หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐาน

ตามธรรมชาติ ไวรัสตับอักเสบชนิดบี ทำให้เกิดโรคได้เฉพาะในคน และจากการทดลองการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[35-38] พบว่า สัตว์บางจำพวกเท่านั้นที่ติดเชื้อนี้ แม้ว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในคนมาก แต่ก็ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสนี้ให้ทวีจำนวนในเนื้อเยื่อ เหมือนกับไวรัสทั่วไป เป็นเหตุให้ทำการศึกษาการติดเชื้อนี้โดยตรงไม่ได้

การค้นพบที่สำคัญที่สุดเกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบชนิดบี คือการค้นพบของ Blumberg และคณะ ในปี ค.ศ. 1964[39] ซึ่งสังเกตพบสารแปลกปลอมในเลือดของชาวพื้นเมืองออสเตรเลีย และได้ตั้งชื่อว่า Australia antigen (Au Ag) ต่อมา ปี ค.ศ. 1967[40] ได้สังเกตพบสารเดียวกันนี้ในเลือดผู้ป่วยตับอักเสบ และมีรายงานหลายฉบับที่ยืนยันความสัมพันธ์ของ antigen นี้กับการเกิดโรคตับอักเสบ[1,2,41-43] สารนี้จึงได้ชื่อว่า Hepatitis antigen (HA) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Hepatitis B antigen (HB Ag), Hepatitis associated antigen (HAA), Serum hepatitis antigen (SH Ag) และ SH/Au Ag[44] ไม่นานมานี้ องค์การอนามัยโลกได้ให้ชื่อเฉพาะว่า Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ซึ่ง antigen นี้เป็นตัวบ่งชี้ตัวแรกสำหรับการวิเคราะห์โรคตับอักเสบชนิดบีและการศึกษาธรรมชาติของไวรัสนี้

จากการศึกษา antigen ใน serum ของผู้ป่วยตับอักเสบ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบอนุภาคที่มีลักษณะแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ลักษณะทรงกลมเล็กแตกต่างกัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 นาโนมิเตอร์[45] และมีอนุภาคเป็นแท่งกลวงเล็ก หรือเป็นสายยาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 20 นาโนมิเตอร์ ยาว 200 นาโนมิเตอร์[46,47] อนุภาคทั้งสองชนิดนี้ไม่มีโครงสร้างซับซ้อนภายใน ไม่มี nucleic acid และ DNA polymerase ส่วนอนุภาคอีกชนิดหนึ่งมี

ลักษณะทรงกลมใหญ่ ขนาด 42 นาโนมิเตอร์ มีเปลือกนอกขนาด 7 นาโนมิเตอร์ และแกนใน 28 นาโนมิเตอร์ โครงสร้างภายในค่อนข้างซับซ้อน อนุภาคนี้พบโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ D.M.S. Dane[48] จึงเรียกอนุภาคนี้ว่า Dane particle อนุภาคนี้มีคุณสมบัติหลายอย่างที่แสดงว่าอาจเป็นรูปแบบที่สมบูรณ์ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี[49] และเป็นรูปแบบเดียวของ antigen ที่มี nucleic aicd

ไม่นานมานี้ก็มีผู้ศึกษาถึงโครงสร้างของ DNA ใน Dane particle รวมทั้งหลักฐานอย่างอื่น ทำให้ทราบว่าความแตกต่างในการติดเชื้อของเซลล์อาจเป็นการอธิบายถึงความแตกต่างของยีนในไวรัส แสดงว่า ใน Dane particle มีโมเลกุลของ DNA หลายชนิด แตกต่างคละเคล้ากัน ทำให้เชื่อว่า genome ของไวรัสที่สมบูรณ์ อาจไม่ได้อยู่ใน DNA ของ Dane particle ใด particle หนึ่งโดยเฉพาะ[50,51] แม้ว่าขนาดของ genome ของไวรัสตับอักเสบชนิดบียังไม่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีการตรวจพบผลของยีนหลายชนิดจากไวรัสนี้ รวมทั้ง antigen ที่สำคัญ 3 ชนิด ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสตับอักเสบชนิดบี คือ Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Hepatitis B core antigen (HBcAg) และ Hepatitis B e antigen (HBeAg)

1. <u>Hepatitis B surface antigen</u> (HBsAg)

จากการศึกษาอนุภาคทั้งสามชนิดใน serum ผู้ป่วยตับอักเสบ ด้วยวิธีการทางจุลทรรศน์อิมมูโนอิเลคตรอน พบว่า antibody ต่อ antigen ของผู้ป่วยตับอักเสบจะทำให้เกิดการ aggregate ของ Dane particle เช่นเดียวกับอนุภาคชนิดกลมและชนิดแท่งกลวง ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างทั้งสามชนิดนี้มี common antigen ที่ผิว[52,53] จึงเรียก antigen นี้ว่า Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ซึ่งเป็นข้อแสดงให้เห็นชัดว่า อนุภาคที่มี HBsAg ที่ผิว จะเป็น antigenically complex โดยมีตัวบ่งชี้เฉพาะกลุ่มหนึ่งตัว คือ a และมีตัวบ่งชี้กลุ่มย่อยอีกสองชนิด คือ d, y และ w, r[54-56] จึงจัดแบ่ง HBsAg ได้เป็นสี่ชนิดย่อย (subtypes) คือ adw, adr, ayw และ ayr[57] นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาถึงตัวบ่งชี้อื่น เช่น q, x, f, t, n, j และ g[54,58,59] และเชื่อว่าตัวบ่งชี้เหล่านี้เป็นผลมาจาก genome

ของไวรัส และความแตกต่างของ genotype[60] Holland และพวกได้ให้ข้อสังเกตว่า อาจเกี่ยวเนื่องกับลักษณะอาการที่แสดงออกหลังการติดเชื้อ[61] และช่วยในการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสนี้ ซึ่งพบว่ากลุ่มย่อยเหล่านี้มีกระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของโลก[58,61] ในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นชนิด adr มีชนิด adw บ้าง แต่ไม่พบ ayw หรือ ayr[62]

HBsAg ประกอบด้วย lipid, glycolipid และ glycoprotein ในปริมาณต่างกัน[63] และมีส่วนผสมเชิงซ้อน polypeptide ร่วมด้วย[64] จากการศึกษาอนุภาค 22 นาโนมิเตอร์ โดยใช้ Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ polyacylamide gel electrophoresis แยกออกได้เพียงสองหรือสาม peptide ใหญ่[65] ขนาด 26,000 ถึง 40,000 daltons ต่อมามีผู้แยกได้ถึงเจ็ด[66] หรือเก้า peptides[67] โดยย้อมด้วย Coomasie blue ใน SDS-polyacrylamide gel ได้ขนาดตั้งแต่ 23,000-97,000 daltons และ 19,000-120,000 daltons ตามลำดับ และพบว่าสอง[68] หรือสาม[67] polypeptides เป็น glycoprotein โดยย้อมด้วย periodic acid-Schiff

peptide ใน HBsAg ต่าง subtype จะไม่มีความแตกต่างกัน แม้ว่าจะมีรายงานพบ peptide สองชนิด (69,000 และ 109,000 daltons) เล็กน้อยใน HBsAg/ayw ซึ่งไม่พบใน HBsAg/adw[67] แต่นอกจากรายงานฉบับนี้ ก็ไม่มีผู้อื่นรายงานความแตกต่างของ peptide ระหว่าง subtype Shih และ Gerin[69] พบว่า HBsAg/adw ที่ทำให้บริสุทธิ์ จะมี polypeptide ขนาดและจำนวนเท่ากัน ปริมาณใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ antigenic determinant จำเพาะของแต่ละไวรัสจะอยู่ใน polypeptide มากกว่าในคาร์โบไฮเดรตของ glycoprotein[68] ทั้ง group และ type specific determinant คงอยู่บน polypeptide เดียวกันด้วย

จากรายงานหลายฉบับ[64-67,69-71] แสดงให้เห็นว่า อนุภาค HBsAg จะมี polypeptide อย่างน้อย 7 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน แต่มี immunochemical structure หรือ amino acid sequence อย่างใดอย่างหนึ่งเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันมาก และ polypeptide จาก HBsAg ต่าง subtype จะมี amino

acid sequence ส่วนหนึ่งที่เหมือนกัน ซึ่งจะจำเพาะแสดงถึง group specific determinant a และมีส่วนอื่นที่แตกต่างกัน แสดงถึง type specific determinant d หรือ y

Mackay และ Burrell[72] ได้เสนอว่า การที่มี polypeptide หลายชนิดขนาดต่างกัน แต่ antigenic determinant คล้ายคลึงกัน อาจเนื่องจากมี proteolytic degradation ของ polypeptide บางตัวใน HBsAg โดย protease ใน serum ซึ่งระบบนี้จะเกิดขึ้นได้ในพื้นผิวของเม็ดเลือดแดงของคน และภาวะที่มี polypeptide หลายชนิดขนาดต่างกัน แต่มี antigenic determinant เหมือนกันนี้ ยังไม่ปรากฏพบในไวรัสชนิดอื่น

2. Hepatitis B core antigen (HBcAg)

เมื่อนำ Dane particle ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 42 นาโนมิเตอร์[48] และมี HBsAg ที่ผิวนอก[48,52] โดยมีเปลือกหุ้มที่ประกอบด้วยไขมัน[50] มา treat ด้วย detergent ปรากฏว่า particle ดังกล่าวจะปล่อยแกนกลางซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 27 นาโนมิเตอร์ออกมา[49,52] ซึ่งพบว่ามี antigen จำเพาะชนิดหนึ่ง คือ HBcAg ที่ผิว ส่วนภายในประกอบด้วย DNA[73] และจากการทำให้แกนกลางบริสุทธิ์ พบว่ามี DNA polymerase[74-77] ในผู้ป่วยตับอักเสบจะตรวจพบ DNA polymerase ในช่วงสั้น ๆ ภายหลังที่ตรวจพบ HBsAg แต่จะพบก่อนที่ระดับ transaminase จะเพิ่มขึ้น และแสดงอาการทางคลินิค ส่วนพวกตับอักเสบที่ตรวจไม่พบ HBsAg ก็จะไม่พบ DNA polymerase และไม่พบ HBcAg อิสระในกระแสเลือด จะพบเฉพาะใน nucleus ของเซลล์ตับที่ติดเชื้อเท่านั้น[78]

การตรวจพบ DNA polymerase เป็นข้อบ่งชี้ว่า มีการทวีจำนวนของไวรัส ได้ดีกว่าการตรวจหา HBsAg โดยวิธี radioimmunoassay ทำให้ทราบถึงอัตราการติดเชื้อ โดยเปรียบเทียบจำนวน Dane particle กับอนุภาคลักษณะกลม และแท่งกลวง[79] จากการทำ electron micrograph โดยย้อมด้วย uranyl acetate เห็นแกนกลาง Dane particle ในลักษณะต่างกันบ้างก็มีลักษณะทึบ บ้างก็โปร่งแสง[76] Dane particle ที่มีความหนาแน่นสูง จะให้ DNA poly-

merase activity มาก ส่วนที่มีความหนาแน่นต่ำจะไม่แสดง DNA polymerase activity[76]

ใน serum ผู้ที่เคยเป็นโรคตับอักเสบซึ่งตรวจไม่พบ anti-HBs แต่อาจตรวจพบ anti-HBc ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า มีการทวีจำนวนของไวรัส[80,81] และคงอยู่ในสภาพพาหะเรื้อรัง จะตรวจพบ anti-HBc ใน serum ผู้ป่วยตับอักเสบอย่างเฉียบพลันในช่วงระยะยาว ก่อนที่จะพบ anti-HBs หรือ HBsAg และมักไม่พบ anti-HBs ในพาหะเรื้อรัง แต่จะพบ anti-HBc ในพาหะทุกราย[79] นอกจากนี้ในผู้บริจาคโลหิตที่ตรวจไม่พบ HBsAg แต่มี anti-HBc ก็สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสนี้ได้[81]

3. Hepatitis B e antigen (HBeAg)

พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 โดย Magnius และคณะ[32] คุณสมบัติทางฟิสิคส์ และ antigenic determinant ต่างจาก HBsAg และมีขนาดเล็กกว่า ต่อมา Magnius[83] ยังได้เสนอว่า HBeAg อาจเป็น antigen ที่สังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสนี้ ขณะเดียวกัน Hirchman และคณะ[30] คาดว่า HBeAg อาจเป็นตัวเชื่อมระหว่าง HBsAg กับแกนกลางของไวรัส มักพบ HBeAg ใน serum ของพาหะเรื้อรังที่ตรวจพบ HBsAg ซึ่งจะมีปริมาณของ Dane particle มาก[84,85] ดังนั้นการมี HBeAg จะเกี่ยวพันกับความโน้มเอียงในการแพร่เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีไปยังผู้ใกล้ชิด[84,86,87] เนื่องจากพาหะที่มีปริมาณของ Dane particle มากมักมี HBeAg ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่ antigen ทั้งสองชนิดนี้จะมีความสัมพันธ์กันในทางใดทางหนึ่ง เคยมีผู้รายงานว่า anti-HBe จะทำปฏิกิริยากับผิวของ Dane particle[88] แสดงว่า HBeAg อาจเป็นส่วนประกอบของผิว Dane particle อย่างไรก็ตาม antiserum ที่ใช้ในการศึกษานี้ ไม่ได้ทดสอบให้เห็นชัดว่าเป็น mono-specific และมีผู้ศึกษารายอื่นคัดค้านรายงานนี้[89,90] นอกจากนี้ยังพบว่า HBeAg เป็นส่วนประกอบภายในของ Dane particle แต่ต่างจาก HBcAg[89] HBeAg มีความสัมพันธ์กับ lactate dehydrogenase isozyme-5[91] และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ immunoglobulin[92,93] ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อไวรัสนี้

จะตรวจพบ HBeAg ทั้งลักษณะอิสระ และอยู่ร่วมกับ immunoglobulin[94]

จากการแยกแกนกลางของ Dane particle ด้วย sodium dodecyl sulfate และ 2-mercaptoethanol ได้ polypeptide สองชนิด ซึ่งมี antigenicity ของ HBeAg ซึ่งมีขนาด 19,000 และ 45,000 daltons ตามลำดับ[95] แสดงว่า HBeAg เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของ nucleocapsid ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี ซึ่งควบคุมโดย genome ของไวรัส มากกว่าที่จะเป็นผลผลิตจากการสร้างภูมิต้านทานของ host[96]

มีการตรวจพบ HBeAg ได้เฉพาะใน serum ที่มี HBsAg โดยพบในระยะแรกของการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน[82,83,97] และคงอยู่ในร่างกายของผู้ที่เป็นโรคตับอักเสบอย่างเรื้อรัง[83,92,98] การมี HBeAg ใน serum ของพาหะ จะสัมพันธ์กับการทวีจำนวนของไวรัส โดยพบว่า DNA polymerase activity สูง และจำนวน Dane particle เพิ่มขึ้น[99-102] และยังสัมพันธ์กับการถูกทำลายของเซลล์ตับ[85, 103,104] นอกจากนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงความรุนแรงของโรคตับด้วย[105,106] จากการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในหญิงตั้งครรภ์ พบว่าจะมีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสนี้สู่ทารกได้ เฉพาะในกรณีที่มารดามี HBeAg แต่จะไม่มีการถ่ายทอดในมารดาซึ่งมี anti-HBe[87] มักพบ HBeAg ในพาหะที่มี HBsAg และมีอาการของโรค แต่จะพบ anti-HBe ในพาหะที่แข็งแรง[103,105,107]

4. <u>การทำให้เกิดโรคของไวรัสตับอักเสบชนิดบี</u>

กลไกในการทวีจำนวนของไวรัสตับอักเสบชนิดบียังไม่ทราบแน่ชัด เพียงแต่ทราบว่าเซลล์ตับเป็น target cell ของการติดเชื้อไวรัสนี้[30,31] ได้มีผู้เสนอเกี่ยวกับสมมติฐานการทวีจำนวนของไวรัสตับอักเสบชนิดบีในเซลล์ตับไว้มาก Edgington และ Chaisari[29] ได้อาศัยความรู้ที่ว่า HBsAg อยู่ที่ cytoplasm ส่วน HBcAg อยู่ที่ nucleus ของเซลล์ตับที่ติดเชื้อ[32,33] Dane particle ประกอบด้วย HBcAg และ HBsAg โดย HBsAg อยู่บนผิวเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสนี้ จึงอธิบายว่า หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์ จะมีการทวีจำนวน DNA ของไวรัส มี transcription ของ messenger ribonucleic acid (m-RNA)-HBs และ m-RNA-

-HBc ใน nucleus ต่อมามีการรวมกลุ่มของ HBcAg อยู่ใน nucleus และ HBsAg ใน cytoplasm ก่อนที่จะปล่อยออกจากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด Hirchman[30] ได้รายงานสนับสนุนสมมติฐานนี้เช่นกัน

มีรายงานพบ DNA polymerase activity ในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี ในขณะที่มีอนุภาคของไวรัสจำนวนมาก และคงอยู่เป็นวันหรือสัปดาห์ ในกรณีมีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน หากเป็นพาหะเรื้อรังจะคงอยู่เป็นเดือนหรือปี[109,110] อย่างไรก็ตาม ในน้ำเหลืองที่มี HBsAg อาจตรวจไม่พบ DNA polymerase[111] คณะกรรมการที่ศึกษาไวรัสตับอักเสบขององค์การอนามัยโลก[80] ได้เสนอแนะว่า DNA polymerase อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับการติดเชื้อได้ แต่ยังไม่เป็นตัวบ่งชี้เฉพาะ ดังเช่น HBsAg

อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าไวรัสตับอักเสบชนิดบีทำให้เซลล์ตับถูกทำลายได้อย่างไร แต่ก็พอสันนิษฐานได้สองทาง คือ ไวรัสนี้ทำให้เกิดโรคต่อเซลล์ตับโดยตรง หรือการทำลายเซลล์ตับเกิดจาก immune response ของ host[112,113] ข้อสันนิษฐานข้อแรกนั้นมีผู้สนใจศึกษา โดยทำการวิจัยทั้งในสัตว์ทดลองและหลอดทดลอง พบว่าไวรัสนี้ไม่สามารถมีอิทธิพลในการทำลายเซลล์ตับโดยตรง[114,115] นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ antigen ของไวรัสตับอักเสบชนิดบีปริมาณมากในคนที่มีสุขภาพดี[12,116]

ในโรคตับอักเสบอย่างเฉียบพลัน immune complex ของ HBsAg และ anti-HBs สามารถตรวจพบได้ในน้ำเหลือง การลดต่ำลงของระดับ HBsAg จะพ้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ anti-HBs และการลดต่ำลงของ complement ซึ่งเป็นเชิงแนะว่าน่าจะมีการกำจัด HBsAg โดย immune mechanism คือทำให้เกิดเป็น immune complex ขึ้น การเกิด immune complex ที่ผิวเซลล์ตับที่ติดเชื้อ จะเป็นแหล่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลให้มีการทำลายเซลล์ตับในโอกาสต่อมา[117,118] มีผู้ตรวจพบ immunoglobulin บนผิวเซลล์ตับของผู้ป่วยตับอักเสบบางราย[108,119,120] และมีรายงานตรวจพบ immunoglobulin และ antigen ของไวรัสตับอักเสบชนิดบีในเซลล์ตับเดียวกันในพาหะเรื้อรังที่มี HBsAg[121] Popper และ Mackey[122]

รายงานว่า โปรตีนของเซลล์ตับอาจรวมเข้ากับอนุภาคไวรัส และ antigen ที่มีอยู่ทำให้เกิด autoimmunity ขึ้นในโรคตับบางชนิด cellular immunity ก็มีส่วนสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสนี้ และมีความสัมพันธ์กับการถูกทำลายของเซลล์ตับด้วย[112,113,123,124] Dudley และคณะ ได้ตั้งสมมติฐานว่า การบกพร่องของ cell mediated immunity อาจบ่งชี้ถึงอาการทางคลินิค และการถูกทำลายของเซลล์ตับ[123]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย