หลักการประยุกต์ใช้แลคโตบาซิลลัสเป็นพาหะนำส่งวัคซีน

Conceptual application of Lactobacillus spp. as vaccine delivery vehicle

มารุตพงศ์ ปัญญา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Marutpong Panya
College of Medicine and Public Health, UbonRatchathani University
Correspondence author: marutpong.p@ubu.ac.th
(Received: March 17, 2019; Revised: April 23, 2019; Accepted: April, 30 2019)

บทคัดย่อ

แลคโตบาซิลลัส เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง สามารถคัดแยกได้จากอาหาร เครื่องดื่ม ระบบทางทางเดินอาหาร และบริเวณช่องคลอดของคนและสัตว์ แลคโตบาซิลลัสหลายสปีชีส์มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้เป็นพาหะนำส่งแอนติเจนจากแบคทีเรีย ไวรัส รา และโปรโตซัว เพื่อใช้เป็นวัคซีนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ตำแหน่งแอนติเจนจากเซลล์แลคโตบาซิลลัส และปริมาณแอนติเจนที่ถูกสร้างจากเซลล์แลคโตบาซิลลัส บทความปริทัศน์นี้จะกล่าวถึงหลักการพัฒนาใช้แลคโตบาซิลลัสเป็นพาหะนำส่งแอนติเจน ซึ่งนับว่าเป็นอีกหนึ่งกลยุทธ์สำหรับการพัฒนาวัคซีนชนิดรับประทานในอนาคต

คำสำคัญ : แลคโตบาซิลลัส โพรไบโอติก วัคซีน วัคซีนชนิดรับประทาน

Abstract

Lactobacillus spp. are gram positive bacilli that have been isolated from foods, beverages, gastrointestinal tract and vargina of human and animals. Many species have been verified to carry probiotic properties that can be used in human. Currently, they are of interest in using Lactobacillus spp. as antigen delivery vehicle for carrying the antigens derived from bacteria, viruses, fungi and protozoa for immunization. The factors affecting the immunization efficacy including antigen locations and quantity of produced antigens in lactobacilli cell. This shot review will inform the reader about the concept of the development of Lactobacillus spp. as antigen delivery vector as alternative strategies for oral vaccine development in the near future.

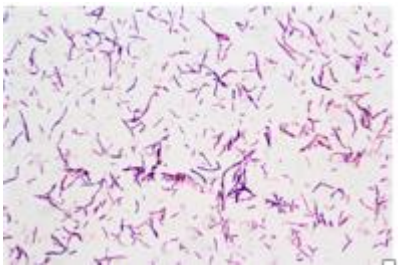
Keywords: Lactobacillus, Probiotic, vaccine, oral vaccine

1. หลักการพัฒนาวัคซีน

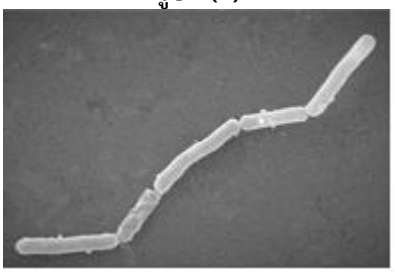
การให้วัคซีน หรือ vaccination ถือเป็นวิธีการป้องกันโรคติดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด หลักการของการให้วัคซีน คือ กระตุ้นให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะและสามารถป้องกันการติดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการให้วัคซีนแบบฉีด (parenteral vaccine) กับวัคซีนแบบรับประทาน (oral vaccine) พบว่าวัคซีนแบบรับประทานมีข้อดี คือ เป็นวัคซีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทั้งในกระแสเลือดและภูมิคุ้มกันในบริเวณเยื่อบุเมือก (mucosal immunity) ซึ่งเป็นบริเวณทางเข้าของเชื้อก่อโรคหลายชนิด ในขณะที่วัคซีนแบบฉีดจะไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในบริเวณเยื่อบุเมือกได้[1] ปัจจุบันการผลิตวัคซีนแบบรับประทาน มีหลักการ คือ การทำให้เชื้อก่อโรคมีฤทธิ์อ่อนแอลงจนไม่สามารถก่อโรคได้ แต่ยังคงคุณสมบัติของอิมมิวโนเจน (immunogen) ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เรียกวัคซีนแบบนี้ว่า วัคซีนชนิดอ่อนแรง (attenuated vaccine) ตัวอย่างวัคซีนชนิดที่ประสบผลสำเร็จและใช้กับคนมาจนถึงปัจจุบัน เช่น Mycobacterium bovis (BCG)[2] เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาใช้แบคทีเรียก่อโรคชนิดอ่อนแรงมาเป็นพาหะนำส่งแอนติเจนไปยังตำแหน่งเป้าหมายเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้แบคทีเรียก่อโรคสามารถเกาะติดกับผิวเซลล์ร่างกายคนได้ดี ได้แก่ แบคทีเรีย Salmonella Typhimurium และ Vibrio cholerae อย่างไรก็ตาม การใช้วัคซีนชนิดอ่อนแรงยังคงมีข้อจำกัดการใช้ในกลุ่มประชากรที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น เด็กทารก คนชรา และคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น ทั้งนี้ เชื้ออาจกลับมาก่อโรคได้ ดังนั้น จึงต้องมีการพัฒนาหาพาหะนำส่งวัคซีนชนิดใหม่ (vaccine delivery vehicle) ซึ่งแบคทีเรียที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก หรือ lactic acid bacteria (LAB) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสกุลแลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus spp.)

2. คุณสมบัติทั่วไปของแลคโตบาซิลลัส

แลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus, L.) เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง (Gram positive bacilli) (รูปที่ 1) การเรียงเซลล์มีทั้งเดี่ยวและเรียงต่อกันเป็นสายยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ แลคโตบาซิลลัสจัดอยู่ในวงศ์ Firmicutes คลาส Bacilli ออร์เดอร์ Lactobacillales แฟมิลี Lactobacillaceae ปัจจุบันมีสมาชิกมากกว่า 152 สปีชีส์ และ 17 สับสปีชีส์ แลคโตบาซิลลัสอาศัยอยู่ตามสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ น้ำนม อาหารหมักพื้นเมือง (ปลาร้า ปลาส้ม ปลาจ่อม แหนม และหม่ำ) ผักและผลไม้ ระบบทางเดินอาหาร และบริเวณช่องคลอดของคนและสัตว์ [3] แลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์ถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นสายพันธุ์โพรไบโอติก (probiotic) ซึ่งหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต หากคนได้รับประทานในปริมาณที่เหมาะสมก็จะเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย โดยแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคน สปีชีส์ของแลคโตบาซิลลัสที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ L. acidophilus L. bulgaricus L. casei L. plantarum และ L. rhamnosus [4]



รูป 1(ก)



รูป 1(ข)

รูปที่ 1 รูปร่างและการจัดเรียงเซลล์แบคทีเรีย L. gasseri HY02 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา 1(ก) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 1(ข) (รูปถ่ายโดยผู้เขียน)

จากการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ ในสัตว์ทดลอง และการประยุกต์ใช้ในคน พบว่า แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสมีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีหลายประการ ได้แก่ ช่วยสร้างเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด ลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ ปรับสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ตัวอย่างความสำเร็จในการประยุกต์ใช้แลคโตบาซิลลัสในคน เช่น เด็กที่ได้รับโพรไบโอติก L. rhamnosus GG ลดการเกิดโรคผื่นภูมิแพ้ได้ [5] การใช้แลคโตบาซิลลัสเพื่อลดการอักเสบและช่วยรักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Crohn's disease) [6] และการใช้แลค

โตบาซิลลัสเพื่อรักษาผู้ป่วยเด็กท้องเสียจากการติดเชื้อไวรัสโรต้า [7] จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้ว่าแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสมีความปลอดภัยและมีประโยชน์กับคน เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในคนได้

3. หลักการคัดเลือกแลคโตบาซิลลัสเพื่อเป็นพาหะนำส่งวัคซีน

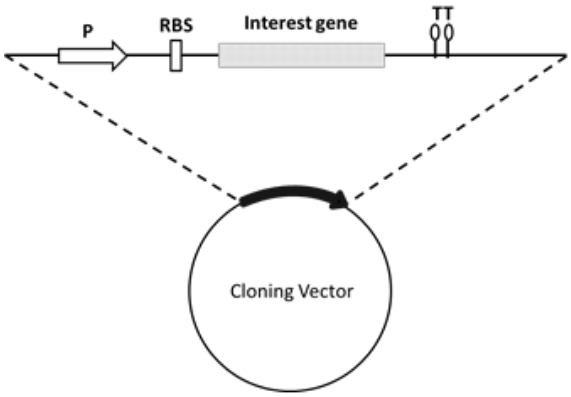
การคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับนำมาใช้เป็นพาหะนำส่งวัคซีนนั้น ถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก ทั้งนี้แลคโตบาซิลลัสต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ 1) ต้องไม่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค 2) ทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อน้ำดีและความเป็นด่างในบริเวณลำไส้และเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร [8] 3) สามารถเกาะติดกับผิวเซลล์ลำไส้ได้ [9] 4) ไวต่อยาปฏิชีวนะ [10] และ 5) สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค [9] ทั้งนี้เชื้อที่จะนำมาให้เป็นพาหะนำส่งวัคซีนต้องมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตและเพียงพอสำหรับก่อประโยชน์ในร่างกาย นอกจากนี้ สมบัติอื่นที่ใช้ทดสอบเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์โพรไบโอติก คือ การทดสอบการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน โดยวิธีการขั้นต้นเพื่อคัดกรองเชื้อที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก คือ การทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และเมื่อได้เชื้อที่มีแนวโน้มจะเป็นสายพันธุ์โพรไบโอติกที่ดี จึงนำไปทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และระดับคลินิก (clinical trial) ต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบในระดับหลอดทดลองอาจไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบในระดับสัตว์ทดลองและในคน ทั้งนี้สภาวะแวดล้อมจำลองกับสภาวะแท้จริงในร่างกายคนมีความแตกต่างกัน

ภายหลังการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยเทคนิคที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ คือ การจำแนกเชื้อด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล เทคนิคที่นิยมใช้เพื่อจำแนกสปีชีส์แลคโตบาซิลลัส คือ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) และ nucleotide sequencing [11] มีหลักการ คือ การเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายอย่างจำเพาะ โดยยีนเป้าหมายที่ใช้เพื่อจำแนกเชื้อ คือ ยีนสำหรับการสร้าง ribosomal RNA (rRNA) ได้แก่ ยีน 16S rRNA [12] ยีน 23S rRNA และ บริเวณที่เป็น 16S-23S intergenic spacer region (ISR) [13] โดยภายหลังการทำ PCR มักจะใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย เช่น 1) DNA sequencing คือ การหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถูกเพิ่มจำนวน และ 2) Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) คือ การย่อยดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) [14] นอกจากนี้ ยังมีเทคนิคอื่น ได้แก่ เทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD) [15] และเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [16] ดังนั้น นอกเหนือคุณสมบัติโพรไบโอติก สิ่งหนึ่งที่มีความจำเป็นคือการจำแนกเชื้อที่แม่นยำ ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในคนต่อไป

4. ระบบความคุมการสร้างแอนติเจนในแลคโตบาซิลลัส

ภายหลังจากการคัดเลือกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสที่คุณสมบัติโพรไบโอติกสำหรับนำไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตแอนติเจน (antigen) จากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และโปรโตซัว ขั้นตอนต่อไปในการพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้แลคโตบาซิลลัสนำส่งวัคซีนนั้น ต้องออกแบบระบบควบคุมการสร้างแอนติเจนในเซลล์แลคโตบาซิลลัส โดยหลักการแสดงออกของยีนในแลคโตบาซิลลัส ถูกควบคุมด้วย 2 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการทรานสคริปชั่น (transcription) และกระบวนการทรานสเลชั่น (translation) ในกระบวนการทรานสคริปชั่นเป็นกระบวนการเปลี่ยนสายดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ให้ได้สาย messenger RNA หรือ เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอนี้จะมีรหัสที่เรียกว่าโคดอน (codon) ซึ่งจะนำเข้าสู่กระบวนการ ทรานสเลชั่นเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนเรียงต่อกันเป็นสายยาวเรียกว่าโพลีเพปไทด์ (polypeptide) โดยในกระบวนการทรานสเลชั่นจะเป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง transfer RNA หรือ ทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) และไรโบโซม

การสร้างเชื้อดัดแปลงเชื้อแลคโตบาซิลลัสให้ควบคุมการสร้างแอนติเจนตามต้องการนั้น ต้องอาศัยเทนคนิคการออกแบบระบบควบคุมการแสดงออกของยีนให้เหมาะสมกับเชื้อแลคโตบาซิลลัสเจ้าบ้าน โดยระบบดังกล่าวนี้จะถูกโคลน (cloning) ไว้ในโคลนนิ่งเวคเตอร์ โดยองค์ประกอบของระบบควบคุมการแสดงออกของยีน ได้แก่ โปรโมเตอร์ (promoter, P) ตำแหน่งจับสำหรับไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) ยีนที่สนใจ (interest gene) และ transcriptional terminator (TT) ตามลำดับ โดยองค์ประกอบเหล่านี้จะนำมาต่อเรียงกัน เรียกว่า gene cassette (รูปที่ 2) (3) ในบทความปริทัศน์นี้จะกล่าวถึงคุณสมบัติของโปรโมเตอร์และระบบความคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญ



รูปที่ 2 ระบบควบคุมการแสดงออกของยีนบนโคลนนิ่งเวกเตอร์ในเชื้อแลคโตบาซิลลัส ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (promoter, P) ตำแหน่งจับกับไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) ยีนที่สนใจ (interest gene) และ transcriptional terminator (TT) หัวลูกศรแสดงทิศทางการแสดงออกของยีน [3]

โปรโมเตอร์ คือ ตำแหน่งดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการควบคุมการแสดงออกของยีน ได้แก่ constitutive promoter และ inducible promoter โดยคุณสมบัติของ constitutive promoter คือ สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่ต้องอาศัยตัวเหนี่ยวนำ (inducer) การทำงานของโปรโมเตอร์ชนิดนี้จะเป็นไปตามกลไกการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย ปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ในระบบนี้จะมีอยู่แล้วภายในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ดังนั้น หากเราใช้โปรโมเตอร์ชนิดนี้ ง่ายต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนและช่วยลดค่าใช้จ่ายตลอดจน แต่พบข้อด้อย คือ ไม่สามารถควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาจำเพาะตามที่ต้องการ และปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นพบในระดับต่ำ (low yield) ตัวอย่างโปรโมเตอร์ชนิด constitutive promoter ได้แก่ โปรโมเตอร์ L-lactate dehydrogenase (ldh) จากเชื้อ L. plantarum [17] โปรโมเตอร์ Surface layer protein (slp) จากเชื้อ L. acidophilus [18] และโปรโมเตอร์ P32 promoter จากเชื้อ L .casei [19] ซึ่งประสบผลสำเร็จในการควบคุมการสร้างแอนิเจนในเซลล์แลคโตบาซิลลัส เช่น การใช้โปรโมเตอร์ slp ควบคุมสร้างแอนติเจนจากไวรัสเอชไอวีในเซลล์ L. acidophilus [18] เป็นต้น สำหรับโปรโมเตอร์ชนิด Inducible promoter ซึ่งก็คือ โปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาศัยตัวเหนี่ยวนำ การแสดงออกของยีนในระบบนี้จะมีความจำเพาะสูงกับตัวเหนี่ยวนำ ทำให้ยีนมีการแสดงออกในช่วงเวลาที่ต้องการและได้ปริมาณของแอนติเจนสูง ตัวอย่าง inducible promoter ได้แก่ nisin-controlled gene expression system (NICE) [20] และ bacteriocin promoter-based expression system [21] ซึ่งประสบผลสำเร็จในการควบคุมการสร้างแอนติเจนจากแบคทีเรียและไวรัส ตัวอย่างเช่น การใช้ระบบ NICE เพื่อควบการสร้างแอนติเจนชนิด Viral protein 60 ของ Norwalk virus ใน L. casei [22] และควบคุมการสร้างแอนติเจน C subunit of tetanus toxin ของ Clostridium tetani ใน L. plantarum NCIMB8826 [23] เป็นต้น

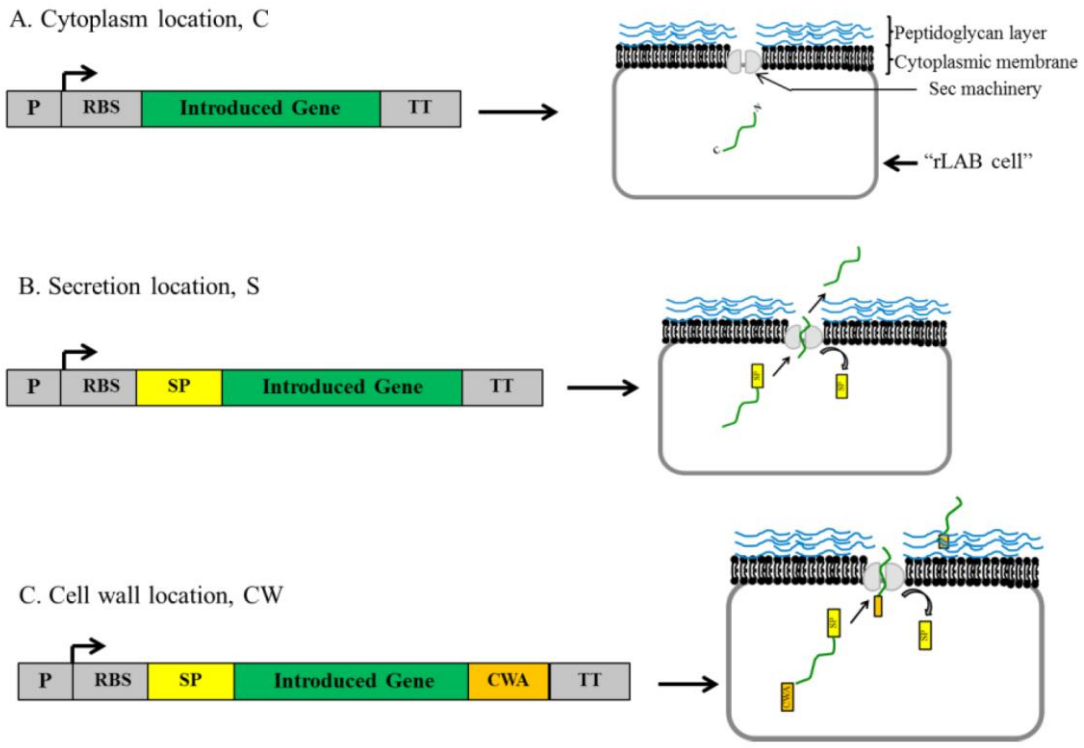
5. แลคโตบาซิลลัสที่สร้างแอนติเจนกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันมีรายงานการสร้างเชื้อแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ดัดแปลง หรือ recombinant lactobacilli ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส รา และโปรโตซัว (ตารางที่ 1) โดยตำแหน่งของแอนติเจนที่ถูกสร้างในเชื้อแลคโตบาซิลลัส พบว่า มี 3 ตำแหน่ง คือ ผนังเซลล์ (cell wall, CW) ไซโทพลาซึม (cytoplasm, C) และตำแหน่งหลั่งออกนอกเซลล์แลคโตบาซิลลัส (Secretion, S) (รูปที่ 3) โดยเหตุผลที่สร้างแลคโตบาซิลลัสให้แสดงออกแอนติเจนใน 3 ตำแหน่งของเซลล์เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ตำแหน่งของแอนติเจนมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยหากมีการสร้างแอนติเจนให้อยู่ภายในเซลล์แลคโตบาซิลลัส คือ บริเวณไซโทพลาซึมเซลล์แบคทีเรีย พบว่าในตำแหน่งนี้แอนติเจนจะไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร แต่มีข้อด้อย คือ แอนติเจนจะสัมผัสกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ก็ต่อเมื่อเซลล์แลคโตบาซิลลัสถูกทำลายหรือแตกสลาย ในขณะที่แอนติเจนในผนังเซลล์และหลั่งออกนอกเซลล์แลคโตบาซิลลัส จะสามารถสัมผัสกับแอนติเจนได้โดยตรงแต่ก็ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 1 เชื้อแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ดัดแปลงที่สร้างแอนติเจน

แลคโตบาซิลลัส	แอนติเจน/เชื้อก่อโรค	ตำแหน่งแอนติเจน	อ้างอิง
Lactobacillus casei	VP2/Porcine Parvovirus (PPV)	CW	(24)
	E7/ human papillomavirus (HPV)	CW	(25)
	L2 / human papillomavirus (HPV)	CW	(26)
	Spike (S) protein/ Transmissible gastroenteritis coronavirus virus (TGEV)	S	(27)
	VP60/Norwalk virus	C	(22)
	surface adhesion protein P23/ *Cryptosporidium parvum*	C	(19)
	Cholera Toxin B Subunit/ *Vibrio cholerae*	C, S	(28)
	flagellar antigen *(fliC)* from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis	CW	(29)
Lactobacillus acidophilus	Dual antigen of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* FliC	CW	(30)
Lactobacillus plantarum	LpA/*Borrelia burgdorferi*	S	(31)
	TTFC/*Clostidium tetani*	C	(32)
	E7/ human papillomavirus (HPV)	CW	(33)

CW, cell wall คือ ผนังเซลล์; C, cytoplasm คือ ไซโทพลาซึม; S, secretion คือ หลั่งออกนอกเซลล์แบคทีเรีย



รูปที่ 3 ตำแหน่งการสร้างแอนติเจนในเซลล์แลคโตบาซิลลัส 3 ตำแหน่ง คือ ผนังเซลล์ (cell wall, CW) ไซโทพลาซึม (cytoplasm, C) และตำแหน่งหลั่งออกนอกเซลล์แลคโตบาซิลลัส (Secretion, S) [34]

ตัวอย่างการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งแอนติเจนในเซลล์แลคโตบาซิลลัสต่อผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การทดสอบการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันในหนูด้วยเชื้อ L. plantarum NCIMB8826 ที่สร้างแอนติเจน tetanus toxin fragment C (TTFC) จากเชื้อ Clostridium tetanus โดยแอนติเจน TTFC ถูกสร้างใน 3 ตำแหน่งของเซลล์ ได้แก่ ไซโทพลาซึม หลั่งออกนอกเซลล์ และผนังเซลล์แลคโตบาซิลลัส พบว่าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธีการรับประทานและการพ่นในโพรงจมูกด้วยแลคโตบาซิลลัสที่สร้างแอนติเจนในตำแหน่งไซโทพลาซึมสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ชนิด serum IgG และ intestinal IgA ได้ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแลคโตบาซิลลัสที่สร้างแอนติเจนในตำแหน่งที่หลั่งออกนอกเซลล์และที่ผนังเซลล์ [35] ทั้งนี้พบว่าในตำแหน่งไซโทพลาซึมมีการสร้างแอนติเจนได้ปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแอนติเจนในตำแหน่งหลั่งออกนอกเซลล์และที่ผนังเซลล์ จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน คือ ตำแหน่งและปริมาณแอนติเจนจากเซลล์แลคโตบาซิลลัส ดังนั้น หากต้องการสร้างเชื้อแลคโตบาซิลลัสเพื่อนำไปทดสอบใช้เป็นวัคซีน และเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน ผู้วิจัยควรพัฒนาการสร้างแลคโตบาซิลลัสที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ภายในเซลล์ หลั่งออกนอกเซลล์ และที่ผนังเซลล์ รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนเพื่อสร้างในแต่ละแบบ เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ดัดแปลงเป็นวัคซีนต้นแบบสำหรับใช้กับคนและสัตว์ต่อไป

6. บทสรุป

การพัฒนาวัคซีนโดยใช้เซลล์แลคโตบาซิลลัสเป็นเจ้าบ้านในการผลิตแอนติเจนและใช้เป็นพาหะนำส่งวัคซีนไปยังอวัยวะเป้าหมายเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีองค์ประกอบที่สำคัญที่ต้องพิจารณา ได้แก่ 1) สายพันธุ์ของแลคโตบาซิลลัส ซึ่งจะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับสร้างแอนติเจน โดยการศึกษาก่อนหน้านี้จะใช้แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์โพรไบโอติก ทั้งนี้สายพันธุ์โพรไบโอติกช่วยส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนได้ 2) เครื่องทางพันธุศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่ โคลนนิ่งเวกเตอร์และองค์ประกอบของ gene cassette นอกจากนี้ยังพบว่าแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ดัดแปลงที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนใน 3 ตำแหน่งของเซลล์ ได้แก่ ภายในเซลล์แลคโตบาซิลลัส หลั่งออกนอกเซลล์ และที่ผนังเซลล์ มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกประการ คือ ปริมาณแอนติเจนที่สร้างในแต่ละตำแหน่งของเซลล์แลคโตบาซิลลัส ทั้งนี้ การรายงานก่อนหน้านี้พบว่า นอกจากตำแหน่งแอนติเจนที่สร้างจากแลคโตบาซิลลัสแล้ว ปริมาณแอนติเจนก็เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

7. เอกสารอ้างอิง

1. Russell-Jones GJ. Oral vaccine delivery. J Control Release. 2000 Mar 1;65(1-2):49-54.
2. Fletcher HA. Sleeping Beauty and the Story of the Bacille Calmette-Guerin Vaccine. MBio. 2016 Aug 30;7(4).
3. มารุตพงศ์ ปัญญา. แลคโตบาซิลลัส: พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2562.
4. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiol Mol Biol Rev. 2008 Dec; 72(4):728-64, Table of Contents.
5. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. J Allergy Clin Immunol. 2007 Apr;119(4):1019-21.
6. Lichtenstein L, Avni-Biron I, Ben-Bassat O. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2016 Feb;30(1):81-8.
7. Grandy G, Medina M, Soria R, Teran CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. BMC Infect Dis. 2010 Aug 25; 10:253.
8. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit

tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 1998 May; 84(5):759-68.

9. Panya M, Lulitanond V, Rattanachaikunsopon P, Srivoramas T, Chaiwong T. Isolation, Identification, and Evaluation of Novel Probiotic Strains Isolated from Feces of Breast-Fed Infants. J Med Assoc Thai. 2016 Jan;99 Suppl 1:S28-34.
10. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol. 2003 Jan 26;82(1):1-11.
11. Chen YL, Lee CC, Lin YL, Yin KM, Ho CL, Liu T. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. BMC Bioinformatics. 2015;16 Suppl 18:S13.
12. Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kotsou M, Kyriacou A. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. Anaerobe. 2011 Dec;17(6):440-3.
13. Moreira JL, Mota RM, Horta MF, Teixeira SM, Neumann E, Nicoli JR, et al. Identification to the species level of Lactobacillus isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiol. 2005 Mar 23;5:15.
14. Ventura M, Casas IA, Morelli L, Callegari ML. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of Lactobacillus spp. isolated from fecal and vaginal samples. Syst Appl Microbiol. 2000 Dec;23(4):504-9.
15. Gardiner GE, Heinemann C, Bruce AW, Beuerman D, Reid G. Persistence of Lactobacillus fermentum RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 but not L. rhamnosus GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Jan;9(1):92-6.
16. Roy D, Ward P, Vincent D, Mondou F. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. Curr Microbiol. 2000 Jan; 40(1):40-6.
17. Sasikumar P, Gomathi S, Anbazhagan K, Abhishek A, Paul E, Vasudevan V, et al. Recombinant Lactobacillus plantarum expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. J Biomed Sci. 2014 Aug 30; 21:86.
18. Kajikawa A, Zhang L, LaVoy A, Bumgardner S, Klaenhammer TR, Dean GA. Mucosal Immunogenicity of Genetically Modified Lactobacillus acidophilus expressing an HIV-1 Epitope within the Surface Layer Protein. PLoS One. 2015;10(10):e0141713.
19. Geriletu, Xu R, Jia H, Terkawi MA, Xuan X, Zhang H. Immunogenicity of orally administrated recombinant Lactobacillus casei Zhang expressing Cryptosporidium parvum surface adhesion protein P23 in mice. Curr Microbiol. 2011 May;62(5):1573-80.
20. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Oct;68(6):705-17.
21. Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H, Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002 Aug;81(1-4):639-54.
22. Martin MC, Fernandez M, Martin-Alonso JM, Parra F, Boga JA, Alvarez MA. Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in Lactobacillus casei. FEMS Microbiol Lett. 2004 Aug 15;237(2):385-91.
23. Pavan S, Hols P, Delcour J, Geoffroy MC, Grangette C, Kleerebezem M, et al. Adaptation of the nisin-controlled expression system in

Lactobacillus plantarum: a tool to study in vivo biological effects. Appl Environ Microbiol. 2000 Oct;66(10):4427-32.

24. Xu Y, Li Y. Induction of immune responses in mice after intragastric administration of Lactobacillus casei producing porcine parvovirus VP2 protein. Appl Environ Microbiol. 2007 Nov;73(21):7041-7.
25. Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, et al. Oral immunization with a Lactobacillus casei vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. Vaccine. 2010 Apr 1;28(16):2810-7.
26. Yoon SW, Lee TY, Kim SJ, Lee IH, Sung MH, Park JS, et al. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on Lactobacillus casei induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. Vaccine. 2012 May 9;30(22):3286-94.
27. Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intragastric administration of Lactobacillus casei expressing transmissible gastroentritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. Vaccine. 2005 Feb 3;23(11):1335-42.
28. Okuno T, Kashige N, Satho T, Irie K, Hiramatsu Y, Sharmin T, et al. Expression and secretion of cholera toxin B subunit in lactobacilli. Biol Pharm Bull. 2013;36(6):952-8.
29. Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S. Intragastric immunization with recombinant Lactobacillus casei expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against Salmonella enterica serovar Enteritidis. Vaccine. 2007 May 4;25(18):3599-605.
30. Kajikawa A, Zhang L, Long J, Nordone S, Stoeker L, LaVoy A, et al. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and Salmonella enterica serovar Typhimurium FliC in Lactobacillus acidophilus for vaccine delivery. Clin Vaccine Immunol. 2012 Sep;19(9):1374-81.
31. del Rio B, Dattwyler RJ, Aroso M, Neves V, Meirelles L, Seegers JF, et al. Oral immunization with recombinant lactobacillus plantarum induces a protective immune response in mice with Lyme disease. Clin Vaccine Immunol. 2008 Sep;15(9):1429-35.
32. Grangette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant Lactobacillus plantarum. Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1547-53.
33. Cortes-Perez NG, Azevedo V, Alcocer-Gonzalez JM, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, et al. Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in Lactococcus lactis and in Lactobacillus plantarum using a new cell-wall anchor from lactobacilli. J Drug Target. 2005 Feb;13(2):89-98.
34. Mayo MPB. Lactic acid bacteria: an alternative platform for live vaccine development. The Asia-Pacific Journal of Science and Technology. 2014;19(5):734-42.
35. Reveneau N, Geoffroy MC, Locht C, Chagnaud P, Mercenier A. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant Lactobacillus plantarum producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. Vaccine. 2002 Mar 15;20(13-14):1769-77.