แนวทางการปฏิบัติในการทำให้เกิดท้องมานในสัตว์เพื่อการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้

(Guidelines for Ascites Production)

วิธีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้ (mAb) โดยการทำให้เกิดท้องมานหนูจะต้องพิจารณาเหตุผลความจำเป็นด้านวิทยาศาสตร์ในกรณีที่ไม่มีวิธีการอื่นที่สามารถให้คุณภาพและความเข้มข้นของ mAb ตามที่ต้องการใช้ในโครงการวิจัย สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้วิธีทำให้เกิดท้องมานคือความเจ็บปวดและความไม่สบายที่จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของการอักเสบในช่องท้องของสัตว์ซึ่งไม่ใช่เฉพาะเกิดการอักเสบในเยื่อบุช่องท้อง (peritonitis) เท่านั้น แต่ต้องพิจารณาการเกิดเนื้องอก (fibrinous tags) เกาะติดกับผิวของอวัยวะอื่นในช่องท้องเช่น ลำไส้ ม้าม และตับ

โครงการที่จะผลิต mAb โดยใช้วิธีนี้ต้องมีกระบวนการต่างๆที่สมเหตุสมผล เพื่อลดความไม่สบายและความเครียดที่จะเกิดขึ้นกับสัตว์ ดังนี้

1. ขั้นตอนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunization procedure) ต้องทำโดยบุคลากรที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญ
2. มีการสังเกตสัตว์ทุกวัน วันละ 2 ครั้ง โดยบุคลากรที่มีความรู้และความสามารถในการสังเกตอาการแสดงของสัตว์
3. จำกัดการเจาะช่องท้องเพื่อระบายของเหลวเพียง 3 ครั้ง โดยการเจาะครั้งที่ 4 ต้องเป็นการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย
4. เตรียมการทำการุณยฆาต (euthanasia) หากสัตว์แสดงอาการเครียดและพบว่าสัตว์อยู่ในภาวะเจ็บใกล้ตาย

เนื่องจากมีการพัฒนาใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ มากยิ่งขึ้นเพื่อการผลิต mAb ดังนั้นนักวิจัยต้องตระหนักถึงและพิจารณาใช้ทางเลือกเหล่านี้ทดแทนการผลิตในสัตว์ ยกเว้นมีเหตุผลความจำเป็นด้านวิทยาศาสตร์

ข้อพิจารณาเพื่อการประเมินการจัดเตรียมข้อเสนอโครงการผลิต mAb

1. มีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการผลิต mAb หรือไม่ อะไรคือเป้าหมายของงานวิจัยหรือโครงการที่ต้องการใช้แอนติบอดี้
2. ต้องการแอนติบอดี้จำนวนเท่าใด? และช่วงเวลาใด
3. hybridomas ต้องถูกทดสอบโดยวิธี MAP (Mouse Antibody Production) หรือไม่
4. มีความพยายามอย่างเพียงพอที่จะเพิ่มปริมาณ hybridomas ในหลอดทดลอง(*in vitro*) หรือไม่
5. ผลิตที่หน่วยงานหรือผลิตเพื่อการค้า
6. สายพันธุ์ (strain) และจำนวนของสัตว์ที่ใช้มีความเหมาะสมหรือไม่

7. มีการปูพื้น (priming) เหมาะสมหรือไม่ในแง่ของประเภท (type) และจำนวน (amount) และช่วงเวลาเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ (inoculation of hybridomas)
8. สัตว์ควรได้รับการเฝ้าสังเกตอย่างเพียงพอเพื่อดูอาการทางคลินิก และกำหนดหลักเกณฑ์การการุณยฆาต

<u>ขั้นตอนการผลิต mAb โดยการทำให้สัตว์ท้องมาน</u>

แนวทางการปฏิบัติมีดังนี้

ก. การปูพื้น (priming) : ปริมาณของสารที่ใช้กระตุ้นเพื่อทำให้เกิดการเติบโตของถุงน้ำในช่องท้องควรลดจำนวนลงให้เหลือน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น เช่นเดียวกันกับที่ต้องลดความเครียดที่อาจจะเกิดขึ้นจากการระคายเคืองจากสารกระตุ้นที่ใช้ แม้ว่ามีการใช้ Pristane ปริมาณ 0.5 ml ในหนูไมซ์โตเต็มวัย แต่พบว่าปริมาณ 0.1-0.2 ml ก็มีประสิทธิภาพสำหรับ hybridomas หลายชนิด ตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ให้ใช้ในปริมาณ >0.2 ml และกระตุ้นซ้ำหลายครั้ง แต่ปริมาณ pristine ที่แนะนำให้ใช้คือ 0.1 ml (เอกสารอ้างอิง 1)

ข. การบ่มเพาะ hybridomas (Hybridomas Inoculation) : ช่วงเวลาระหว่างการปูพื้นและการบ่มเพาะ hybridomas และจำนวนเซลล์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของนักวิจัย จำนวนเซลล์ที่ใช้อยู่ในช่วง 10^5 – 10^7 เซลล์ ในปริมาณ 0.1-0.5 ml โดยปกติขั้นตอนนี้จะทำหลังการปูพื้น 10-14 วัน โดยทั่วไปปริมาณความเข้มข้นที่สูงมากจะทำให้อัตราการตายสูง และความเข้มข้นน้อยกว่า $1x10^5$ ทำให้เกิดถุงน้ำขนาดเล็กและมีแนวโน้มที่จะได้ปริมาณ mAb น้อยด้วย การเตรียมเซลล์ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย (cells suspension) ควรทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

ค. MAP Testing: Hybridomas ควรมีการทดสอบ Mouse Antibody Production: MAP ก่อนที่จะฉีดเข้าไปในสัตว์ตัวรับ (host) เพื่อป้องกันการติดเชื้อที่อาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของ cell lines ใน mouse antibodies ซึ่งอาจติดต่อถึงเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานในสัตว์ ต้องแนบสำเนาผลการทดสอบ MAP testing ไว้กับข้อเสนอโครงการด้วย

ง. การสังเกต/ติดตามดูแลสัตว์ : การดูแลสัตว์เป็นรายตัวโดยบุคลากรที่ทราบลักษณะอาการทางคลินิกของสัตว์ที่ถูกทำให้เกิดท้องมาน ควรสังเกตอาการสัตว์ทุกวัน วันละ 2 ครั้ง รวมทั้งในวันหยุดและวันนักขัตฤกษ์ด้วยหลังจากมีการฉีดสาร สังเกตขนาดของท้องเป็นประจำทุกวัน เพื่อว่าอาจทำการเจาะระบายของเหลวจากช่องท้องหากจำเป็น สัตว์จะถูกสังเกตวันละ 2 ครั้งเพื่อดูลักษณะการโป่งนูนของช่องท้อง ความหยาบของขน การสูญเสียความอยากอาหาร ภาวะขาดน้ำของร่างกาย น้ำหนักตัวลด สูญเสียสภาพปกติของร่างกาย ไม่ทำกิจกรรม เคลื่อนไหวตัวยากลำบาก หายใจเร็ว หายใจลำบาก สัตว์ที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง มีก้อนเนื้องอกโตแข็ง หรือเริ่มมีอาการเจ็บป่วยรุนแรงก่อนที่ถุงน้ำจะมีขนาดใหญ่ที่สุด (ประมาณ 2 เท่าของความกว้างปกติของช่วงท้อง) จะเตรียมพร้อมเพื่อทำ

การุณยฆาต การพิจารณาให้การตายเป็นจุดสิ้นสุดการทดลองไม่สามารถยอมรับได้ ควรมีการระบุอย่างชัดเจนไว้ในข้อเสนอโครงการว่าจะใช้จุดสิ้นสุดการทดลองอย่างไร

จ. การเจาะช่องท้อง/การเก็บ ascites fluid: ลักษณะจำเพาะของผลผลิต antibodies มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ hybridomas cell lines ที่ใช้ วิธีการปฏิบัติเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางคลินิกของโรคก็มีความแตกต่างเช่นกัน เพื่อให้ได้ปริมาณ antibody มากที่สุดแต่ต้องเกิดความไม่สบายกับสัตว์น้อยที่สุด นักวิจัยต้องตระหนักถึงสิ่งสำคัญ 4 อย่าง

- มีการประเมินขนาดช่วงท้องของสัตว์เป็นประจำเพื่อดูเวลาที่จะเจาะระบายของเหลวเพื่อลดอาการรุนแรงของโรคและอัตราการตาย (ไม่เกิน 2 เท่าของขนาดท้องปกติ)
- ต้องติดตามสังเกตสัตว์วันละ 2 ครั้ง ดูแลอย่างใกล้ชิดหลังการเจาะระบายของเหลวเพื่อหลีกเลี่ยงอาการช็อคที่เกิดจากการสูญเสียน้ำจากร่างกาย อาจให้น้ำเกลือใต้ผิวหนังประมาณ 2-3 ml เพื่อทดแทน
- ควรเจาะระบายของเหลวเพื่อไม่ให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเกิน 20% เมื่อเทียบกับวันแรกที่เริ่มการทดลอง (day 0) ยกตัวอย่างเช่นหนูน้ำหนัก 20 กรัม ก็ไม่ควรมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่า 24 กรัม
- เจาะระบายของเหลวได้มากที่สุด 3 ครั้ง (ปริมาณ antibody สูงสุด/จำนวนสัตว์น้อยที่สุด)

รายงานสรุปของ ILAR (สภาวิจัยแห่งชาติ, การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้, National Academy Press, 1999) อยู่ในเอกสารอ้างอิง 2

เอกสารอ้างอิง 1

ผลการใช้ Pristane ที่ปริมาณแตกต่างกันเพื่อการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้

(Effect of Different Pristane Priming Protocols on the Production of HPCG-14 MoAB in CD2F1 Mice)

ขนาด Pristane	ครั้งที่เจาะ	จำนวนหนู		ผลผลิตที่ได้		MoAB (mg)		สรุปสะสม			
		เริ่มต้น	ทดสอบ	ต่อ1ตัว	รวม	ความเข้มข้น	รวม	ml		mg	
								ต่อตัว	รวม	รวม	ต่อตัว
0.2 ml (1X)	1st	14	14	2.4	34	0.3	10.1	2.4	34	10.1	0.7
	2nd	-	6	2.3	14	<0.1	<0.1	3.4	48	10.2	0.7
0.5 ml (1X)	1st	14	8	3.0	24	1.6	38.4	3.0	24	38.4	4.8
	2nd	-	8	2.3	18	2.3	42.0	5.25	42	80.4	5.7
	3rd	-	2	2.1	4	0.6	2.5	5.76	46	82.9	5.9
0.2 ml (2X)	1st	18	14	4.3	60	0.6	37.7	4.3	60	37.7	2.7
	2nd	-	12	2.8	34	1.5	50.6	6.7	94	88.3	4.9
	3rd	-	3	2.3	7	3.2	22.2	7.2	101	110.5	6.1
0.5 ml (2X)	1st	20	19	4.3	81	0.6	47.4	4.3	81	47.4	2.5
	2nd	-	19	3.1	59	0.9	54.0	7.3	140	101.4	5.1
	3rd	-	10	2.0	20	1.4	27.4	8.0	160	128.8	6.4

Kenny J. and Reynolds C, 1992

เอกสารอ้างอิง 2

การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้

รายงานคณะกรรมการดูแลวิธีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้

สถาบันวิจัยสัตว์ทดลอง

สภาวิจัยแห่งชาติ

1999

(Monoclonal Antibody Production, A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, 1999)

โมโนโคลนัลแอนติบอดี้ (Monoclonal Antibody: mAb) คือสารสำคัญที่ใช้ในงานวิจัยด้านชีวการแพทย์เพื่อวินิจฉัยโรค และการรักษาโรคติดเชื้อ และมะเร็ง แอนติบอดี้ (Ab) เหล่านี้ผลิตขึ้นโดย cell lines หรือการ clone ที่ได้จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารที่เป็นวัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อผลิต mAb ที่ต้องการ เซลล์จะต้องเจริญเติบโตโดยวิธีใดวิธีหนึ่งคือ โดยการฉีดเข้าไปในช่องท้อง (abdominal cavity) ของหนูที่ได้รับการเตรียมอย่างเหมาะสม หรือโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง (plastic flask) ขั้นตอนหลังจากการเก็บของเหลวในท้องหนู (mouse ascitic fluid) หรือการเก็บสารจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture supernatant) คือการหา mAb ที่ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ตามต้องการ การผลิต mAb ในหนูเป็นวิธีที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย และมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง แต่วิธีการผลิตในหนูนั้นต้องระวังเรื่องการลดความเจ็บปวดทรมานที่จะเกิดขึ้นจาก cell lines ซึ่งบางครั้งเกิดขึ้นมากจนหนูท้องมานขนาดใหญ่เกินความจำเป็น หรือเกิดจากการเกิดเนื้องอกในอวัยวะอื่นที่อยู่ในช่องท้อง (invasion of the viscera)

การผลิตโมโนโคลนัลโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน่าจะเป็นที่ยอมรับกว้างขวางขึ้นหากวิธีการนี้เป็นที่รู้จักและมีความเข้าใจเป็นอย่างดีเทียบเท่ากับวิธีการใช้สัตว์ทดลอง และหากวิธีการนี้สามารถผลิต Ab ได้ทุกๆ cell lines ที่ต้องการ แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลามาก และมักล้มเหลวในการผลิต Ab ที่ต้องการหากปราศจากทักษะความชำนาญของผู้ปฏิบัติ อย่างไรก็ตามวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันเริ่มมีต้นทุนถูกลง เป็นที่รู้จักมากยิ่งขึ้น และเริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น

ต้นปี 1997 กลุ่มต่อต้านการทดลองกับสิ่งมีชีวิต (The American Anti-Vivisection :AAVA) ยื่นข้อร้องเรียนถึง NIH เพื่อยับยั้งการผลิต mAb ในสัตว์ทดลอง NIH ตอบรับปลายปี 1997 ยืนยันสิทธิ์ในการใช้วิธีการผลิต mAb ในสัตว์ทดลองว่าเป็นความจำเป็นทางวิทยาศาสตร์ ปี 1998 กลุ่มต่อต้านการทดลองกับสิ่งมีชีวิตยื่นข้อร้องเรียนที่สองถึงสภาวิจัยแห่งชาติ (NRC) เนื่องจากไม่ยอมรับคำตอบของ NIH เพื่อให้สภาวิจัยแห่งชาติตั้งคณะกรรมการศึกษาข้อร้องเรียนนี้ คณะกรรมการพิจารณาวิธีการผลิต mAb จึงถูกแต่งตั้งขึ้น

โดยประกอบด้วยผู้เชี่ยวชาญ 11 คน ซึ่งมีประสบการณ์ด้านงานวิจัยทางชีวการแพทย์ อายุรกรรมสัตว์ทดลอง การวิจัยความเจ็บปวดในสัตว์ สวัสดิภาพสัตว์ และทนายแก้ต่าง (patient advocacy) คณะกรรมการถูกร้องขอให้พิจารณาว่ามีความจำเป็นทางวิทยาศาสตร์ในการผลิต mAb ในสัตว์หรือไม่ หากมีความจำเป็นจะมีข้อเสนอแนะใดที่ใช้เพื่อลดความเจ็บปวดทรมานที่จะเกิดขึ้น นอกจากนี้คณะกรรมการยังพิจารณาว่ามีข้อเรียกร้องด้านกฎหมายในการผลิต mAb หรือไม่ และสรุปสถานการณ์ปัจจุบันของการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง และเสนอข้อพิจารณาต่างๆให้คณะกรรมการซึ่งสมาชิกมีประสบการณ์ มีการนำเสนอผลงานในการประชุมเชิงปฏิบัติ 1 วัน โดยมีผู้บรรยาย 14 คน มีผู้สังเกตการณ์ 20 คน และคณะทำงานอีก 20 คน คณะกรรมการมีข้อสรุปและข้อเสนอแนะดังนี้

คณะกรรมการเห็นว่า การเลือกใช้วิธีการผลิต mAb ในสัตว์เป็นไปตามข้อเสนอแนะอื่นใน The Guide for Care and Use of Laboratory Animals ข้อแนะนำข้อหนึ่งซึ่งเกี่ยวกับการผ่าตัดแบบรอดชีพหลายครั้ง The Guide ระบุว่า (หน้า 12) “การปฏิบัตินี้ไม่ควรทำแต่อนุญาตให้ทำได้หากนักวิจัยมีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์อธิบาย และได้รับการอนุมัติโครงการโดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง (IACUC)” ดังนั้นคณะกรรมการจึงมีความเห็นว่าการผลิต mAb ในสัตว์สามารถกระทำได้หากมีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนและได้รับการอนุมัติโครงการจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ นอกจากนี้คณะกรรมการเห็นว่าควรเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการผลิต mAb โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับ mAb ที่มีความต้องการกำลังการผลิตในระดับสูง (large scale) หาก hybridomas ไม่เติบโตหรือไม่ให้ผลผลิตตรงตามวัตถุประสงค์การทดลองที่ตั้งไว้ นักวิจัยจะเป็นผู้เสนอข้อเท็จจริงในการขอใช้วิธีการเพาะเลี้ยง hybridomas ในหลอดทดลอง ก่อนจะมีการเลือกใช้วิธีการผลิตในสัตว์ทดลอง

<u>ข้อเสนอแนะที่ 1 :</u> เป็นความจำเป็นสำหรับชุมนุมด้านวิทยาศาสตร์ในการหลีกเลี่ยงหรือลดความเจ็บปวดทรมานของสัตว์ นอกจากนั้นในช่วงเวลาหลายปีต่อจากนี้เมื่อวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับการพัฒนามากยิ่งขึ้น การผลิต mAb จากวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรนำมาใช้ปฏิบัติเป็นวิธีพื้นฐาน หากไม่มีเหตุผลดีพอว่าเหตุใดไม่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ และเหตุใดวิธีการนี้ยังคงมีอุปสรรคเรื่องค่าใช้จ่ายซึ่งขึ้นอยู่กับเงินทุนที่แผนงานได้รับการสนับสนุน ซึ่งควรแก้ไขโดยการจัด facility ของสถาบันเพื่อรองรับการผลิตแบบ tissue culture

มีเหตุผลหลากหลายที่อธิบายว่าเหตุใดไม่สามารถเลิกใช้วิธีการผลิต mAb ในสัตว์ ได้แก่:

1) cell lines บางชนิดไม่สามารถเติบโตในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2) ในหลายๆงานวิจัยซึ่งต้องการ mAb ที่แตกต่างกันหลากหลายชนิดที่ปริมาณความเข้มข้นสูงๆ เพื่อฉีดเข้าในหนู วิธีการผลิตในหลอดทดลอง (*in vitro*) ไม่มีประสิทธิภาพ

3) cell lines ของหนูแรทโดยปกติจะไม่มีประสิทธิภาพในการสร้าง mAb ในหนูแรทและพัฒนาได้ยากในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ต้องสร้าง mAb โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูไมซ์ (immunocompromised mice)

4) กระบวนการที่ใช้เพื่อการทำเซลล์ให้บริสุทธิ์ (purification) หรือการสร้างความเข้มข้น (concentration) จากวิธี *in vitro* ทำให้โปรตีนผิดลักษณะ (denaturation) และลดหน้าที่ของ Ab ลง

5) วิธี tissue culture ให้ผลผลิต mAb ที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามปกติของโปรตีนด้วยน้ำตาล และความผิดปกตินี้เองจะมีผลในการทำงานและหน้าที่ของ mAb

6) การเกิดการปนเปื้อนของ cell lines ด้วยเชื้อราหรือแบคทีเรียทำให้ต้องมีการเตรียมพร้อมสำหรับขั้นตอนการส่งผ่าน cell lines เข้าไปในหนูเพื่อไม่ให้เสีย cell lines นั้นไป

7) cell lines บางชนิดไม่มีความสามารถในการเติบโตในสภาพ tissue culture ซึ่งทำให้ไม่สามารถให้ผลผลิต mAb ที่เพียงพอทำให้เกิดปัญหาใหญ่ตามมา ด้วยเหตุผลต่างๆเหล่านี้เอง คณะกรรมการจึงสรุปว่ายังคงมีความจำเป็นด้านวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นต้องใช้วิธีการผลิตในสัตว์ อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาล่วงผ่านไป เมื่อวิธี *in vitro* มีการพัฒนามากยิ่งขึ้น ความจำเป็นในการใช้วิธีการผลิต mAb ในสัตว์ย่อมจะลดลง

<u>ข้อแนะนำที่ 2:</u> ไม่ควรห้ามใช้วิธีการทำให้หนูท้องมานเพื่อการผลิต mAb เนื่องจากยังคงมีความจำเป็นด้านวิทยาศาสตร์อยู่

ยังไม่มีหลักฐานเป็นที่ประจักษ์ว่านัยสำคัญของความเจ็บปวดทรมานเกิดจากการฉีดสารเข้าไปในหนูด้วยสารเคมีที่ทำให้เกิดการเติบโตของเซลล์เนื้องอก (pristine) แต่ความเจ็บปวดทรมานจะเกิดในระหว่างที่สัตว์มีอาการท้องมาน โดยเฉพาะเมื่อ cell lines บางชนิดเช่นเนื้อเยื่อที่เป็นเนื้อร้ายถูกนำมาใช้และในกรณีที่หนูเกิดอาการท้องมานอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นหลังจากการฉีด hybridomas แล้วควรมีการประเมินสภาพสัตว์ทุกๆวันรวมทั้งในวันหยุดและวันนักขัตฤกษ์ด้วยหลังจากสัตว์เริ่มปรากฏอาการท้องมานให้เห็น ควรมีการเจาะระบายของเหลวออกจากช่องท้องก่อนที่สัตว์จะทรมานจากอาการท้องมานนั้น ควรพิจารณาสิ้นสุดการทดลองเมื่อเจาะเก็บของเหลวจากสัตว์ และจะอนุญาตให้มีการเจาะเก็บของเหลวหลายครั้งก็ต่อเมื่อสัตว์ไม่แสดงอาการทรมาน

<u>ข้อแนะนำที่ 3:</u> หากใช้วิธีการผลิต mAb โดยการทำให้สัตว์ท้องมาน ต้องมีการกระทำที่สมเหตุสมผลทุกอย่างเพื่อลดความเจ็บปวดทรมานที่จะเกิดกับสัตว์ รวมทั้งต้องมีการสังเกตสัตว์อย่างสม่ำเสมอ จำกัดจำนวนครั้งที่เจาะเก็บของเหลว และเตรียมพร้อมเพื่อการทำการุณยฆาตหากสัตว์แสดงอาการทรมาน

2 ใน 13 ชนิดของ mAb ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาว่าเป็นไปเพื่อการรักษาไม่สามารถผลิตขึ้นโดยกระบวนการ *in vitro* ได้ หรือหากจะเปลี่ยนไปใช้วิธี *in vitro* ต้องได้รับการยืนยัน (เนื่องจากเป็นข้อบังคับ) ว่าผลที่ได้มีความเทียบเท่ากันทางชีวภาพ (bioequivalence) ซึ่งอาจไม่เป็นที่

ยอมรับด้านต้นทุนการผลิต ยิ่งกว่านั้น mAb หลายชนิดที่ผลิตเพื่อการค้าโดยปกติจะผลิตในสัตว์ โดยเฉพาะเมื่อปริมาณที่ต้องการน้อยกว่า 10 กรัม ซึ่งเป็นอีกกรณีหนึ่งที่อาจนำมาพิจารณาไม่ใช้วิธีต้นทุนสูงอย่างวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามด้วยเทคโนโลยีที่จะเกิดขึ้นในอนาคตเพื่อการกลั่นกรองกระบวนการ (refinement) สื่อ (media) ต่างๆ และการฝึกปฏิบัติต่อไปข้างหน้า การผลิต mAb โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสนองความต้องการด้านงานวิจัยและการรักษาผู้ป่วยน่าจะพอเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นกับวิธีการผลิตในสัตว์ได้ และสามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีการใช้สัตว์ทดลองได้ด้วย

<u>ข้อแนะนำที่ 4:</u> mAb ที่ขณะนี้ผลิตเพื่อการค้าโดยการผลิตในสัตว์ควรจะกระทำต่อไป แต่ในระดับอุตสาหกรรมควรจะพัฒนาเพื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในบางครั้ง การผลิต mAb โดยการทำให้สัตว์เกิดท้องมานอาจมีความจำเป็น แต่มีข้อเสนอตามหลักเกณฑ์ของ IACUC เพื่อกำหนดแนวทางเรื่องการผลิต mAb ในหนูโดยการทำให้สัตว์ท้องมานดังนี้

เมื่อส่วนที่ลอยอยู่ด้านบน (supernatant) ของความหนาแน่นของ hybridomas ที่เพาะเลี้ยงมีอายุประมาณ 7-10 วัน (ใช้วิธี stationary batch method) จะให้ผลผลิต mAb ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 5 ug/ml หากมีการนำ hallow-fiber reactor หรือระบบ semipermeable-membrane มาใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 500 ug/ml และ 300 ug/ml ตามลำดับ จะถูกพิจารณาว่า mAb มีความเข้มข้นต่ำ

เมื่อมีความต้องการ mAb มากกว่า 5 mg ที่ถูกผลิตได้จากแต่ละ 5 hybridomas cell lines หรือมากกว่า พร้อมกัน ซึ่งในด้านเทคนิคแล้วเป็นไปได้ยากที่จะผลิต mAb ได้ในปริมาณนี้ เนื่องจากต้องมีการตรวจติดตามและมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าระดับเฉลี่ยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

เมื่อผลการวิเคราะห์ mAb ที่ผลิตได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสดงให้เห็นว่าบทบาทของ Ab ที่ต้องการถูกทำลายลงหรือสูญเสียไป

เมื่อ hybridomas cell lines สามารถเติบโตและเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในหนูเท่านั้น

เมื่อมีความต้องการ mAb มากกว่า 50 mg และประสิทธิภาพของ cell lines ก่อนหน้าชี้ให้เห็นว่า hollow-fiberreactor, small-volume membrane-based fermentors หรือเทคนิคอื่นไม่เป็นไปตามความต้องการในช่วงการเติบโตและการเพิ่มประสิทธิภาพที่ดีที่สุด

คณะกรรมการมีความเห็นว่าหลักเกณฑ์เหล่านี้ยังไม่ได้ครอบคลุมในทุกประเด็น ซึ่งก็คือหน้าที่รับผิดชอบของคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ ในการพิจารณาว่าการใช้สัตว์ทดลองมีความจำเป็นทางวิทยาศาสตร์หรือเป็นเพียงการทดลองตามปกติ หลักเกณฑ์เหล่านี้ไม่ได้ถูกกำหนดขึ้นเพื่ออธิบายกรณีที่ cell lines ผลิตได้ในปริมาณต่ำหรือเมื่อวิธี tissue culture ไม่มีประโยชน์สำหรับการผลิต mAb อีกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ascites Production in Mice. NIH Animal Research Advisory Committee Guideline. Revised March 27, 2002. http://oacu.od.nih.gov/ARAC/ascites.pdf
2. Special Section on Monoclonal Antibodies. Alternatives to Animal Testing on the Web (ALTWEB). http://altweb.jhsph.edu/mabs/mabs.htm
3. Behavioral, Clinical, and Physiological Analysis of Mice Used for Ascites Monoclonal Antibody Production (Attachment C). Norman C. Peterson. Comparative Medicine 50(5): 516-526, 2000.
4. Monoclonal Antibody Production in Murine Ascites I and II (Attachments D and E). Jackson LR, Trudel LJ, Fox JG, Lipman NS. Laboratory Animal Science 49(1): 70-86, 1999.
5. ILAR Journal Volume 37, Number 3, 141-152 (1995).
6. ILAR Report on Monoclonal Antibody Production. A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. 1999. http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf