05/0069/34

บทความปริทัศน์

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย
Malaria Vaccines

จันทน์สุดา วงศ์ศรีชนาลัย เอ็ช ไคล์ เว็บสเตอร์**

Abstract : **Chansuda Wongsrichanalai and H.Kyle Webster. 1991. Malaria vaccines. Thai J Hlth Resch 5(1): 63 - 75**

Malaria is still a major public health problem in Thailand. Development of parasite resistance to antimalarial drugs is a reason for increased malaria severity in certain parts of the country. While research on new malaria chemotherapy is on-going, there has been an interest in a vaccine against malaria as well. In the past 10 years, research on vaccines for human malaria has progressed rapidly. Malaria vaccines may be classified into 3 groups according to the stages of parasite development that they act on, namely, sporozoite vaccines, asexual blood-stage vaccines and sexual-stage or transmission blocking vaccines. Among vaccines against the different stages of malaria, sporozoite vaccines are the most advanced. There have been several human trials including one that is being conducted in Thailand. Although we have not yet been able to produce a malaria vaccine with satisfactory efficacy, it may turn out that a successful vaccine will be made from components of each of the parasite stages in the human host (multi-component vaccine). Success in malaria vaccine development is therefore anticipated and depends on the collaboration between developed countries, where modern biotechnology exists and enthusiastic and dedicated medical experts in developing countries, who have strong interests and expertise in malaria control.

Key words : *Vaccine, malaria*

* แผนกอิมมูนวิทยาและชีวเคมี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (ฝ่ายสหรัฐอเมริกา) กทม. 10400
Dept of Immunology and Biochemistry, US Army Medical Component , Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS), Bangkok 10400.

01/0070/34

บทคัดย่อ : **จันทน์สุดา วงศ์ศรีชนาลัย และ เอ็ช ไคล์ เว็บสเตอร์. 2534. วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5(1) : 63 - 75**

มาลาเรียยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของประเทศไทย ภาวะดื้อยาเป็นสาเหตุหนึ่ง ซึ่งทำให้โรคมาลาเรียทวีความรุนแรงในบางส่วนของประเทศ ในขณะที่มีการค้นคว้าเกี่ยวกับเคมีบำบัดใหม่ ๆ ก็ได้มีความสนใจเกี่ยวกับการป้องกันโรคมาลาเรียโดยใช้วัคซีนด้วย ใน 10 ปีที่ผ่านมา งานวิจัยเกี่ยวกับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียได้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียอาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ตามชีพจักรของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ วัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อต้านต่อ sporozoite ต่อระยะ asexual blood stage (ABS) และต่อระยะ gametocyte หรือที่เรียกว่า transmission blocking vaccines ในบรรดาวัคซีนทั้งหมดที่กล่าวมานี้ วัคซีนต่อ sporozoite ได้มีการพัฒนาไปไกลที่สุด มีการทดลองในคนมาแล้วหลายครั้ง รวมทั้งที่กำลังดำเนินอยู่ในประเทศไทยด้วย แม้ว่าปัจจุบันเรายังไม่สามารถผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจได้ แต่ในที่สุดวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพดี อาจประกอบขึ้นด้วยส่วนย่อยซึ่งออกฤทธิ์ต่อทุก ๆ ระยะของเชื้อมาลาเรียก็ได้ ความสำเร็จในการผลิตวัคซีนดังกล่าว จึงเป็นความหวังที่ทุกคนรอคอย และจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมืออันดีระหว่างประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งมีเทคโนโลยีที่ทันสมัย กับนักวิทยาศาสตร์และแพทย์ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งมีความสนใจและเชี่ยวชาญในการควบคุมโรคมาลาเรีย ตลอดจนมีความกระตือรือร้นและพร้อมที่จะทุ่มเทพลังความสามารถเพื่องานวิจัยดังกล่าว

คำสำคัญ : *วัคซีน, มาลาเรีย*

บทนำ

ตามรายงานขององค์การอนามัยโลก จากประชากรทั่วโลกราว 5,000 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2531 กว่า 2,000 ล้านคน (41%) อาศัยอยู่ในดินแดนซึ่งยังมีการแพร่เชื้อมาลาเรีย แทบไม่น่าเชื่อว่าทุกวันนี้ยังมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกราว 270 ล้านคนต่อปี โดยเกือบครึ่งหนึ่งหรือประมาณ 110 ล้านคน มีอาการของโรคปรากฏ (WHO, 1990) เฉพาะประเทศไทยในปีงบประมาณ 2531 ตรวจพบผู้ป่วยประมาณ 350,000 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 6.8 ต่อประชากร 1,000 คน มาลาเรียเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 6 ของประเทศ จังหวัดที่มีอัตราป่วยมาลาเรียสูงสุด ได้แก่ ตราด รองลงไปคือ กระบี่ ตาก และจันทบุรี แม้ว่าการแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยได้ลดลงอย่างมากในสามทศวรรษที่ผ่านมา แต่ปัจจุบันมีเพียง 10 จังหวัดซึ่งจัดเป็นเขตปลอดโรคมาลาเรีย คือกรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี อยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และนครปฐม ท้องที่ส่วนใหญ่ของประเทศ ได้แก่ ที่ราบลุ่มและเขตเมืองในจังหวัดต่าง ๆ ยังจัดอยู่ในพื้นที่ที่ต้องระวังโรคมาลาเรีย เพราะการแพร่เชื้ออาจหวนกลับมาใหม่ได้ คนไทยราว 12 ล้านคนหรือ 1 ใน 5 ของประชากรทั้งประเทศ อาศัยอยู่หรือประกอบอาชีพประจำในท้องที่ป่าเขาและชายแดน ซึ่งโรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญยิ่งทางสาธารณสุข ความสำเร็จในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประชาชนไทยกลุ่มนี้ตลอดจนผู้ที่ปฏิบัติหน้าที่หรือเดินทางไปในท้องถิ่นที่มีการแพร่เชื้อมาลาเรีย ปัจจุบันรัฐบาลต้องใช้งบประมาณหลายร้อยล้านบาทต่อปี ในการป้องกันและรักษาโรคมาลาเรีย นับเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงมากอย่างหนึ่งของประเทศ

ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์หลังสงครามโลกครั้งที่สองทำให้หวังว่า เราจะสามารถกำจัดมาลาเรียให้สูญสิ้นไปจากโลกได้ในไม่ช้า ทั้งนี้เนื่องจากผลสำเร็จของการใช้ dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) ในการกำจัดยุงและการใช้ยา chloroquine ในการป้องกันและรักษาโรคมาลาเรีย ราว 20 ปีต่อมาเริ่มเป็นที่เข้าใจว่า การกวาดล้างมาลาเรียไม่ได้ง่ายอย่างที่เคยคิด เพราะความล้มเหลวในการกำจัดยุงโดยการฉีด DDT รวมทั้งการที่เชื้อมาลาเรียดื้อต่อ chloroquine และยารักษาโรคมาลาเรียชนิดอื่น ๆ (Harinasuta *et al.*, 1962; Boudreau *et al.*, 1982) ทั้งนี้ประกอบกับปัจจัยสำคัญ

อื่น ๆ ที่ส่งผลสนับสนุนการแพร่เชื้อมาลาเรีย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางเศรษฐกิจ การพัฒนาทางการเกษตร ปัญหาการเมืองและการอพยพพลัดถิ่น เป็นต้น ดังนั้นการค้นคว้าเกี่ยวกับวิธีป้องกันและกำจัดมาลาเรีย จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง ได้มีการค้นคว้าเกี่ยวกับเคมีบำบัดใหม่ ๆ การวิจัยทางกีฏวิทยา ตลอดจนการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ทำให้การวิจัยเกี่ยวกับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย มีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วใน 10 ปีที่ผ่านมา

ชีพจักรของมาลาเรีย

มาลาเรียจัดอยู่ใน genus *Plasmodium* ซึ่งมีอยู่หลายสิบ species แต่มีเพียง 4 species ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในคน ในจำนวนนี้ *Plasmodium falciparum (P. falciparum)* มีความสำคัญทางการแพทย์ที่สุด เนื่องจากความรุนแรงของโรค และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ความชุก (prevalence) ของโรคมีมากกว่า species อื่น วงจรชีวิตของมาลาเรียซับซ้อนแต่พอสรุปได้คือ เมื่อยุง *Anopheles* ซึ่งเป็นพาหะของโรคมาลาเรียกัดคน (หรือสัตว์พาหะ) เชื้อมาลาเรียในระยะที่จะติดต่อได้เรียกว่า sporozoite จะถูกปล่อยออกจากต่อมน้ำลายยุงขณะที่กัดเข้าสู่กระแสโลหิต sporozoite จะอยู่ในกระแสโลหิตเพียงช่วงเวลาสั้น ๆ หลังจากนั้นจะไปเจริญเติบโตต่อที่เซลของตับ ระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลตับนี้ เรียกว่า exoerythrocytic schizogony (EES) ในที่สุดเซลตับจะแตกออกและปล่อย merozoites หลายหมื่นตัวเข้ากระแสโลหิต Merozoites เหล่านี้จะไปเจริญเติบโตต่อในเม็ดโลหิตแดง เราเรียกว่า ring form เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความหนาแน่นของ ring forms ของเชื้อ *P. falciparum* ในกระแสโลหิต มักจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการไข้มาลาเรีย ring forms เจริญต่อไปจนเข้าสู่ระยะ mature trophozoites และ schizonts ทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า asexual blood stages (ABS) ช่วงชีพจักรของมาลาเรียในระยะนี้เรียกว่า erythrocytic schizogony สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียระยะ ABS ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมสี thick และ thin blood films เมื่อ schizont เจริญเต็มที่ทำให้เม็ดโลหิตแดงแตกออก merozoites จำนวนมากถูกปล่อยออกมา และเข้าไปเจริญในเม็ดโลหิตแดงเม็ดใหม่วนเวียนไปเรื่อย ๆ เชื้อมาลาเรียในระยะ ABS นี้บางตัวไม่เจริญไปเป็น schizont แต่เจริญไปเป็น gametocyte ซึ่งเป็นระยะที่มีเพศ (sexual stage) เมื่อยุง *Anopheles* ซึ่งเป็นพาหะของโรคมากัดคนซึ่งมี gametocyte อยู่ในกระแสโลหิต gametocyte ก็จะไปเจริญต่อในยุงโดย gametocyte เพศผู้ (microgametocyte) จะเข้าสู่ระยะ exflaggelation และผลิต microgamete เพื่อไปผสมพันธุ์กับ macrogamete ซึ่งเป็นเพศเมียกลายเป็น zygote ต่อมา zyygote จะกลายเป็น ookinete ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงเป็น oocyst อยู่ที่ผนังทางเดินอาหารของยุง เมื่อ oocyst เจริญเต็มที่จะแตกปล่อย sporozoites ซึ่งอยู่ภายในจำนวนมากออกมา sporozoites เหล่านี้เข้าไปสู่ช่องในลำตัวยุง sporozoites จะกระจายไปตามเนื้อเยื่อจนที่สุดเจริญเต็มที่ทะลุผ่านต่อมน้ำลายยุง พร้อมที่จะแพร่สู่บุคคลที่ถูกยุงกัดต่อไป

ภูมิคุ้มกันต่อระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของมาลาเรีย

ภูมิคุ้มกันต่อ Sporozoite

ความคิดที่ว่าโรคมาลาเรียอาจป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีน เริ่มได้รับความสนใจใหม่ เมื่อ Nussenzweig *et al.*, (1967) ได้ทำการทดลองฉีด sporozoite ซึ่งถูกทำให้อ่อนกำลังโดยผ่านการฉายรังสี (radiation attenuated) เข้าในหนูเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (active immunization) แล้วติดตามดูความสามารถของหนู ในการต้านทานโรคมาลาเรีย โดยลองฉีด sporozoite ที่ปกติเข้าไป ในเวลาต่อมาปรากฏว่าหนูไม่เป็นโรคมาลาเรีย ภายหลังพบว่าไม่เพียงแต่หนูเท่านั้น เรายังสามารถให้ active immunization ทำนองเดียวกันในลิงวอก (Gwadz *et al.*, 1979) และคน (Clyde *et al.*, 1973; Rieckmann *el al.*, 1979) ได้สำเร็จด้วย เมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการทดลองในอาสาสมัคร ให้ผลสนับสนุนการทดลองในคนที่ทำไว้ดั้งเดิม เท่าที่ทราบในปัจจุบัน immunogen ชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ attenuated sporozoites

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่สำคัญอื่น ๆ ได้แก่ การทดลองของ Vanderberg *et al.* (1969) ซึ่งพบว่า ความสามารถในการต้านทานโรคมาลาเรียนั้น ส่วนหนึ่งเนื่องมาจาก antibodies การใช้ immunofluorescent assay ทดสอบน้ำเหลืองของชาวแอฟริกัน ซึ่งอาศัยอยู่ในท้องถิ่นที่มีมาลาเรียชุกชุมโดย Nardin *et al.* (1979) พบ antisporozoite antibodies ซึ่งมีระดับและความชุกเพิ่มมากขึ้นตามอายุ เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียในหนู โดยนำ monoclonal antibodies ต่อ sporozoite ไปฉีดหนู (passive immunization) แล้วลองฉีด sporozoites เข้าไปในหนูในเวลาต่อมา พบว่าหนูไม่เป็นมาลาเรีย (Potocnjak *et al.*, 1980) ต่อมา Nussenzweig & Nussenzweig (1985) ได้ศึกษาน้ำเหลืองของผู้ที่เคยป่วยเป็นมาลาเรีย โดยใช้ monoclonal antibodies ทำให้ค้นพบ circumsporozoite (CS) protein ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญบนผิวของ sporozoite และที่ CS protein นี้เอง มีกลุ่มของ amino acids ซึ่งเรียงตัวต่อกันซ้ำไปซ้ำมาทำหน้าที่เด่นในการกระตุ้น B lymphocytes ให้สร้าง antibodies (immunodominant repetitive B epitope) อยู่ด้วย

ปัจจุบันเราทราบว่าภูมิคุ้มกันต่อ sporozoite มีความจำเพาะต่อระยะ sporozoite (stage-specific) เท่านั้น และจำเพาะต่อ species (species-specific) ด้วย หมายความว่าผู้ที่ได้รับ active immunization ด้วย *P. falciparum* sporozoites จะสามารถต้านทานโรคมาลาเรียได้ ถ้าถูกยุงซึ่งมีเชื้อชนิด *P. falciparum* กัดหรือถูกฉีด *P. falciparum* sporozoites เข้ากระแสโลหิต แต่จะยังเป็นโรคมาลาเรีย หากได้รับเชื้อระยะ ABS เข้าสู่ร่างกาย เช่น เมื่อได้รับการถ่ายเลือด (blood transfusion)

แม้ว่าวิธีให้ภูมิคุ้มกันโดยการฉีด radiation attenuated sporozoites จะดูมีหลักการดี แต่ในทางปฏิบัติดูเหมือนว่าจะทำได้ยาก เพราะ

1. การที่จะนำเอายุงซึ่งผ่านการฉายรังสีมากัดคน เป็นวิธีมาตรฐานของการให้ภูมิคุ้มกัน ย่อมเป็นไปไม่ได้ในเชิงปฏิบัติ

2. เราไม่สามารถเลี้ยง sporozoites ในห้องปฏิบัติการได้ และ

3. แม้ว่าเราจะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte ในห้องปฏิบัติการได้ และสามารถเลี้ยงยุง *Anopheles* ตลอดจนนำ gametocyte ที่เลี้ยงมาให้ยุงกิน และผ่าเอา sporozoite จากยุงในเวลาต่อมา การผลิต sporozoites โดยวิธีนี้ ก็จะให้ผลผลิตได้ไม่เพียงพอกับปริมาณอันมหาศาลที่ต้องการ เพื่อนำไปผลิตวัคซีน ดังนั้นจึงได้มีการพยายามผลิตวัคซีนจาก sporozoite โดยอาศัยวิวัฒนาการ ทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ (genetic engineering)

ภูมิคุ้มกันต่อระยะ Asexual Blood Stages (ABS)

ความเข้าใจเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อระยะ ABS ของมาลาเรียนั้น มีรากฐานมาจากข้อสังเกตที่ว่า ในท้องถิ่นที่มีการแพร่เชื้อมาลาเรีย (malaria endemic area) สูง เด็กจะป่วยด้วยไข้มาลาเรียบ่อยและมีอาการรุนแรง ต่อเมื่ออายุมากขึ้นความถี่ของโรคจึงจะลดลง และความรุนแรงก็น้อยลงด้วย อาการมักจะดีขึ้นและหายไปก่อนที่จำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตจะลดลง ซึ่งบ่งชี้ว่าบุคคลนั้น สร้างทั้งภูมิคุ้มกันต่อพิษโรค (anti-toxic immunity) และต่อเชื้อมาลาเรีย (antiparasitic immunity) ได้มีการทดลองที่เป็นแบบฉบับสำคัญการทดลองหนึ่ง ด้วยการนำเอา immunoglobulin จากผู้ใหญ่ซึ่งอาศัยอยู่ใน endemic area (immuned adults) มาฉีดเข้ากล้ามเนื้อเด็กซึ่งป่วยเป็นมาลาเรีย (passive immunization) ชนิด *P. falciparum* แล้วติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียในเด็ก พบว่าเชื้อระยะ ABS หายไปรวดเร็วกว่าปกติ (Cohen *et al.*, 1961)

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำเหลืองของผู้ที่เคยเป็นมาลาเรีย พบว่า สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่ม (agglutination) ของ merozoites และขัดขวางไม่ให้ merozoite เข้าไปเจริญเติบโตในเม็ดโลหิตแดงได้ แสดงว่าน่าจะมี antigens บนผิวของ merozoite ไปกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น

ข้อสังเกตและผลการทดลองข้างต้น นำไปสู่ความคิดที่จะป้องกันโรคมาลาเรียด้วยวัคซีนต่อระยะ ABS วัตถุประสงค์เบื้องต้น คือ การผลิตวัคซีนที่เพียงสามารถเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของโรค โดยลดจำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตและอาการ ทำนองเดียวกับ anti-toxic immunity ที่เกิดในธรรมชาติ ทั้งนี้ไม่จำเป็นต้องทำให้ parasites หมดสิ้นไปจากกระแสโลหิต (sterilizing immunity)

ภูมิคุ้มกันต่อระยะ Sexual Stages

Antibodies ต่อ sexual stage ของมาลาเรียนั้น เกิดขึ้นโดยธรรมชาติในผู้ที่เคยเป็นมาลาเรีย เช่นเดียวกับ antibodies ต่อระยะการเจริญเติบโตอื่น ๆ (Meuwissen *et al.*, 1985; Mendis *et al.*, 1987) ความเข้าใจเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อระยะ sexual stages จะนำไปสู่ความสำเร็จในการค้นคว้าเกี่ยวกับวัคซีนต่อระยะดังกล่าวของมาลาเรีย หรือที่เรียกว่า transmission-blocking vaccines เพราะหลักการทำงานของมันคือ ขัดขวางการแพร่เชื้อจากผู้ป่วยโดยผ่านยุงไปยังบุคคลอื่นต่อไป ผู้ป่วยเองไม่ได้ประโยชน์จากวัคซีนโดยตรง เพราะไม่ได้ทำให้รอดพ้นจากการป่วย แต่วัคซีนดังกล่าวจะมีประโยชน์ในแง่สาธารณสุขศาสตร์ โดยช่วยลดภาวะการแพร่เชื้อในท้องถิ่นที่ผู้ป่วยอาศัยอยู่ (altruistic vaccine)

ชนิดของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

เราอาจแบ่งวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ตามระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ที่วัคซีนมีฤทธิ์ขัดขวางได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Sporozoite vaccines

ในบรรดาวัคซีนที่ให้ภูมิคุ้มกันต่อระยะต่าง ๆ ของมาลาเรียนั้น วัคซีนต่อ sporozoite นับว่าได้รับการพัฒนาไปไกลที่สุด และเริ่มพัฒนามาก่อนวัคซีนต่อระยะอื่นใด โดยเฉพาะ sporozoite vaccines ต่อเชื้อ *P. falciparum* ถือว่าก้าวหน้าไปมาก งานวิจัยเกี่ยวกับ sporozoite vaccine ต่อ *P. vivax* มีน้อยกว่า แต่ก็ก้าวหน้าไปถึงการทดสอบความปลอดภัยและความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนขั้นต้น (Gordon *et al.*, 1990)

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนซึ่งควบคุม CS protein ของ *P. falciparum* โดยวิธี cloning และ sequencing และแยกแยะ amino acids พบว่า amino acids ที่เป็นส่วนประกอบของ CS protein มีลักษณะจำเพาะคือ ช่วงกลางประกอบด้วยส่วนซึ่งคงที่ (non-variable) เป็น tetrapeptides |$(NANP)_{37}$ $(NVDP)_4$| เรียงตัวกัน ซ้ำไปซ้ำมา และเป็นตำแหน่งที่ตั้งของ B cell epitope หลายตัว กับอย่างน้อย T cell epitope 1 ตัว ทั้งหมดถูกขนาบข้างด้วย N terminal ปลายหนึ่ง ส่วนอีกปลายหนึ่งเป็น C terminal ปลายทั้งสองมีส่วนประกอบซึ่งต่างกัน (variable) ไปในแต่ละสายพันธุ์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์แห่งกองทัพบกสหรัฐอเมริกา (Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.) ซึ่งได้ทุ่มเทเกี่ยวกับงานวิจัยด้านมาลาเรียมาเป็นเวลานาน (Webster *et al.*, 1988 b) ร่วมมือกับบริษัท Smith, Kline and Beecham ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ทดลองผลิตวัคซีนต่อ sporozoite ชนิดแรกขึ้น เรียกว่า Falciparum Sporozoite Vaccine 1 (FSV1) ซึ่งโครงสร้าง peptides ของวัคซีนดังกล่าว (Young *et al.*, 1985) คือ MDP $(NANP)_{15}$ NVDP $(NANP)_{15}$ $NVDPtet_{32}$ โดยที่ M = methionine D = aspatic acid V = valine ส่วน tet_{32} ซึ่งประกอบด้วย amino acid 32 ตัว ที่ได้จาก expression plasmid ทำหน้าที่เป็น carrier และมี aluminum hydroxide เป็น adjuvant

ทางด้านมหาวิทยาลัยนิวยอร์ค (New York University) กับบริษัท Hoffmann-La Roche ได้ทดลองผลิตวัคซีนสังเคราะห์ (synthetic peptide vaccine) ขึ้น มี $(NANP)_3$ เป็นส่วนประกอบสำคัญ โดยใช้ tetanus toxoid (TT) เป็น carrier และ aluminum hydroxide เป็น adjuvant (Herrington *et al.*, 1987)

วัคซีนทั้งสองชนิดมีความปลอดภัย สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง antibodies ในระดับสูงในสัตว์ทดลอง และได้นำไปทดลองในคนเป็นครั้งแรกในเวลาใกล้เคียงกัน

การทดลองในคน เพื่อประเมินความมีปลอดภัยและความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

1) วัคซีน FSV1 (Ballou *et al.*, 1987)

ได้ทำการศึกษาโดยสถาบัน Walter Reed ใน Washington, D.C. ใช้อาสาสมัคร 15 คน โดยฉีดเข้ากล้าม รวม 3 ครั้ง คือ ครั้งแรกกับสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 อาสาสมัครถูกแบ่งเป็นกลุ่มตามขนาดของวัคซีน คือ ขนาด 10 30 100 300 และ 800 μg ปรากฏว่า เฉพาะผู้ที่ได้รับวัคซีนขนาด 800 μg/dose เท่านั้น ที่มีระดับ antibodies สูงทัดเทียมกับระดับที่วัดได้ในผู้ที่ป่วยเป็นมาลาเรีย นอกนั้นมี antibodies ในระดับต่ำ นอกจากนี้ half-life ของ antibodies ยังค่อนข้างสั้น (28 วัน) และพบว่าการฉีดกระตุ้น ไม่ช่วยเพิ่มระดับ antibodies

อาสาสมัคร 6 ใน 15 คน ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย FSV1 dose ที่ 4 เมื่อสัปดาห์ที่ 50 หลังจากนั้นลองทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน โดยให้ยุงซึ่งมีเชื้อมาลาเรียกินเลือดเมื่อสัปดาห์ที่ 53 พบว่าระยะการฟักตัวของเชื้อมาลาเรีย (pre-patent-period) ของอาสาสมัคร 2 ใน 6 คน ยาวกว่าในอาสาสมัครกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งไม่ได้รับวัคซีน และมี 1 คน ไม่เป็นโรคมาลาเรีย

2) วัคซีน $(NANP)_3$ (Herrington *et al.*, 1987)

ได้ทำการทดลองในอาสาสมัครในเวลาใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มของ Dr. Nussenzweig แห่งมหาวิทยาลัยนิวยอร์ค วิธีการคือ ฉีดวัคซีนเข้ากล้าม 3 ครั้ง (หรือ 4 ครั้ง ในบางราย) โดยแบ่งอาสาสมัครเป็น 4 กลุ่ม ตามขนาด dose ของวัคซีน คือ 20 50 100 และ 160 μg ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับ tetanus toxoid ปริมาณเท่ากัน ผลปรากฏว่ามีเพียงอาสาสมัครที่ได้รับ dose 100 μg (5 ใน 15 คน) และ 160 μg (8 ใน 14 คน) เท่านั้น ที่วัดระดับ antibody ต่อ $(NANP)_3$ ได้ สำหรับการฉีดกระตุ้น (booster dose) ไม่ได้ช่วยเสริมให้ระดับ antibodies สูงขึ้นเสมอไป ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนในอาสาสมัครที่มีระดับ antibodies สูงสุด 3 คน โดยนำยุงซึ่งมีเชื้อมาลาเรียมากัด ปรากฏว่าอาสาสมัคร 2 ใน 3 คน มีระยะฟักตัวของโรคที่เนิ่นนานกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับวัคซีน) เล็กน้อย ส่วนอีก 1 คน ไม่เป็นมาลาเรีย

การทดลองวัคซีนทั้งสองในคนถือได้ว่าให้ผลเหมือนกัน แม้อาสาสมัครส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้าง antibodies ถึงระดับที่น่าพอใจได้ แต่ในผู้ที่มี antibodies สูงก็ดูเหมือนว่าวัคซีนทำให้ระยะการฟักตัวของโรคเนิ่นนานขึ้น หรือไม่ก็มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ในอาสาสมัคร 2 ราย

สิ่งที่นำความผิดหวังจากการทดลองวัคซีนรุ่นแรกทั้งสองชนิดในคน คือ ระดับภูมิคุ้มกันซึ่งต่ำเกินคาดในอาสาสมัครส่วนใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เราจำเป็นที่จะต้องเข้าใจเกี่ยวกับ CS protein และ recombinant proteins ของมัน ที่ใช้เป็นวัคซีนให้ดียิ่งขึ้น ข้อมูลดังกล่าวเข้าได้กับการศึกษาระดับ antibodies ต่อ sporozoite ในทหารพรานซึ่งปฏิบัติหน้าที่อยู่ตามชายแดนไทย- กัมพูชา โดยแผนกอิมมูนวิทยา AFRIMS (Webster *et al.*, 1988a) การศึกษาดังกล่าวใช้ $R32tet_{32}$ เป็น antigen พบว่าเพียง 80% ของทหารซึ่งป่วยเป็นมาลาเรียเท่านั้นที่ตรวจพบ CS antibodies ส่วนใหญ่อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ มี half-life น้อยกว่า 1 เดือน สำหรับผู้ที่เป็นมาลาเรียซ้ำอีกพบเพียง 6% ที่มีการกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ (natural boosting) การศึกษาโดยใช้ antigen ตัวเดียวกันกับชาวบ้าน ซึ่งอาศัยอยู่ใน malaria endemic area ที่จังหวัดจันทบุรี พบว่าระดับของ CS antibodies ซึ่งเกิดขึ้นในธรรมชาติและภาวะการคงระดับ (persistence) ของมันไม่สามารถป้องกันโรคมาลาเรีย (Wongsrichanalai *et al.*, 1991)

3) วัคซีน R32ToxA

เป็นวัคซีนรุ่นที่สองซึ่งสร้างขึ้นโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ โดยนำเอา R32 recombinant CS antigen ของ *P. falciparum* มาประกอบกับ Toxin A ของ *Pseudomonas aeruginosa* การทดสอบขั้นตอนในอาสาสมัคร

ชาวอเมริกันและยุโรปพบว่า มีความปลอดภัยสูงและสามารถกระตุ้น CS antibodies ได้ดีกว่า $R32tet_{32}$ ขณะนี้ (พ.ศ. 2533) กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษา ซึ่งเน้นในแง่ประสิทธิภาพ การศึกษานี้ทำในทหารพรานกลุ่มหนึ่ง ซึ่งปฏิบัติหน้าที่อยู่บริเวณชายแดนไทย- กัมพูชาและไทย- ลาว โดยความร่วมมือระหว่าง AFRIMS กับกองทัพบกไทย

การพัฒนา sporozoite vaccine กำลังดำเนินต่อไป เพื่อให้ได้มาซึ่งวัคซีนที่จะสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง antibodies ในระดับสูงขึ้น และในขณะเดียวกันก็ต้องพัฒนาประสิทธิภาพของ carrier protein และ adjuvants ด้วย

ภูมิคุ้มกันต่อ sporozoite ไม่ได้ขึ้นกับ antibodies เพียงอย่างเดียว cell mediated immunity (CMI) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งสิ้นต่อ sporozoites ด้วย T cell epitopes มีหน้าที่สำคัญในการส่งเสริมสังเคราะห์ antibodies และในการกำหนดการตอบสนองของเซล (cellular effector responses) ซึ่งอาจมีบทบาทในการคุ้มกันโรคมาลาเรีย เช่น cytotoxic T lymphocytes, CTL) บน CS protein ส่วน repeat region ซึ่งทราบแล้วว่าเป็นส่วนซึ่งคงที่ มี T cell epitope อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง T cell epitopes ส่วนใหญ่อยู่บนส่วนของโมเลกุลของ CS protein ซึ่งขนาบสองข้างของ repeat region และดังที่กล่าวแล้ว เป็นส่วนที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (Good *et al.*, 1988; Sinigaglia *et al.*, 1988) สำหรับบทบาทของพันธุกรรมในการจำกัดหรือช่วยเหลือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ CMI ต่อ CS protein ในคน ยังต้องทำการศึกษาให้ได้ข้อมูลที่เด่นชัดขึ้นต่อไปอีก

การศึกษาเกี่ยวกับ cell-mediated immunity (CMI) โดยดูผลตอบสนองของการกระตุ้นเม็ดโลหิตขาว (lymphocyte proliferation assays) ในชาวบ้านจากท้องถิ่นที่มีการแพร่เชื้อมาลาเรีย ทั้งในผู้ป่วยมาลาเรียเฉียบพลันและผู้ป่วยระยะพักฟื้นในประเทศไทย (Webster *et al.*, 1987) พบว่า การตอบสนองมีจำกัดแค่ช่วงเวลาสั้น ๆ และถูกขัดขวางในระหว่างที่มีอาการเฉียบพลัน การวิจัยดังกล่าวส่งผลสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่า T cell epitope บน CS antigen คงมีประปรายไม่คงที่ และช่วยอธิบายสาเหตุที่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในธรรมชาติและในผู้ที่ได้รับวัคซีนแล้วได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ

เมื่อเร็ว ๆ นี้ ความสนใจเกี่ยวกับบทบาทของภูมิคุ้มกันต่อ sporozoite ได้เบนไปที่ระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรีย หลังจากเข้าไปในเซลตับ ปัจจุบันเชื่อว่าเม็ดโลหิตขาว (lymphocytes) ประเภท CD8+ cells มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว โดย CD8+ cells กลุ่มที่เรียกว่า MHC class I restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) สามารถสลายเซลตับซึ่งมีเชื้อมาลาเรียอยู่โดยตรง (directlytic effect) และขณะเดียวกันยังมีหลักฐานว่า CD8+ cells สามารถถูกกระตุ้นให้หลั่ง interferon ออกมาทำลายเชื้อมาลาเรียระยะดังกล่าวเช่นกัน (Good and Miller, 1989)

งานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนา sporozoite vaccine ในปัจจุบัน จึงมุ่งที่ 4 จุดสำคัญ คือ

1. การศึกษาเพื่อค้นคว้า T cell epitope ที่จะสามารถกระตุ้น CMI อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะจุดมุ่งหมายสำคัญในขณะนี้คือ การสร้างวัคซีนต่อ sporozoite โดยหลักพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วยทั้ง B cell epitope ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันโรคมาลาเรีย และ T helper cell epitope

2. บทบาทของพันธุกรรมในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ CS protein เพราะปัจจุบันเข้าใจว่าการตอบสนองมีข้อจำกัดทางพันธุกรรม

3. กลไกในการต้านทานโรคมาลาเรียที่ไม่อาศัย antibodies เช่น บทบาทของ CTL และ interferon gamma และกลุ่มเซลซึ่งทำหน้าที่กำจัดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งรวมถึง macrophage และ neutrophil

4. บทบาทของเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญในตับ (EES) ในแง่ที่จะเป็นเป้าหมายของวัคซีน และปฏิกิริยาโต้ตอบทางภูมิคุ้มกันต่อการที่เชื้อเข้าสู่เซลตับ

2. วัคซีนต่อระยะ Asexual Blood Stage (ABS)

การป้องกันโรคมาลาเรียด้วย sporozoite vaccine นั้น แม้ว่าจะมีหลักการดี แต่ในทางปฏิบัติถ้าหากมี sporozoite เพียงตัวเดียวสามารถเล็ดลอดไปเจริญเติบโตต่อในตับได้ ก็หมายความว่า ผู้นั้นจะเป็นมาลาเรียได้ในเวลาต่อมา ดังนั้น วัคซีนต่อระยะ ABS จึงมีความสำคัญ ไม่ว่าจะทำหน้าที่โดด ๆ โดยตัวของมันเอง หรือเป็นส่วนประกอบของวัคซีน ซึ่งมีผลต่อระยะการเจริญเติบโตอื่นของมาลาเรียด้วย

แม้ว่าเราจะสามารถเลี้ยงเชื้อมาลาเรียระยะ ABS ในห้องปฏิบัติการได้ การผลิตเชื้อมาลาเรียจำนวนมากโดยปราศจากผลิตภัณฑ์ของเลือดที่ใช้เลี้ยงมัน เพื่อนำไปทำวัคซีนย่อมเป็นไปไม่ได้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นเช่นเดียวกับวัคซีนต่อระยะการเจริญเติบโตอื่นของมาลาเรีย เราจึงต้องพยายามผลิตโดยอาศัยหลักพันธุวิศวกรรมศาสตร์และอณูชีววิทยา โดยเริ่มด้วยการพยายามค้นหา antigens ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ABS antigens ที่กำลังศึกษากันอยู่ถึงความเป็นไปได้ ที่จะนำไปผลิตวัคซีน ได้แก่ โปรตีนกลุ่มที่เรียกว่า Precursors to the Major Merozoite Surface Antigens (PMMSA) (Holder and Freeman, 1981, 1984) เป็นโปรตีนที่มี relative molecular mass (Mr) สูง ถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อมาลาเรียเจริญเข้าสู่ระยะ schizogony PMMSA ปรากฏบนผิวของ merozoite และบนผิวของเม็ดโลหิตแดงที่มีเชื้อมาลาเรียระยะ ring form เจริญอยู่ สำหรับ *P. falciparum* PMMSA มี Mr ระหว่าง 180 ถึง 210 kDa ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

การทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า monoclonal antibodies ต่อ PMMSA หลายตัว สามารถขัดขวางไม่ให้ merozoite เข้าไปเจริญเติบโตในเม็ดโลหิตแดง ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีน PMMSA บริสุทธิ์หรือ peptide ของมันใน *Plasmodium* หลาย species โดยใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด ได้ผลป้องกันได้เฉพาะในสัตว์ทดลองบางส่วน และไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ antibodies กับความสามารถในการป้องกันโรค (Holder, 1988) การทดลองโดยใช้วัคซีน PMMSA ต่อ *P. falciparum* ซึ่งสร้างขึ้นโดยอาศัยหลักพันธุวิศวกรรมศาสตร์ (recombinant PMMSA fusion proteins) ในลิงพบว่า ให้ผลป้องกันเฉพาะลิงบางตัว ซึ่งเข้าได้กับผลการทดลองข้างต้น และไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ antibodies กับความรุนแรงของโรค มีเพียงการทดลองเดียว (Siddiqui *et al.*, 1987) ที่ให้ผลป้องกันมาลาเรียได้ 100% โดยทั้งนี้ใช้ PMMSA บริสุทธิ์ที่สกัดจาก merozoites มาใช้เป็นวัคซีน แต่การศึกษานี้ใช้ลิง *Aotus* เพียง 3 ตัว

Antigen ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งคือ Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) หรือ Pf155 (Kemp *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1986) ซึ่งเป็น protein ที่มี Mr 155 kDa เกาะอยู่บนผิวของเม็ดโลหิตแดง โดยเนื่องมาจาก merozoite ที่เข้าไปเจริญในเม็ดโลหิตแดง พบว่า antibodies ต่อ RESA มีคุณสมบัติในการขัดขวางการเจริญเติบโตของระยะ ABS ของ *P. falciparum in vitro* (Berzins *et al.*, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ antibodies ต่อ RESA สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานโรคมาลาเรียในชาวแอฟริกัน ซึ่งอาศัยอยู่ในท้องถิ่นที่มีมาลาเรียชุกชุม (Wahlin *et al.*, 1984)

ได้มีการทดลองในลิง *Aotus* โดยใช้โปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุลของ RESA ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ทำหน้าที่เป็นวัคซีนและเปรียบเทียบผลกัน ปรากฏว่าป้องกันโรคมาลาเรียได้เพียงในลิงบางตัว (Collins *et al.*, 1986) แม้ว่าการศึกษานี้จะพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ antibodies ต่อ Pf155/RESA กับ ความรุนแรงของโรค แต่ความสัมพันธ์ดังกล่าวแตกต่างกันไปในการศึกษาอื่น ๆ ยังหาข้อสรุปไม่ได้ ปัจจุบันจึงกำลังเป็นที่สนใจว่าวัคซีน RESA แบบสังเคราะห์ (synthetic peptides) จะสามารถป้องกันโรคมาลาเรียได้ดีเพียงใด

ยังได้มีผู้สนใจเกี่ยวกับคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ rhoptry protein ด้วย rhoptry เป็น organelle ของ merozoite ซึ่งถูกกำจัดออกไปติดอยู่ที่ผิวของเม็ดโลหิตแดง การศึกษาในลิงกระรอก *Saimiri* พบว่า rhophy antigen มีคุณสมบัติในการป้องกันโรคมาลาเรีย และเข้าใจว่าส่วนหนึ่งคงเนื่องมาจาก antibodies (Perrin *et al.*, 1984)

การทดลองประสิทธิภาพของวัคซีนต่อระยะ ABS มีเพียงการทดลองเดียว การทดลองของ Patarroyo *et al.* (1987) โดยใช้วัคซีนซึ่งมีส่วนประกอบของ peptides จาก protein ที่มี Mr ต่างกัน 2 ชนิด กับ peptides จาก PMMSA ปรากฏว่าได้ผลดีในลิง *Aotus* เมื่อนำมาทดลองในคนพบว่า ในจำนวนอาสาสมัคร 5 คนที่ได้รับวัคซีน แล้วต่อมาลองทำให้เป็นมาลาเรีย พบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียลดน้อยลงกว่าที่ควรเป็น

วัคซีนจาก CS protein อีกตัวหนึ่งซึ่ง Patarroyo *et al.* (1988) ทดลองคือ ใช้ peptide จาก PMMSA จาก RESA และจาก tetrapeptide repeat บน CS protein มาประกอบกัน ปรากฏว่าเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคมาลาเรีย ด้วยการฉีดเชื้อมาลาเรียระยะ ABS เข้าไป พบว่าระยะปรากฏอาการของโรคเนิ่นนานออกไป แต่ในที่สุดก็เป็นมาลาเรีย

เรามีความรู้เกี่ยวกับบทบาทของ CMI ต่อมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดโลหิตแดงค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการตอบสนองเมื่อถูกกระตุ้น เราทราบว่า CMI แบบ non-specific มีความสำคัญ ส่วนบทบาทเสริมจาก phagocytosis ยังมีข้อสนับสนุนไม่เพียงพอ ความผิดปกติของ CMI นั้น ได้มีการบันทึกไว้ชัดเจนกว่า เช่น immunosuppression ความผิดปกติของ immunoregulation หรือการผลิตสาร cytokine เช่น TNF มากเกินความต้องการ (Ho and Webster, 1989) การพัฒนาวัคซีนต่อมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดโลหิตแดง จึงจำเป็นต้องประกอบด้วยไม่เพียงการค้นหา เพื่อบ่งชี้ถึง epitope ที่สามารถตอบโต้เมื่อถูกกระตุ้น และให้ภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่านั้น แต่จำเป็นที่จะต้องหลีกเลี่ยงการที่ระบบภูมิคุ้มกันมีสภาพอ่อนแอหรือทำงานมากผิดปกติ อันเนื่องจากผลกระตุ้นของ antigen จากเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าห่วงอย่างยิ่งว่า วัคซีนต่อระยะการเจริญเติบโตในเม็ดโลหิตแดง จะก่อให้เกิดผลร้ายไปกดดันต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดภาวะเหมาะกับการแปรเปลี่ยนสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็ว ในกลุ่มผู้ที่ได้รับวัคซีน

3. Transmission Blocking Vaccines

ได้มีการสร้าง monoclonal antibodies ต่อโปรตีนบนผิวของ gamete zygotes และ ookinete เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการขัดขวาง การแพร่เชื้อมาลาเรีย สำหรับ *P. falciparum* นั้น antigen บนผิวของ gamete และ zygote เป็นเป้าหมายสำคัญของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน (Vermeulen *et al.*, 1986) ได้แก่ โปรตีนซึ่งมี Mr 230 kda 48 kDa และ 45 kDa

การทดลองในหนูโดยใช้โปรตีนบริสุทธิ์จาก gamete ของ *Plasmodium yoelii* ทำหน้าที่เป็นวัคซีนพบว่า ได้ผลดีในการขัดขวางการแพร่พันธุ์ เพราะจำนวน oocyst ลดลงเกือบ 100% (Harte *et al.*, 1985a) นอกจากนี้คณะผู้ทดลองยังได้พิสูจน์ต่อไปอีกว่า CMI มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อระยะ sexual stages ของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้โดยฉีด T cells จากม้ามของหนูที่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคมาลาเรีย เข้าไปในหนูที่ปราศจากภูมิคุ้มกัน พบว่าสามารถขัดขวางการแพร่เชื้อมาลาเรียสู่ยุงโดยไม่อาศัย antibodies (Harte *et al.*, 1985b)

บทสรุป

ช่วงเวลาที่ผ่านมา ได้มีนานาทัศนะเกี่ยวกับความสำเร็จในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย บ้างก็มองว่าน่าจะเป็นไปได้ บ้างก็เชื่อว่าเป็นความหวังซึ่งไม่อาจเป็นจริง บ้างก็มองด้วยความผิดหวัง และสำหรับปัจจุบัน (หวังว่า) คงเป็นการมองด้วยความทรงจำอันเศร้า เกี่ยวกับผลการทดลองวัคซีนในคนเมื่อเร็ว ๆ นี้ การทดลองวัคซีนดังกล่าวไม่เพียงแต่แสดงถึงความก้าวหน้าทางปัญญา แต่ถือเป็นความเร่งด่วนในเชิงปฏิบัติด้วย แน่นอนที่สุด วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องทำให้สำเร็จในเร็ววันนี้ สถานการณ์โรคมาลาเรียในประเทศไทย เป็นตัวอย่างอันดีของความจำเป็น ที่จะต้องมีวัคซีนอย่างเร่งด่วน และอาจจะมากกว่าที่อื่นใดในโลกด้วย แม้การควบคุมมาลาเรียในประเทศไทยจะพัฒนาไปอย่างดีและประสบผลสำเร็จเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็ยังมีหลายท้องที่ในประเทศไทยที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

ซึ่งดื้อต่อยาหลาย ๆ ชนิด (multi-drug resistant หรือ MDR) ยารักษาโรคมาลาเรียชนิดใหม่ ๆ เช่น mefloquine และ halofantrine กำลังประสบความล้มเหลวในการรักษาโรคมาลาเรียชนิด MDR *P. falciparum* มากขึ้นทุกวัน (Wongsrichanalai *et al.*, manuscript in preparation) จึงจำเป็นที่จะต้องหาทางเลือกวิธีอื่น แต่ปัจจุบันยาใหม่ ๆ แม้แต่พวกที่ยังอยู่ในระหว่างพัฒนา ก็มีเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้น ภายในทศวรรษหน้าเราอาจไม่สามารถรักษาโรคมาลาเรียแบบ MDR โดยใช้ยาชนิดเดียว (single drug) ได้เลย ที่กล่าวมานี้ถือเป็นการคาดการณ์ที่ต่ำไปด้วยซ้ำ เมื่อคำนึงถึงความจำเป็นของงานวิจัยเพื่อพัฒนายาใหม่ และวัคซีนสำหรับโรคมาลาเรีย ตลอดจนการหามาตรการควบคุมโรคด้วยวิธีอื่น ซึ่งมุ่งที่ยุงพาหะ

อุปสรรคสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียปัจจุบันคือ การที่เราขาดความรู้พื้นฐาน เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันวิทยาของโรคมาลาเรียในคน มนุษย์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดโลหิตได้ แต่ขบวนการตอบสนองโดยละเอียด ที่ทำให้ร่างกายมนุษย์สามารถต้านต่อเชื้อมาลาเรียและพิษของโรคยังไม่เป็นที่เด่นชัด ความรู้ดังกล่าวจะช่วยบ่งชี้ถึงส่วนที่เป็น antigen บนตัวเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมี epitope ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ และเป็นเป้าหมายของการตอบสนองทั้งโดย antibodies และ CMI ของร่างกายมนุษย์ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องทราบ เพื่อสามารถสร้างวัคซีนที่เหมาะสม

การทดลองที่พบว่า sporozoites ซึ่งทำให้อ่อนกำลังโดยการฉายรังสี สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพได้ มีความสำคัญยิ่ง เพราะเป็นรากฐานของความเป็นไปได้ที่จะได้มาซึ่งวัคซีน และเป็นแบบฉบับของงานวิจัยทางห้องปฏิบัติการซึ่งมุ่งศึกษาเกี่ยวกับการค้นหา antigen ที่มีคุณสมบัติป้องกันโรคจากตัว sporozoite ดังที่ได้กล่าวแล้วว่างานส่วนใหญ่ที่ทำไปแล้ว เป็นความพยายามในการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ sporozoite ของ *P. falciparum* ทั้ง ๆ ที่ได้มีการทดลองวัคซีนหลายการทดลอง โดยใช้วัคซีนหลายชนิด เราก็ยังไม่ทราบแน่นอนว่า CS protein มี antigen ซึ่งกระตุ้นให้เกิดของภูมิคุ้มกันอันเนื่องจาก antibodies หรือ CMI หรือทั้งสองอย่าง ในขณะที่งานวิจัยเกี่ยวกับ CS protein เพื่อการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ sporozoite ดำเนินต่อไป ความพยายามด้านอื่น ๆ ก็ดำเนินร่วมไปเช่นกัน เพื่อศึกษาว่ายังมี antigen ตัวอื่นบนผิวของ sporozoite ที่มีประโยชน์ในการป้องกันโรค เมื่อ sporozoite ถูกปล่อยจากยุงสู่กระแสโลหิต หรือว่ามี antigen ที่เป็นเป้าหมายสำคัญตัวอื่น ซึ่งพัฒนาขึ้นมาในระหว่างที่ sporozoite เจริญเข้าสู่ระยะต่อไปในเซลตับของคนหรือไม่

นอกจากการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ sporozoite แล้ว ยังมีกลุ่มผู้วิจัยหลายกลุ่มกำลังศึกษาเกี่ยวกับวัคซีนต่อระยะ ABS และระยะ sexual stage ในที่สุดอาจจะเป็นไปได้ ที่วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่ได้ผล จะประกอบด้วยส่วนย่อยซึ่งมีผลต่อทุก ๆ ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในคน นอกจากนี้ยังอาจประกอบด้วยส่วนย่อยมากกว่าหนึ่งชนิดจากแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย วัคซีนซึ่งประกอบด้วยหลาย ๆ ส่วนประกอบย่อย มีเป้าหมายต่อระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต อาจจะมีศักยภาพที่สูงขึ้นในการป้องกันโรคในผู้ได้รับวัคซีน และยังอาจต้านทานความสามารถของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมุ่งรุกรานร่างกายของเราได้ดีกว่าด้วย

หนทางของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียนั้น ซับซ้อนและท้าทายอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้นค่าใช้จ่ายยังสูงมากด้วย เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพอันสูงของอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) และเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัย ดูเหมือนว่าคงมีเพียงแต่ประเทศที่พัฒนาแล้ว และสถาบันในประเทศดังกล่าวเท่านั้น ที่จะมีขีดความสามารถเพียงพอที่จะรองรับภาระในการพัฒนาวัคซีนได้ (Webster, 1989) ที่จริงแล้วแม้ว่าเราจะหา antigen ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ค่าใช้จ่ายในการเริ่มผลิตวัคซีนก็ยังสูงมาก ขณะเดียวกันในปัจจุบัน ประเทศอุตสาหกรรมเองก็ไม่ได้ตระหนักถึงความจำเป็นเร่งด่วนของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ทั้งนี้เพราะนอกจากนักท่องเที่ยวและกองทหารแล้ว ประเทศเหล่านั้นก็ไม่ได้ประสบกับปัญหาโรคมาลาเรียโดยตรง ประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย ซึ่งมีปัญหาโรคมาลาเรีย ก็ขาดแคลนซึ่งปัจจัยที่ต้องพึ่งเทคโนโลยีระดับสูง เพื่อกระตุ้นและคงไว้ซึ่งความพยายามที่จะได้มาซึ่งวัคซีน อย่างไรก็ตาม ประเทศที่กำลังพัฒนาก็มีพร้อมด้วยปัจจัยสำคัญ และมีลักษณะจำเพาะอย่างอื่น เช่น มีโรคมาลาเรีย มีความสนใจระดับชาติ และความเชี่ยวชาญในงานควบคุมโรคมาลาเรีย และที่สำคัญยิ่งกว่านั้นคือ การที่มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์และแพทย์ ซึ่งมีความกระตือรือล้นพร้อมที่จะทุ่มเทพลังความสามารถเพื่อการนี้ เมื่อนำปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มารวมกัน และประกอบกับความสามารถในการทำ

วิจัยต่าง ๆ ที่มีอยู่แล้วในประเทศอุตสาหกรรม ก็จะเป็นจุดเริ่มต้นของความร่วมมือ เพื่องานวิจัยซึ่งมุ่งเน้นความเข้าใจเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันวิทยาของโรคมาลาเรีย อันจะนำไปสู่การค้นหาและพัฒนาวัคซีน อย่างมีหลักเกณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้เขียนขอขอบคุณ แพทย์หญิง คัชรินทร์ณี ภวนันท์ และ ดร.สาธิต พิชญางกูร ที่ได้กรุณาอ่าน วิจารณ์และให้คำแนะนำในการปรับปรุงต้นฉบับ

REFERENCES

Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, Gordon DM, Schneider I, Wirtz, RA, Young JF, Wasserman GF, Reeve P, Diggs CL, and Chulay JD. 1987. Safety and efficacy of recombinant DNA *P. falciparum* sporozoite vaccine. Lancet i: 1277-1282.

Berzins K, Perlmann H, Wahlin B, Carlsson J, Wahlgren M, Udomsangpetch R, Bjorkman A, Patarroyo ME, and Perlmann P. 1986. Rabbit and human antibodies to a repeated amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen, Pf155, react with the native protein and inhibit merozoite invation. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1065-1069.

Boudreau EF, Webster HK, Pavanand K, and Thosinha L. 1982. Type II mefloquine resistance in Thailand. Lancet ii: 1335.

Clyde DF, Most H, McCarthy V, and Vanderberg JP. 1973. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. Am J Med Sci 266: 169-177.

Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, and Woodward WE. 1975. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. Am J Trop Med Hyg 24: 397-401.

Cohen S, McGregor IA, and Carrington S. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192: 733.

Collins WE, Anders RF, Pappaioanou M, Campbell GH, Brown GV, Kemp DJ, Coppel RL, Skinner JC, Andrysiak PM, Favaloro JM, Corcoran LM, Broderson JR, Mitchell GF, and Campbell CC. 1986. Immunization of *Aotus* monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. Nature 322: 259-262.

Good MF, Berzofsky JA, and Miller LH. 1988. The T cell response to the malaria circumsporozoite protein: an immunological approach to vaccine development. Annu Rev Immunol 6: 663-688.

Good MF and Miller LH. 1989. Involvement of T cells in malaria immunity: implications for vaccine development. Vaccine 7: 3-9.

Gordon DM, Cosgriff TM, Schneider I, Wasserman GF, Majarian WR, Hollingdale MR, and Chulay JD. 1990. Safety and immunogenicity of a *Plasmodium vivax* sporozoite vaccine. Am J Trop Med Hyg 42: 527-531.

Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, and Nussenzweig RS. 1979. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. Bull WHO 57 (suppl. 1): 165-173.

Harinasuta T, Migasen S, and Bannag D. 1962. Chloroquine resistance in *P. falciparum* in Thailand. UNESCO First Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites, University of Singapore, 5-9 November 1962: University of Singapore: 148-153.

Harte PG, Rogers N, and Targett GAT. 1985a. Vaccination with purified microgamete antigens prevents transmission of rodent malaria. Nature 316: 258-259.

Harte PG, Rogers N, and Targett GAT. 1985b. Role of T cells in preventing transmission of rodent malaria. Immunology 56: 1-7.

Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Baqar S, Felix AM, Heimer EP, Gillessen D, Nardin E, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Hollingdale M, and Levine MM. 1987. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *P. falciparum* sporozoites. Nature 328: 257-259.

Ho M and Webster HK. 1989. Immunology of human malaria. A cellular perspective. Parasite Immunol 11: 105-116.

Holder AA. 1988. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. In: Progress in Allergy. P Perlmann and H Wigzell (eds). S Karger, Basel. pp 41-72.

Holder AA and Freeman RR. 1981. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. Nature 294: 361-364.

Holder AA and Freeman RR. 1984. The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high-molecular-weight precursor. J Exp Med 160: 624-629.

Kemp DJ, Coppel RL, Cowman AF, Saint RB, Brown GV, and Anders RF. 1983. Expression of *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in *Escherichia coli:* Detection with antibodies from immune humans. Proc Natl Acad Aci USA 1983; 80:3787-3791.

Mendis KN, Munesinghe YD, de Silva YNY, Keragalla I, and Carter R. 1987. Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. Infection and Immunity, 55: 369-372.

Meuwissen JHET, Ponnudurai T, Vermeulen AN, and Smits M. 1985. Studies on the development of a *P. falciparum* malaria vaccine for the induction of transmission blocking immunity. In: Proceedings of the Asia and Pacific Conference on Malaria, Siddiqui, WA (editor), Hawaii: University of Hawaii, pp 133-142.

Miller LH, Howard RJ, Carter R, Good MF, Nussenzweig V, and Nussenzweig RS. 1986. Research toward Malaria vaccines. Science 1, 234: 1349-1356.

Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA, and Bryan JH. 1979. Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. Science 206: 597-599.

Nussenzweig RS, Vanderberg I, Most H, and Orton C. 1967. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei.* Nature 216: 160-162.

Nussenzweig V and Nussenzweig RS. 1985. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. Cell 42: 401-403.

Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Cavijo P, Moreno A, Martinez A, Rodriguez R, Guzman F, and Cabezas E. 1987. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Nature 328: 629-632.

Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, Tascon R, Franco A, Murillo LA, Ponton G. *et al.* 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood-stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 332: 158-161.

Perrin LH, Merkli B, Loche L, Chizzolini C, Smart J, and Richie R. 1984. Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. J Exp Med 160: 441.

Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, and Nussenzweig V. 1980. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection. J Exp Med 151: 1504-1513.

Rieckmann KH, Beaudoin RL, Cassells JS, and Sell KW. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. Bull WHO 57 (supp. 1): 261-265.

Siddiqui WA, Tam LO, Kramer KJ, Hui GSN, Case SE, Yamaga KM, Chang SP, Chan EBT, and Kan SC. 1987. Merozoite surface coat precuresor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. Proc Natl Acad Sci USA 84: 3014-3018.

Sinigaglia F, Guttinger M, Kilgus J, Doran DM, Matile H, Etlinger H, Trzeciak A, Gillessen D, and Pink JR. 1988. A malaria T cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. Nature 336: 778-780.

Vanderberg J, Nussenzweig R, and Most H. 1969. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. *In vitro* effects of immune serum on sporozoites. Mil Med 134: 1183-1190.

Vermeulen AN, van Deursen J, Brakenhoff RH, Lensen THW, Ponnudurai T, and Meuwissen JHET. 1986. Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronized gametocyte cultures. Mol Biochem Parasitol 20: 155-163.

Wahlin B, Wahlgren M, Perlmann H, Berzins K, Bjørkman A, Patarroyo ME, and Perlmann P. 1984. Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. Proc Natl Acad Sci USA 81: 7921-7926.

Webster HK, Ho M, Looareesuwan S, Pavanand K, Wattanagoon Y, Warrell DA, and Hockmeyer WT. 1987. Lymphocyte responsiveness to a candidate malaria sporozoite vaccine ($R32tet_{32}$) of individuals with naturally acquired *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 38: 37-41.

Webster HK, Brown AE, Chuenchitra C, Permpanich B, and Pipithkul J. 1988a. Characterization of antibodies of sporozoites in *Plasmodium falciparum* malaria and correlation with protection. J Clin Microbiol 26: 923-927.

Webster HK, Diggs CL, Ballou WR, and Chulay JD. 1988b. Vaccines for human malaria: epidemiological and immunological perspectives. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 19: 375-389.

Webster HK. 1989. Malaria vaccines: overview and perspective for developing countries. Asian Pac J of Aller and Immunol 7: 77-78.

Wongsrichanalai C, Webster HK, Permpanich B, Chuanak N, and Ketrangsri S. 1991. Naturally acquired circumsporozoite antibodies and their role in protection in endemic falciparum and vivax malaria. Am J Trop Med Hyg *(in press)*.

Wongsrichanalai C, Webster HK, Wimonwattrawatee T, Sookto P Chuanak N, Wenrnsdorfer WHO and, Thimarsarn K. An emergence of reduction in *P. falciparum* sensitivity to mefloquine in Thailand: evidence based on *in vitro* microtests. *(manuscript in preparation)*.

World Health Organization. 1990. World Malaria Situation. Wkly Epidem Rec No. 25 (22 June): 189.

Young JF, Hockmeyer WT, Gross M, Ballou WR, Wirtz RA, Trosper JH, Beaudoin RL, Hollingdale MR, Miller LH, Diggs CL, and Rosenberg M. 1985. Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria.