บทที่ 2

บทสืบสวนเอกสาร

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune response)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนผ่านเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของร่างกายจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนนั้น เพื่อทำลายและกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนดังกล่าวออกไปจากร่างกาย การตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมมีอยู่ 2 แบบคือ

1. การตอบสนองแบบไม่จำเพาะ (non-specific body response) เป็นการตอบสนองเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายด้วยวิธีการไม่ซับซ้อน การตอบสนองแบบนี้จะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นครั้งแรกหรือเมื่อได้รับอีกในคราวต่อมา ร่างกายจะใช้วิธีการตอบสนองแบบนี้ร่วมกับการตอบสนองแบบจำเพาะ ลักษณะการตอบสนองแบบไม่จำเพาะนี้เช่นทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนย้ายของ phagocyte มายังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม แล้วเกิด phagocytosis ซึ่งเป็นขบวนการกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมของ phagocyte

2. การตอบสนองแบบจำเพาะ (specific immune response) เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ต้องอาศัยกลไกที่ยุ่งยากกว่าแบบแรก จะเกิดขึ้นเมื่อการตอบสนองแบบไม่จำเพาะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ การตอบสนองแบบนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

2.1 Humoral immune response เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยมีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมนั้น เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีดังกล่าวได้แก่ B lymphocyte และ plasma cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (differentiate) มาจาก B lymphocyte และทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดี

2.2 Cell-mediated immune response เป็นการตอบสนองโดยเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวคือ T lymphocyte ชนิดต่างๆได้แก่ helper T lymphocyte, suppressor T lymphocyte และ cytotoxic T lymphocyte โดย helper T lymphocyte ทำหน้าที่ส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน, suppressor T lymphocyte ทำหน้าที่ยับยั้งหรือหยุดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และ cytotoxic T lymphocyte มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

แอนติบอดีที่เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย จะเข้าจับกับแอนติเจนตรงส่วนที่เป็น antigenic determinant หรือ epitope ซึ่งเป็นตำแหน่งย่อยๆบนโมเลกุลของแอนติเจนและมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตรงส่วนที่จับกัน (antigen binding site) บนโมเลกุลของแอนติบอดีนั้น การจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจนมีลักษณะคล้ายกับการทำงานของลูกกุญแจกับแม่กุญแจ ทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดหรือทำลายแอนติเจนของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Herscowitz,1979 ; Sikora and Smedley,1984)

ตารางที่ 1 ผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนในร่างกาย (Sikora and Smedley,1984)

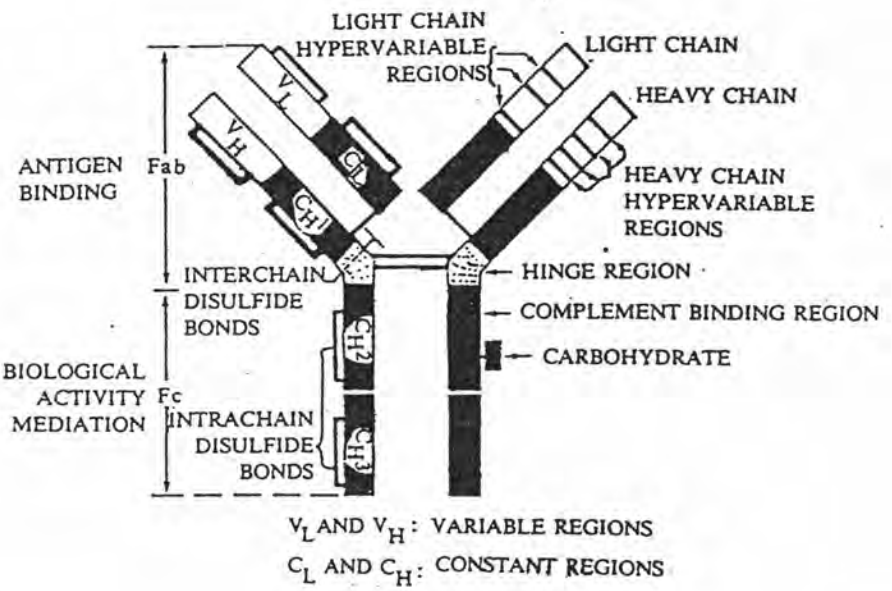
Interaction	Effects
Immune complex formation	Removal of antigen, serum sickness, disease states
Complement activation	Lysis of bacteria or cells
Macrophage activation	Cell lysis
Killer cell activation	Cell lysis
Immunoregulation	Control of immune system

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้าง Class และ Subclass ของโมเลกุลแอนติบอดี

แอนติบอดีหรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าอิมมูโนโกลบุลิน (Ig) เป็นสารประกอบจำพวกไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นโดย plasma cell และตรวจพบอยู่ในส่วนของซีรั่มและสิ่งคัดหลั่ง (secretion) Ig แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจนเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น

โครงสร้างของโมเลกุล Ig ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 4 สาย โดย 2 สายเป็น Heavy chain (H-chain) และอีก 2 สายเป็น Light chain (L-chain) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ดังแสดงในรูปที่ 1 รูปร่างโมเลกุลของ Ig มีลักษณะเป็นรูปตัวอักษร Y ซึ่งจากความแตกต่างขององค์ประกอบใน H-chain สามารถแบ่ง Ig ของคนออกได้เป็น 5 ชนิด (class) คือ IgG, IgM, IgA, IgD และ IgE โดย H-chain ของ IgG เรียกว่าแกมมา (ɣ), IgM เรียกว่ามิว (μ), IgA เรียกว่าแอลฟา (α), IgD เรียกว่าเดลตา (δ) และ IgE เรียกว่าเอปซิลอน (ε) ส่วน L-chain แบ่งเป็น 2 แบบคือ แคปปา (k) และ



รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลอิมมูโนโกลบุลิน (ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, 2527)

แลมดา (λ) Ig ของคนทั้ง 5 ชนิดมีคุณสมบัติทางเคมี ชีวภาพ และ กายภาพ แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วน Ig ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆพบว่าอาจมี Ig ได้ไม่ครบทั้ง 5 ชนิด และจากการศึกษาความแตกต่างของสมบัติทางเคมี ชีวภาพ และกายภาพของ Ig ทั้ง 5 ชนิดที่เป็นของสัตว์แต่ละชนิดแล้ว พบว่าสามารถแบ่ง Ig ในแต่ละชนิดออกเป็นชนิดย่อย (subclass) ต่างๆได้ โดยที่ชนิดย่อยของ Ig ของสัตว์ต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 (ฤทัย สกุลแรมรุ่ง,2527 ; Steward,1984 ; Goodman,1984)

ทฤษฎี Clonal Selection

ทฤษฎี Clonal selection ของ Burnet (1959) เป็นทฤษฎีที่ยอมรับกันว่าสามารถใช้อธิบายการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนต่างๆ โดยได้อธิบายไว้ดังนี้คือ B lymphocyte แต่ละเซลล์มียีนที่กำหนดการสร้างแอนติบอดีเพียง 1 แบบเท่านั้น และแอนติบอดีดังกล่าวจะปรากฏอยู่บนผิวเซลล์เรียกว่า membrane Ig หรือ (mIg) ทำหน้าที่เป็น receptor สำหรับจับกับแอนติเจนที่จำเพาะ เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย B lymphocyte ที่มี mIg จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นเท่านั้นที่จะจับกับแอนติเจนแล้วเกิดปฏิกิริยาตอบสนองขึ้น โดย B lymphocyte นั้นถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนนั้นอย่างเดียว และกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่จดจำแอนติเจนชนิดนั้นเรียกนี้ว่า memory cell ดังแสดงในรูปที่ 2 (Roitt et al.,1986)

กลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายครั้งแรกเรียกว่า primary immune response เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะยังไม่เกิดมีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีอยู่ชั่วระยะหนึ่ง เรียกระยะนี้ว่า inductive phase หรือ latent phase ระยะนี้เป็นระยะที่ B lymphocyte รับรู้แอนติเจน โดยได้รับความช่วยเหลือจาก T lymphocyte

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางเคมี, ชีวภาพและกายภาพของอิมมูโนโกลบุลินของคน (Goodman, 1984)

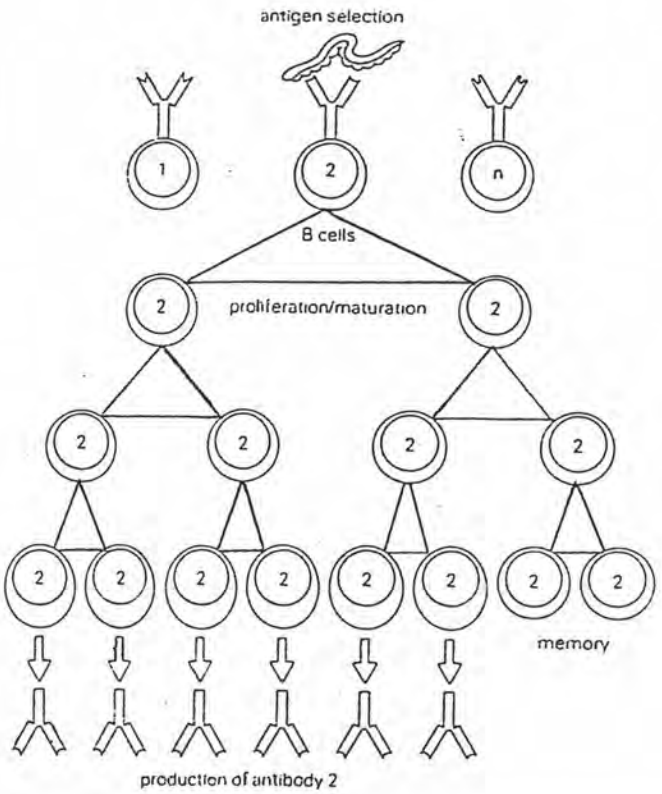
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
H chain class	γ	α	μ	δ	ϵ
H chain subclass	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$	$\mu 1, \mu 2$		
L chain type	κ and λ	κ and λ	κ and λ	κ and λ	κ and λ
Molecular formula	γ_2L_2	α_2L_2* or $(\alpha_2L_2)_2SC\dagger J\ddagger$	$(\alpha_2L_2)_5J\ddagger$	δ_2L_2	ϵ_2L_2
Sedimentation coefficient (S)	6–7	7	19	7–8	8
Molecular weight (approximate)	150,000	160,000* 400,000§	900,000	180,000	190,000
Electrophoretic mobility (average)	γ	Fast γ to β	Fast γ to β	Fast γ	Fast γ
Complement fixation (classic)	+	0	++++	0	0
Serum concentration (approximate; mg/dL)	1000	200	120	3	0.05
Serum half-life (days)	23	6	5	2–8	1–5
Placental transfer	+	0	0	0	0
Reaginic activity	?	0	0	0	++++
Antibacterial lysis	+	+	+++	?	?
Antiviral activity	+	+++	+	?	?

*For monomeric serum IgA.
†Secretory component.
‡J chain.
§For secretory IgA.

ตารางที่ 3 Class และ Subclass ของอิมมูโนโกลบุลินที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ (Goodman, 1984)

Species	Class and Subclass				
Human	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgA1, IgA2	IgM1, IgM2	IgD	IgE
Ape	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Monkey	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Mouse	IgG2a, IgG2b, –*, IgG1	IgA1, IgA2	IgM	IgD	IgE
Rat	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG1	IgA	IgM	?	IgE
Guinea pig	IgG2, –, –, IgG1	IgA	IgM	?	IGE
Rabbit	IgG2, –, –, IgG1	IgA1, IgA2	IgM	?	IgE
Dog	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG1	IgA	IgM	?	IgE
Cow	IgG2, –, –, IgG1	IgA	IgM	?	?
Horse	IgGa, IgGb, IgGc, IgGT	IgA	IgM	?	?
Fowl	IgG	IgA	IgM	?	?
Reptile	IgG	?	IgM	?	?
Amphibian	IgG	?	IgM	?	?
Fish	?	?	IgM	?	?
Lamprey	?	?	IgM	?	?

* – indicates the absence of an additional subclass corresponding to that in humans.



รูปที่ 2 ทฤษฎี Clonal Selection ของ Burnet (Roitt et al.,1986)

และ macrophage ทำให้ B lymphocyte เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ต่อมาจะเข้าสู่ระยะ logarithmic phase (log phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงจุดสูงสุด ระยะนี้เป็นระยะที่ B lymphocyte เปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell และผลิตแอนติบอดีจำนวนมากออกมาอยู่ในซีรั่ม ระยะเวลาของ log phase ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจน และระยะต่อมาเรียกว่า steady state เป็นระยะที่มีปริมาณของแอนติบอดีคงที่เพราะมีการสร้างและทำลายแอนติบอดีในอัตราเดียวกัน ส่วนระยะสุดท้าย คือระยะ decline phase เป็นระยะที่ปริมาณของแอนติบอดีที่มีอยู่ค่อยๆลดต่ำลง เนื่องจากมีการทำลายแอนติบอดีมากกว่าการสร้าง และเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนชนิดเดียวกันซ้ำอีกจะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า secondary immune response ซึ่ง

มีการตอบสนองเช่นเดียวกับที่เกิดครั้งแรก แต่จะมีการตอบสนองได้รวดเร็วและรุนแรงกว่าครั้งแรกมาก เนื่องจากมี memory T และ B lymphocyte ที่เตรียมพร้อมอยู่แล้ว เมื่อแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย เซลล์ดังกล่าวซึ่งมีหน้าที่จดจำแอนติเจนชนิดนั้นจะเกิดการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น active T lymphocyte และ plasma cell สร้างแอนติบอดีออกมาในปริมาณมากกว่าที่เกิดใน primary immune response และอยู่ในร่างกายได้นานกว่า (รูปที่ 3)

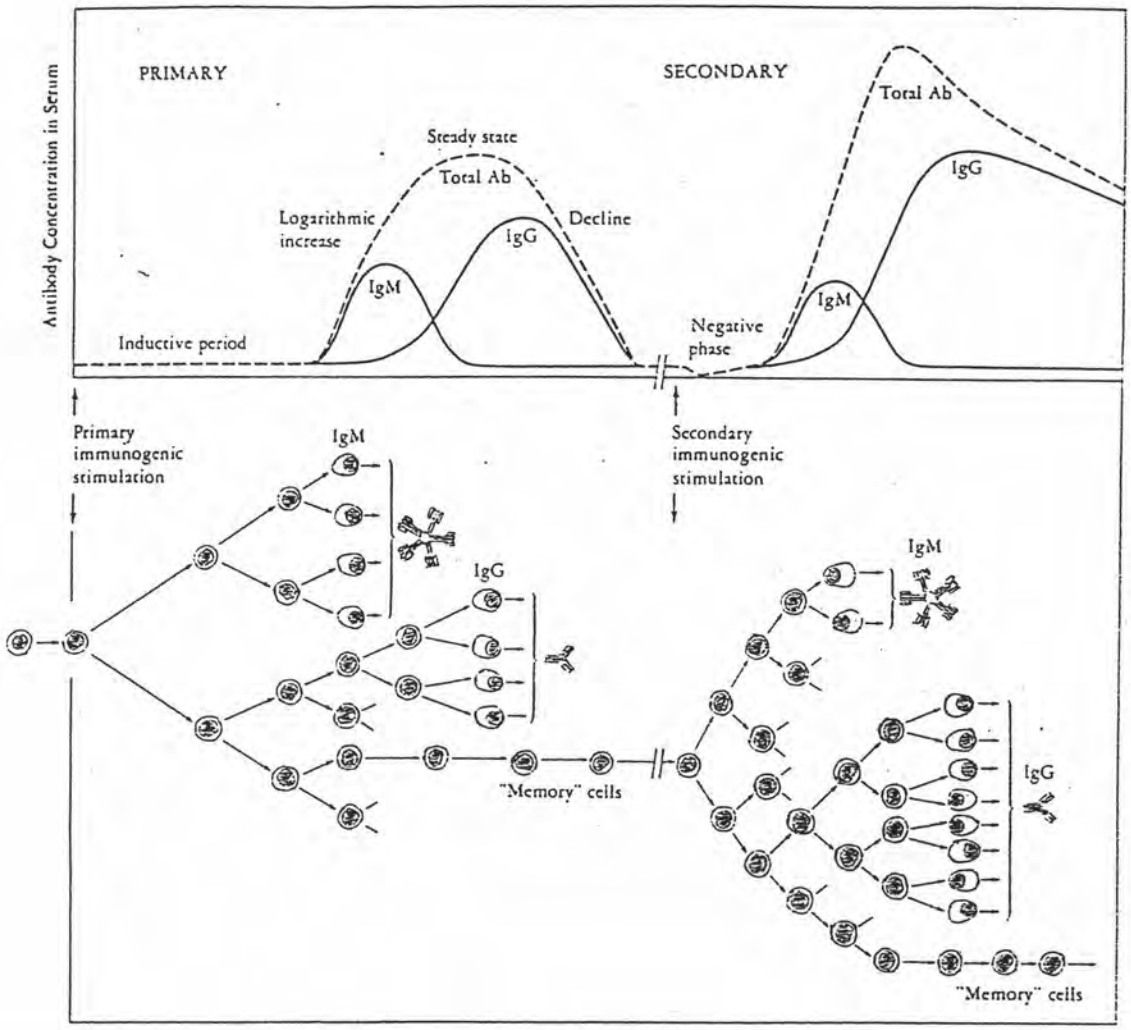
การเกิดแอนติบอดีใน primary immune reponse และ secondary immune response พบว่าระดับของ IgM จะขึ้นสูงก่อนแล้วค่อยๆลดลงมาส่วนระดับ IgG จะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นตามมาทีหลัง และระดับของ IgG ที่เกิดใน secondary immune response จะมีปริมาณมากกว่าระดับของ IgM ดังแสดงในรูปที่ 3 (Herscowitz,1979)

<u>การผลิตแอนติบอดี</u>

ในปัจจุบันการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ กระทำได้ 2 วิธี (Herscowitz,1979 ; Milstein,1980 ; Tijssen,1985) ดังต่อไปนี้

1. Conventional Method ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ผลิต heterogenous antibody ทำได้ โดยการฉีดแอนติเจนเข้าสู่ตัวสัตว์ทดลอง ทำให้ B lymphocyte เกิดการตอบสนองสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่ใช้ฉีด ซึ่งแอนติเจนทั่วไปจะมีหลาย epitope บนโมเลกุล ทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดที่มีความจำเพาะต่อ epitope ต่างๆของแอนติเจนออกมารวมปะปนกัน เรียกแอนติบอดีชนิดนี้ว่า polyclonal antibody (PAb) (รูปที่ 4ก)

2. Hybridoma Technique เป็นวิธีการผลิต homogenous antibody ทำได้โดยใช้เทคนิคการเชื่อมเซลล์ (cell fusion) เป็นการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีซึ่งก็คือ B lymphocyte หรือ plasma cell กับเซลล์มะเร็งที่เรียกว่า เซลล์ myeloma เกิดเป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) แล้วนำเซลล์ดังกล่าวมาทำ single cell

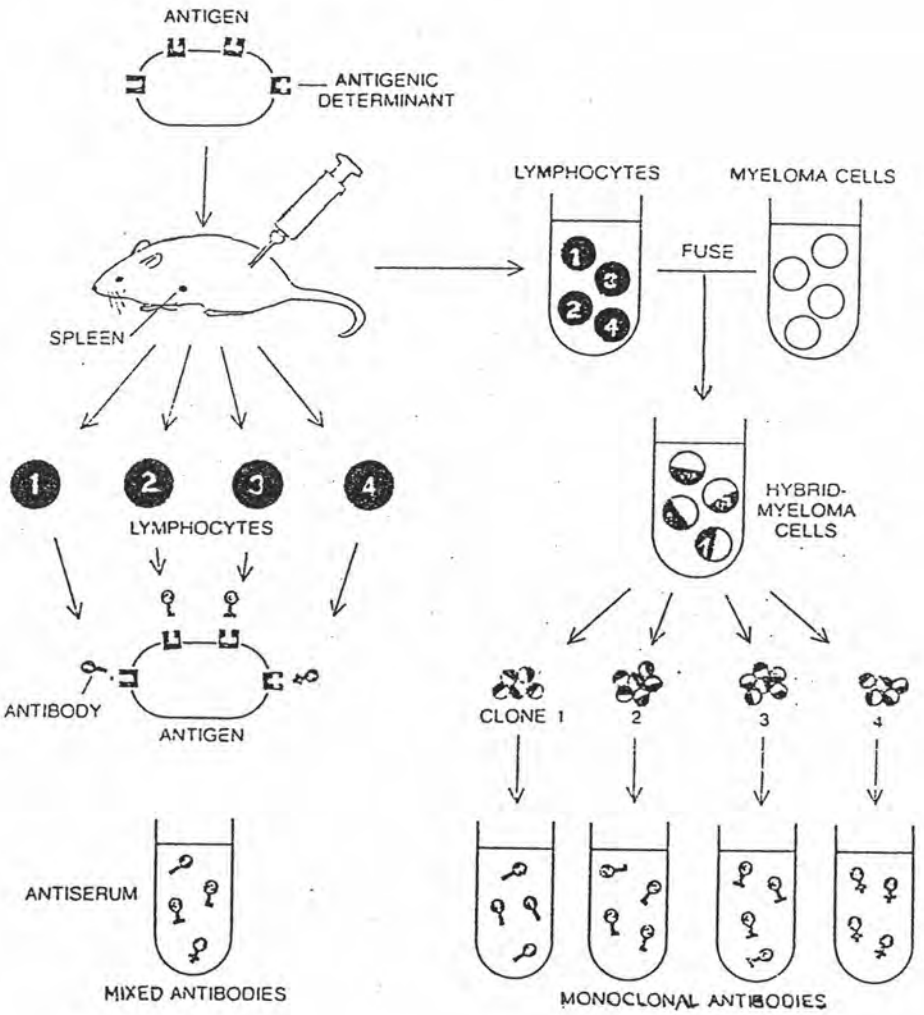


รูปที่ 3 แผนภาพแสดง primary และ secondary immune response (Herscowitz, 1979)

cloning จะได้เป็นกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกัน (monoclone) ที่สร้างแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว และมีความจำเพาะต่อ epitope บนโมเลกุลของแอนติเจนเพียงตำแหน่งเดียว เรียกแอนติบอดีชนิดนี้ว่า monoclonal antibody (MAb) (รูปที่ 4ข)

แอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นทั้ง 2 วิธีนั้น มีสมบัติที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

(ก) Conventional method (ข) Hybridoma technique



รูปที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Conventional (ก) และวิธี Hybridoma (ข) (Milstein,1980)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ Polyclonal antibody และ Monoclonal antibody (Tijssen,1985)

Character	Polyclonal	Monoclonal
Purity of immunogen	important	not of prime importance
Time and expense	little	initially high
Useful antibody content	<1 mg/ml-few mg/ml	0.5-5 mg/ml (ascites) 5-40 mg/ml (medium)
Irrelevant Ig	about 10 mg/ml	0.5-1 mg/ml (ascites)
Physiochemical properties	spectrum which change	individual
Cross-reactivity to copurifying immunogens	+	-
Cross-reactivity removable	mostly	no
Number of epitopes recognized	many	1
Affinity	heterogeneous	homogeneous

<u>ความเป็นมาของเทคนิคการผลิต monoclonal antibody</u>

เนื่องจาก ในซีรั่มของคนไข้ หรือ polyclonal antibody ที่ผลิตจากสัตว์ทดลอง ประกอบไปด้วยแอนติบอดีหลายชนิด เมื่อนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันทำให้การสรุปผลการศึกษาที่ทำได้ไม่แน่นอน ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่จะผลิตแอนติบอดีที่มีความ

จำเพาะต่อ epitope เพียงตำแหน่งเดียวที่เรียกว่า MAb แต่ความพยายามที่จะแยกกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจาก B lymphocyte ตามปกติ ไม่สามารถเจริญในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องได้เป็นเวลานาน (Kimball,1983 ; Goding,1988) จากการที่มีการศึกษาพบเซลล์มะเร็งของ B lymphocyte หรือ plasma cell ที่เรียกว่า myeloma cell หรือ myeloma เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติ สามารถเจริญแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วโดยไม่หยุดยั้ง และผลิตแอนติบอดีออกมาได้ในปริมาณมาก ต่อมามีนักวิจัยสามารถแยกกลุ่มเซลล์ myeloma ของหนูไมซ์มาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้สำเร็จ (Horibata and Harris,1970) เซลล์ดังกล่าวจะเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ Ig แต่ไม่สามารถบ่งบอกความจำเพาะของแอนติบอดีที่ myeloma ผลิตได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้นำเทคนิคทางด้าน somatic cell hybridization มาใช้ โดยทำการเชื่อมเซลล์ระหว่าง myeloma กับ B lymphocyte

ผู้ที่ทำการวิจัยพบปรากฏการณ์ somatic cell hybridization ของ mammalian cell เป็นครั้งแรกคือ Barski และคณะ (1961) ซึ่งเขาได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast ของหนูไมซ์สายพันธุ์ C3H ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งจำนวน 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ NCTC 2472 (N1) และ NCTC 2555 (N2) โดยเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันคือ เซลล์สายพันธุ์ N1 มีรูปร่างของเซลล์คล้ายกับเซลล์ fibroblast ปกติแต่ที่ผิวของเซลล์มีการพับเป็นลอน มีคุณสมบัติแบ่งเซลล์ได้รวดเร็ว (high-cancer) นอกจากนี้จำนวนโครโมโซมของเซลล์ N1 มีทั้งหมด 55 แท่ง ซึ่งมีลักษณะเป็น telocentric chromosome โดยมีอยู่ 1 แท่งที่มีขนาดยาวกว่าแท่งอื่น ส่วนเซลล์สายพันธุ์ N2 มีคุณสมบัติการแบ่งเซลล์ได้ช้ากว่าสายพันธุ์ N1 (low-cancer) รูปร่างของเซลล์มีลักษณะกลมผิวเรียบและมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด ประมาณ 54-67 แท่งเป็น metacentric chromosome จำนวน 9-19 แท่ง เขาได้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์รวมกันอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน พบว่ามีเซลล์ชนิดใหม่เจริญขึ้นมาเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมขนาดใหญ่กว่าเซลล์ N2 นอกจากนี้ที่ผิวเซลล์มีการพับเป็นลอนคล้ายกับเซลล์ N1 และจำนวนโครโมโซมทั้งหมดของเซลล์ชนิดใหม่เท่ากับ 115-116 แท่ง และพบมีลักษณะเป็น metacentric chromosome 9-15 แท่ง และอีก 1 แท่งเป็น telocentric chromosome ที่มีขนาดยาวมาก ลักษณะของเซลล์ที่ได้นี้เป็นลักษณะของทั้งเซลล์

N1 และ N2 ดังนั้น Barski และคณะจึงสรุปว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ N1 และ N2 ในภาชนะเดียวกัน สามารถเกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ 2 ชนิดได้

ในปี ค.ศ.1973 Cotton และ Milstein ได้ทำการเชื่อมเซลล์ myeloma ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ของหนูไมซ์ (P1Bu1) และของหนูแรท (210.RCY3.Ag1) ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันเช่นความทนทานต่อสารเคมี (chemical resistant) และการผลิตแอนติบอดี โดยเซลล์ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ของหนูไมซ์ มีความทนทานต่อสาร 5-bromo-2 deoxyuridine และผลิตแอนติบอดีชนิด IgG2a ที่มี L-chain เป็นชนิดแคปปา สำหรับเซลล์สายพันธุ์ของหนูแรทเป็นเซลล์ที่ทนทานต่อสาร 8-azaguanine และมีการผลิตเฉพาะ L-chain ของ Ig ที่เป็นชนิดแคปปาเท่านั้น เมื่อนำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเชื่อมกันโดยใช้ Sendai virus เป็นตัวชักนำการเชื่อมเซลล์ได้เซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีชนิด IgG2a และ L-chain ชนิดแคปปา ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิดที่ผลิตโดยเซลล์สายพันธุ์ P1Bu1 และ 210.RCY3.Ag1

อีก 2 ปีต่อมา Köhler และ Milstein (1975) ได้ประสบผลสำเร็จในการเชื่อมเซลล์ plasmacytoma (P1Bu1) ที่เป็นเซลล์มะเร็งของ plasma cell ของหนูไมซ์ กับเซลล์ม้ามของหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเม็ดเลือดแดงของแกะ ได้เป็นเซลล์ลูกผสมซึ่งมีคุณสมบัติสามารถเจริญแบ่งตัวได้ทั้งในหลอดทดลองและในร่างกาย (in vivo) และยังสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดของแกะด้วย เมื่อทำ cell cloning แล้วได้เป็น monoclone โดยแต่ละ monoclone สามารถผลิตแอนติบอดีที่ประกอบด้วย Ig ชนิดเดียวกันออกมาเรียกแอนติบอดีที่ monoclone ผลิตขึ้นว่า monoclonal antibody จากผลงานที่ได้นี้ทำให้ Köhler และ Milstein ได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ ในปีค.ศ. 1984

ภายหลังจากความสำเร็จของ Köhler และ Milstein แล้ว ได้มีนักวิจัยหลายท่านทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เขาสนใจต่อมาจนถึงปัจจุบัน โดยใช้เทคนิคการผลิต MAb ของ Köhler และ Milstein เป็นพื้นฐาน และได้มีการดัดแปลงรายละเอียดบางขั้นตอนให้มีความเหมาะสมต่องานวิจัยและห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอย่างเช่น Galfre และคณะ (1977) ได้ทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อ major histocompatibility complex (MHC) ของหนูแรทสายพันธุ์ DA โดยทำการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูแรทสายพันธุ์ AO ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย MHC ของหนูแรทสายพันธุ์ DA กับ myelomas ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ของ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

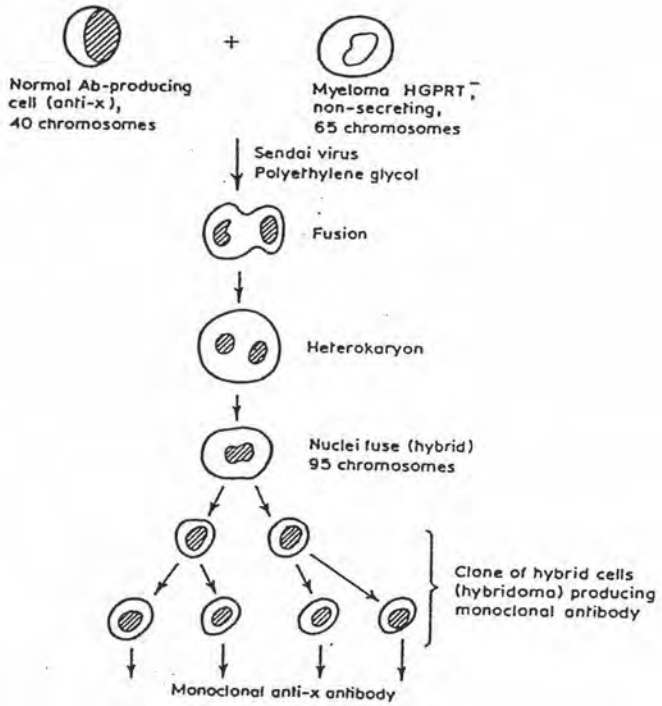
หนูไมซ์ (P3-X63-Ag8) โดยชักนำการเชื่อมเซลล์ด้วยสารละลาย polyethylene glycol (PEG) ซึ่ง Pontecorvo (1975) ได้ทำการศึกษา พบว่าสาร PEG นี้มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิด mammalian somatic cell hybrid ได้เช่นเดียวกับการใช้ไวรัส ซึ่งมีข้อเสียบางประการคือ การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็นงานที่ค่อนข้างลำบาก และคุณสมบัติของไวรัสที่เพิ่มขึ้นมาในแต่ละครั้งจะไม่เหมือนกัน นอกจากนั้นการกำจัดไวรัสออกจากเซลล์ host ภายหลังจากเชื่อมเซลล์แล้วทำได้ยาก

หลักการเตรียม Hybridomas

Hybridoma เป็นคำที่มาจากคำว่า hybrid ที่หมายถึงลูกที่เกิดจากการผสมระหว่างพ่อและแม่ที่มีความแตกต่างกันใน เชื้อชาติ, พันธุกรรม ฯลฯ และคำว่า oma ที่หมายถึงก้อนเนื้องอก รวมกันเป็น hybridoma ซึ่งเป็นคำที่ย่อมาจากคำว่า hybrid myeloma ซึ่งหมายถึงเซลล์ที่เกิดจาก การเชื่อมกันของเซลล์มะเร็งชนิดที่เรียกว่า myeloma cell กับเซลล์ชนิดอื่นโดยการชักนำการเชื่อมเซลล์ด้วย Sendai virus หรือ PEG ซึ่งมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงกันเกิดการเชื่อมกันเป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส เรียกเซลล์ดังกล่าวว่า heterokaryon ซึ่งต่อมานิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองชนิดจะเกิดการรวมตัวกันเป็น 1 นิวเคลียส แล้วเกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ได้เซลล์ลูก (daughter cell) ที่มีลักษณะของเซลล์พ่อแม่ทั้งสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 5

การเชื่อมเซลล์ที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบสุ่มคืออาจมีการเชื่อมกันของเซลล์ม้ามกับ myeloma หรือเซลล์ม้ามด้วยกันเอง หรือ myeloma ด้วยกันเอง หรือเป็นการเชื่อมของเซลล์หลายเซลล์เข้าด้วยกัน นอกจากนั้นยังอาจพบเซลล์ที่ไม่ถูกเชื่อมกันเลยด้วย ดังนั้นเมื่อต้องการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการออกไป และให้เซลล์ลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ม้ามกับ myeloma เท่านั้น จำเป็นต้องใช้วิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือก โดยการใช้สาร HAT ที่ประกอบด้วย Hypoxanthine , Aminopterine และ Thymidine ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ (HAT selective medium) ทำให้เซลล์ myeloma ตายแต่เซลล์ลูกผสมจะเจริญได้ (Littlefield, 1964) ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ myeloma เป็นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ Thymidine kinase (TK)

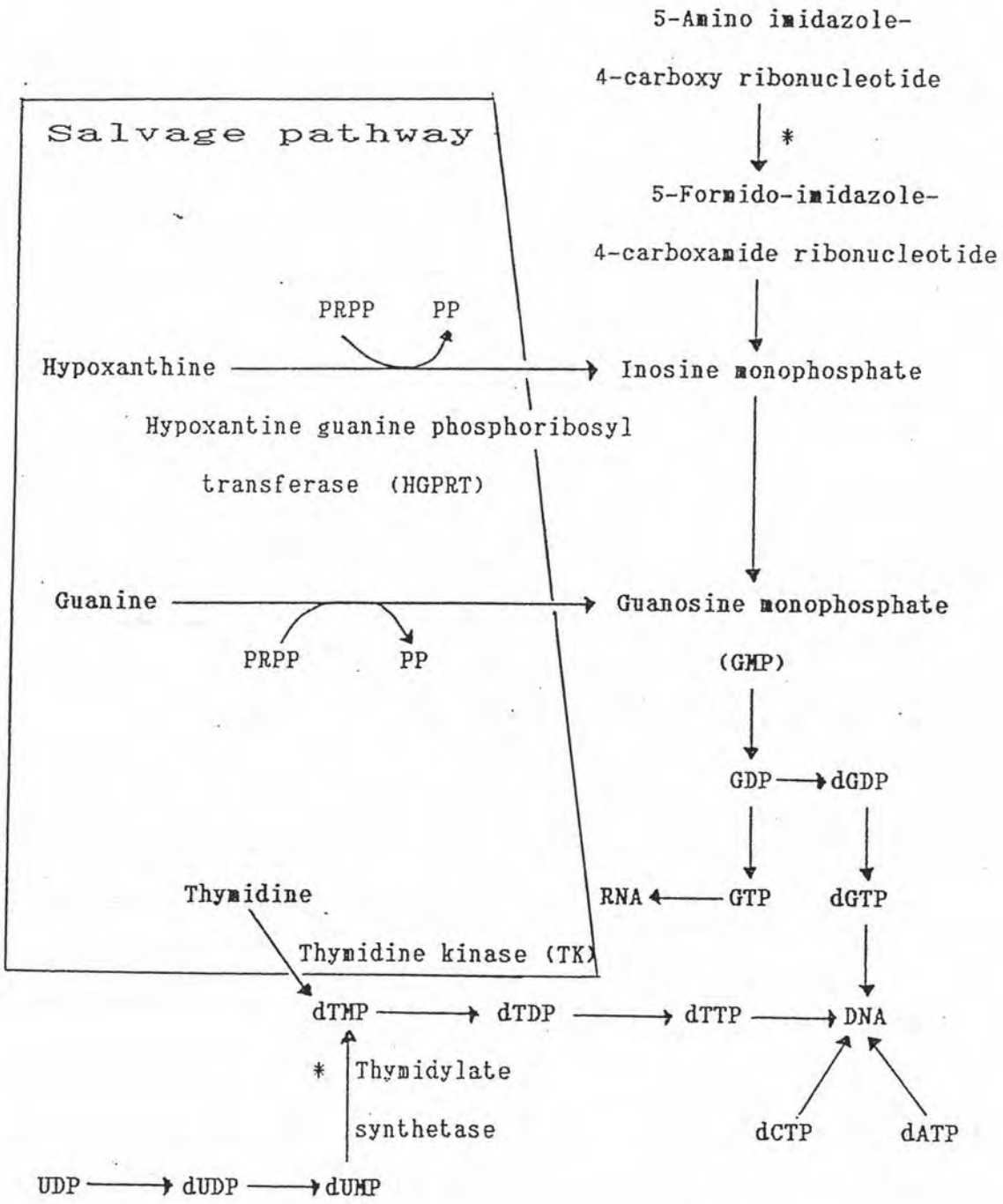
019198



รูปที่ 5 หลักการพื้นฐานของการเชื่อมเซลล์ (Steward, 1984)

และ/หรือ Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ nucleotide ใน salvage pathway และการเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma ใน HAT selective medium ซึ่งมีสาร aminopterine ผสมอยู่จะยับยั้งการสังเคราะห์ nucleotide ใน pathway หลักที่เรียกว่า *de novo* pathway ทำให้เซลล์ myeloma ไม่สามารถสร้าง DNA และ RNA ได้ สำหรับเซลล์ม้ามที่ไม่ถูกเชื่อมจะไม่สามารถอยู่รอดได้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์เกิน 2 สัปดาห์ขึ้นไป

การสังเคราะห์ purine และ pyrimidine nucleotide ของทั้ง DNA และ RNA ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีอยู่ 2 pathway คือ *de novo* pathway และ salvage pathway ดังแสดงในรูปที่ 6 โดย *de novo* pathway เป็น pathway ที่สังเคราะห์ nucleotide จากสารตั้งต้นที่เป็น amino acid, CO_2 และ $-NH_2$ ส่วน salvage pathway เป็น pathway ที่สังเคราะห์ nucleotide จาก purine และ pyrimidine base โดยเอนไซม์ HGPRT และ TK (Goding, 1988 ; Smith et al., 1983)



รูปที่ 6 วิถีเมตะโบลิซึมของการสร้าง DNA และ RNA ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Goding,1988)

หมายเหตุ : * ถูกยับยั้งโดยสารที่เป็น analogue ของ folic acid ได้แก่สาร aminopterin

ในระยะเริ่มแรกของการวิจัยเกี่ยวกับการผลิต MAb นั้น เซลล์ myeloma ที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ยังคงเป็นเซลล์ที่สามารถสร้าง H-chain และ L-chain ของ Ig ได้ ทำให้เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นสามารถผลิตแอนติบอดีทั้งของเซลล์พ่อและแม่ได้ทั้งสองชนิด ทำให้ความบริสุทธิ์และระดับของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specific antibody titre) ลดลง นอกจากนี้อาจมีการสร้างแอนติบอดีชนิดใหม่ ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ L-chain ของเซลล์พ่อกับ H-chain ของเซลล์แม่ หรือในทางกลับกัน ทำให้ได้ Ig โมเลกุลผสมที่มีลักษณะผิดไปจาก Ig ของเซลล์พ่อและเซลล์แม่ เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวนักวิจัยจึงทำการผลิตเซลล์สายพันธุ์ชนิดใหม่ของ myeloma ที่ไม่สังเคราะห์ทั้ง L-chain และ H-chain เลย หรือสังเคราะห์ได้เฉพาะ L-chain เท่านั้น ดังเช่นเซลล์สายพันธุ์ Sp2/0-Ag14 เป็นเซลล์สายพันธุ์ที่ไม่มีการผลิตทั้ง L-chain และ H-chain ซึ่งแยกมาจาก clone P3-X63Ag8 x BALB/c (Köhler et al.,1976 ; Shulman et al.,1978) ตารางที่ 5 เป็นตารางที่ Harlow และ Lane, 1988 ได้รวบรวมเซลล์สายพันธุ์ต่างๆของ myeloma ของหนูไมซ์และแรท ที่นักวิจัยส่วนมากเลือกใช้ในการเชื่อมเซลล์ในปัจจุบัน

<u>การประยุกต์ใช้เทคนิคการผลิต MAb เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อมาลาเรีย</u>

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (Protozoa) จัดอยู่ใน Class Sporozoa และ Genus Plasmodium เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมาลาเรียในคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิดเช่น ลิง (Monkey), สัตว์ฟันแทะ (Rodent) และนก (Aves) เป็นต้น เชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนมีอยู่ 4 ชนิดคือ <u>P. falciparum</u>, <u>P. vivax</u>, <u>P. ovale</u> และ <u>P. malariae</u> เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจของประชาชนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา องค์การอนามัยโลกได้เล็งเห็นถึงอันตรายของโรคนี้จึงมีมาตราการในการควบคุมและกำจัดโรค เป้าหมายหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจ คือ การผลิตวัคซีนป้องกันโรค และความสนใจนี้ได้ทวีเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

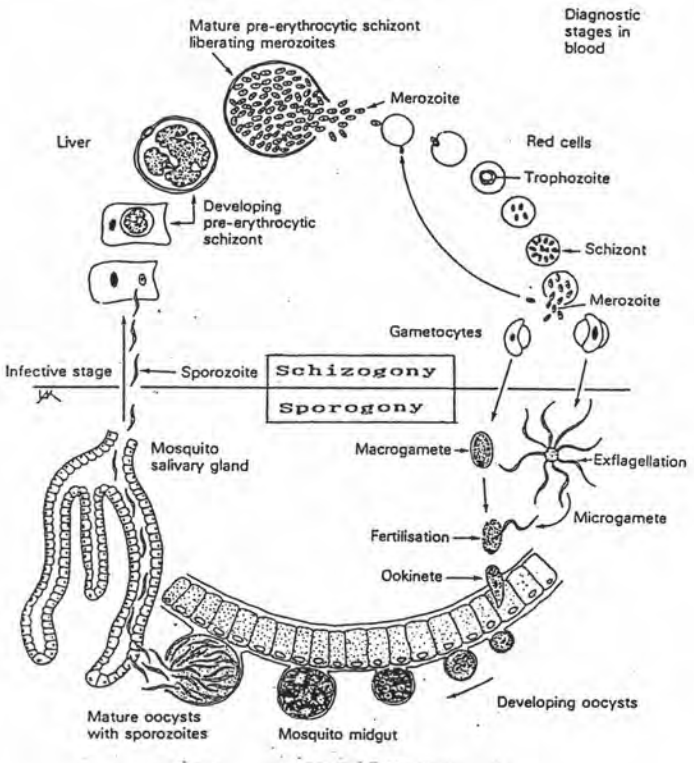
ตารางที่ 5 ชนิดของ Myeloma Cell Line ที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์เพื่อผลิต MAb (Harlow and Lane, 1988)

Cell Line	Derived from	Chains expressed	Secreting	References
Mice Lines				
P3-X63Ag8	P3K	γ1,k	IgG1	Köhler & Milstein (1975)
X63Ag8.653	P3-X63Ag8	-	-	Kearney et al. (1979)
Sp2/0-Ag14	P3-X63Ag8 x BALB/c	-	-	Köhler & Milstein (1976) Shulman et al. (1978)
FO	Sp2/0-Ag14	-	-	de St.Groth & Schidegger (1980)
NSI/1-Ag4-1	P3-X63Ag8	k	-	Köhler et al. (1976)
NSO/1	NSI/1-Ag4-1	-	-	Galfre & Milstein (1981)
FOX-NY	NSI/1-Ag4-1	k(?)	-	Taggart & Samloff (1984)
Rat Lines				
Y3-Ag1.2.3	Y3	k	-	Galfre et al. (1979)
YB 2/0	YB2/3HL	-	-	Kilmartin et al. (1982)
IR983F	LOU/c rats	-	-	Bazin (1982)

ประกอบกับในปัจจุบัน สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum ในหลอดทดลองได้สำเร็จ (Trager and Jensen,1976) จึงสามารถนำไปใช้ทดลองในสัตว์ทดลองบางชนิด เช่น ลิงชิมแปนซี เพื่อศึกษาภูมิต้านทานต่อเชื้อมาลาเรียทำให้มีการพบแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียหลายชนิดที่สามารถทำให้เกิดภูมิต้านทานได้ แต่ถึงกระนั้นก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า แอนติเจนชนิดใดของเชื้อมีคุณสมบัติเป็น immunogen ที่ดีที่สุดที่จะกระตุ้นให้เกิด protective antibody ในร่างกายได้เป็นเวลานาน ซึ่งจะทำให้การป้องกันโรคมีประสิทธิภาพมากที่สุด จากการพัฒนาวิธีการผลิต MAb และความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineerings) ทำให้นักวิจัยมีแนวทางที่จะทำการศึกษาวิจัย หาแอนติเจนที่มีคุณสมบัติเป็น immunogen ที่เหมาะสมแก่การนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีโฮสท์ (host) 2 ชนิด คือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย (Anopheles spp.) และสัตว์มีกระดูกสันหลัง ดังแสดงในรูปที่ 7 แอนติเจนของเชื้อมาลาเรียจึงมีความแตกต่างไปตามระยะการเจริญของเชื้อในวงจรชีวิต ซึ่งมีนักวิจัยทำการศึกษาแอนติเจนของเชื้อหลายกลุ่มอาทิเช่น ศึกษาแอนติเจนของเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในต่อมน้ำลายของยุงพาหะซึ่งเป็นระยะ sporozoite และแอนติเจนของเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงของสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งคน (Nardin and Nussenzweig,1978 ; Nardin et al.,1979 ; WHO, 1984)

การผลิต MAb ต่อเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในระยะ sporozoite มีผู้ทำการวิจัยได้แก่ Yoshida และคณะ (1980) ได้ทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ผิวของ sporozoite ของเชื้อ P. berghei ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ จากการใช้วิธี indirected immunofluorescent assay (IFA) และวิธี circumsporozoite precipitation (CSP) เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียแล้วพบว่ามี hybridoma อยู่เพียง 5 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์จากจำนวนทั้งหมด 600 หลุม เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีตามต้องการ และสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เพียง 1 clone เท่านั้น การศึกษาคุณสมบัติของ MAb ของ clone ที่ได้โดยการทดลองฉีด sporozoite ที่ถูก incubate ด้วย MAb เข้าในตัวหนูทดลอง ซึ่ง Yoshida และคณะพบว่าหนูที่ได้รับการฉีด sporozoite ดังกล่าวตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด และหนูมีอาการเป็นปกติ



รูปที่ 7 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (Zaman, 1984)

นอกจากนี้ Yoshida และคณะ ได้ทำการศึกษา sporozoite ของเชื้อมาลาเรียในระดับ ultrastructure ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า sporozoite ของเชื้อ P. berghei ที่ถูก incubate ด้วย MAb ที่เขาผลิตได้นี้ เกิดการทึบอิเลคตรอน (electron dense) ตรงบริเวณผิวเซลล์ของ sporozoite และจากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE ทำให้เขาทราบว่า MAb ที่ผลิตได้ มีความจำเพาะกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดาลตัน (Pb44) สำหรับ Potocnjak และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ MAb ที่ Yoshida ผลิตได้ โดยนำ MAb มาแยกเอาเฉพาะส่วนของ Fab ของโมเลกุล Ig แล้วนำไปทดสอบการติดเชื้อ P. berghei ในระยะ sporozoite ที่เจริญในตัวสัตว์ทดลอง และที่แยกได้จากต่อมน้ำลายของยุง เทียบกับการทดสอบที่ใช้ Ig ของ MAb ทั้งโมเลกุล โดยวิธี neutralizing test และวิธี CSP พบว่า ส่วน Fab ของโมเลกุล MAb มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ เช่นเดียวกันกับการใช้ MAb ทั้งโมเลกุล ต่อมาในปี ค.ศ.1982 Nardin และคณะ ได้รายงานการผลิต

MAb ที่มีความจำเพาะต่อผิวเซลล์ของ sporozoite ของเชื้อ P. falciparum และ P. vivax ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) กับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น และจากการทำ immunoprecipitation ด้วย MAb ที่ผลิตได้กับเชื้อ P. falciparum และ P. vivax ได้รายงานว่า MAb ของเชื้อ P. falciparum ทำปฏิกิริยากับโปรตีนของ P. falciparum ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67,000 และ 58,000 ดาลตัน ส่วน MAb ของเชื้อ P. vivax ก็ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 และ 51,000 ดาลตัน ซึ่งได้มีการศึกษาและพบว่า โปรตีนเหล่านี้เป็นแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด

สำหรับการผลิต MAb ต่อเชื้อมาลาเรีย ที่มีการเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ได้มีผู้ทำการวิจัยและรายงานไว้ ได้แก่ Freeman และคณะ (1980) ได้ทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย P. yoelii ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะ เขาได้ทำการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ P. yoelii กับเซลล์ myeloma ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ P3-NS1/1-Ag4-1 ได้เซลล์ลูกผสมทั้งหมด 144 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธี IFA พบว่ามีเพียง 38 หลุมที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ P. yoelii และ เมื่อทำ single cell cloning ใน semi-solid agar ได้ monoclone 5 clone ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของ MAb ทั้ง 5 clone นี้ Freeman และคณะได้รายงานว่า MAb มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย P. yoelii สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ P. vinckei petteri ที่เป็นเชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะอีกชนิดหนึ่งได้ด้วย นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาความสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียของ MAb ที่ผลิตได้ดังกล่าว พบว่า MAb เหล่านี้สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ต่อมา Holder และคณะ (1981)ได้ใช้ MAb ที่ Freeman และคณะผลิตได้มาศึกษาแอนติเจนของเชื้อ P. yoelii โดยนำ MAbมาทดสอบเพียง 2 clone ผลจากการทำ SDS-PAGE และ immunoprecipitation พบว่า MAb ที่นำมาศึกษานั้น ทำปฏิกิริยากับโปรตีนของเชื้อได้แตกต่างกัน คือ MAb clone หนึ่งทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 235,000 ดาลตัน ส่วน MAb อีก clone หนึ่งจะทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาดคือ 230,000 ถึง 28,000 ดาลตัน และได้ใช้ MAb ดังกล่าวแยกแอนติเจนของเชื้อให้มีความบริสุทธิ์สูง แล้วนำแอนติเจนบริสุทธิ์นี้ไปฉีดหนู Balb/c พบว่าแอนติเจนที่มีขนาด 235,000 และ 230,000

ดาลตันและที่มีขนาดใกล้เคียงกันสามารถป้องกันการติดเชื้อ P. yoelii ในหนูได้

ในปี ค.ศ.1981 Perrin และคณะ ได้ผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย P. falciparum โดยทำการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ P. falciparum กับเซลล์ myeloma ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ P3-X63-Ag8 ในอัตราส่วนของ myeloma ต่อเซลล์ม้าม เท่ากับ 1:2 ได้เซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ P. falciparum ทั้งหมด 47 หลุมจากจำนวนที่ทำทั้งหมด 978 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และ MAb ที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแตกต่างตามระยะการเจริญของเชื้อได้ 3 แบบ คือ มีความจำเพาะกับเชื้อที่มีการเจริญในระยะ trophozoite หรือ schizont เท่านั้น, มีความจำเพาะกับเชื้อที่อยู่ในระยะ schizont เท่านั้นและที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียทุกระยะการเจริญ นอกจากนี้ได้ทำการทดลองศึกษา ความสามารถของ MAb ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้ MAb ที่ผลิตได้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ P. falciparum พบว่ามี MAb เพียง 3 clone จากจำนวนทั้งหมด 11 clone เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในระยะ schizont และการ reinvasion ของ merozoite ได้ หลังจากนั้นมีผู้ทำการผลิต MAb ต่อเชื้อมาลาเรียชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น โดยในปี ค.ศ.1982 McBride และคณะได้ทำการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ P. falciparum กับเซลล์ myeloma (P3-X63-NS/1(NS-1)) ทั้งหมด 7 ครั้ง ได้เซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย ทั้งหมด 247 หลุมจากจำนวนที่ทำทั้งหมด 856 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อทำ single cell cloning ได้ monoclone ทั้งหมด 32 clone ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่อระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรีย และรูปแบบการติดสารเรืองแสงของปฏิกิริยา IFA ระหว่าง MAb กับแอนติเจนของเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ schizont และ merozoite ดังนี้คือ MAb กลุ่มที่ 1 มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียทุกระยะที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดง รวมทั้งระยะ gametocyte ด้วย ส่วน MAb กลุ่มที่ 2 มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียที่เจริญอยู่ในระยะ schizont และ merozoite โดยเกิดการเรืองแสงเข้มบริเวณภายในเซลล์ของ merozoite สำหรับ MAb กลุ่มที่ 3 มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียทุกระยะ และระยะ late schizont ซึ่งเป็นระยะที่มี merozoite อยู่ภายในเซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยากับ MAb กลุ่มนี้ มีการเรืองแสงบริเวณขอบของ merozoite แต่ละเซลล์ทำให้เห็นมี

ลักษณะคล้ายกับพวงองุ่น และ MAb กลุ่มที่ 4 มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียที่เจริญอยู่ในระยะ schizont และ merozoite เท่านั้นโดยติดสีสารเรืองแสงบริเวณขอบของ merozoite แต่ละเซลล์ที่อยู่ในเซลล์ของ schizont ได้รูปแบบการเรืองแสงเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3 ส่วน MAb กลุ่มที่ 5 มีปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ trophozoite และ schizontโดยมีการติดสีสารเรืองแสงตรงบริเวณรงควัตถุที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ McBride และคณะได้ทำศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum จำนวน 27 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ได้รับมาจากประเทศต่างๆ 8 ประเทศได้แก่ ไทย, ปาปัวนิวกินี, ศรีลังกา, ฮอนดูรัส, แกมเบีย, อินโดนีเซีย, พม่า, และยูกันดา ด้วย MAb กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 พบว่า MAb ที่ใช้ในการทดสอบสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อ P. falciparum ระหว่างไอโซเลตได้ Schofield และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาในทำนองเดียวกัน โดยได้ทำการผลิต MAb ที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ที่เป็นไอโซเลตจากประเทศ ปาปัวนิวกินี และทำการศึกษาความสามารถของ MAb ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียไอโซเลตที่ได้จากประเทศต่างๆ พบว่า MAb เหล่านั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียเฉพาะที่เป็นไอโซเลตจากประเทศปาปัวนิวกินีเท่านั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของไอโซเลตจากประเทศอื่นๆได้

ในปี ค.ศ. 1983 Hall และคณะ ได้ทำการผลิต monoclone ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ P. falciparum ได้ 22 clone จำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม เช่นเดียวกับ McBride และคณะ (1982) รายงานไว้ นอกจากนี้เขายังได้ทำการศึกษาโดยทำ immunoprecipitation และ SDS-PAGE ของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียด้วย MAb ที่เขาผลิตได้ พบว่า MAb กลุ่มที่ 1 ทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนที่มีขนาด 35 และ 50 กิโลดาลตัน MAb กลุ่มที่ 2 ทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนที่มีขนาด 160 กิโลดาลตัน ส่วน MAb กลุ่มที่ 3 และ 4 ทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนขนาดใหญ่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 190 กิโลดาลตัน MAb กลุ่มที่ 5 ทำปฏิกิริยา immunoprecipitate กับโปรตีนที่มีขนาด 160, 60 และ 35 กิโลดาลตัน

Khusmith และคณะ (1984) รายงานการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ McBride และคณะ

(1982) และงานวิจัยของ Hall และคณะ (1983) จากจำนวนที่ทำทั้งหมด 600 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีอยู่ 125 หลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรีย และได้ถูกจำแนกออกเป็น 5 กลุ่มทำนองเดียวกับที่ McBride และคณะ(1982) และ Hall และคณะ (1983) รายงานไว้ ยกเว้น MAb กลุ่มที่ 4 ที่ Khusmith ผลิตได้คล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 3 ของ McBride และ Hall แต่การติดสารเรืองแสงของเชื้อที่อยู่ในระยะ schizont มีลักษณะคล้ายกับกลุ่มลูกบอลเล็กๆ

Andrysiak และคณะ (1986) ได้ทำการผลิต MAb ต่อเชื้อมาลาเรีย P. vivax และ P. ovale สามารถผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อ P. vivax ได้ 9 clone และต่อ P. ovale 11 clone และได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ MAb ที่ผลิตได้กับเชื้อมาลาเรีย P. falciparum และ P. malariae พบว่า MAb บาง clone สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นได้ มีบาง clone เท่านั้นที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ P. vivax หรือ P. ovale งานวิจัยนี้มีประโยชน์มากสำหรับใช้ในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียในคนไข้ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียทั้ง 2 ชนิด คือ P. vivax และ P. ovale เป็นเชื้อที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน เมื่อตรวจดูจากสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมด้วยสีย้อมซ้ำ ทำให้ยากแก่การวินิจฉัย ยกเว้นแต่ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจดูลักษณะของเชื้อมาลาเรียเท่านั้น

MAb ต่อเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ที่มีผู้ผลิต นอกจากจะใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของแอนติเจนแล้ว ยังมีการนำไปใช้ศึกษา serotyping ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย (McBride et al.,1984) และการใช้ MAb ตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อ ซึ่งจะให้ความแม่นยำ และถูกต้องกว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Khusmith et al., 1986,1987b.,1988)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย