J Med Biosci Vol. 8 No. 2 July - December 2026; 205 - 213 DOI: 10.58837/CHULA.JMBS.8.2.2

Original article

A comparison between anti-M monoclonal antibodies derived from humans versus mice produced by the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Sompong Boonhai

Department of Antiserum and Standard Cell Preparation, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: Since the first monoclonal antibody was approved for clinical use 30 years ago, the monoclonal antibody industry has grown rapidly and is of enormous value. Today, the National Blood Centre, Thai Red Cross Society, has successfully produced a monoclonal antibody blood typing reagent, which has brought many benefits to blood banks.

Objective: To comparatively study the efficiency of anti-M monoclonal reagents derived from humans *vs.* mice produced by the National Blood Centre, Thai Red Cross Society.

Methods: Serological tests for specificity and potency of anti-M monoclonal antibodies, the effect of proteolytic enzyme using papain enzyme, and the effect of different temperature and pH values on antigen-antibody binding reactions were performed. In addition, anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) and anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) reagents were delivered to the Kanto-Kosshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society, to assist in testing rare blood cells for M antigen subclasses. Donor blood samples with unknown MN antigens were also studied.

Results*:* The anti-M human monoclonal was found to be significantly more effective than the anti-M mouse monoclonal. In terms of specificity, it showed similar effects against M and N antigens. In terms of potency, there were clear differences, with anti-M human monoclonal having a titer and total hemagglutination score of 1,024 (OMM), 512 (OMN), and 107 (OMM), 103 (OMN), respectively, while anti-M mouse monoclonal had a titer and total hemagglutination score of 32 (OMM), 8 (OMN), and 60 (OMM), 57 (OMN), respectively. In terms of the proteolytic enzymes effect, both were negative. The effect of temperature and pH on the reaction tended to be in the same direction; that is, anti-M reacted well at 4 ^{0}C and room temperature, while the optimum pH was 7.0. In terms of the results of the M antigen subclass tests, it was found that anti-M human monoclonal could detect Mc (MNS8), while anti-M mouse monoclonal was negative. In the study of 600 blood donors with unknown MN antigens, 270 (45.0%) had MM antigens, 252 (42.0%) had MN antigens, and 78 (13.0%) had NN antigens.

Conclusion: Based on the comparative study of the efficacy of all these agents, it was shown that human monoclonal anti-M is much more effective than mouse monoclonal anti-M. Thus, it can replace the production of mouse monoclonal anti-M for distribution. Additionally, the high potency can be diluted to reduce the production cost very well.

Keywords: Anti-M, blood typing reagents, monoclonal antibody.

***Correspondence to: Sompong Boonhai,** Department of Antiserum and Standard Cell Preparation, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: aiscivic@hotmail.com
Received: April 10, 2025
Revised: September 22, 2025
Accepted: October 6, 2025

Open Access 2026 Boonhai., published by Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา anti-M human monoclonal กับ anti-M mouse monoclonal ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

สมพงศ์ บุญให้

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

ความเป็นมา: นับตั้งแต่มีการอนุญาตให้ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีตัวแรกสำหรับการใช้ทางคลินิกเมื่อ 30 ปีก่อน อุตสาหกรรมโมโนโคลนัลแอนติบอดีได้ขยายตัวอย่างรวดเร็วและมีมูลค่ามหาศาล ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สามารถผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีได้สำเร็จ ก่อให้เกิดประโยชน์ทางด้านธนาคารเลือดมากมาย

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา anti-M monoclonal ที่ผลิตขึ้นมาจากมนุษย์และหนู โดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วิธีการทำวิจัย: ทำการทดสอบ anti-M monoclonal ทางซีรัมวิทยา ทางด้านความจำเพาะ (specificity) และศักยภาพ (potency) ของแอนติบอดี ผลของเอนไซม์โปรตีโอไลติกโดยใช้เอนไซม์ papain การทดสอบอุณหภูมิและค่า pH ที่แตกต่างกันมีผลต่อปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจน-แอนติบอดี และยังได้ทำการจัดส่งน้ำยา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) กับ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) ไปยังศูนย์บริการโลหิต Kanto-Kosshinetsu Block สภากาชาดญี่ปุ่น เพื่อช่วยทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตหายากสำหรับ M antigen subclasses ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด

ผลการศึกษา: พบว่า anti-M human monoclonal มีประสิทธิภาพเหนือกว่า anti-M mouse monoclonal อย่างมากในด้านความจำเพาะ (specificity) ให้ผลเหมือนกันต่อแอนติเจน M และ N ทางด้านศักยภาพ (potency) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย anti-M human monoclonal มีความแรงของ titer และ score รวมเท่ากับ 1,024 (OMM), 512 (OMN) และ 107 (OMM), 103 (OMN) ตามลำดับ ในขณะที่ anti-M mouse monoclonal มีความแรงของ titer และ score รวม เท่ากับ 32 (OMM), 8 (OMN) และ 60 (OMM), 57 (OMN) ตามลำดับ ทางด้านผลของเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes effect) ให้ผลเป็นลบทั้งคู่ ส่วนผลของอุณหภูมิและผลของ pH ที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยานั้นมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ anti-M จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C และอุณหภูมิห้อง ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมพบว่าอยู่ที่ pH 7.0 ทางด้านผลการตรวจ M antigen subclass ต่าง ๆ พบว่า anti-M human monoclonal สามารถตรวจพบ Mc (MNS8) ได้ ในขณะที่ anti-M mouse monoclonal ได้ผลลบ ในส่วนของการศึกษาตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด จำนวน 600 ราย ในครั้งนี้พบว่ามีแอนติเจน MM จำนวน 270 ราย คิดเป็นร้อยละ 45, MN จำนวน 252 ราย คิดเป็นร้อยละ 42 และ NN จำนวน 78 ราย คิดเป็นร้อยละ 13

สรุป: จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่า anti-M human monoclonal มีประสิทธิภาพเหนือกว่า anti-M mouse monoclonal อย่างมาก จึงสามารถนำมาทดแทนการผลิต anti-M mouse monoclonal เพื่อจัดจำหน่ายต่อไปได้ และความแรงของ titer ที่สูงมากนั้นสามารถนำมาเจือจางเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: แอนติ-M, น้ำยาตรวจหมู่โลหิต, โมโนโคลนัลแอนติบอดี.

นับตั้งแต่ lansteiner K.ได้ค้นพบหมู่โลหิต ABO ในปี พ.ศ. 2443[1] และได้มีการค้นพบหมู่โลหิตอื่น ๆ อีกมาก ทำให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับหมู่โลหิต การบริจาคโลหิต การให้โลหิตผู้ป่วย และงานทางด้านธนาคารเลือดก็เจริญก้าวหน้าอย่างมาก ต่อมาในปี พ.ศ. 2518 Kohler G. และ Milstein C. ได้เผยแพร่งานวิจัยที่มีประโยชน์ต่องานธนาคารเลือดอย่างยิ่ง โดยสามารถนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมซ์โฟไซด์ (B-lymphocyte) มารวมตัวกับเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) ทำให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridoma)[2] ซึ่งจะมีคุณสมบัติร่วมกัน คือเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์และสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงได้โดยไม่มีที่สิ้นสุด และในปี พ.ศ. 2530 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และคณะทำงานของค่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ได้นำหลักการดังกล่าวมาศึกษาค้นคว้าต่อยอดเพื่อผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MoAb) เพื่อทดแทนน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแบบเดิมที่เป็นชนิดโพลีโคลนัลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งเตรียมมาจากซีรัมผู้บริจาคโลหิต โดยเริ่มศึกษาและพัฒนาน้ำยาตรวจหมู่โลหิตในระบบ ABO จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี hybridoma technique จนประสบความสำเร็จ สามารถผลิต anti-B monoclonal[3,4] ได้ในปี พ.ศ. 2534 จากนั้นผลิตน้ำยาชนิดอื่นเพิ่มเติมขึ้น ได้แก่ anti-A monoclonal[5, 6], anti-D monoclonal[7], anti-AB monoclonal[8] และ anti-A1 monoclonal[9] ตามลำดับ

หมู่โลหิต MNS เป็นหมู่โลหิตลำดับที่ 2 ที่ถูกค้นพบต่อจากหมู่โลหิต ABO แอนติเจนของหมู่โลหิต MNS อยู่บน glycophorin A (GPA) และ glycophorin B (GPB) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่ค้ำจุนโครงสร้างของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง รักษาประจุระหว่างภายในและภายนอกผนังเม็ดเลือดแดง[10] และยังทำหน้าที่เป็นส่วนจำเพาะต่อเชื้อโรคหลายชนิดที่มีเป้าหมายในการทำลายเม็ดเลือดแดง เช่น Influenza virus[11], Encephalomyocarditis virus[12] และ Plasmodium falciparum[13] เป็นต้น การตรวจแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงในหมู่โลหิตระบบ MNS จะให้ผลบวกปลอมได้สูง เนื่องจากประชากรชาวไทย มีความถี่ของ hybrid glycophorin สูงกว่าเชื้อชาติอื่น ๆ[14] ดังนั้น การเลือกใช้น้ำยาและการแปลผลในการตรวจจำเป็นต้องอาศัยความระมัดระวังและความเข้าใจในข้อจำกัดของน้ำยาเพื่อไม่ให้สรุปผลผิดพลาดและอาจนำไปสู่การจัดหาโลหิตที่ไม่เหมาะสมกับผู้ป่วย ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยได้ผลิต anti-M monoclonal ออกจำหน่ายให้แก่โรงพยาบาลต่าง ๆ ซึ่งเป็นชนิด mouse monoclonal antibody (anti-M NBC2) ที่ยังไม่สามารถตรวจ M antigen subclass ได้ทั้งหมด และได้พัฒนา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) ได้สำเร็จ จึงนำมาศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาและเปรียบเทียบกับ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) เพื่อที่จะใช้ทดแทนต่อไป

วิธีการทำวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย (COA no. NBC 6/2016)

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา anti-M human monoclonal โดยเปรียบเทียบกับ anti-M mouse monoclonal

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) โดยเปรียบเทียบกับ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) โดยทำการทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้ทางด้านต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะ (specificity) ศักยภาพ (potency) ผลของเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes effect)

ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยา ผลของ pH และการทดสอบ M antigen subclass ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา phenotype ของตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) และศักยภาพ (potency)

ทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบน้ำยา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) กับน้ำยา anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) โดยทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างที่ทราบชนิดของเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต O ได้แก่ MM, MN และ NN โดยใช้เทคนิค tube test เริ่มจากทำการเจือจาง anti-M แบบต่อเนื่อง (serial two-fold dilution) ใน Phosphate bufler saline - Bovine serum albumin (PBS - BSA) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (pH 7.2) เมื่อเจือจางเสร็จแล้วให้ดูดแอนติบอดีปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดง (ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ในน้ำเกลือ) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงตรวจสอบความแรง (titer) และคะแนนผลรวมของการเกาะกลุ่ม (scoring of hemagglutination reactions)[15] ดังแสดงใน **ตารางที่ 1**

การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes effect)

การเตรียม working papain โดยผสม stock papain (ความเข้มข้นร้อยละ 1.0) 1 ส่วน กับ PBS (pH 7.2) 9 ส่วน นำ panel cells ใหม่อายุ 1 วัน ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง เพื่อเตรียมเป็น packed red cells (PRC) จากนั้นผสม working papain 4 ส่วน กับ PRC แต่ละชนิด 1 ส่วน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8-10 นาที ทำการล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง และน้ำยารักษาสภาพเม็ดเลือดแดง (Alsever's solution) 1 ครั้ง เตรียมให้เป็นความเข้มข้นร้อยละ 3 ใน Alsever's solution ทำการควบคุมคุณภาพโดยทดสอบกับ anti-D (IgG) และ inert serum ซึ่งได้ผลบวกและผลลบที่ถูกต้องตามลำดับ นำ papainized identification panel cells มาเตรียมให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ในน้ำเกลือ แล้วนำมาทดสอบกับ anti-M โดยใช้แอนติบอดีปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดง papainized cells ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงตรวจสอบคะแนนผลรวมของการเกาะกลุ่ม

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยา

ทำการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างที่ทราบชนิดของเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต O ได้แก่ MM และ MN โดยใช้เทคนิค tube test เริ่มจากทำการเจือจาง anti-M แบบต่อเนื่องในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 นำแอนติบอดีที่เจือจางแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ในน้ำเกลือ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4^0C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงตรวจสอบคะแนนผลรวมของการเกาะกลุ่ม

Table 1. Scoring of hemagglutination reactions.[15]

Grade	Score	Red blood cell aggregation characteristics
4+	12	The strongest reaction is when the particles clump together and fall out of the bottom of the tube.
$3+^s$	11	
3+	10	There are several large clusters, and the water is clear.
$2+^s$	9	
2+	8	There are several medium-sized clusters, and the water is clear.
$1+^s$	6	
1+	5	There are many small clusters, and the water is slightly turbid and pink.
W(+)	1-3	There are very small clusters, and the water is turbid and pink.
-	0	No aggregation

W, weak.

การทดสอบผลของ pH ที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยา

นำ anti-M ที่ต้องการทดสอบมาเจือจางแบบต่อเนื่องในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และมีค่า pH จำเพาะคือ pH 5.5, pH 7.0 และ pH 8.5 นำแอนติบอดีที่เจือจางแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต O: MM, MN และ NN ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ใน PBS ที่ผสม BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (pH 7.2) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงตรวจสอบคะแนนผลรวมของการเกาะกลุ่ม

การทดสอบ M antigen subclass ต่าง ๆ

การทดสอบนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสภากาชาดญี่ปุ่น โดยน้ำยา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) และ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย ได้ทำการจัดส่งไปยังศูนย์บริการโลหิต Kanto-Kosshinetsu Block สภากาชาดญี่ปุ่น เพื่อช่วยเหลือในการทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตหายากทางด้าน M antigen subclass ต่าง ๆ

การศึกษา phenotype ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด

ทำการสุ่มตัวอย่างโลหิตจากผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จำนวน 600 ราย โดยมีตัวอย่างหมู่โลหิต A 150 ราย หมู่โลหิต B 194 ราย หมู่โลหิต O 202 ราย และ หมู่โลหิต AB 54 ราย มาทดสอบแอนติเจน M โดยใช้น้ำยา anti-M human monoclonal (anti-M NBC3), anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) เทียบกับน้ำยาของบริษัทต่างประเทศ (CE-Immundiagnostika lot OMM103, Germany) และทดสอบแอนติเจน N โดยใช้น้ำยา anti-N mouse monoclonal ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ โดยเทคนิค tube test นำตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเจือจางด้วย PBS ที่ผสม BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (pH 7.2) ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0 จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับ anti-M และ anti-N ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นตรวจสอบคะแนนผลรวมของการเกาะกลุ่มกัน

ผลการศึกษา

จากการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และศักยภาพ (potency) พบว่าน้ำยาทั้ง 2 ชนิด มีผล specificity ที่ได้ไม่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจน M และ N แต่ทางด้าน potency พบว่า anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) มี potency (titer/hemagglutination score) 1024/107 และ 512/97 ต่อเซลล์ O, MM และ O, MN ตามลำดับ ในขณะที่ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) มี potency (titer/hemagglutination score) 32/60 และ 8/57 ต่อเซลล์ O, MM และ O, MN ตามลำดับ ดังแสดงใน **ตารางที่** 2. ทางด้านการทดสอบผลของเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes effect) ให้ผลลบเหมือนกัน ดังแสดงใน **ตารางที่** 3. การทดสอบผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้ผลดีที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C และอุณหภูมิห้อง ส่วนที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C จะทำให้ความแรงของแอนติบอดีลดลง และมีทิศทางไปในทางเดียวกันทั้ง anti-M human monoclonal (anti-M NBC3) และ anti-M mouse monoclonal (anti-M NBC2) ดังแสดงใน **ตารางที่** 4. ผลการทดสอบ pH ที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยาจะมีความแตกต่างกันใน pH ที่ต่างกัน โดยที่ anti-M mouse monoclonal มีความแรงลดลงอย่างมากใน pH ที่เป็นด่าง (pH 8.5) ซึ่งได้ผล hemagglutination score ดังนี้ 38 (pH 5.5), 26 (pH 7.0), 5 (pH 8.5) และ 26 (pH 5.5), 26 (pH 7.0), 3 (pH 8.5) ต่อเซลล์ O, MM และ O, MN ตามลำดับ ในขณะที่ anti-M human monoclonal สามารถเกิดปฏิกิริยาในช่วง pH ที่กว้างกว่า (pH5.5 - 8.5) โดยที่ความแรงลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งได้ผhemagglutination score ดังนี้ 101 (pH 5.5), 107 (pH 7.0), 100 (pH 8.5) และ 85 (pH 5.5), 90 (pH 7.0), 88 (pH 8.5) ต่อเซลล์ O, MM และ O, MN ตามลำดับ ดังแสดงใน **รูปที่** 1. ส่วนการทดสอบ M antigen subclass ต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันที่ subclass M^{c} (MNS8) ที่น้ำยา anti-M human monoclonal สามารถตรวจพบได้ ส่วน subclass M-He(+) (MNS6) สามารถตรวจพบได้เหมือนกันในน้ำยาทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงใน **ตารางที่** 5 และผลการศึกษา phenotype ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด จำนวน 600 ราย ได้ผลดังนี้ พบแอนติเจน MM จำนวน 270 ราย, MN จำนวน 252 ราย และ NN จำนวน 78 ราย ดังแสดงใน **ตารางที่** 6.

Table 2. Specificity and potency of anti-M from human and mouse monoclonal antibodies.

Anti-M	Titers/Hemagglutination score		
	RBCs		
	O, MM	O, MN	O, NN
Mouse moAb	32/60	8/57	0
Human moAb	1024/107	512/97	0

moAb, monoclonal antibody; RBCs, red blood cells

Table 3. Proteolytic enzyme effect.

Anti-M	Papainized identification panel cells Lot. 68030										
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11
	M+N-	M-N+	M+N-	M+N+	M+N-	M+N-	M+N+	M+N-	M+N-	M+N-	M+N+
Mouse moAb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Human moAb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4. Temperature variation affected the binding reaction between M antigens and antibodies.

Anti-M	Temperature											
	3.0% O, MM cells in NSS						3.0% O, MN cells in NSS					
	4 ^{0}C		RT		37 ^{0}C		4 ^{0}C		RT		37 ^{0}C	
	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
Mouse moAb	32	60	32	58	16	48	8	57	8	55	4	21
Human moAb	1024	107	1024	105	512	99	512	103	512	100	256	97

T, titer; S, hemagglutination score

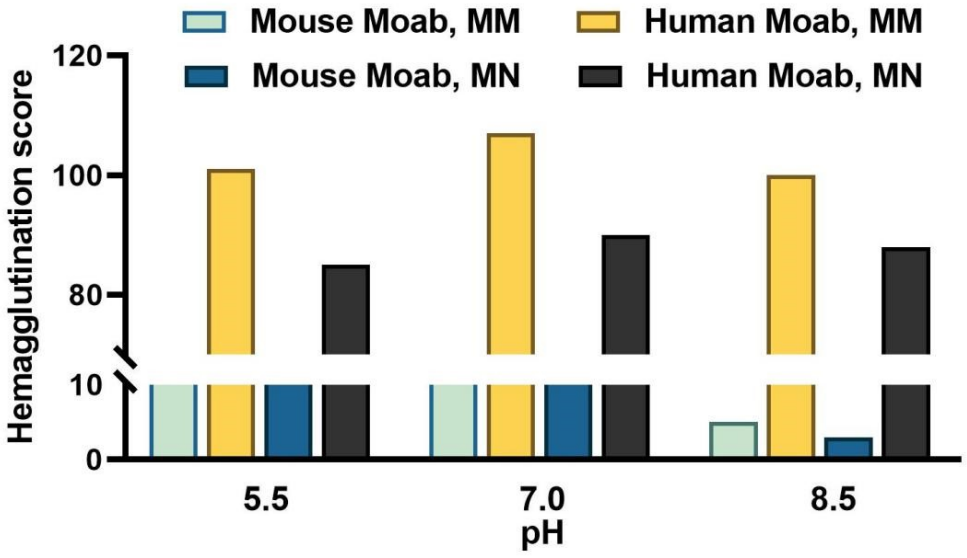


Figure 1. Effect of pH on anti-M binding with 2.0% red blood cells group O, MM, and O, MN.

Table 5. M antigen variation in RBCs from the Japanese Red Cross.

Rbcs	Grading	
	Mouse moAb	Human moAb
M^c	0	4+
M-He(+)	4+	4+
M+N+	4+	4+
M-N+	0	0

M^c, MNS8; M-He(+), MNS6.

Table 6. The phenotyping results of an unknown MN antigen from blood donor samples.

RBCs ABO	Number tested	Anti-M			Anti-N	MN antigen detected
		mouse monoclonal	human monoclonal	commercial monoclonal	mouse monoclonal	
A	70	70	70	70	0	MM
A	69	69	69	69	69	MN
A	11	0	0	0	11	NN
B	85	85	85	85	0	MM
B	84	84	84	84	84	MN
B	25	0	0	0	25	NN
O	90	90	90	90	0	MM
O	74	74	74	74	74	MN
O	38	0	0	0	38	NN
AB	25	25	25	25	0	MM
AB	25	25	25	25	25	MN
AB	4	0	0	0	4	NN
Total	600	522	522	522	330	

สรุป

Anti-M เป็นแอนติบอดีในหมู่โลหิตระบบ MNS[16] ประกอบไปด้วยแอนติเจนหลายชนิด ซึ่งแอนติเจนหลักที่สำคัญคือ M, N, S และ s โดยแอนติเจน M และ N อยู่บนโมเลกุลของโปรตีน glycophorins A และ แอนติเจน S และ s จะอยู่บนโมเลกุลของโปรตีน glycophorins B บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ในคนไทยพบการกระจายของหมู่โลหิต MN ดังนี้ MM ร้อยละ 44, MN ร้อยละ 42 และ NN ร้อยละ 14[17] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน MN ที่ไม่ทราบแน่ชัด จำนวน 600 ราย ในครั้งนี้ คือผล phenotyping ที่ได้พบแอนติเจน MM จำนวน 270 ราย คิดเป็นร้อยละ 45, MN จำนวน 252 ราย คิดเป็นร้อยละ 42 และ NN จำนวน 78 ราย คิดเป็นร้อยละ 13 แสดงให้เห็นถึงการกระจายของหมู่โลหิตที่มีแอนติเจน MM มากที่สุดในผู้บริจาคโลหิตชาวไทย ส่วนแอนติบอดีของระบบนี้สามารถพบได้ทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และชนิดที่เกิดจากการกระตุ้น ซึ่ง anti-M เป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยกว่าชนิดอื่น ๆ ความสำคัญทางคลินิกของหมู่โลหิตระบบ MNS นี้สามารถทำให้เกิด delayed หรือ acute hemolytic transfusion reaction[18 - 23] ซึ่งพบได้ในรายงานจากที่ต่าง ๆ เช่น ในรายงานของ Yanjing He. และคณะ เรื่อง acute hemolytic transfusion reaction (AHTR) caused by anti-M antibodies: a case report and literature review[18] รายงานกรณีศึกษาพบว่า ผู้ป่วยชายอายุ 61 ปี ที่ได้รับการให้เลือดมีอาการไข้ หนาวสั่น ปัสสาวะมีสีเหมือนซอสถั่วเหลือง

และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ระดับฮีโมโกลบินลดลงอย่างต่อเนื่อง ภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ระดับ lactate dehydrogenase สูงขึ้น ไตวายเฉียบพลัน ตับวายเฉียบพลันเล็กน้อย และการทำงานของระบบการแข็งตัวของเลือด ซึ่งบ่งชี้ถึงปฏิกิริยาการถ่ายเลือดแบบเฉียบพลัน (AHTR) ผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีพบว่าให้ผลบวกอ่อนที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C สำหรับตัวอย่างทั้งหลังการให้เลือดและก่อนการให้เลือด การตรวจทางซีรัมในภายหลังบ่งชี้ว่ามี anti-M ชนิด IgM ในซีรัม สาเหตุเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้เป็นชนิด MM และผู้ป่วยเป็นชนิด NN โดยให้คำแนะนำถึงการวินิจฉัยภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันที่เกิดจาก anti-M ที่แม่นยำ ถือเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับแนวทางการตัดสินใจในการรักษา เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีน้ำยา anti-M ที่มีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา anti-M human monoclonal โดยเปรียบเทียบกับ anti-M mouse monoclonal พบว่า anti-M human monoclonal มีประสิทธิภาพเหนือกว่า anti-M mouse monoclonal อย่างมาก ดังนี้ ด้านความจำเพาะ (specificity) ให้ผลเหมือนกันต่อแอนติเจน M และ N ทางด้านศักยภาพ (potency) มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย anti-M human monoclonal มีความแรงของ titer และ hemagglutination score รวมเท่ากับ 1024 (OMM), 512 (OMN) และ 107 (OMM), 103 (OMN) ตามลำดับ ในขณะที่ anti-M mouse monoclonal มีความแรงของ titer และ hemagglutination score รวมเท่ากับ 32 (OMM), 8 (OMN) และ 60 (OMM), 57 (OMN) ตามลำดับ ทางด้านผลของเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes effect) ให้ผลเป็นลบทั้งคู่ เนื่องจากเอนไซม์ papain ได้ทำลายแอนติเจน M บนผิวเม็ดเลือดแดงใน papainized identification panel cells ไปแล้ว[16, 24] ส่วนผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยานั้น มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ anti-M จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C และ อุณหภูมิห้อง ส่วน pH ที่แตกต่างกันต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมของ anti-M mouse monoclonal จะอยู่ที่ pH 7.0 ในขณะที่ anti-M human monoclonal จะสามารถเกิดปฏิกิริยาในช่วง pH ที่กว้างกว่า (pH 5.5-8.5) และผลการตรวจ M antigen subclass ที่สภากาชาดญี่ปุ่นนั้นพบว่า anti-M human monoclonal สามารถตรวจพบ M^{c} (MNS8) ได้ในขณะที่ anti-M mouse monoclonal ได้ผลลบ ถึงแม้ว่า variant RBCs type M^{c} นี้จะเป็นแอนติเจนที่มีอุบัติการณ์ต่ำ (low prevalence antigen)[17, 25] ก็ตาม

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่า anti-M human monoclonal มีประสิทธิภาพเหนือกว่า anti-M mouse monoclonal อย่างมาก จึงสามารถนำมาทดแทนการผลิต anti-M mouse monoclonal เพื่อจัดจำหน่ายต่อไปได้ และความแรงของ titer ที่สูงมากนั้นสามารถนำมาเจือจางเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa, Ms. Chizu Toyoda และทีมงานของ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society ที่ได้ถ่ายทอดความรู้เรื่องการสร้างเซลล์สายพันธุ์ด้วยวิธี human hybridoma technology และยังช่วยเหลือในการทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิตหายากทางด้าน M antigen subclass ต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Kyle RA, Shampo MA. Karl Landsteiner--discoverer of the major human blood groups. Mayo Clin Proc 2001;76:830.
2. KÖhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.
3. Phikulsod S, Potien R, Uthid K, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagent prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: I mouse response to immunization with different quantity and sources of B antigens. Thai J Hematol Transfus Med 1991;1:299-307.
4. Phikulsod S, Potien R, Uthid K, Kaewkitiroj P, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagent prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: II the study of the efficacy of the monoclonal anti-B compared with commercial monoclonal reagents and conventional polyclonal anti-B. Thai J Hematol Transfus Med 1992;2:295-302.
5. Phikulsod S, Potien R, Kaewkitiroj P, Uthid K, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal anti-A reagent using hybridoma technique prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transfus Med 1992;2:373-81.

6. Tingtoy U, Phonimit S, Siripongsanusit A, Makechay S, Sakuldamrongpanich T. Development of monoclonal anti-A production of National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transfus Med 2008;18:11-9.
7. Sakuldamrongpanich T, Tubrod J, Saengkla S, Tingtoy U. Evaluation of anti-D reagent as Rh(D) blood typing. Thai J Hematol Transfus Med 1999;9:39-48.
8. Kaewmongkol R, Tingtoy U, Sakuldamrongpanich T. Production of blood grouping monoclonal anti-A, B reagent. Thai J Hematol Transfus Med 2000;10: 175-81.
9. Tingtoy U, Sakuldamrongpanich T, Kaewmongkol R. Production of monoclonal anti-A1 blood group reagent by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transfus Med 2001;11:21-8.
10. Storry JR, Coghlan G, Poole J, Figueroa D, Reid ME. The MNS blood group antigens, Vr (MNS12) and Mt(a) (MNS14), each arise from an amino acid substitution on glycophorin A. Vox Sang 2000;78: 52-6.
11. Pearton M, Kang SM, Song JM, Kim YC, Quan FS, Anstey A, et al. Influenza virus-like particles coated onto microneedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin. Vaccine 2010;28: 6104-13.
12. Allaway GP, Burness AT. Site of attachment of encephalomyocarditis virus on human erythrocytes. J Virol 1986;59:768-70.
13. Lomas-Francis C. Miltenberger phenotypes are glycophorin variants: a review. Vox Sang 2011;6: 296-301.
14. Palacajornsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, Bejrachandra S, Reid ME. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique. Transfus Med 2007;17:169-74.
15. Walker, Richard H. AABB technical manual. 10th ed. Arlington Virginia: American Association of Blood Banks; 1990.
16. Reid ME, Lomas-Francis C. The blood group antigen FactsBook. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2004.
17. Reid ME. MNS blood group system: a review. Immunohematology 2009;25:95-101
18. Fongsarun J, Nuchprayoon I, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood Groups in Thai Blood Donors. Thai J Hematol Transfus Med 2002;12:277-86.
19. Yanjing He, Yang Li, Qiushi Wang. Acute hemolytic transfusion reaction caused by anti-M antibodies: a case report and literature review: Lab Med 2024;55:795-801.
20. Duguid JK, Bromilow IM, Entwistle GD, Wilkinson R. Hemolytic disease of the newborn due to anti-M. Vox Sang 1995;68:195-6.
21. Telischi M, Behzad O, Issitt PD, Pavone BG. Hemolytic disease of the newborn due to anti-N. Vox Sang 1976;31:109-16.
22. Dopp SL, Isham BE. Anti-U and hemolytic disease of the newborn. Transfusion 1983;23:273-4.
23. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonif cio Sle O, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone Dd Dde A. Hemolytic disease of the newborn due to anti-U. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2003;58:320-3.
24. Broadberry RE, Lin M. The incidence and significance of anti-"Mia" in Taiwan. Transfusion 1994;34:349-52.
25. Palacajornsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants. Immunohematology 2006;22: 171-82.