

การผลิตและพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อการวินิจฉัยและรักษา
Production and development of cholangiocarcinoma specific monoclonal antibody
for diagnosis and treatment

1. คณะผู้วิจัย

รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร. ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ที่ปรึกษา Associate Professor Dr. Kazuhiko Kuwahara, Kumamoto University,
Kumamoto, Japan

2. แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ-มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการต่อเนื่อง 5 ปี ปี 2554 เป็นปีที่ 5

3. แผนงานวิจัย การพัฒนาชุดวินิจฉัยมะเร็งตับในอีสาน

ประเภทของการวิจัย การพัฒนาทดลอง (Experimental development)

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย (ผนวก 1) วิทยาศาสตร์การแพทย์ ชีวเคมีและภูมิคุ้มกันวิทยา
คำสำคัญ (keywords): cholangiocarcinoma, monoclonal antibody, tumor marker, MUC5AC, mucin

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งยังคงเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรไทยคือ 78.9 ต่อแสนคน (<http://203.157.19.19/input-bps.htm>) ในจำนวนนี้มีเพียง 50% ที่สามารถใช้วิธีผ่าตัดในการรักษาได้ อีก 50% ต้องรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียง 10% เท่านั้นที่ตอบสนองต่อยาที่รักษา อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่เสียชีวิตในเวลาอันสั้น เนื่องจากมะเร็งเป็นโรคเรื้อรังและไม่ติดต่อเหมือนโรคติดต่อ ดังนั้นความสูญเสียทั้งชีวิตและทรัพย์สินของชาติต่อปัญหาสุขภาพนี้จึงไม่ปรากฏชัดแจ้งเหมือนโรคเอดส์หรือไข้หวัดนก และไม่เห็นผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจของชาติในภาพรวม จึงไม่ได้รับความสนใจในการป้องกัน-รักษาและรับผิดชอบจากผู้บริหารประเทศเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถปฏิเสธความจริงของการสูญเสียในชีวิตและทรัพย์สินของผู้ป่วยมะเร็งและครอบครัวที่เกิดขึ้นได้

ปัญหาของมะเร็งในประเทศไทยคือการขาดการติดตามเฝ้าระวังประชากรกลุ่มเสี่ยง และการขาดการวินิจฉัยมะเร็งให้ได้ในระยะแรกซึ่งการผ่าตัดยังให้ผลดี รวมทั้งขาดการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งในผู้ป่วยที่ได้รับหรืออยู่ในระหว่างการบำบัดรักษา ทำให้อุบัติการณ์ของมะเร็งและความสูญเสียที่เกิดจากโรคนี้อยู่เป็นปัญหาอันดับแรกของประเทศ ปัญหาเหล่านี้แก้ไขได้หากมีตัววินิจฉัยที่มีความไว ความจำเพาะและความแม่นยำในการรายงานต่อแพทย์ เพื่อหาวิธีการบำบัดรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม

มะเร็งตับเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกของผู้ป่วยมะเร็งในประเทศไทย ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ มะเร็งตับ (hepatoma) และมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์

ของมะเร็งท่อน้ำดีที่สูงที่สุดในประเทศและในโลก มะเร็งท่อน้ำดีท่อน้ำดีจึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่จำเพาะและสำคัญของคนอีสานนับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้พบน้อยมากในชาวตะวันตกจึงทำให้การวิจัยและรายงานการศึกษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระดับสากลมีน้อยและมีผู้สนใจในวงจำกัด แม้ว่ารายงานระบาดวิทยาของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศตะวันตกเช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลียเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทยมีสมมุติฐานของโรคที่แตกต่างจากคนในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่นจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงในระยะเริ่มแรก และยังไม่มีการวินิจฉัยหรือการตรวจกรองที่จำเพาะต่อโรคในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจึงมักมาพบแพทย์เมื่ออาการหรือโรคได้ดำเนินถึงระยะท้ายแล้ว ซึ่งในระยะดังกล่าวมักมีการกระจายของมะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่นทั้งที่ใกล้เคียงหรือห่างไกลและเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้การบำบัดรักษาและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้ผลดีและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต นอกจากนี้ปัญหาการเกิดซ้ำของมะเร็ง (Recurrence) เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตแม้ในรายที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด ดังนั้นการวินิจฉัยโรคให้ได้อย่างจำเพาะทั้งในระยะเริ่มแรก ระยะลุกลาม และการเกิดซ้ำของมะเร็ง จึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูงในการลดความรุนแรงและความสูญเสียที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้ ปัจจุบัน ยังไม่มีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรก ระยะแพร่ลุกลามและ/หรือระยะเกิดซ้ำ การวิจัยเพื่อพัฒนาตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็งตับโดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความสำคัญและจำเป็นต่อการแก้ปัญหาสุขภาพที่เรื้อรังของภูมิภาคนี้

5. เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัยนี้ตอบสนองโดยตรงต่อยุทธศาสตร์การพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ การสร้างเสริมสุขภาวะของประชาชนให้มีคุณภาพมาตรฐาน และการเสริมสร้างความมั่นคงของชีวิตและสังคม เนื่องจากสังคมที่มั่นคงและมีสุขย่อมเกิดจาสมานชิกของสังคมที่เป็นสุข ปราศจากโรคภัยที่มีผลกระทบต่อการดำรงชีพและชีวิต ทั้งต่อตนเองหรือสมาชิกในครอบครัว การสูญเสียประชากรก่อนวัยอันควรโดยเฉพาะบุคคลที่เป็นกำลังสำคัญของครอบครัวย่อมมีผลกระทบต่อยุทธศาสตร์ชาติ และความปกติสุขของประชากร ซึ่งไม่สามารถประมาณค่าเป็นตัวเลขหรือมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ ข้อมูลจากสถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย 2542 แสดงว่าร้อยละ 35.51 ของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นคนจนและส่วนใหญ่อยู่ในภาคเกษตรกรรม (10.45 ล้านคน) (www.thaieconwatch.com/ecdata/poverty/povreg-t.htm) รายได้ประชากรของประชากรกลุ่มนี้คิดเป็น 940 บาท/คน/เดือน หากมีสมาชิกในครอบครัวป่วยเป็นมะเร็งและทำให้ไม่สามารถประกอบอาชีพได้ ย่อมหมายถึงภัยคุกคามอย่างหนักต่อเศรษฐกิจของประชากรในกลุ่มนี้ ข้อมูลผู้ป่วยในที่ป่วยด้วยมะเร็งตับและเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วง พ.ศ. 2538-2545 เฉลี่ยปีละ 1,100 ราย เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับหนึ่ง และไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลง (ดังรูป, Tumor registry, Faculty of Medicine, Khon Kaen

University, 2002) ประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยเท่านั้นที่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งค่าใช้จ่ายเฉพาะในโรงพยาบาล 40,000-260,000 บาท หรือเฉลี่ย 60,000 บาทต่อราย (ข้อมูลโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ม.ค.-มี.ค. 2548 จำนวน 23 ราย) และร้อยละ 90 ของผู้ป่วยเสียชีวิตภายใน 1 ปี ผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งได้รับการรักษาโดยยาเคมีบำบัดซึ่งมีค่าใช้จ่ายเฉลี่ย 60,000 บาทต่อราย และส่วนใหญ่ไม่สามารถบำบัดรักษาได้

จากการคำนวณประมาณการได้ว่าความสูญเสียจากการรักษามะเร็งท่อน้ำดีเฉลี่ย 66 ล้านบาท/จังหวัด และ 1,254 ล้านบาทใน 19 จังหวัดของภาคอีสาน ซึ่งยังไม่รวมถึงความสูญเสียที่เกิดกับสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย ดังนั้นการวิจัยเพื่อพัฒนาตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีให้ได้ในระยะเริ่มต้นซึ่งการผ่าตัดให้ผลดี และการวินิจฉัยเพื่อติดตามการแพร่ลุกลามและการเกิดซ้ำของมะเร็งจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยรักษาชีวิตของผู้ป่วยและเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา รวมทั้งลดการสูญเสียทั้งทรัพย์สิน ชีวิตและจิตใจของประชาชนที่ถูกคุกคามจากมะเร็งชนิดนี้ ทำให้ประชาชนมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น สังคมเข้มแข็งและประเทศที่แข็งแกร่งในอนาคต

6. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

วิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทย เพื่อการตรวจคัดกรองผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงให้ได้ในระยะแรกของมะเร็ง ผู้ป่วยที่มีการแพร่ลุกลามและการเกิดซ้ำของมะเร็ง เพื่อการรักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ



เซลล์ปกติ เช่นอัตราการแบ่งเซลล์ ระยะการมีชีวิตของเซลล์ การเคลื่อนที่ และการเจริญลุกลาม อวัยวะอื่น เป็นต้น ในขณะที่เซลล์มะเร็งก่อตัวและแพร่กระจาย จะมีการแสดงออกของยีนเพื่อสร้างโปรตีนที่ จำเป็นต่อกระบวนการเหล่านั้น โปรตีนจำเพาะเหล่านี้ถูกสร้างและหลังจากเซลล์มะเร็งซึ่งสามารถตรวจพบได้ ในกระแสโลหิตและ/หรือน้ำคั่งหลังของร่างกาย จึงเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งแบบ Noninvasive โดยการตรวจโปรตีนจำเพาะเหล่านี้ในน้ำคั่งหลัง เช่น ซีรัม, ปัสสาวะหรือน้ำดีของผู้ป่วย ซึ่งมี หลายวิธีเช่น การตรวจคุณสมบัติจำเพาะของโปรตีนนั้น หรือใช้แอนติบอดีซึ่งจับจำเพาะกับโปรตีนนั้น เป็นต้น ดังนั้นกลยุทธ์หนึ่งของแผนงานนี้คือการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของมะเร็งแต่ ไม่จับกับโปรตีนของเซลล์ปกติ

วัตถุประสงค์โครงการ (ต่อเนื่อง 5 ปี)

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้หนู Balb/c-gamp-Tg mice ซึ่งเป็นหนูที่ พัฒนาให้มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง

2. คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเฉพาะกับเนื้อเยื่อมะเร็งหรือซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

3. พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีจากซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA

7. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยและพัฒนาจากการศึกษาจะช่วยแก้ปัญหาของการขาดการตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมดังนี้

1. ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องและทำให้ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว รวมทั้งการใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดี

2. แพทย์และบุคลากรด้านการแพทย์และสาธารณสุข ในโรงพยาบาลต่าง ๆ จะใช้ผลงานที่พัฒนาแล้วในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีและใช้ในการติดตามการรักษา

3. ประชาชนกลุ่มเสี่ยง ในการเฝ้าระวังต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

4. ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ โดยการพัฒนางานวิจัยให้สะดวก ง่ายและราคาถูก ซึ่งสามารถจดสิทธิบัตรและผลิตเชิงพาณิชย์ได้

8. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่จำเพาะและสำคัญของชาวอีสาน นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้พบน้อยมากในชาวตะวันตกจึงทำให้การวิจัยและรายงานการศึกษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระดับสากลมีน้อยและมีผู้สนใจในวงจำกัด แม้ว่ารายงานระบาดวิทยาของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศตะวันตกเช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทยมีสมมุติฐานของโรคที่แตกต่างจากคนในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่น จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงในระยะเริ่มแรก และยังไม่มีการวินิจฉัยหรือการตรวจกรองที่จำเพาะต่อโรคในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจึงมักมาพบแพทย์เมื่ออาการหรือโรคได้ดำเนินถึงระยะท้ายแล้ว ซึ่งในระยะดังกล่าวมักมีการกระจายของมะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่นทั้งที่ใกล้เคียงหรือห่างไกล และเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้การบำบัดรักษาและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้ผลดี และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ดังนั้นการการวินิจฉัยโรคให้ได้อย่างจำเพาะในระยะเริ่มแรกและการป้องกันการแพร่ลุกลามของมะเร็ง จึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูงในการลดความรุนแรงและความสูญเสียที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้

ปัจจุบัน ยังไม่มีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรก และ/หรือระยะแพร่ลุกลาม คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาไมวซิน MUC5AC ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลที่สร้างและหลั่งจากเนื้อเยื่อมะเร็งและตรวจพบได้ในซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Electrophoresis ร่วมกับ immunoblotting วิธี

ดังกล่าวสามารถใช้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้ดี เนื่องจากสามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากมะเร็งตับและมะเร็งในระบบทางเดินอาหารได้สูงถึง 97% แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อมิวซิน MUC5AC ทำให้มีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์สูง ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อมิวซิน MUC5AC และ/หรือแอนติเจนอื่นที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งคาดว่าจะได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยและรักษามะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะในอนาคต

Tumor marker หรือตัวบ่งชี้ชีวภาพของภาวะมะเร็งมีประโยชน์ในการตรวจคัดกรอง (screening) ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งหรือผู้ที่สงสัยว่าเป็นมะเร็ง และใช้เป็นตัวสนับสนุนหรือเสริมการวินิจฉัย ช่วยทำนายหรือพยากรณ์การดำเนินโรค รวมทั้งช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับการดำเนินโรคของผู้ป่วย แม้ว่าปัจจุบันการศึกษาวินิจฉัยเพื่อค้นหา tumor marker จะก้าวรุดหน้าอย่างมาก แต่ tumor marker ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจคัดกรองหรือบ่งชี้การเป็นมะเร็งในระยะแรกได้ อย่างไรก็ตาม tumor marker ก็ยังมีประโยชน์อย่างมากทางคลินิก โดยเฉพาะในการเฝ้าระวังการเกิดซ้ำและบ่งชี้การแพร่กระจายของมะเร็ง รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลประกอบสำหรับแพทย์ในการเลือกการรักษาเฉพาะราย

การวิจัย tumor marker ในระยะหลังจากทราปรายละเอียดของจีโนมมนุษย์ (post-genome era) มีความก้าวหน้าอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้เทคนิค high throughput ซึ่งสามารถให้ข้อมูลจำนวนมากในหลักพันถึงหมื่นในการศึกษาแต่ละครั้ง มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของจีนในมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เทคนิค Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) และ cDNA Microarray¹ เพื่อค้นหาจีนที่เกี่ยวข้องหรือมีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง หรือมีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อนำมาใช้เป็น tumor marker ต่อไป แม้ว่ามะเร็งท่อน้ำดีจะมีอุบัติการณ์สูงในประเทศแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบน้อยมากในประเทศตะวันตก แต่ในระยะสิบปีที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับยกเว้นประเทศญี่ปุ่น² และรายงานการศึกษามะเร็งท่อน้ำดีในวารสารนานาชาติก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับ tumor marker ของมะเร็งท่อน้ำดีพบว่ามีข้อมูลใหม่น้อยมาก ดังนั้นข้อมูลส่วนใหญ่ในรายงานนี้จึงมาจากการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยและเน้นเฉพาะ tumor marker ที่ตรวจพบได้ในซีรัมเท่านั้น

Carcinoembryonic antigen (CEA) และ **carbohydrate antigen (CA) 19-9** เป็น tumor marker ที่ใช้มากในการเสริมการวินิจฉัย ติดตาม และพยากรณ์การดำเนินโรคของมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี แต่ tumor marker ทั้งสองไม่ใช่ marker ที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี เพราะนอกจากสามารถตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่นแล้ว ยังพบมากในผู้ป่วยอื่นที่มีภาวะอักเสบหรือพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี ถุงน้ำดีและตับอ่อน

CEA เป็นไกลโคโปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน ตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยที่มีการอักเสบของท่อน้ำดี ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับอ่อนและมะเร็งท่อน้ำดี ส่วน CA19-9 เป็น Lewis blood group epitope ของ glycosphingolipid ในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุของระบบทางเดินอาหาร แต่ในซีรัมพบ epitope นี้ในโมเลกุลของมิวซินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนของเยื่อเมือก CA19-9 ไม่ใช่แอนติเจนของมะเร็งแต่เป็น

แอนติเจนที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากพบได้ในเซลล์ปกติของเซลล์เยื่อบุหลายชนิด เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ ท่อน้ำดี ตับอ่อนและต่อมน้ำลาย เนื้อเยื่อเหล่านี้มีการสร้าง epitope นี้มากขึ้นเมื่อเป็นมะเร็ง จึงนิยมใช้ CA19-9 เป็น marker ของมะเร็งกระเพาะอาหาร-ลำไส้ มะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับอ่อน

สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี CEA และ CA19-9 เป็น tumor marker ที่มีการศึกษามากที่สุด การใช้ระดับซีรัม CA19-9 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี ให้ค่าความไวแตกต่างกันในแต่ละรายงานตั้งแต่ 57.1%³, 73%⁴, และ 86%⁵ เนื่องจากระดับ CA19-9 ในเลือดจะสูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของตับอ่อน ตับและท่อน้ำดี เช่น นิ่วในท่อน้ำดี (CA1), ท่อน้ำดีอักเสบ⁶ และภาวะท่อน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน⁷ ดังนั้นการใช้ CA19-9 เป็นตัวบ่งชี้ภาวะมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามในรายที่ผู้ป่วยมีระดับ CA19-9 ในซีรัมสูงมากและเป็นระยะเวลานาน ร่วมกับประวัติและลักษณะทางคลินิกที่บ่งชี้การเป็นมะเร็งท่อน้ำดี CA19-9 ก็ยังคงเป็น marker ที่ดีในการสนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้

รายงานวิจัยการใช้ CEA และ CA19-9 ในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศจีนจำนวน 35 ราย เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี 92 รายและคนปกติ 15 ราย พบว่าระดับซีรัม CEA และ CA19-9 สามารถใช้จำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยให้ค่าความไว 68% และ 66% ค่าความจำเพาะ 81% และ 88% ตามลำดับ และถ้าใช้ marker ทั้งสองร่วมกันจะให้ค่าความไว 62% และความจำเพาะ 86%⁸

Pungpak และคณะ[3] รายงานการใช้ซีรัม CA19-9 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยไทย พบว่า 57% ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับซีรัม CA19-9 สูงกว่า 3SD ของค่าปกติ การศึกษา CA19-9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า 60% ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมี CA19-9 เพิ่มขึ้นและสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทางหลอดเลือดและสามารถใช้พยากรณ์โรคได้⁹

คณะผู้วิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น ได้วิจัยเพื่อหา tumor marker ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย โดยใช้หลักการที่แตกต่างกัน ดังนี้

Soybean agglutinin specific biliary glycoprotein (SBG) เป็นไกลโคโปรตีนที่ตรวจพบได้ในซีรัม มีน้ำหนักโมเลกุล 57 กิโลดาลตัน มีหมู่น้ำตาล galactose และ N-acetylgalactosamine เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถจับจำเพาะกับ soybean agglutinin (SBA) ได้ การใช้วิธี western blotting ร่วมกับ SBA ในตรวจสอบ SBG ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ พบว่าการใช้ SBG เป็น marker ให้ค่าความจำเพาะต่อการเกิดพยาธิสภาพของท่อน้ำดีถึง 100%¹⁰ โดยให้ค่าความไวในการบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีสูงถึง 93% อย่างไรก็ตาม SBG ไม่ใช่ marker ที่ดีของมะเร็งท่อน้ำดีเพราะสามารถตรวจพบในซีรัมผู้ป่วยที่มีการอักเสบของท่อน้ำดีถึง 84% ดังนั้นจึงอาจพิจารณาการใช้ marker นี้ในการคัดกรองเพื่อหากลุ่มคนที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้

Total sialic acid sialic acid เป็นหมู่น้ำตาลที่พบในส่วนปลายของสายโมเลกุล มีรายงานการเพิ่มสูงขึ้นของระดับ sialic acid ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด การวัดปริมาณ sialic acid โดยวิธีเคมีในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ โดยใช้ค่า cut-off ที่ 2.33 mmol/L สามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากคนปกติและผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีได้ด้วย ความไว 71.9% และค่าทำนายผลบวกสูงถึง 89%¹¹ ค่าระดับ Total sialic acid ในซีรัมมีความสัมพันธ์อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับมิวซินชนิด MUC5AC, alkaline phosphatase และ CA19-9 ในซีรัมของผู้ป่วย¹² Kongtawelert และคณะ¹³ ใช้ระดับ total sialic acid ในซีรัม (1.75 mmol/L) ในการแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยมะเร็งตับและผู้ป่วยโรคตับอื่น ๆ โดยให้ค่าความไวและความจำเพาะ 82% และ 83% ตามลำดับ การวัดระดับ sialic acid ในซีรัมเป็นวิธีที่ง่าย ๆ ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือหรือน้ำยาที่มีราคาแพง จึงอาจใช้เป็นตัวคัดกรองเบื้องต้นในสถานพยาบาลที่ยังไม่มีเครื่องมือหรืองบประมาณรองรับ

มิวซิน (mucin) MUC5AC มิวซินเป็นไกลโคโปรตีนที่พบในเมือก (mucous) ซึ่งสร้างจากเซลล์เยื่อบุของระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร และระบบท่อน้ำดี มิวซินมีหลายชนิด ชนิดที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีคือ MUC1 และ MUC5AC การศึกษามิวซินชนิด MUC5AC โดย immunohistochemistry ไม่พบมิวซินชนิดนี้ในเยื่อบุท่อน้ำดีปกติแต่พบปริมาณมากในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี การตรวจหามิวซิน MUC5AC โดยวิธี agarose gel electrophoresis และ immunoblotting ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ บ่งชี้ว่า การตรวจมิวซินดังกล่าวสามารถใช้เป็น marker ของมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยให้ค่าความจำเพาะสูงถึง 97% และค่าความไว 63% ตรวจพบมิวซินชนิดนี้ในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีและผู้ป่วยมะเร็งอื่นเพียง 6% และตรวจไม่พบเลยในคนปกติและคนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ¹⁴ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบมิวซิน MUC5AC ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง ระยะท้ายของมะเร็งและใช้พยากรณ์โรคได้¹⁵ ดังนั้นซีรัม MUC5AC จึงเป็น marker ของมะเร็งท่อน้ำดีที่เป็นความหวังใหม่ในการเสริมการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้เป็นอย่างดี

Biliary alkaline phosphatase ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ตับและท่อน้ำดีมักมี alkaline phosphatase ในซีรัมสูงกว่าปกติ แต่ระดับของเอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถใช้วินิจฉัยแยกกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองได้ การตรวจ isoform ของเอนไซม์ดังกล่าวโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis¹⁶ พบว่า isoform ที่มีขนาดใหญ่และเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า liver isoform ที่เรียกว่า Biliary alkaline phosphatase พบมากในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีถึง 65% โดยไม่ขึ้นกับระดับบิลิรูบิน และให้ค่าความไวในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีภาวะเหลืองถึง 85% ความจำเพาะ 79% การวิเคราะห์ทำได้ง่ายและราคาถูกกว่าการตรวจ CEA หรือ CA19-9 การตรวจ Biliary alkaline phosphatase จึงเป็น marker ที่น่าสนใจในการใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน

โดยสรุป tumor marker ที่ใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบัน ให้ค่าความไวที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 55-70% และความจำเพาะ 70-95% โดยการตรวจระดับซีรัม MUC5AC ให้ค่าความจำเพาะสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการตรวจหาซีรัม MUC5AC ในรายงานวิจัยดังกล่าวใช้ antibody ที่จัดซื้อจากบริษัทต่างชาติและใช้วิธี western blotting ร่วมกับ electrochemiluminescence ซึ่งมีวิธีที่ยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีตรวจวัดในห้องปฏิบัติการชันสูตรในโรงพยาบาลทั่วไป การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อมิวซิน MUC5AC หรือโมเลกุลที่สร้างและจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีจะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในซีรัมได้ ซึ่งหากมีการพัฒนาต่อไปเป็นวิธี ELISA หรือวิธีอื่นที่สามารถดำเนินการได้ง่าย สะดวก และราคาถูก จะทำให้การตรวจซีรัม MUC5AC หรือ

โมเลกุลที่สร้างและจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีที่มีศักยภาพมากในอนาคตอันใกล้ โดยเฉพาะในสถานพยาบาลที่ยังขาดเครื่องมือหรืออุปกรณ์ราคาแพงในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี

9. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะคัดเลือกเฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยไม่มีหรือมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติต่ำ และสามารถจำแนกซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากซีรัมคนปกติได้เพื่อพัฒนาเป็นตัวตรวจวินิจฉัยโดยวิธี ELISA ต่อไป

10. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตลอดโครงการ 5 ปีโดยแบ่งเป็น 2 Phase

Phase 1 ใช้เวลา 2 ปี

ปีที่ 1 (2550) ผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชุดที่ 1

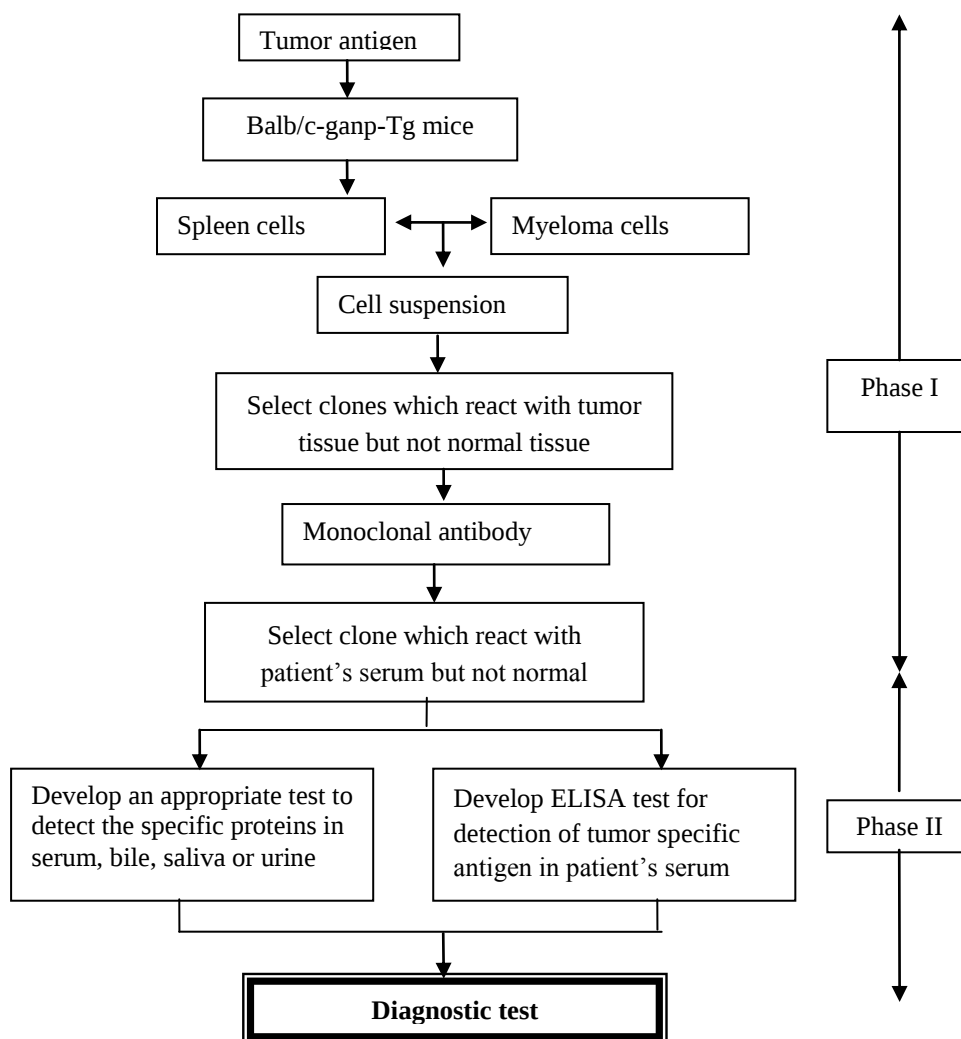
ปีที่ 2 (2551) ผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชุดที่ 2 และคัดเลือกโคลนให้บริสุทธิ์

Phase 2 ใช้เวลา 3 ปี

ปีที่ 3 (2552) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติเจน

ปีที่ 4-5 (2553-54) พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

11. ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



12. วัตถุประสงค์ของโครงการในปีงบประมาณ 2554

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพต่าง ๆ ของแอนติเจนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดได้ดังนี้

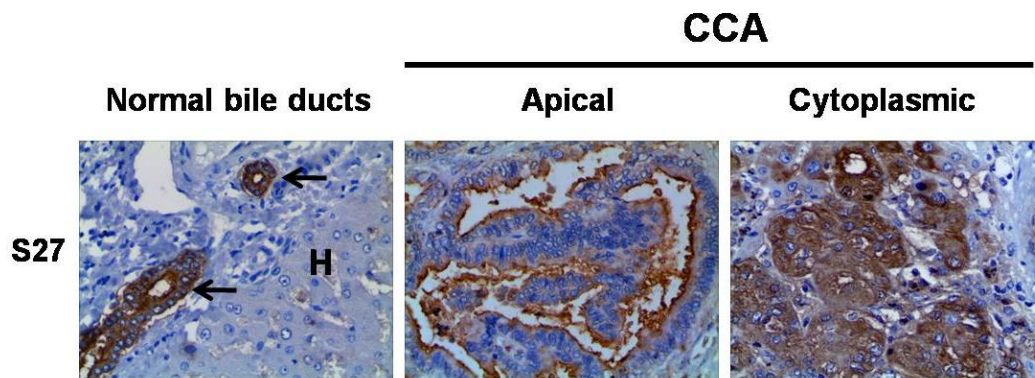
- ศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
- พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีจากซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA
- ศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

13. วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

13.1 การศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ที่ผลิตได้ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 45 รายที่มีผลทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อแล้วว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีจากฐานข้อมูลชีวภาพของศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ทำการทดสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการปรับความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ second antibody รวมทั้งระบบบัฟเฟอร์

และระบบการ retrieve antigen เพื่อให้ได้ภาวะที่ดีที่สุดในการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดี ก่อนทำการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป ซึ่งจากการย้อมชิ้นเนื้อผู้ป่วยจำนวน 45 รายพบ การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สูงในเยื่อหุ้มท่อทางเดินน้ำดีทั้งที่เป็นมะเร็งและท่อทางเดินน้ำดีปกติ แต่ไม่พบการแสดงออกในเซลล์ตับ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะพบการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะสูงในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเกือบทุกราย คิดเป็นร้อยละ 93 (42 ใน 45 ราย) แสดงถึงความจำเพาะและความสำคัญของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ต่อท่อทางเดินน้ำดี



รูปที่ 1 แสดงการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ที่ผลิตได้ โดยไม่พบการติดสีในเซลล์ตับ (H) แต่พบการติดสีที่ท่อทางเดินน้ำดีปกติ (ลูกศรชี้) และ ที่เป็นมะเร็ง ซึ่งในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีพบรูปแบบการติดสีที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย โดยแบ่งเป็น apical staining และ cytoplasmic staining แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซลล์ท่อน้ำดี นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความจำเพาะ

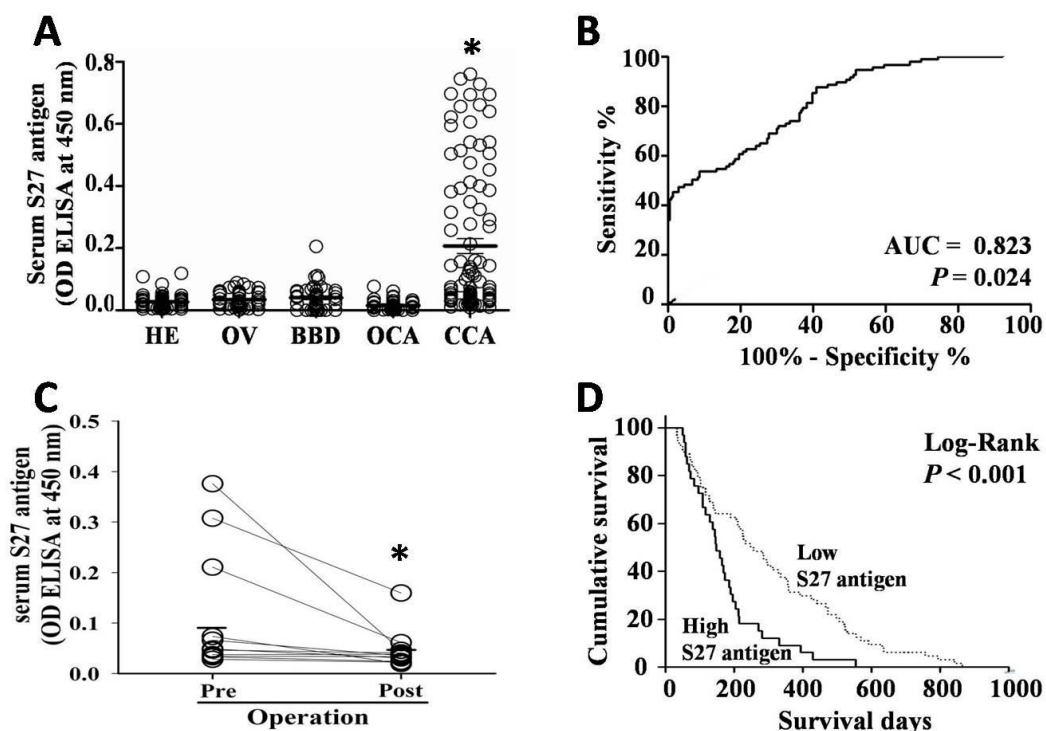
ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจพบ S27 ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับ clinical data ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Correlation of tissue S27 antigen staining pattern with patient's clinical data

Variable	No. of patients	tissue S27 antigen			P-value
		Negative	Cytoplasmic	Apical	
Age					
≤ 56 years	20	1	14	5	0.730
> 56 years	25	1	15	9	
Gender					
Male	18	2	17	9	0.497
Female	17	0	12	5	
Histopathology					
PAP	13	1	8	4	0.795
Non-PAP	32	1	21	10	
Tumor stage					
I-III	18	1	11	6	0.505
IVA and IVB	27	1	18	8	

13.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจวัด S27 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดี และความสัมพันธ์กับพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อและระยะรอดชีพของผู้ป่วย

ได้ขยายการตรวจหา S27 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดี 96 ราย และกลุ่มควบคุม 192 ราย ราย ได้แก่ ผู้ป่วยโรกระบบท่อน้ำดี 42 ราย ผู้ป่วยมะเร็งในระบบท่อน้ำดีทางเดินอาหาร 47 ราย คนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 52 ราย และคนปกติ 51 ราย เพื่อคำนวณระดับ S27 ในซีรัมที่สามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีจากกลุ่มควบคุมต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น โดยพบว่าปริมาณ S27 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดี (ค่าเฉลี่ย OD 450 nm $\pm$ SE = 0.206 ± 0.024) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ค่าเฉลี่ย OD 450 nm $\pm$ SE = 0.029 ± 0.002) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีได้อย่างเหมาะสม โดย ณ จุดตัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (cutoff O.D. at 450 nm) ที่ 0.026 โดยมีค่าความไว (sensitivity) = 87% ความจำเพาะ (specificity) 59% ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) 52% และการทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) 90% และเมื่อแบ่งผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีออกเป็น 2 กลุ่มตามระดับ S27 ในซีรัม เป็นผู้ป่วยที่มีระดับ S27 สูง และกลุ่มที่มีระดับ S27 ต่ำ โดยใช้ค่า cutoff O.D. 450 nm ที่ 0.206 พบว่า ผู้ป่วยที่มีระดับ S27 ในซีรัมสูงจะมีอัตราการรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ S27 ในซีรัมต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ S27 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากผู้ป่วยเข้ารับรักษาด้วยการผ่าตัด ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 A) แสดงระดับ S27 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีจำนวน 96 ราย มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งประกอบไปด้วย คนปกติ (HE) ผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (OV) ผู้ป่วยโรกระบบท่อน้ำดี (BBD) และผู้ป่วยมะเร็งในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่นๆ (OCA) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$; Mann-Whitney U test) B) การวิเคราะห์ด้วย ROC analysis พบว่าระดับ S27 ในซีรัมสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดีออกจากกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.024$) โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve; AUC) เท่ากับ 0.823 C)

เมื่อแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามระดับ S27 ในซีรัม พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ S27 ในซีรัมสูง ($OD_{450\text{ nm}} > 0.206$) มีอัตราการรอดชีพที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ S27 ในซีรัมต่ำ ($OD_{450\text{ nm}} \leq 0.206$) D) S27 ในซีรัมของผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยการผ่าตัด มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (pair T-test, $P < 0.001$) เทียบกับซีรัมก่อนผ่าตัดที่ได้รับจากผู้ป่วยรายเดียวกัน

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ S27 ในซีรัม กับข้อมูล clinical data ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าระดับ S27 ในซีรัมของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์กับ อายุ เพศ พยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) และ ระยะของมะเร็ง (tumor stage) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Correlation of serum S27 and clinical data of CCA patients

Variable	No. of patients	Serum S27 antigen		<i>P</i>
		Low (OD ≤ 0.206)	High (OD > 0.206)	
Age				
≤ 56 years	52	33	19	0.469
> 56 years	44	31	13	
Gender				
Male	69	47	22	0.632
Female	27	17	10	
Histopatholog				
y	21	15	6	0.600
PAP	75	49	26	
Non-PAP				
Tumor stage				
I-III	14	12	2	0.102
IVA and IVB	82	52	30	

ทำการวิเคราะห์ความเป็นอิสระในการทำนายโรค (independent prognostic factor) ของระดับ S27 ในซีรัม เปรียบเทียบกับข้อมูล clinical data อื่นๆ ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ อายุ เพศ พยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) และ ระยะของมะเร็ง (tumor stage) โดย Multivariate analysis (Cox Regression) พบว่าระดับ S27 ในซีรัมของผู้ป่วยมีคุณสมบัติเป็น independent prognostic factor ไม่มีความสัมพันธ์กับ ได้แก่ อายุ เพศ histopathology และ tumor stage ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Multivariate analysis of serum S27 antigen in CCA patients

Variable	Adjusted HR	95% CI	P
Serum S27 antigen			
Low (OD $\leq$ 0.206)	1		
High (OD > 0.206)	2.273	1.390-3.717	0.001
Age			
$\leq$ 56 years	1		
> 56 years	1.598	1.042-2.451	0.032
Gender			
Male	1		
Female	0.805	0.510-1.270	0.351
Histopathology			
PAP	1		
Non-PAP	2.840	1.618-4.998	<0.001
Tumor stage			
I-III	1		
IVA and IVB	2.273	1.218-4.240	0.010

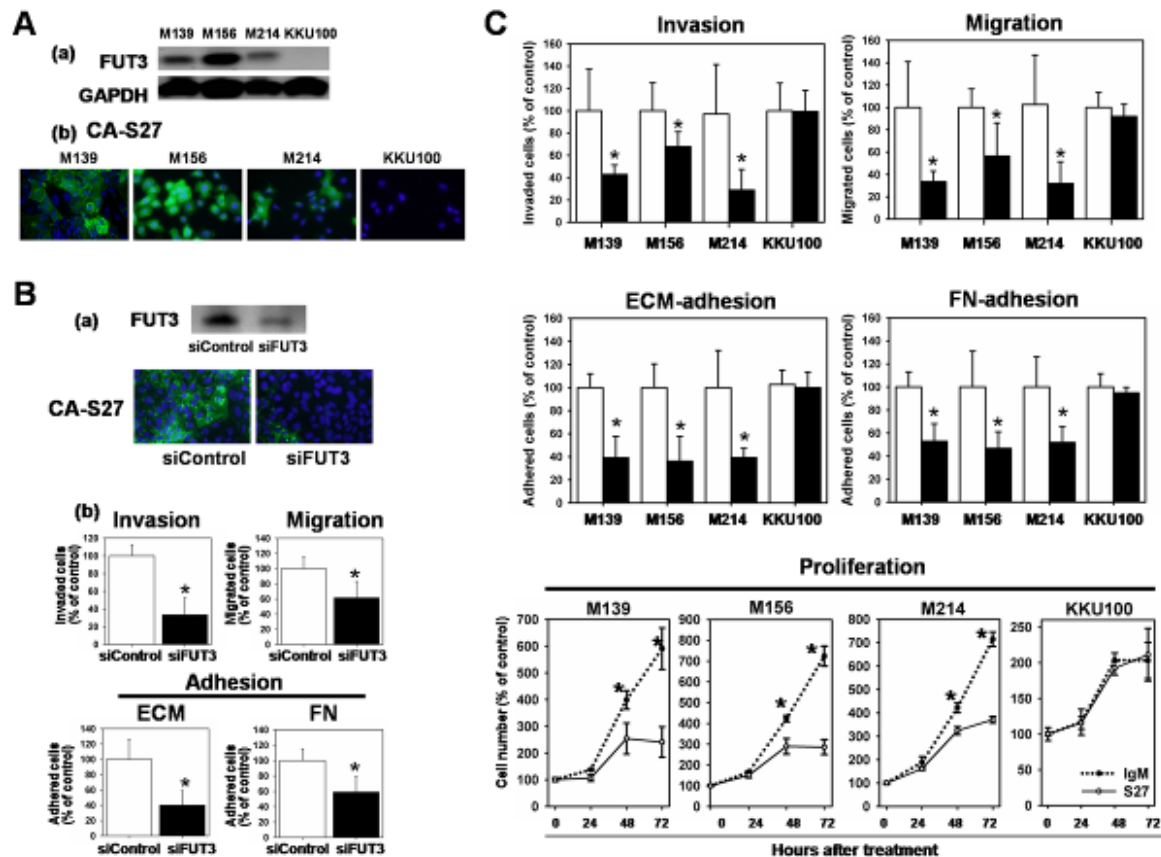
13.3 ศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ได้ทำการศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในหลอดทดลอง โดยทำการกวดการแสดงของเอ็นไซม์ FUT3 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ในการสังเคราะห์แอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ FUT3-mRNA และทำการกวดการทำงานของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 แล้วศึกษาผลต่อ

- (1) การยึดเกาะ (adhesion assay) กับ extra cellular matrix (ECM, Matrigel) และ fibronectin
- (2) การเคลื่อนที่ (migration assay)
- (3) การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion assay)
- (4) การแบ่งตัว (proliferation assay)

พบว่า การยับยั้งการทำงานของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 โดยทำการกวดการแสดงของเอ็นไซม์ FUT3 ด้วย siRNA และทำการกวดการทำงานของแอนติเจนด้วยโมโนโคลนอล

แอนติบอดี S27 สามารถยับยั้งความสามารถของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในการยึดเกาะ การเคลื่อนที่ การรุกราน เนื้อเยื่อข้างเคียง และการแบ่งตัว ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 (A)การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 มีความสัมพันธ์กับการแสดงของ เอ็นไซม์ FUT3 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (B)ปริมาณของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างนัยสำคัญ เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของ เอ็นไซม์ FUT3 ด้วยวิธี siRNA เป็นผลให้ความสามารถของเซลล์ในการยึดเกาะ การเคลื่อนที่ การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ siControl (3)นอกจากนี้พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27สามารถยับยั้งการทำงานของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เป็นผลให้การยึดเกาะ การเคลื่อนที่ การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และการแบ่งตัวของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ IgM control

14. อภิปรายผล/วิจารณ์

จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีศักยภาพในการจำแนกชี้รั้วผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับชี้รั้วคนปกติได้ 2 โคลน คือ S27 และ S121 โดยได้การศึกษาข้อมูลเชิงลึกเพื่อวิเคราะห์และจำแนกชนิดของแอนติเจนที่จับจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองไปแล้วนั้น ในปัจจุบันนี้ได้ทำการศึกษาความไวและจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สามารถทำปฏิกิริยากับชี้รั้วผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากกลุ่มควบคุมได้เป็นอย่างดี

โดยให้ความไวและความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และการมีระดับ S27 ในซีรัมสูงยังสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 พบว่าแอนติเจน S27 มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยที่มีคุณภาพต่อไปในอนาคต

15. เอกสารอ้างอิง

1. Hansel DE, Rahman A, Hidalgo M, Thuluvath PJ, Lillemoe KD, Shulick R, Ku JL, Park JG, Miyazaki K, Ashfaq R, Wistuba II, Varma R, Hawthorne L, Geradts J, Argani P, Maitra A: Identification of novel cellular targets in biliary tract cancers using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2003;163:217-229.
2. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC: Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002;37:806-813.
3. Pungpak S, Akai PS, Longenecker BM, Ho M, Befus AD, Bunnag D: Tumour markers in the detection of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:277-279.
4. Jalanko H, Kuusela P, Roberts P, Sipponen P, Haglund CA, Makela O: Comparison of a new tumour marker, CA 19-9, with alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in patients with upper gastrointestinal diseases. *J Clin Pathol* 1984;37:218-222.
5. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C: CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002;22:2311-2316.
6. Katsanos KH, Kitsanou M, Christodoulou DK, Tsianos EV: High CA 19-9 levels in benign biliary tract diseases. Report of four cases and review of the literature. 2002;13:132-135.
7. Albert MB, Steinberg WM, Henry JP: Elevated serum levels of tumor marker CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 1988;33:1223-1225.
8. Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR: Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004;10:427-432.
9. Juntavee A, Sripa B, Pugkhem A, Khuntikeo N, Wongkham S: Expression of sialyl Lewis(a) relates to poor prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:249-254.
10. Luengpailin S, Wongkham S, Wongkham C, Sripa B, Sirijaichingkul S, Chauin S, Proungvitaya T, Chokkanapitak J: Demonstration of a biliary-associated glycoprotein in human serum. *Clin Chim Acta* 1996;244:237-240.
11. Wongkham S, Boonla C, Kongkham S, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Sripa B: Serum total sialic acid in cholangiocarcinoma patients: an ROC curve analysis. *Clin Biochem* 2001;34:537-541.

12. Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Chau-in S, Boonla C, Muisuk K, Kongkham S, Wongkham C, Boonsiri P, Thuwajit P: Clinical significance of serum total sialic acid in cholangiocarcinoma. *Clin Chim Acta* 2003;327:139-147.
13. Kongtawelert P, Tangkijyanich P, Ong-Chai S, Poovorawan Y: Role of serum total sialic acid in differentiating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2178-2181.
14. Wongkham S, Sheehan JK, Boonla C, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, Sripa B, Wongkham C, Bhudhisawasdi V: Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2003;195:93-99.
15. Boonla C, Wongkham S, Sheehan JK, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Tepsiri N, Pairojkul C: Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* 2003;98:1438-1443.
16. Bhudhisawasdi V, Muisuk K, Areejitranusorn P, Kularbkaew C, Khampitak T, Saeseow OT, Wongkham S: Clinical value of biliary alkaline phosphatase in non-jaundiced cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:87-92.

16. การเผยแพร่ผลงาน

ได้จัดทำ draft manuscript เรื่อง CA-S27: A novel Lewis A associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร *Journal of Hepatology* (IF = 9.26)