บทความพิเศษ

การแยกพลาสมาโปรตีน

ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์*
สวง ปัณฑวงศ์**

Tosukhowong P, Puntawong S. Plasma protein fractionation. Chula Med J 1986 May; 30(5) : 399-404

The fractionation of blood plasma yeilds a number of therapeutic proteins which together constitute a billion dollar worldwide market. Conventional fractionation procedures (Cohn precipitatation) are still currently in use. However, sophisticated chromatographic techniques such as affinity chromatography have been used to improve the purity of plasma protein fractions. The application of genetic engineering is likely to replace the conventional method of production of plasma fractions such as Faction VIII.

In Thailand, plasma components are supplied by the National Blood Transfusion Service. Enriched plasma components are supplied in the form of cryoprecipitation. It has been estimated that there is a severe shortage of blood components. This is due to the inadequate blood supply, and only few National Blood Transfusion Centers are well equipped enough to carry out the Cryoprecipitation of blood plasma.

*ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ฝ่ายวิชาการ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

พลาสมาเป็นส่วนประกอบของเลือดที่มีประโยชน์ใช้ในการรักษาโรคบางชนิดได้[1,2] ตารางที่ 1 ได้สรุปโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในพลาสมาที่มีความสำคัญทางคลีนิค โดยเหตุที่โปรตีนชนิดต่าง ๆ อยู่รวมกันในพลาสมา การแยกพลาสมาโปรตีนจึงเป็นสิ่งจำเป็นด้วยเหตุผลที่สำคัญกล่าวคือ เป็นการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่มีอยู่น้อยซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา ตัวอย่างเช่น factor VIII มีความเข้มข้นประมาณ 1 หน่วยต่อ ลบ.ซม. ของพลาสมา ถ้าคนไข้ต้องการ 250 หน่วย เท่ากับว่าต้องได้รับพลาสมา 250 มล. แต่ถ้าใช้ concentrate ของ factor VIII ที่แยกจากพลาสมาซึ่งมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 15 เท่าของพลาสมา[3] ให้คนไข้ 8-10 ลบ.ซม. เท่านั้น ก็พอเพียง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มจำนวนของการรักษา ถ้าหากไม่มีการแยกส่วนทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีนชนิดอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น Albumin ที่ใช้เป็นตัวเพิ่มปริมาตรของเลือดในกรณีสูญเสียเลือด ถ้ามีการแยกส่วนเอา factor VIII ออกมาทำให้มีประโยชน์ในการรักษาเลือดออกผิดปกติเพิ่มขึ้นได้

เทคโนโลยีของการแยกพลาสมาโปรตีนได้รับการพัฒนามาเป็นเวลานาน และยังไม่หยุดยั้ง ดังนั้นจึงขอเสนอวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันและแนวโน้มของการพัฒนาในอนาคต รวมทั้งความต้องการพลาสมาโปรตีนในประเทศไทยและในต่างประเทศ

Table 1 The physiological and clinical properties of proteins of current commercial interest

Protein	Normal plasma concentration (g/l)	Physiological function	Clinical indication and uses
Albumin	34 - 45	Maintaining blood tissue balance, hormone and drug transport	Plasma volume expander following haemorrhage
Immunoglobulin	10 - 25	Removal of foreign material	Inherited deficiencies, Infection, immunization
Factor IX (Christmas factor)	0.005	Component of the blood clotting cascade	Hemophilia B
Factor VIH (Antihemophilic globulin)	0.0001	"	Hemophilia A
Prothrombin complex	0.05 - 0.1	"	Rare Inherited deficiencies
Factor I (Fibrinogen)	2 - 4.5	Precursor of fibrin	Inherited deficiency Topical application after surgery
Fibronectin	0.3	Removal of particular matter	Sepsis, major surgery, burns & trauma
Antithrombin III	0.17 - .3	Inhibition of blood clotting	Inherited deficiency, anticoagulant
α 1-Antitrypsin	2.0	Inhibition of Collagenase & elastase	Inherited deficiency

การแยกพลาสมาโปรตีน

ปัจจุบันการแยกโปรตีน จากพลาสมายังคงใช้วิธีการของ Cohn[4] ซึ่งค้นพบในปี 1946 โดยอาศัยหลักการของการตกตระกอนของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ด้วยความเข้มข้นของเอธานอล อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ กัน ทำให้แยกพลาสมาโปรตีนออกเป็น 5 ส่วน (fraction) Factor VIII จะออกมาในส่วนแรก (fraction I) ส่วนที่ 2 และ 3 เป็น Immunoglobulin ชนิดต่าง ๆ และมี Factor II, VII, IX, X ร่วมอยู่ด้วย ส่วนที่ 4 จะเป็น Antithrombin III และ α -1-antitrypsin และ Albumin จะออกมาในส่วนที่ 5 (Fraction V) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2

Table 2 Summary of Cohn fractionation method

Cohn fraction	ETOH (%)	Temperature (°C)	pH	Main Theraputic proteins
I	8	-3	7.2	Factor VIII, fibrinogen fibronectin
II and III	25	-5	6.9	Immunoglobulin G, A, M Clotting factor II, VII, IX, X
IV	18	-5	5.2	Antithrombin III α -anti-trypsin,
V	40	-5	4.8	Albumin

ในแต่ละส่วนของ Cohn fraction มีการทำให้โปรตีนบริสุทธิต่อไปด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น ใช้ Column chromatography หรือ Affinity chromatography การเลือกใช้วิธีที่จะทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะให้โปรตีนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด สำหรับ factor VIII ที่อยู่ในส่วนที่ 1 ในต่างประเทศนิยมทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยสกัดด้วย Tris buffer แล้วตกตระกอนในที่เย็นเพื่อแยก fibrinogen และ fibronectin ออก จากนั้นทำ column chromatography โดยใช้ อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวดูดซับ แยกเอา factor อื่นที่ปนมาออกไป แล้วทำให้แห้ง เรียกส่วนนี้ว่า concentrated factor VIII[5,6] แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่เหมาะสมเพื่อสดวกสำหรับนำไปใช้กับผู้ป่วยที่มีเลือดออกต่อไป

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นหลังจากแยกโดยวิธีของ Cohn ไม่เพียงแต่ทำเฉพาะ Factor VIII เท่านั้น โปรตีนที่สำคัญตัวอื่นก็มีการทำให้บริสุทธิ์ด้วย โดยเฉพาะการทำ Albumin ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography[7] เป็นต้น หรือการทำ factor II IX และ X ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น[6] เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคต่อไป

อย่างไรก็ตามปัญหาการแยกและการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ยังคงมีอยู่ในอุตสาหกรรมของการแยกส่วนของพลาสมาโปรตีน โดยเฉพาะการสูญเสีย activity ของโปรตีนบางส่วนของ

Factor VIII ในระหว่างที่มีการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังไม่สามารถกำจัดปัญหาการติดเชื้อของไวรัสตับอักเสบบี และไวรัส HTLV-3 ที่ทำให้เกิดโรค AIDS ที่อาจ ปนปลอมอยู่ในเลือด เป็นต้น

การผลิตพลาสมาโปรตีนในอนาคต

สำหรับอนาคตแล้ววิธีของ Cohn ยังคงเป็นวิธีที่เหมาะสมทางด้านอุตสาหกรรม ถ้ามีการพัฒนาขั้นตอนของ chromotagraphy ให้ดีรวมทั้งใช้ affinity chromatography เพื่อให้ผลผลิตมีคุณภาพสูงขึ้นและมีความบริสุทธิเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้เทคโนโลยีใหม่ที่ควรมุ่งพัฒนาเพื่อ นำมาใช้ในการผลิต albumin factor VIII, factor IX และพลาสมาโปรตีนอื่น คือ วิธีวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันได้มีผู้พยายามนำเทคนิควิศวกรรมพันธุศาสตร์มาใช้ในการผลิต Albumin ได้[8] แต่โอกาสที่จะพัฒนาขึ้นมาใช้ผลิตเป็นอุตสาหกรรมยังเป็นไปไม่ได้ ทั้งนี้เพราะต้นทุนการผลิตยังสูงมาก และยังไม่มีวิธีทำให้บริสุทธิ์ปราศจาก non human antigenic protein สำหรับ factor VIII ก็เช่นเดียวกัน มีผู้ clone ใน mammalian cell[9] ได้สำเร็จแล้วแต่ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และขณะนี้สามารถทราบยีนที่ใช้สังเคราะห์ factor IX[10] ได้แล้ว เป็นต้น โดยเหตุที่ความต้องการ Factor VIII มีมากและมีราคาแพง การผลิตพลาสมาโปรตีนโดยวิธีวิศวกรรมพันธุศาสตร์ในอนาคตอาจเป็นไปได้ถ้ามีการพัฒนาให้ดีขึ้นไปอีก

การผลิตพลาสมาโปรตีนในประเทศไทย

ในประเทศไทยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่ให้บริการเลือดและส่วนประกอบของเลือดแก่โรงพยาบาลต่าง ๆ ทั้งในกรุงเทพและต่างจังหวัด และเก็บเลือดจากอาสาสมัครทั่วประเทศโดยมีสาขาศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติอยู่ทุกจังหวัด โดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ พยายามผลิตส่วนประกอบของเลือดจากเลือดผู้มาบริจาคให้ได้หลายชนิดเพื่อให้ได้ผลคุ้มค่ามากที่สุด อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถผลิตให้พอกับความต้องการของผู้ใช้ทั่วประเทศได้ และยังประสบกับปัญหาการขาดแคลนพลาสมาที่จะใช้ผลิตอยู่เพราะปัจจุบันทางศูนย์ฯ สามารถนำเอาเลือดมาเพื่อแยกส่วนประกอบของเลือดได้ประมาณ 25% ของจำนวนเลือดที่เจาะเก็บที่ศูนย์ฯ[11]

สำหรับเรื่องการผลิตส่วนประกอบของเลือดและพลาสมาโปรตีน ที่ศูนย์ฯ ได้ทำและให้บริการคือการผลิตพลาสมาสดที่เป็นของเหลว พลาสมาสดแห้ง พลาสมาสดแช่แข็ง และมีพลาสมาที่แยกจากเลือดเก่า (Aged plasma) ซึ่งทำออกมาทั้งชนิดที่เป็นของเหลวและชนิดแห้ง ส่วน concentrate ของ Factor VIII ชนิดที่แห้งและบริสุทธิ์ยังไม่ได้ผลิตขึ้นมา แต่ได้ผลิต cryoprecipitate ที่มี factor VIII ในปริมาณสูง แต่ยังมี factor อื่น และ fibrinogen ปนอยู่ออกมาในรูปของเหลว ปริมาตร 10-25 มล. มีแฟกเตอร์ VIII ประมาณ 100 หน่วย ซึ่งต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. สำหรับการทำ plasma fractionation เช่นเตรียม Albumin และโปรตีนอื่น ๆ เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรค ได้เริ่มทำออกมาบ้าง ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างทดลองประสิทธิภาพของโปรตีนที่แยกออกมาได้ และทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติได้เริ่มผลิต Hepatitis B vaccine ด้วย

พลาสมาโปรตีนในตลาดโลก

พลาสมาโปรตีนที่นำมาใช้ในการรักษาโรคและมีบทบาททางเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สำคัญคือ Albumin มีการนำมาใช้ถึง 38% และซื้อขายกัน

ในราคา 2.5 เหรียญสหรัฐต่อกรัม เมื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคจะใช้ประมาณ 12.5 กรัมต่อครั้ง มีคุณค่าทางเศรษฐกิจปีละ 250-750 ล้านเหรียญสหรัฐ และมีการใช้ factor VIII กันประมาณ 18% ซึ่งมีราคาถึง 5,000,000 เหรียญสหรัฐต่อกรัม เมื่อนำไปใช้ต้องใช้ประมาณ 12.5 ไมโครกรัม (250 หน่วย) ต่อครั้ง เสียค่าใช้จ่ายประมาณปีละ 250-275 ล้านเหรียญสหรัฐ ส่วน Immunoglobulin ใช้กันมากในประเทศญี่ปุ่น เยอรมัน และซื้อขายกันประมาณ 300-500 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี[8]

ประเทศที่ใช้พลาสมาและส่วนประกอบต่าง ๆ ของพลาสมามากที่สุดคือสหรัฐอเมริกา เยอรมัน และญี่ปุ่น ในปี 1980 พบว่าประเทศเหล่านี้ใช้พลาสมาโปรตีนประมาณ 65% ของตลาดโลกคิดเป็นมูลค่าถึง 1.2 พันล้านเหรียญสหรัฐ คาดว่าความต้องการนี้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นปีละ 10% ตามที่ American Blood Resources Association[8] ได้รายงานว่าทั่วโลกต้องการใช้พลาสมาปีละ 9.5×10^6 ลิตร ขณะที่สหรัฐอเมริกาผลิตได้เพียงปีละ 7.7×10^6 ลิตร

ความต้องการพลาสมาโปรตีนในประเทศไทย

พิจารณาเฉพาะความต้องการ Factor VIII เพื่อรักษาโรค Hemophilia A ในประเทศไทย ซึ่งมีอัตราพอ ๆ กับต่างประเทศคือ จากรายงานในปี 2522 พบว่ามีอัตรา 1 คนต่อประชากร 20,000 คน หรือในประเทศไทยมี hemophilia A ประมาณ 2,500 คน เฉลี่ยแล้วต้องใช้ Factor VIII ประมาณ 20,000 หน่วย ต่อรายต่อปี ซึ่งต้องใช้ Factor VIII 50 ล้านหน่วย ถ้าประเมินราคาในต่างประเทศประมาณ 5 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี แต่ในประเทศไทยไม่นิยมใช้ concentrate ของ Factor VIII จากต่างประเทศ และยังไม่มีใช้เพราะราคาแพงมาก[13] สำหรับความต้องการโปรตีนชนิดอื่นในบ้านเรา เช่น เมื่อมีความต้องการใช้ Albumin เพื่อรักษาโรคจะใช้ในรูปของพลาสมาแทน หรือกรณีที่มีการเสียเลือดจากสาเหตุต่าง ๆ เนื่องจากขาดปัจจัยของการแข็งตัวของเลือดจะใช้พลาสมาสดโดยถือว่าพลาสมาสดมีปัจจัยของการแข็งตัวของเลือดทุกตัว หรือใช้ในรูป cryoprecipitate แทน ซึ่งส่วนใหญ่ก็ได้จากที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และ โรงพยาบาลใหญ่บางแห่งผลิตขึ้นเอง[13]

ข้อเสนอแนะ

การแยกพลาสมาโปรตีน จะได้โปรตีนหลายชนิดที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ การศึกษาเทคโนโลยีสำหรับใช้แยกพลาสมาที่เหมาะสมและเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะเป็นผลดีต่อการนำเอาโปรตีนนั้นไปใช้รักษาโรค และทำให้ลดการขาดแคลนโลหิตลงได้บ้าง

ฉะนั้นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสมควรจะเป็นแหล่งผลิต concentrate ของ factor VIII และโปรตีนอื่น ๆ รวมทั้งเผยแพร่เทคนิคของการแยกให้กับบุคลากรของสาขาศูนย์ต่าง ๆ ได้ผลิตขึ้นใช้เองได้ และสามารถนำพลาสมาที่เหลือจากการแยกองค์ประกอบของเลือดที่จะทิ้งไปมาใช้ให้เป็นประโยชน์ สำหรับสาขาศูนย์ที่ยังไม่พร้อมที่จะผลิตขึ้นเอง ทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติควรจะเป็นศูนย์กลางการผลิตเพื่อแจกจ่ายให้ผู้ใช้ และปัญหาที่สำคัญที่สุดคือทางศูนย์ฯ ต้องพยายามหาผู้บริจาคโลหิตจำนวนมากเพื่อจะได้มีพลาสมาที่มากพอที่จะมาใช้แยกพลาสมาโปรตีนด้วย

อ้างอิง

1. Howland WS. Anesthesiologic Perspectives of Blood Trans fusion. In : Petz LD, Swisher SN, eds. Clinical Practice of Blood Transfusion. London : Churchill Livingstone, 1981. 475-477
2. วิชัย เหล่าสมบัติ. โรคฮีโมฟีเลียในภาวะเลือดออกผิดปกติในเด็ก พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เรือนแก้วการพิมพ์, 2527. 89-106
3. Jean ERA, Marshall PJ, Lowe Cr. Plasma protein fractionation. Trends in Biotechnology 1985 Oct; 3(10) : 267-270
4. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL. Plasma protein fractionation. J Am Chem Soc 1946; 68 : 459-475
5. Newman J, Johnson AJ, Karpatkin MH, Puszkin S. Methods for the production of clinically effective intermediate and high purity factor VIII. Br J Haematol 1971 July 21(1) : 1-20
6. Johnson AJ, Mathews RW, Fulton AJ. Fractionation of factor VIII and IX. Scand J Haematol 1984 Feb; 33(Suppl 40) : 513-524
7. Travis J, Bowen J, Tewksburg D. Isolation of albumin from whole plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. Biochem J 1976 Aug; 157(2) : 301-306
8. Klausner A. Adjustment in the blood fraction market. Biotechnology 1985 Jun; 3(2) : 119-125
9. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. Nature 1984 Nov 22; 312(5992) : 342-347
10. Choo KH, Gould KG, Rees DJG, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. Nautre 1982 Sep 9; 299(5878) : 178-180
11. สวง ปัณฑวงศ์. Blood components Role of National Blood Transfusion Services. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร 2528; 2(1) : 4-8
12. Israngkura P, Bintadish P, Hathirat P, Sasanakul W. Prevalence of hereditary bleeding disorders in Thailand. The 22th SEAMEOTROPMED seminar and Workshop on Congenital and Acquired Bleeding Disorders in Tropical Areas. Bangkok January 21, 1979.
13. ศศิธร เพชรจันทร. การรักษาโดยการให้ทดแทนในโรคฮีโมฟีเลีย A,B และโรค von-willebrand. ใน : จินตนา ศิรินาวิน, ชนิกา ตู้จินดา, บรรณาธิการ. เวชพันธุศาสตร์และปัญหาโรคพันธุกรรมในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : เรือนแก้วการพิมพ์, 2524. 70-73

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 17 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529