บทที่ 2

บทสืบสวนเอกสาร

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อโปรโตซัวใน Genus *Plasmodium* ซึ่งดำรงชีวิตเป็นปรสิต (parasite) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่นคน ลิง นก และหนู เป็นต้น โดยมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในเซลล์ตับ และเม็ดเลือดแดง ส่วนการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) เกิดขึ้นในยุงก้นปล่อง (Genus *Anopheles*) ซึ่งเป็นพาหะนำโรค (vector) โดยยุงเพศเมียที่มากัดคนจะปล่อยเชื้อระยะสปอโรซอยต์ (sporozoite) ซึ่งอยู่ในต่อมน้ำลายเข้าไปในกระแสโลหิต ภายในเวลาประมาณหนึ่งชั่วโมงสปอโรซอยต์จะเข้าไปเจริญอยู่ในเซลล์ตับ และมีการเพิ่มจำนวนโดยไม่อาศัยเพศเรียกระยะต่างๆ ในการเจริญนี้ว่า exo-erythrocytic stages หรือ hepatic stages เมื่อมีการเพิ่มจำนวนนิวเคลียสในเซลล์เดิม และมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 42 ไมครอนเรียกว่าระยะไชซอนต์ (schizont) เมื่อไชซอนต์เจริญเต็มที่ ไซโตพลาสซึมจะถูกแบ่งสำหรับแต่ละนิวเคลียสเป็นระยะ เมอร์โรซอยต์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 ไมครอน จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย โดย *P. falciparum* จะมีจำนวนเมอโรซอยต์สูงสุดประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ในขณะที่ *P. vivax, P. malariae* และ *P. ovale* จะมีจำนวนประมาณ 10,000 ถึง 15,000 ตัว (Spencer, 1986) สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* เมื่อสปอร์โรซอยต์เข้า สู่เซลล์ตับนอกจากจะมีการเจริญดังกล่าวมาแล้ว แต่จะมีส่วนหนึ่งหยุดพักการเจริญในเซลล์ตับชั่วระยะเวลาหนึ่ง และสามารถกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่างๆดังกล่าวได้อีก เรียกระยะที่หยุดการเจริญนี้ว่า ฮิปโนซอยต์ (hypnozoite) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดไข้กลับ (relapse) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดดังกล่าว (Krotoski et al., 1980; Krotoski et al., 1982) เมื่อเมอร์โรซอยต์ออกจากเซลล์ตับจะเข้าไปอยู่ในเม็ดเลือดแดง เรียกระยะการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงนี้ว่า erythrocytic stages เมื่อเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงจะอยู่ใน parasitophorous vacuole ซึ่งมีเยื่อหุ้ม

(membrane) ล้อมรอบ แล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นรูปร่างคล้ายวงแหวนจึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ ring form ต่อจากนั้นจะมีการเจริญต่อไปเป็นระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) โดยไซโตพลาสซึมจะแผ่ขยายมากขึ้นทำให้โทรโฟซอยต์มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อมีการแบ่งนิวเคลียส และไซโตพลาสซึม โทรโฟซอยต์จะเปลี่ยนเป็นระยะไชซอนต์ และเมอร์โรซอยต์ ตามลำดับ จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดแดงจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรียเช่น *P. falciparum* จะมีเมอร์โรซอยต์ประมาณ 8 ถึง 18 ตัว ส่วน *P. vivax* มีประมาณ 12 ถึง 24 ตัว สำหรับ *P. malariae* และ *P. ovale* มีประมาณ 8 ตัว ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญตั้งแต่ระยะวงแหวนถึง ระยะเมอร์โรซอยต์ในเม็ดเลือดแดง มีความแตกต่างกันตามชนิดของมาลาเรียเช่นกัน กล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36 ถึง 48 ชั่วโมง *P. vivax* และ *P. ovale* ใช้เวลา 48 ชั่วโมง ส่วน *P. malariae* ใช้เวลา 72 ชั่วโมง (Beaver et al., 1984) เมื่อเมอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่จะออกจากเซลล์โดยการแตกของเม็ดเลือดแดง และเข้าไปเจริญเป็นระยะวงแหวนในเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป คนที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจะมีอาการแสดงของโรคเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงโดยจะมีอาการ ไข้ หนาวสั่น เป็นระยะเวลาใกล้เคียงกับระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียใช้ในวงชีวิตที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงซึ่งจะเกิดขึ้นซ้ำๆไปเรื่อยๆ (paroxysm) เมอร์โรซอยต์ที่ลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงบางส่วนจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า แกมมีโตไซต์ (gametocyte) ซึ่งมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย รูปร่างลักษณะของแกมมีโตไซต์จะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรียกล่าวคือ *P. falciparum* มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent shape) ในขณะที่ *P. vivax, P. malariae* และ *P. ovale* จะมีรูปร่างกลมรี (oval shape) เมื่อยุงก้นปล่องมากัดคนก็จะได้รับเชื้อในระยะแกมมีโตไซต์เข้าไปในกระเพาะอาหาร แกมมีโตไซต์เพศผู้จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเกิดกระบวนการสร้างแฟลกเจลลา (exflagellation) พร้อมกับการเพิ่มจำนวนโดย แกมมีโตไซต์เพศผู้ 1 ตัวจะมีการเจริญต่อไปเป็นแกมมีตเพศผู้ (male gamete) ที่มีแฟลกเจลลา 1 เส้น จำนวน 8 เซลล์ และเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) กับแกมมีตเพศเมีย (female gamete) ที่เปลี่ยนแปลงมาจากแกมมีโตไซต์เพศเมียภายในกระเพาะอาหารยุง (stomach lumen) ได้ระยะไซโกต (zygote) ไซโกตจะมีการสร้างเท้าเทียม (pseudopod) เรียกว่าระยะโอโอไคนีต (ookinete) เพื่อจะไชผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและไปเจริญที่ผิวด้านนอกของกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นจึงเจริญต่อไปเป็นระยะโอโอซีสต์ (oocyst) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมครอน ภายในโอโอซีสต์จะมีสปอโร

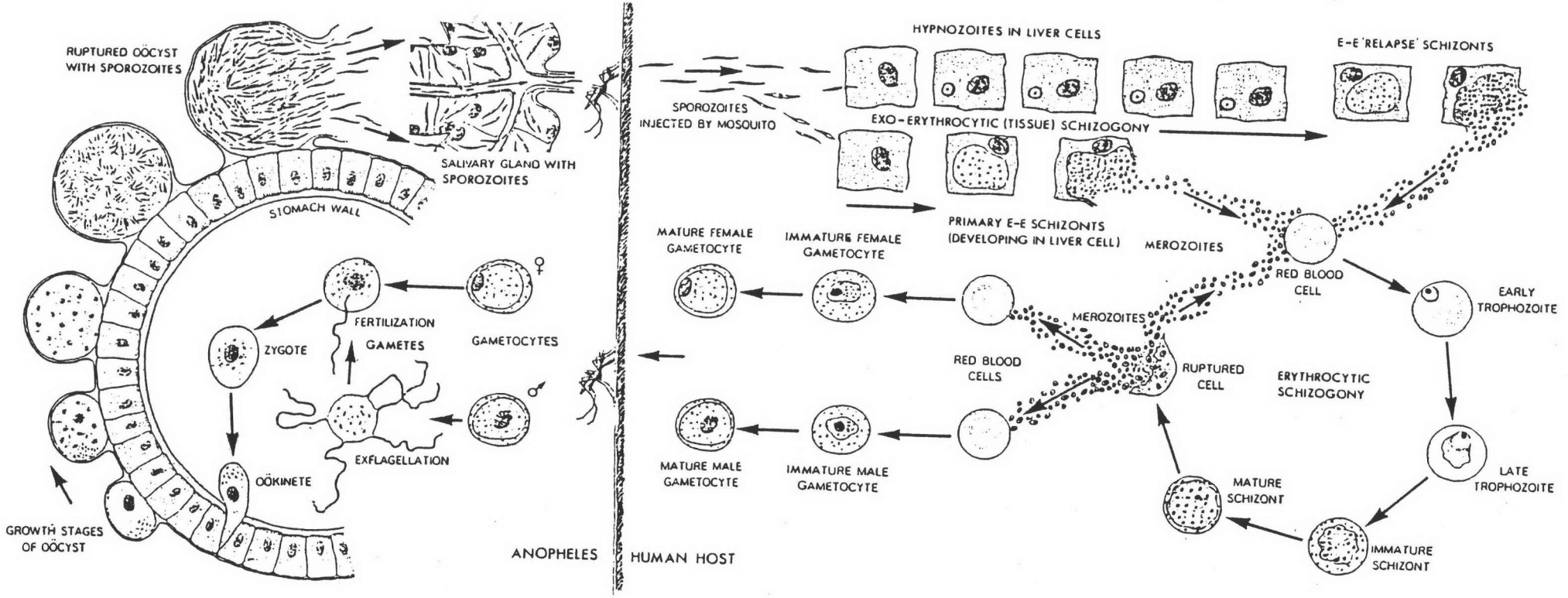
ซอยต์จำนวนมากประมาณ 1 ถึง 2 พันตัว (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991) เมื่อผนังโอโอซีสต์แตกออกสปอโรซอยต์จะถูกปล่อยออกมาผ่านช่องว่างในทรวงอก (thoracic cavity) แล้วไชเข้าสู่ต่อมน้ำลาย (salivary gland) ซึ่งจะเป็นทางนำสปอโรซอยต์ผ่านเข้าไปในคนเมื่อถูกยุงกัด การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศนี้เรียกว่า sporogony ซึ่งจะใช้เวลาโดยเฉลี่ย 8 ถึง 21 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย และชนิดของยุงที่เป็นพาหะ ตลอดจนสภาวะแวดล้อมภายนอก (Spencer, 1986) แผนภาพวงชีวิตของมาลาเรียแสดงในรูปที่ 1

แม้ว่ามาลาเรียทั้ง 4 ชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในคน แต่มาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ทำให้มีพยาธิสภาพและอาการที่รุนแรงที่สุด อันเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญจากการติดเชื้อมาลาเรียภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว ได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory insufficiency) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ (disseminated intravascular coaggulation) ภาวะเลือดเป็นกรดและมีปริมาณกรดแลคติกมากกว่าปกติ (lactic acidosis) ภาวะความดันโลหิตลดต่ำลงจนสู่ภาวะช๊อค (algid malaria) เป็นต้น (Warrell et al., 1990)

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่มีมานานตามหลักฐานที่ค้นพบตั้งแต่สมัย Hippocrates แต่จนถึงปัจจุบันก็ยังไม่สามารถกำจัดโรคมาลาเรียให้หมดไปได้ ถึงแม้ว่าจะมีการพยายามคิดค้นยาที่ใช้รักษามาลาเรียให้ได้ผลหลายชนิด แต่ก็ยังประสบกับปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. falciparum* ในผู้ป่วย (Wernsdorfer, 1991) การดื้อยาของ *P. falciparum* นี้ยังพบว่ามีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก นอกจากนี้มาตรการในการควบคุมโรคโดยการใช้ยาฆ่าแมลงฉีดพ่นเพื่อกำจัดยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะนำโรคก็ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากยุงก้นปล่องมีการดื้อต่อยาฆ่าแมลงมากขึ้น ดังนั้นมาตรการที่สำคัญที่น่าจะมีบทบาทในการควบคุม และป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียคือการผลิตวัคซีน (Nussenzweig & Long, 1994)

แนวทางการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

เนื่องจากภูมิต้านทานในการติดเชื้อมาลาเรียที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมักพบเฉพาะ



รูปที่ 1 แผนภาพวงชีวิตของมาลาเรีย (Bruce-Chwatt, 1985)

ในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีอัตราการแพร่เชื้อมาลาเรียที่สูง (hyperendemic area) โดยประชากรดังกล่าวต้องได้รับเชื้อบ่อยและมีการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียหลายครั้ง ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นนี้มักจะมีประสิทธิภาพบางส่วน (partially effective) ทำให้ผู้ที่มีเชื้ออยู่ในร่างกายมีอาการของโรคมาลาเรียที่ไม่รุนแรงหรืออาจไม่มีอาการเลย แต่สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดงได้ นอกจากนี้ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นจะอยู่ได้ไม่นาน เว้นแต่จะได้รับการกระตุ้นโดยการติดเชื้อมาลาเรียซ้ำบ่อยๆ ดังนั้น มาตรการในการผลิตวัคซีนจึงมุ่งหวังที่จะได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการถูกกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานโดยการติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ โดยระยะเวลาที่มีการสร้างภูมิต้านทานเกิดขึ้นได้ยาวนานกว่าการติดเชื้อในธรรมชาติ ตลอดจนสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection) กล่าวคือภายหลังจากการได้รับวัคซีนแล้วถูกยุงที่มีเชื้อมาลาเรียกัด เชื้อมาลาเรียดังกล่าวจะถูกทำลายไปจนหมด (Nussenzweig & Long, 1994)

ในต้นปี ค.ศ.1970 มีผู้ทดลองใช้สปอร์โรซอยต์ของมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และชนิด *P. vivax* ที่ผ่านการฉายรังสี เอ็กซ์ (X-ray irradiated sporozoites) เพื่อเป็นวัคซีนในอาสาสมัคร ซึ่งสปอร์โรซอยต์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญต่อไปได้ในเซลล์ตับของคนจึงไม่ทำให้เกิดโรคมาลาเรีย ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนดังกล่าว พบว่าสามารถกระตุ้นให้อาสาสมัครเกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียในภายหลังได้ (Miller et al., 1986) อย่างไรก็ตามอุปสรรคในการผลิตวัคซีนตามวิธีการนี้ยังคงมีอยู่ กล่าวคือ แม้ว่าจะมีผู้สามารถเพาะเลี้ยงมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในหลอดทดลองได้อย่างต่อเนื่อง (continuous in vitro cultivation) แต่ปริมาณเชื้อมาลาเรียที่ได้ไม่เพียงพอกับการผลิตเป็นวัคซีนจำนวนเพียงพอ และเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถเกิดโรคในคนได้นั้นยังไม่มีผู้สามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นแนวทางในการผลิตวัคซีนที่ได้ประโยชน์จึงประยุกต์ใช้การแสวงหาแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (protective antigens) โดยอาศัยวิธีการผลิตจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (recombinant organisms) เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และยีสต์ เป็นต้น หรือวิธีการผลิตโดยการสังเคราะห์เป็ปไทด์ (synthetic peptide) โดยวิธีการทางเคมี (Amador et al., 1992; Cattani, 1989; Hollingdale et al., 1990 ; Miller et al., 1986; Nussenzweig & Long, 1994) อุปสรรคสำคัญประการหนึ่งในการผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพคือการที่มาลาเรียมีระยะต่างๆ ในการเจริญในคนหลายระยะ โดยภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นในแต่ละระยะมีความจำเพาะเจาะจง (stage-specific) นอกจากนี้ยัง

พบว่าภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นในระยะเดียวกันยังมีความแตกต่างกันในมาลาเรียแต่ละชนิด (species-specific) และในมาลาเรียชนิดเดียวกันที่มาจากคนละสายพันธุ์นั้นภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นก็มีความจำเพาะด้วยเช่นกัน (strain-specific) ดังนั้นวัคซีนที่ได้ผลดีจึงควรมีผลต่อทุกระยะของการเจริญเติบโต และสามารถใช้ได้ผลกับทุกสายพันธุ์ (Miller et al., 1986)

การแสวงหาโปรตีนที่น่าจะนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นได้มีผู้ทำการศึกษามากมาย โดยเฉพาะโปรตีนที่ผิวเซลล์ของมาลาเรียระยะต่างๆ เช่น โปรตีนบนผิวของระยะสปอร์โรซอยต์ ซึ่งประกอบด้วย circumsporozoite protein (CSP) (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989) และ sporozoite surface protein 2 (SSP2) (Rogers et al., 1992) โปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder, 1988) และ merozoite surface protein 2 (MSP2) (Smythe et al., 1991) โปรตีนบนผิวของเม็ดเลือดแดง ของมาลาเรียในระยะวงแหวนเช่น ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) (Perlmann et al., 1984) โปรตีนบนผิวของเม็ดเลือดแดงของมาลาเรียระยะที่เจริญเต็มที่ เช่น mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) (Petersen et al., 1989) และโปรตีนบนผิวของมาลาเรียระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะแกมมีโตไซต์ ระยะแกมมีตต์ ระยะไซโกต หรือระยะโอโอไคนีตต์ เช่น 25 KD sexual stage surface protein (Pfs25) (Kaslow et al., 1988) 16-KD sexual stage surface protein (Pfs16) (Moelans et al., 1991) ระยะที่มาลาเรียอยู่ในตับจะมีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นกัน อาทิ liver stage antigen-1 (LSA-1) (Zhu & Hollingdale, 1991) และ liver stage antigen-2 (LSA-2) (Guerin-Marchand et al., 1987) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการหาโปรตีนของมาลาเรียที่ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้ที่มีภูมิต้านทานต่อมาลาเรีย (immune sera) หรือโปรตีนของมาลาเรียที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิดโคลนเดียว (monoclonal antibody) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองรวมทั้งการศึกษาโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้ายกัน (homologous proteins) จากมาลาเรียต่างชนิดกันซึ่งมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานในสัตว์ทดลองเป็นต้น (Perrin et al., 1989) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการวิจัยเพื่อแสวงหาโปรตีนหลายๆ ชนิดดังกล่าวนี้ แต่มีโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ทราบหน้าที่ เช่น CSP สามารถจับกับตัวตอบรับของเซลล์ตับ (hepatocyte receptor) และช่วยให้สปอร์โรซอยต์เกาะติด (adhere) กับเซลล์ตับตลอดจนการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ (hepatocyte invasion) (Cerami et al., 1992) สำหรับ MSP1 แม้ว่าหน้าที่โดยตรง

จะยังไม่ทราบชัดเจน แต่เชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกาะติดและลุกลามของระยะเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดง (erythrocyte invasion) (Cooper, 1993)

ในการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ (synthetic peptide) หรือโปรตีนของมาลาเรียที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตอื่น (recombinant polypeptides) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ CSP ในการที่จะนำไปเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นโดยอาศัยส่วน immunodominant B cell epitope ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน Asparagine-Alanine-Asparagine-Proline (NANP) ซ้ำกันหลายๆ ครั้ง และใช้ tetanus toxoid เป็นตัวพา (carrier) พบว่าประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ผลไม่ดีเท่าการใช้สปอร์โรซอยต์ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์โดยตรง ดังนั้นจึงมีผู้พยายามรวมโปรตีนจากแต่ละระยะของการเจริญของมาลาเรียโดยใช้เฉพาะบริเวณที่เป็น T cell และ B cell epitopes เรียกว่า multiple antigen peptides (MAPs) โดยคาดหวังว่าจะให้ผลดีกว่าเนื่องจากมีปริมาณของอิมมูโนเจน (immunogen) สูง สามารถครอบคลุมได้หลายระยะ และมีส่วนของ T cell และ B cell epitopes ที่สำคัญไว้ (Nussenzweig & Long, 1994)

จากการศึกษามาลาเรียในหนูพบว่าหนูที่ $CD8^+$ T cell (cytotoxic T cell) ถูกทำลายไปจะไม่สามารถสร้างภูมิต้านทานต่อมาลาเรียในทางตรงข้ามเมื่อหนูดังกล่าวได้รับ $CD8^+$ T cell ที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อ CSP หรือ SSP2 สามารถสร้างภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อในระยะสปอร์โรซอยต์ได้ ดังนั้นจึงมีผู้พยายามใช้วิธีการสร้าง CSP ใน แบคทีเรีย *Salmonella* หรือไวรัส influenza และ vaccinia ที่สามารถกระตุ้น $CD8^+$ T cell โดยสามารถยับยั้งการเจริญของมาลาเรียในเซลล์ตับได้ ดังนั้น CSP จึงน่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่ดีชนิดหนึ่ง (Sadoff et al., 1988)

สำหรับมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นระยะที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในคน มีผู้ทดลองใช้เพปไทด์สังเคราะห์โดยลอกแบบกรดอะมิโนจากบางส่วนของ MSP1 ซึ่งมี T และ B cell epitopes เชื่อมกับ CSP ในส่วนที่มีกรดอะมิโนซ้ำกัน และรวมกับกรดอะมิโนที่ได้จากบางส่วนของโปรตีนของมาลาเรียอีก 2 ชนิดเรียกว่า SPf66 (Patarroyo et al., 1988) พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในสิงทดลองได้ซึ่ง SPf66 นี้มีผู้กำลังทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียในประเทศโคลอมเบีย เวเนซูเอลา แทนซาเนีย และประเทศอื่นๆ อีกหลายประเทศในเขตปรากฏโรคมาลาเรีย จากการศึกษาในระยะเริ่มต้นพบว่า SPf66 นี้สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานได้ในผู้ที่รับการฉีดวัคซีน และอุบัติการของการติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนลดลงร้อยละ 39 ซึ่งถ้าประสิทธิภาพดังกล่าวมีผลต่อเขต

ปรากฏโรคมาลาเรียในบริเวณอื่น SPf66 นี้จะเป็นประโยชน์ และเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาให้วัคซีนมีประสิทธิภาพดีขึ้นในอนาคต (Tanner et al., 1995)

นอกจากการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคแล้ว การพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง (anti-disease/anti-toxic vaccine) (Playfair et al., 1990) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดด้านใน (endothelium) ของหลอดเลือดในสมองอันทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด (vascular obstruction) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ได้ การค้นหาตัวจับบนผิวเม็ดเลือดแดง (erythrocyte ligand) ดังกล่าว แม้ว่าจะเป็นไปด้วยความยากลำบากแต่เชื่อว่าส่วนของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไป (modified erythrocyte band 3 protien) จากการติดเชื้อมาลาเรียอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าว สำหรับตัวตอบรับ (receptor) บนผิวของเยื่อบุผนังด้านในของหลอดเลือดที่สำคัญได้แก่ CD36, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) และ thrombospondin (Miller et al., 1994)

การผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นจึงมุ่งหวังให้เกิดภูมิต้านทานต่อมาลาเรียหลายระยะที่สำคัญ ได้แก่

1. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ CSP และ SSP2 โดยมุ่งหวังที่จะยับยั้ง หรือป้องกันไม่ให้สปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับ นอกจากนี้ LSA1 และ LSA2 อาจช่วยกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานโดยผ่านทาง $CD8^+$ T cell เพื่อทำลายเชื้อมาลาเรียที่เจริญในตับ (Nussenzweig & Nussengweig, 1989)

2. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่เจริญโดยไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ MSP1, MSP2, RESA/Pf155 และ rhoptry proteins เป็นต้น วัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง หรือระยะที่เมอร์โรซอยต์ออกจากเม็ดเลือดแดง ดังนั้นวงจรของการเจริญของมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงจึงสิ้นสุดลง (Miller et al., 1986)

3. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual stage vaccine) วัตถุประสงค์คือ การสร้างภูมิต้านทานเพื่อทำลายระยะที่มาลาเรียมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นนี้ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียในผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่สามารถ

ยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศในยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะ โดยการกระตุ้นการหลั่ง cytokines หรือการสร้างแอนติบอดีต่อระยะที่มาลาเรียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทำให้ยุงที่กัดคนที่ได้รับวัคซีนดังกล่าวไม่สามารถนำโรคสู่ผู้อื่นได้ (Kaslow et al., 1988)

แม้ว่าวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่ได้ผลน่าจะมาจากหลายระยะ แต่ระยะที่สำคัญที่สุดระยะหนึ่งสำหรับการพัฒนาวัคซีนคือ ระยะที่มาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่ใช้เพศคือโปรตีนบนผิวของเมอร์โรซอยต์ (merozoite surface proteins)

Merozoite surface protein 1

บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิด ชนิดที่พบมากที่สุดได้แก่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 ถึง 200 KD เรียกว่า merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder, 1988) โปรตีนชนิดนี้ถูกสร้างในเซลล์ในระยะไชซอนต์ตอนต้น (early schizont) และจะปรากฏบนผิวของระยะไชซอนต์ตอนปลาย (late schizont) และเมอร์โรซอยต์ (Lyon et al.,1986) ประมาณว่า mRNA ที่สร้าง MSP1 มีปริมาณมากถึงร้อยละ 1 (Holder et al., 1985) ในระยะไชซอนต์นอกจากจะพบ MSP1 ที่ผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงแล้วยังตรวจพบที่ผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ที่อยู่ในเซลล์ตับ (Szarfman et al., 1988) สำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ของมาลาเรียชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายกับ MSP1 ของ *P. falciparum* ได้แก่ Py230 เป็น MSP1 ของ *P. yoelii* (Lewis et al., 1989) ส่วน MSP1 ของ *P. vivax* (Del Portillo et al., 1991; Gibson et al., 1992) และ *P. chabaudi* (Deleersnijder et al., 1990) เรียกว่า Pv200 และ p199 ตามลำดับ

โครงสร้างของ MSP1 ของ *P. falciparum* ประกอบด้วยส่วนต่างๆ หลายส่วนโดยทางด้าน N-terminus มีลักษณะของเพปไทด์สัญญาณ (signal peptide) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) 20 ตัว และเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันหรือเหมือนกัน (conserved) ในระหว่าง *Plasmodium* ทุกชนิด บริเวณที่ต่อจากเพปไทด์สัญญาณ คือบริเวณที่มีกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันเป็น tripeptide repeats ช่วงสั้นๆ ซึ่งจะมีลำดับกรดอะมิโนพื้นฐาน (consensus sequence) คือ Serine-X-X โดยที่ X คือกรดอะมิโนที่แตกต่างกันใน

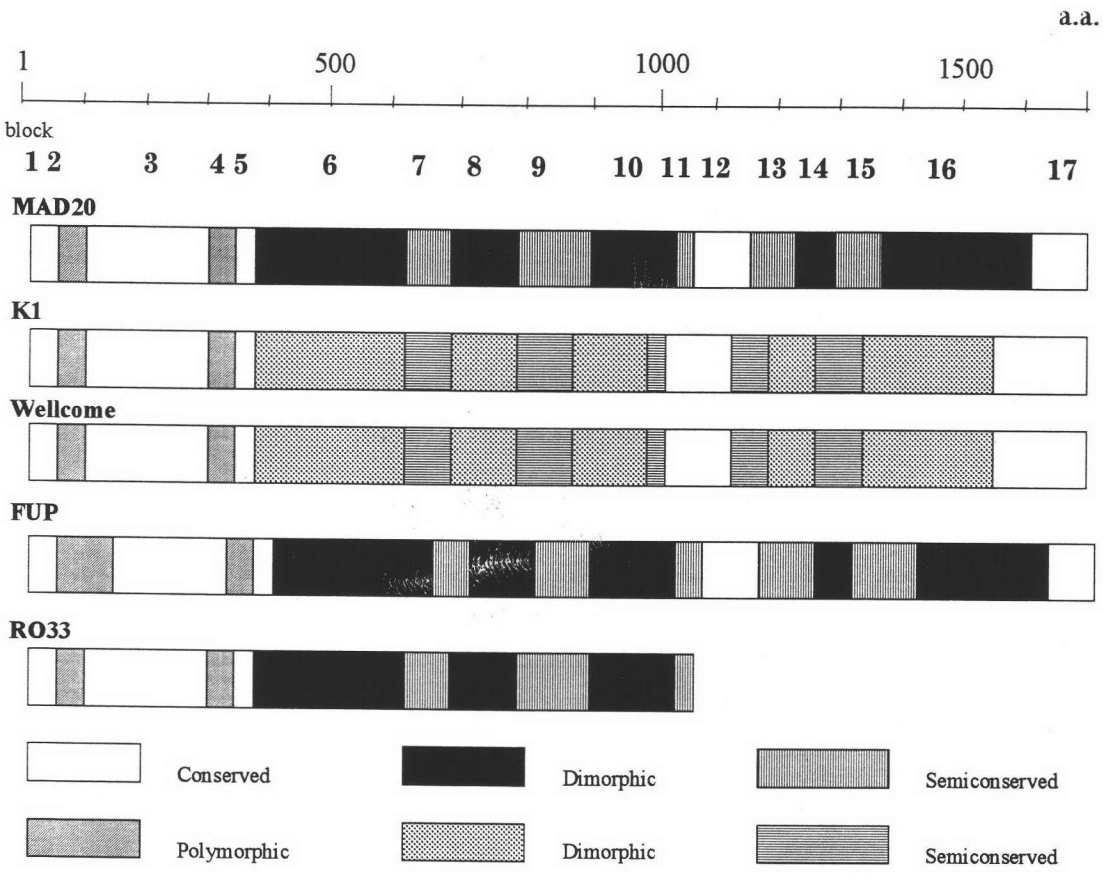
แต่ละสายพันธุ์ และจำนวนของส่วน repeats จะอยู่ระหว่าง 5 ถึง 19 (Jongwutiwes et al., 1992) อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์ของ *P. falciparum* จะไม่มีกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันเป็น tripeptide repeats ดังกล่าว (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988) ในส่วนของ C-terminus จะมีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ จำนวน 20 ตัว ซึ่งบริเวณนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะของ glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) anchor (Smythe et al., 1988) และ epidermal growth factor (EGF) like domains ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 94 ตัวและมี Cysteine residue 12 ตัว โดยมีการสร้างพันธะ disulfide ระหว่าง Cysteine residue บางตำแหน่งทำให้การเคลื่อนตัวของเพปไทด์ขนาด 19 KD ใน sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) เป็นไปได้ช้ากว่าปกติ นอกจากนี้การตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีชนิดโคลนเดียวต่อผิวของ MSP1 โดยวิธี immunofluorescence และ immuno-electron microscopy พบว่า MSP1 ปรากฏบนผิวภายนอกของระยะเมอร์โรซอยต์ (Heidrich et al., 1986; Holder, 1988) จากการวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า MSP1 เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเกิดจากการย่อยของโปรตีนขนาด 180 ถึง 200 KD ในครั้งแรก (primary processing) ได้แก่ 80/83 KD, 42/45 KD, 36/38 KD และ 28/30 KD โดยโพลีเพปไทด์เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม (complex) ด้วยพันธะ non-covalent ที่ผิวของเมอร์โรซอยต์การย่อยโปรตีนนี้เกิดขึ้นทั้งระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง และระยะที่อยู่ในเซลล์ตับ สำหรับบริเวณ C-terminus ซึ่งมีโพลีเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42 KD จะถูกย่อยต่อไป (secondary processing) ให้มีขนาดเล็กลงเป็น 30/36 KD และ 19 KD (Blackman & Holder, 1992) ขบวนการนี้จะเกิดขึ้นนอกเซลล์ของเมอร์โรซอยต์ ก่อนที่เมอร์โรซอยต์จะลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ (Blackman et al., 1991) โดยที่โพลีเพปไทด์ขนาด 19 KD จะยังคงปรากฏอยู่บนผิวของระยะวงแหวนอีกหลายชั่วโมงในขณะที่โพลีเพปไทด์ส่วนอื่นๆ จะถูกทิ้งออกไปจากผิวของเมอร์โรซอยต์ และสามารถตรวจพบได้ในพลาสมา (Blackman, 1990; Blackman & Holder, 1992)

จากการศึกษา MSP1 ของ *Plasmodium* ชนิดต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงระหว่างชนิดของมาลาเรียค่อนข้างน้อย คือประมาณร้อยละ 32 ถึง 38 สำหรับ MSP1 ของมาลาเรียชนิดเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกันมาก กล่าวคือ *P. falciparum* มีความคล้ายคลึงกันของ MSP1 จากมาลาเรียต่างสายพันธุ์กัน ถึงร้อยละ 58 และใน *P. vivax* มีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 81 ส่วน *P. yoelii* และ *P. chabaudi* จะมีความคล้ายคลึงกันของ MSP1 สูงถึง

ร้อยละ 69 ดังนั้น MSP1 ของ *P. falciparum*, *P. vivax* และมาลาเรียของหนู (*P. yoelii* และ *P. chabaudi*) จึงน่าจะมีวิวัฒนาการแยกจากกันในระยะห่างใกล้เคียงกัน (Del Portillo et al., 1991; Gibson et al., 1992; Lewis et al., 1989; Deleersijder et al., 1990)

MSP1 เป็นโปรตีนที่มีความหลายหลายในคุณลักษณะของแอนติเจน (antigenic diversity) จากการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีชนิดโคลนเดียวที่ทำปฏิกิริยากับส่วนต่างๆ ของโปรตีนจากตัวอย่าง *P. falciparum* จากหลายประเทศ พบว่ามีความหลากหลายมากถึง 36 อัลลีล (Conway & McBride, 1991) ซึ่งแอนติบอดีบางกลุ่มสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเมอร์โรซอยต์ของ *P. falciparum* โดยวิธี indirect immunofluorescence ได้ทุกไอโซเลต ส่วนแอนติบอดีบางชนิดทำปฏิกิริยาได้กับเมอร์โรซอยต์บางไอโซเลตเท่านั้น แสดงว่า MSP1 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนบางบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูงหรือเหมือนกัน และบริเวณของลำดับกรดอะมิโนจะมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์หรือไอโซเลต (McBride et al., 1985) เมื่อพิจารณาถึงการนำ MSP1 มาเป็นองค์ประกอบของวัคซีน ความหลากหลายในคุณลักษณะของแอนติเจนชนิดนี้จึงอาจเป็นอุปสรรคของการผลิตวัคซีนให้ครอบคลุมหรือมีผลต่อ *P. falciparum* ทุกสายพันธุ์

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในระดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีนที่สร้าง MSP1 ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ต่างๆ มีพื้นฐานของยีนเพียง 2 รูปแบบ (dimorphism) โดยมีลักษณะต้นแบบ เพียง 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม K1 และกลุ่ม MAD20 (Tanabe et al., 1987) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่ายีนที่สร้าง MSP1 นี้สามารถแบ่งออกเป็นบริเวณ (block) ต่างๆ โดยอาศัยความคล้ายคลึงกัน (homology) ในลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 17 บริเวณ ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 87 (conserved block) จำนวน 5 บริเวณ บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันปานกลางระหว่างร้อยละ 65 ถึง 77 (semiconserved block) จำนวน 5 บริเวณ และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่าร้อยละ 35 (variable block) จำนวน 7 บริเวณ ซึ่งบริเวณที่แตกต่างกันเกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่มีเพียง 2 รูปแบบ (dimorphic nucleotide substitution) และผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ ทำให้สามารถอธิบายการเกิดความหลากหลายในคุณลักษณะของแอนติเจนของ MSP1 ได้จากการเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกันในช่วงที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงก้นปล่อง โครงสร้างและความหลากหลายของยีน MSP1 แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง และความหลากหลายของยีน MSP1 ในสายพันธุ์ต่างๆ

(Tanabe et al., 1987)

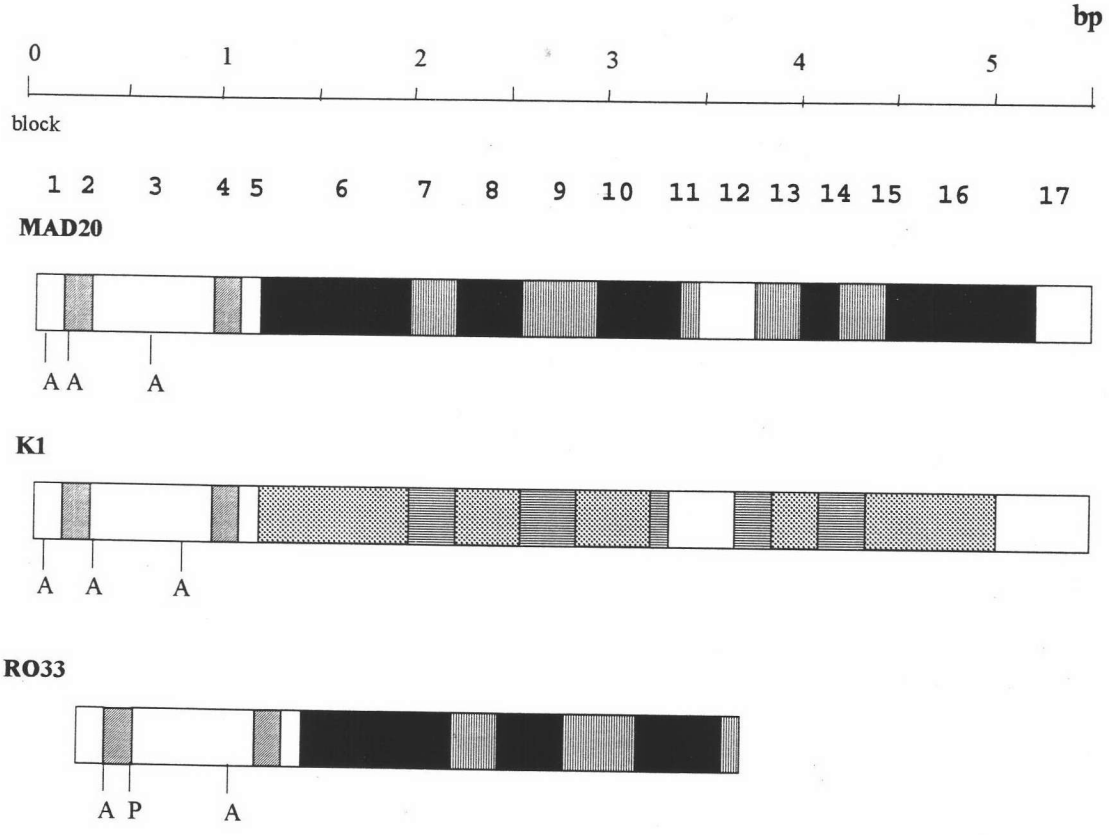
แม้ว่าส่วนใหญ่ของยีนที่สร้าง MSP1 มีพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ แต่บริเวณที่เป็นข้อยกเว้นคือบริเวณที่ 2 (block 2) ซึ่งสร้าง tripeptide repeats แบ่งเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม K1 ประกอบด้วย กรดอะมิโนใน tripeptide repeats ตั้งแต่ 5 ถึง 19 ชุดโดย tripeptide ในชุดแรก และชุดสุดท้ายคือ Serine-Alanine-Glutamine (SAQ) และ Serine-Glycine-Threonine (SGT) ตามลำดับ และปรากฏอยู่ทุกสายพันธุ์เท่าที่มีการศึกษามาในระหว่างชุดแรกและชุดสุดท้ายจำนวนและองค์ประกอบของ tripeptide จะแตกต่างกันไปโดยองค์ประกอบ ส่วนใหญ่เป็น Serine-Glycine-Threonine (SGT) Serine-Glycine-Alanine (SGA) Serine-Alanine-Threonine (SAT) Serine-Glycine-Proline (SGP) หรือ Serine-Alanine-Glutamine (SAQ) สำหรับกลุ่มที่ 2 คือ MAD20 ประกอบด้วย กรดอะมิโนใน tripeptide repeats ตั้งแต่ 5 ถึง 13 ชุด โดย tripeptide ชุดสุดท้ายคือ Serine-Glycine-Glycine (SGG) มีความคงที่เสมอโดยปรากฏอยู่ทุกสายพันธุ์ที่มีการศึกษามาก่อน สำหรับ tripeptide ในตำแหน่งอื่นๆ จำนวนและองค์ประกอบมีความแตกต่างไปตามสายพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็น Serine-Lysine-Glycine (SKG) Serine-Glycine-Glycine (SGG) Serine-Valine-Alanine (SVA) Serine-Valine-Threonine (SVT) Serine-Glycine-Alanine (SGA) หรือ Serine-Serine-Glycine (SSG) สำหรับสายพันธุ์ที่มีจำนวน tripeptide ตั้งแต่ 8 ชุดขึ้นไป องค์ประกอบของ tripeptide ในชุดที่ 3 คือ Serine-Glycine-Glycine (SGG) จะมีความคงที่เช่นกัน (Jongwutiwes et al., 1992) อย่างไรก็ตามแม้ว่ากรดอะมิโนตำแหน่งแรกของ tripeptide ในกลุ่ม K1 และ MAD20 คือ Serine เหมือนกันแต่ในระดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันกล่าวคือ รหัสนิวคลีโอไทด์ (codon) สำหรับ Serine ของ K1 คือ AGT แต่ของ MAD20 คือ TCA เสมอ (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992) ในกลุ่มสุดท้ายคือ RO33 ประกอบด้วยกรดอะมิโนในบริเวณที่ 2 จำนวน 46 ตัวแต่ไม่ปรากฏลักษณะของความซ้ำกันของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแต่กลับพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความซ้ำกัน กล่าวคือ Adenine Cytosine และ Thymine จะมีช่วงห่างทุกๆ 9 นิวคลีโอไทด์เป็นส่วนใหญ่โดยทั่วไปบริเวณที่ 2 ของ RO33 จะมีจำนวนนิวคลีโอไทด์คงที่ แต่จะมีการสับเปลี่ยน (substitution) ในบางตำแหน่งเท่านั้นในสายพันธุ์ที่ต่างกัน (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988 ; Jongwutiwes et al., 1992)

จากลักษณะเฉพาะในบริเวณที่ 2 ของ MSP1 ของ *P. falciparum* นี้ทำให้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonucleases) สามารถตัดดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้แตกต่างกันกล่าวคือ ในส่วนท้ายต่อจาก tripeptide repeats ของกลุ่ม K1 จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์

ที่ถูกตัดได้ด้วย *Alu*I (-AG/CT-) สำหรับ RO33 นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดได้ด้วย *Pst*I (-CTGCA/G-) ในส่วนต้นของบริเวณเดียวกันนี้ ส่วนในกลุ่ม MAD20 จะไม่พบตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Pst*I ดังแสดงในรูปที่ 3 (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992)

สำหรับบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย (variable block) ในบริเวณที่ 4 6 8 10 14 และ 16 นั้นการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่างๆ มีเพียง 2 รูปแบบ ในบริเวณที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย 33 ถึง 36 นิวคลีโอไทด์นั้น จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MSP1 ในสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 2 รูปแบบ เช่นกันคือ กลุ่ม K1 (มี 33 นิวคลีโอไทด์) และกลุ่ม MAD20 (มี 36 นิวคลีโอไทด์) โดยบริเวณกึ่งกลางอาจ เป็นตำแหน่งที่มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม ทำให้เกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนต้นของบริเวณที่ 4 เป็น K1 โดยในส่วนท้ายเป็น MAD20 หรือสลับกันในทางตรงข้ามได้ อย่างไรก็ตามในบริเวณนี้สำหรับอัลลีล K1 สามารถถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Hae*III (-GG/CC-) ได้ ในขณะที่ MAD20 จะไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 4 (Tanabe et al., 1987; Tanabe, 1992) แม้ว่าในบริเวณที่ 6 ถึง 16 จะมีบางบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion) หรือแทรกเข้ามา (insertion) แต่จะมีไม่มาก ดังนั้นพื้นฐานของยีนในบริเวณดังกล่าวมีเพียง 2 รูปแบบ โดยในอัลลีล K1 และ MAD20 ในบริเวณที่ 4 นั้นจะมีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Dra*I และ *Hind*III ที่ต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 5 ทำให้สามารถแยกชนิดของอัลลีล K1 และ MAD20 ออกจากกันได้

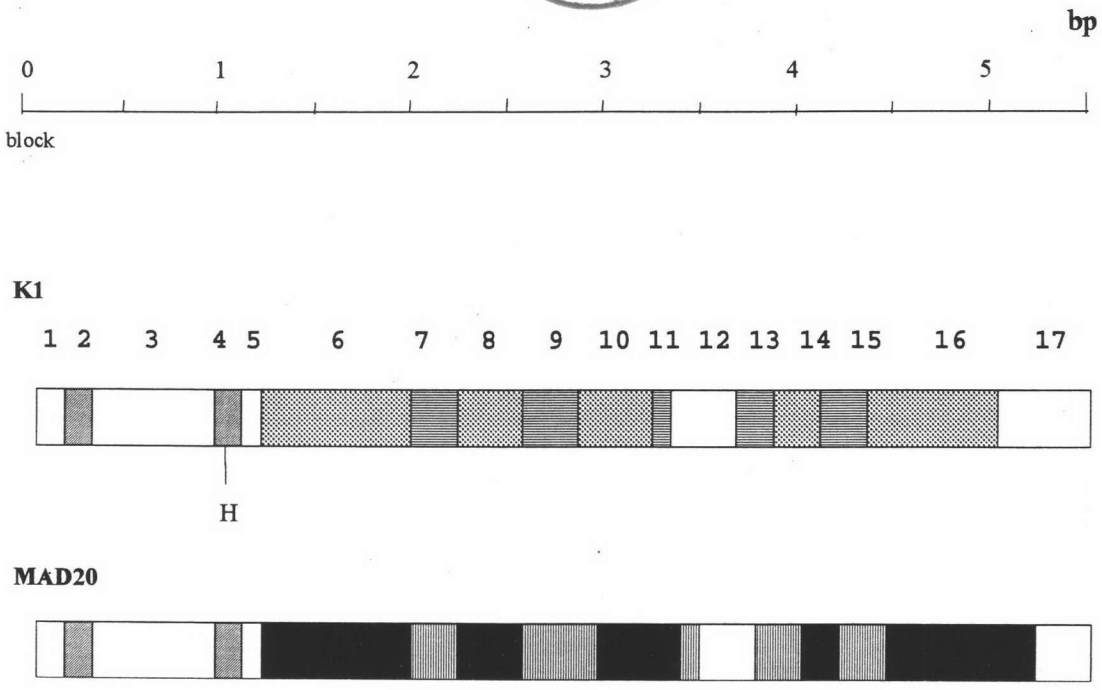
จากการศึกษาโดยใช้ Southern blot hybridization และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MSP1 จากตัวอย่างในธรรมชาติพบว่า บริเวณที่น่าจะเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในขณะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศในยุงนั้น จำกัดอยู่เฉพาะบริเวณที่ 1 ถึง 5 เท่านั้นโดยมีมากถึง 13 ตำแหน่งส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ 3 ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (conserved block) และตำแหน่งสุดท้ายคือ รอยต่อระหว่างบริเวณที่ 4 และบริเวณที่ 5 ในขณะที่บริเวณที่ 6 ถึง 16 รูปแบบของยีนจะมีความสัมพันธ์กันเสมอ (Conway et al., 1991; Jongwutiwes et al., 1992) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ 12 ถึง 17 พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งเท่านั้น ดังนั้นความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวจึงมีน้อย (microheterogeneity) (Jongwutiwes et al., 1993)



A = *Alu*I

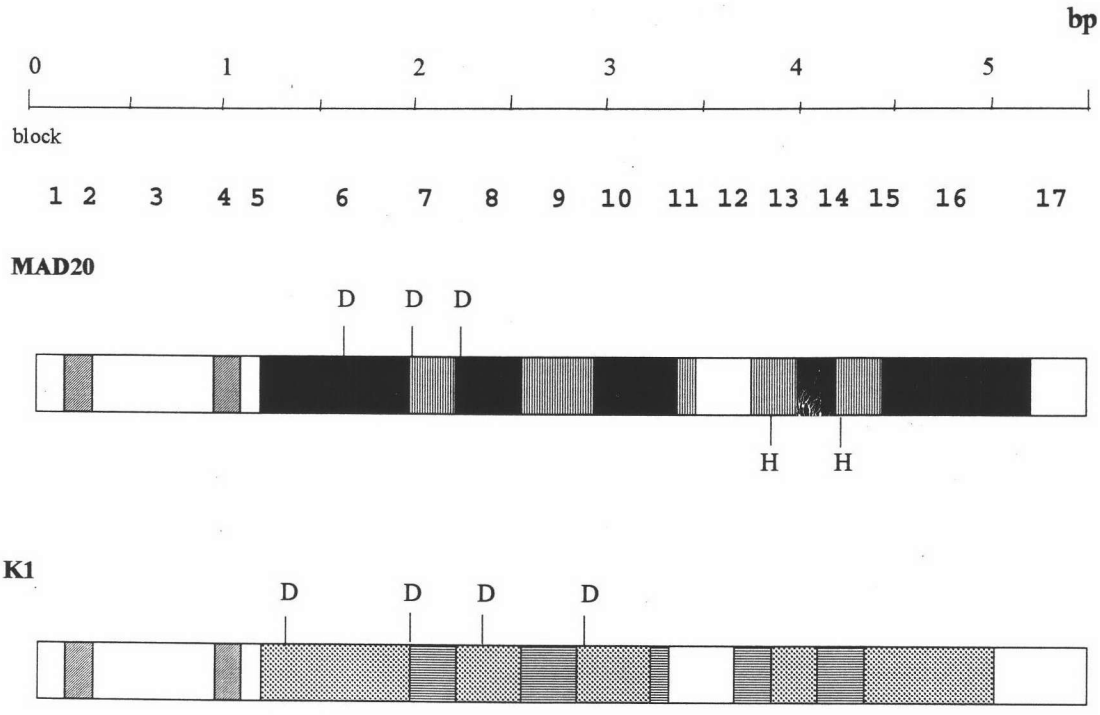
P = *Pst*I

รูปที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Pst*I (-CTGCA/G-) และ *Alu*I (-AG/CT-) ของ K1 type, MAD20 type และ RO33 type (ดูตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ หน้า 51 และ 52) (Certa et al., 1987, Mackay et al., 1985 และ Tanabe et al., 1987)



H = *Hae*III

รูปที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Hae*III (-GG/CC-) ของ K1 type (ดูตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ หน้า 53) (Mackay et al., 1985 และ Tanabe et al., 1987)



D = *Dra*I

H = *Hind*III

รูปที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Dra*I (-TTT/AAA-) และ *Hind*III (-A/AGCTT-) ของ K1 type และ MAD20 type (ดูตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ หน้า 54 และ 55) (Mackay et al., 1985 และ Tanabe et al., 1987)

ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ MSP1 โดยใช้แอนติบอดีชนิดโคลนเดียว (Conway & McBride, 1991)

การศึกษาอุบัติการของอัลลีล MSP1 ในบริเวณที่ 2 ที่สร้าง tripeptide repeats ในตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จากผู้ป่วยในประเทศต่างๆ โดยใช้ oligonucleotide ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละอัลลีลเป็นตัวตรวจสอบ (allele-specific oligonucleotide probe) สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อมาลาเรียโดยตรง (genomic DNA) หรือผลิตผลปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) พบว่าการกระจายของอัลลีลในบริเวณที่ 2 ของ MSP1 มีความแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่นเช่นในประเทศไทยพบอัลลีล MAD20 มากที่สุดคือ ร้อยละ 74 ในขณะที่อัลลีล K1 และ RO33 พบเพียงร้อยละ 21 และ 16 ตามลำดับ (Jongwutiwes et al., 1991) ประเทศโคลอมเบียพบอัลลีล RO33 มากที่สุดคือ ร้อยละ 84 อัลลีล MAD20 พบร้อยละ 48 ส่วนอัลลีล K1 พบเพียงร้อยละ 10 ซึ่งส่วนใหญ่มักจะมีการปะปนของอัลลีลต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน (Snewin et al., 1991) สำหรับในประเทศเซเนกาลพบว่าอัลลีล RO33 พบมากที่สุด อัลลีลที่พบรองลงมาคือ K1 ส่วนอัลลีล MAD20 พบน้อยที่สุด (Scherf et al., 1991) ในประเทศบราซิลพบอัลลีล RO33 และ K1 ใกล้เคียงกัน ส่วนอัลลีล MAD20 พบได้น้อย (Kimura et al., 1990) สำหรับอุบัติการของอัลลีล MSP1 ในส่วนอื่นมีการศึกษาค่อนข้างจำกัดโดยวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอ สำหรับในประเทศไทยพบว่า อัลลีลในบริเวณที่ 4 พบได้ทั้ง K1 และ MAD20 ใกล้เคียงกัน แต่อัลลีลในบริเวณที่ 6 ถึง 16 พบอัลลีล MAD20 มากกว่า K1 ประมาณร้อยละ 60 และร้อยละ 40 ตามลำดับ (Jongwutiwes et al., 1991) การศึกษาโดยใช้กลุ่มแอนติบอดีชนิดโคลนเดียวเพื่อตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในประเทศแกมเบีย ไนจีเรีย และบราซิล พบว่าอัลลีลในบริเวณที่ 6 ถึง 16 ส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 80 เป็นชนิด MAD20 (Conway et al., 1991)

บทบาท และหน้าที่ของ MSP1 นั้นยังไม่ทราบชัดเจนแต่จากการเปรียบเทียบ MSP1 ของมาลาเรียชนิดต่างๆ พบว่ามีบางบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (interspecies conserved blocks) ดังนั้น MSP1 จึงน่าจะมีบทบาทเกี่ยวกับหน้าที่บางประการ และการที่มีการแทนที่ของลำดับดีเอ็นเอบางตำแหน่งทำให้กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไป ซึ่งอาจมีผลต่อการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี นอกจากนี้ MSP1 ในบริเวณ C-terminus ยังมี EGF-like domain ซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวกับการจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ หรือปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ (cell-to-cell-interaction) EGF-like

domain นี้ยังพบได้ในโปรตีนบนผิวของระยะไซโกต และโอโอไคนีตต์ (Pfs25) แอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อมาลาเรียได้ บริเวณที่ 1 ของ MSP1 ของ *P. falciparum* ยังมีลำดับกรดอะมิโน Lysine-Glutamine-Lysine (KEK) Leucine-Glamine-Lysine (LEK) หรือ Lysine-Glutamine-Leucine (KEL) ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับบนผิวเม็ดเลือดแดงดังนั้นจึงมีผู้เสนอว่า MSP1 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลุกลามของเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงในขั้นตอนการจดจำ (recognition) และการเกาะติด (attachment) นอกจากนี้ยังพบว่าการเกาะติดของ MSP1 กับเม็ดเลือดแดงต้องอาศัยกรดไซอาลิค (sialic acid-dependent) และสามารถยับยั้งการเกาะติดดังกล่าวได้ด้วยแอนติบอดีต่อ EGF-like domain หรือไกลโคฟอร์รินที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble glycophorin) MSP1 ยังอาจมีส่วนที่ทำปฏิกิริยากับสเป็คตริน (spectrin) บนผิวเม็ดเลือดแดงด้านที่ติดกับไซโตพลาสซึมในระหว่างที่มาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้ว (Holder & Blackman, 1994)

บทบาทของ MSP1 ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นมีผู้ศึกษาโดยใช้มาลาเรียของหนูชนิด *P. yoelii* และ *P. chabaudi* พบว่า MSP1 ของมาลาเรียดังกล่าว สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียในภายหลัง แอนติบอดีที่เกิดขึ้นนี้เมื่อนำไปฉีดเข้าหนูตัวอื่นที่ไม่ได้รับวัคซีนก็สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (passive transfer of protection) (Holder, 1988) สำหรับการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของ MSP1 ของ *P. falciparum* ในการกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อนั้นมีผู้ศึกษาโดยใช้ MSP1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified MSP1) หรือโปรตีนบางส่วนของ MSP1 ที่สร้างจากแบคทีเรีย (recombinant MSP1) และโปรตีนบางส่วนของ MSP1 ที่สร้างจากการสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic peptide) ทั้งในสิงทดลองและในคน (Tanabe, 1992) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า MSP1 มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้แม้ว่าจะใช้ MSP1 เพียงบางส่วนเป็นอิมมูนโนเจน (immunogen) หรือ MSP1 ทั้งหมดก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่า MSP1 ที่ใช้เป็นอิมมูนโนเจนกับ MSP1 ของเชื้อที่ใช้ฉีดทดลองที่มีความแตกต่างกันก็สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานได้ แสดงว่าบริเวณที่มีความคล้ายคลึงในองค์ประกอบของกรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานดังกล่าว อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียจะเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ (complete protection) กล่าวคือ ภายหลังฉีดอิมมูนโนเจนแล้ว เมื่อฉีดเชื้อมาลาเรียเข้าไปในสิงทดลองจะไม่ปรากฏอาการของการติดเชื้อมาลาเรีย และตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย

ตารางที่ 1 แสดงผลการป้องกันการติดเชื้อ *P. falciparum* ภายหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย MSP1 หรือ ส่วนอื่นๆ ของ MSP1

ชนิดของ MSP1	สายพันธุ์ของเชื้อ	ลิงทดลอง	ผลการป้องกัน		เอกสารอ้างอิง
			กลุ่มที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	กลุ่มควบคุม	
โปรตีนบริสุทธิ์ (Purified protein)					
MSP1	K1/FUP*	*Saimiri*	2/3+	0/4	Hall et al. (1989)
MSP1	FUP/FUP	*Aotus*	3/3	0/2	Siddiqui et al. (1987)
MSP1	SGE2/FUP	*Saimiri*	4/4	2/4	Perrin et al. (1984)
MSP1	K1/FUP	*Saimiri*	2/2	0/4	Etlinger et al. (1991)
83 kD	?	*Aotus*	3/3	0/3	Moreno et al. (1988)
ส่วนรีคอมไบแน้นท์ (Recombinants)					
C terminal pep. (1503-1604)#	Welloome /Welloome	*Aotus*	2/4	0/3	Holder et al. (1988)
p190-1 (147-321)	K1/FUP	*Saimiri*	2/4	0/4	Etlinger et al. (1991)
p190-3 (147-321, 1060-1195)	K1/FUP	*Saimiri*	1/4	0/4	Etlinger et al. (1991)
p190N (146-312, 1059-1196)	K1/FVO	*Aotus*	2/5	0/5	Herrera et al. (1990)
p190L (146-312)	K1/FVO	*Aotus*	1/4	0/5	Herrera et al. (1992)
p190L-CS.T3	K1/FVO	*Aotus*	3/4	0/5	Herrera et al. (1992)
เพปไทด์สังเคราะห์ (Synthetic peptide)					
43(24-66)-TT$	SGE2/FUP	*Saimiri*	3/4	0/4	Cheung et al. (1984)
SPf83.1(43-53)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)
SPf83.2(40-52)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของ MSP1	สายพันธุ์ของเชื้อ	ลิงทดลอง	ผลการป้องกัน		เอกสารอ้างอิง
			กลุ่มที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	กลุ่มควบคุม	
SM83.26(540-552)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)
M83.23(402-413)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)
SM83.30(595-606)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)
SM83.18(277-287)-BSA	Welloome/FVO	*Aotus*	partially proteoted	-	Patarroyo et al. (1987)
SPf66	-/FVO	*Aotus*	1/6	0/6	Ruebush et al. (1990)
SPf66	-/FVO	*Aotus*	7/16	0/11	Rodriguez et al. (1990)
SPf66	-/wild strain	Human	3/5	0/4	Patarroyo et al. (1988)

* สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้เป็นอิมมูนโนเจน/สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ฉีดทดลอง

+ จำนวนของลิงทดลองที่ให้ผลป้องกันได้หรือหายได้เอง / จำนวนของลิงทดลองทั้งหมดที่ได้รับเชื้อ

จำนวนของกรดอะมิโนของ MSP1

$ เพปไทด์สังเคราะห์ที่รวมกับ tetanus toxoid (TT) หรือ bovine serum albumin (BSA)

(Tanabe, 1992)

ในกระแสเลือดเลย ก็ต่อเมื่อ MSP1 ของอิมมูนโนเจนและ MSP1 ของเชื้อที่ใช้ฉีดเพื่อทำให้เกิดโรคนั้นมีความเหมือนกันหมด (homologous challenge) แสดงว่าบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อย (variable regions) ของ MSP1 ก็มีส่วนสำคัญให้ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ขึ้น (Siddiqui et al., 1987)

สำหรับระบาดวิทยาของภาวะการตอบสนองต่อ MSP1 ภายหลังจากการติดเชื้อมาลาเรีย (seroepidemiology) ในธรรมชาตินั้นพบว่าผู้ที่อยู่ในเขตระบาดของโรคมาลาเรีย (malaria endemic area) จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อ MSP1 จากการศึกษาภาวะดังกล่าวในคนไทยโดยใช้โพลีเพปไทด์จากส่วน N-terminus (บริเวณที่ 3 ถึง บริเวณที่ 6) ของ MSP1 ของ *P. falciparum* เป็นแอนติเจนพบว่า ผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* อย่างเฉียบพลัน (acute infection) จะมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนดังกล่าว จากการตรวจพบในผู้ป่วย 84 ราย จากทั้งหมด 85 ราย และระดับแอนติบอดีจะขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการติดเชื้อและจะค่อยๆ ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งภายในเวลาประมาณ 1 เดือน แต่การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมาลาเรียในกระแสเลือดและระดับแอนติบอดีดังกล่าว (Brown et al., 1991) การศึกษาในประเทศแกมเบีย (The Gambia) (Riley et al., 1992) ประเทศมาลี (Mali) (Fruh et al., 1991; Tolle et al., 1993) และประเทศเบอร์กินาฟาโซ (Burkina Faso) (Muller et al., 1989) โดยใช้โพลีเพปไทด์จากส่วนต่างๆ ของ MSP1 เป็นแอนติเจนพบว่า ประชากรในบริเวณดังกล่าวมีแอนติบอดีต่อ MSP1 ภายหลังการติดเชื้อ *P. falciparum* ในธรรมชาติ และระดับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณสูงขึ้นตามอายุ นอกจากนี้แอนติบอดีดังกล่าวมักจักทำปฏิกิริยากับบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของ MSP1 น้อย (allele-specific หรือ variable block) สำหรับการศึกษาในประเทศแกมเบีย (Riley et al., 1992) คณะผู้วิจัยใช้แอนติเจน MSP1 ของ Wellcome strain ดังนั้นจึงพบว่าแอนติบอดีต่อแอนติเจนดังกล่าวในประชากรที่ศึกษาทำปฏิกิริยากับบริเวณของ MSP1 ที่มีความคล้ายคลึงน้อย (variable region) ต่ำมาก ในขณะที่แอนติบอดีส่วนใหญ่มักจะทำปฏิกิริยากับบริเวณของ MSP1 ที่มีความคล้ายคลึงกันสูง (conserved region) ทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากลักษณะของ MSP1 ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศแกมเบียส่วนใหญ่เป็นชนิด MAD20 (Conway et al., 1991) ดังนั้นจึงพบการตอบสนองต่ออัลลีลดังกล่าวต่ำ อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อ MSP1 ในส่วน N-terminus (83 KD polypeptide) และ C-terminus (42 KD polypeptide) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงลดลงต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ถึงร้อยละ 50 โดยผู้ที่ติดเชื้อ

มาลาเรียจะมีปริมาณมาลาเรียในกระแสเลือดต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเด็กที่มีแอนติบอดีดังกล่าว แม้จะมีเชื้อมาลาเรียปริมาณสูงในเลือดนั้น จำนวนครั้งของการเกิดอาการไข้จากมาลาเรียจะลดลงมาก (Riley et al., 1992)

การศึกษาประสิทธิภาพของ MSP1 ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียจำเป็นต้องทราบลักษณะพื้นฐานอัลลีลของ MSP1 ในธรรมชาติเพื่อการปรับปรุงและเข้าใจภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในอนาคต แม้ว่าจะมีวิธีตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) โดยใช้แอนติบอดีชนิดโคลนเดียวจำนวนมาก (McBride et al., 1985; Conway et al., 1991) แต่วิธีการเตรียมแอนติเจนจำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดทดลองอย่างน้อย 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดระยะเมอร์โรซอยต์ และการใช้แอนติบอดีดังกล่าวต้องใช้มากกว่า 10 ชนิด ทำให้เวลาที่ใช้ตลอดจนกระบวนการตรวจสอบยาวนานและยุ่งยาก และแม้ว่าการตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 โดยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอของมาลาเรียจะสามารถตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 ได้สมบูรณ์แต่จำเป็นต้องใช้ตัวตรวจสอบ (probes) หลายตัว และต้องผ่านขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองให้มีปริมาณมากเพียงพอจึงไม่ใช้วิธีที่จะใช้ในการศึกษา MSP1 จากตัวอย่างในธรรมชาติจำนวนมากได้ (Jongwutiwes et al., 1991) สำหรับการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) นั้นส่วนใหญ่มีการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 ของ *P. falciparum* จำกัดเฉพาะบริเวณที่ 2 เท่านั้น (Kimura et al., 1990; Scherf et al., 1991; Snewin et al., 1991) ซึ่งต้องอาศัยการตรวจสอบแยกชนิดโดยวิธี Southern blot hybridization ซึ่งต้องผ่านขั้นตอนมากและใช้เวลาค่อนข้างนาน และไม่สามารถตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 ทั้งหมดได้ การศึกษานี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาประยุกต์ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วนต่างๆ ของ MSP1 และวิเคราะห์อัลลีลในส่วนต่างๆ โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน และหาความสัมพันธ์ในส่วนต่างๆ ของ MSP1 ในการประยุกต์ใช้สำหรับตรวจสอบอัลลีลทั้งหมดของ MSP1 ในเวลาอันรวดเร็วกว่าเดิม