
5. Fongsatikul L, Kamtorn N, Nantachit N, Thongmanee S. The para-Bombay phenotype (Hz) in a Thai family. Thai J Hematol Transf Med 1999;9:7-16.
6. Onchoysakul C. B Para-Bombay: a case report of rare blood group. J Hematol Transfus Med 2016; 26:223-6.
7. Permpikul P. Blood groups. In: Wongkrajang P, Tantanate C, Pratumvinit B, Chinswangwatanakul W, Tientadakul P, editors. Bangkok: P.A. Living; 2014. p.471-81.
8. Yashovardhan A, Chaitanya Kumar I, Sreedhar Babu K, Suresh Babu B, Verma A, Siddhartha Kumar B, et al. Para-Bombay phenotype: report of a rare blood group. J Clin Sci Res 2012;3:141-3.
9. Bhende YM, Deshpande CK, Bhatia HM, Sanger R, Race RR, Morgan WT, et al. A "new" blood group character related to the ABO system. Lancet 1952; 1:903-4.
10. Dipta TF, Hossain AZ. The Bombay blood group: are we out of risk? Mymensingh Med J 2011;20: 536-40.
11. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th ed Oxford: Blackwell Scientific Publication;1975.
12. Chapter 6, The Hh blood group. In: Dean L. Blood groups and red cell antigens [Internet]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information (US);2005. [cited 2019 May 5]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2268/
13. Jonnavithula N, Bonagiri S, Ramachandran G, Mishra R. Perioperative red cell transfusion management in a rare H-deficient (para-bombay) blood group variant. Indian J Anaesth 2013;57:78-9.
14. Harmening DM, Firestone D. The ABO blood group system. In: Harmening DM, editor. Modern blood banking and transfusion practices, 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis;1999.p.90-127.
15. Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. Transfusion 1972;12:352-3.
16. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD. Method Section 2 red cell typing. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. Technical manual 16th ed. Bethesda, American Association of Blood Banks; 2008.p.883-5
17. Gerard G, Vitrac D, Le Pendu J, Muller A, Oriol R. H-deficient blood groups (Bombay) of Reunion Island. Am J Hum Genet 1982;34:937-47.
18. Raid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigen factsbook. 3rd ed. London: Academic Press;2012.
19. Voak D, Lodge TW, Reed JV. The enhancement of *Ulex europaeus* anti-H activity by human serum. Vox Sanguinis 1969;17:134-8.
20. Gorakshakar AC, Ghosh K. Use of lectins in immunohematology. Asian J Transfus Sci 2016;10: 12-21.