

沖縄本島産ハブ毒と奄美大島産ハブ毒の中和実験

野崎真敏、山川雅延、仲間善次

はじめに

本県では毎年350～400名の人々がハブに咬まれ、県内各地の病院、診療所で抗毒素による治療を受けているが、これらの患者に使用されている抗毒素は奄美大島産ハブ毒免疫で造った抗毒素、すなわち厳密に言えば奄美はぶ抗毒素である。

それは、沖縄本島産のハブと奄美大島産のハブにはそれぞれ特有の斑紋があり、両者を注意深く観察すれば容易に区別することができるが、体鱗、腹板、尾下板の数等形態的には全く差がなく分類上は同一種であり、また、両ハブの毒素についても殆んど差がないと考えられてきたからである。

真弘は(3)琉球列島に棲息するハブ属の毒の相異をその毒作用、抗毒素による中和作用、および寒天ゲル内沈降反応、免疫電気泳動で比較したが、奄美大島、沖縄本島、久米島の三種のハブ毒はそのいずれの点からも区別することができず、奄美はぶ抗毒素は奄美大島、沖縄本島、久米島のいずれのハブによる咬傷の治療にも有効であったと報告している。また、山内は(4)沖縄本島産のハブ毒と奄美大島産のハブ毒を詳細に比較すれば僅かな相異はあるが、両毒素の主要な毒成分であるHR-I、HR-IIについては原毒素の由来に関係なく同じ血清学的特異性を示し、どちらの毒素を材料としても大きな差はなかつたと報告している。

しかし、最近の研究で両毒素の間にはいくつかの相異点のあることが明らかになってきた。

現在明らかにされている“両毒素の違い”をまとめてみると下記のとおりである。

① 沖縄本島産ハブ毒と奄美大島産ハブ毒では、主要な毒成分の分布の割合が大きく異なる。

ハブ粗毒をSephadex G-100で分画すると、免疫学的特異性の異なる2つの毒活性画分、HR-I、HR-IIに分離される。その場合、奄美大島産ハブ毒では出血活性、致死活性共に大部分はHR-I画分に分布するが、沖縄産ハブ毒では逆にHR-II画分に多く分布する。(10)

② 沖縄本島産ハブ毒では、HR-I、HR-II以外にも主要な毒成分であるH₂-0が含まれている。

Sephadex G-100より得られた粗HR-II画分を更にAmberlite GG-50を用いて精製すると吸着されずに素通りする画分H₂-0を得る。H₂-0はウサギに対しては殆んど出血作用を示さないが、マウスに対しては致死作用と出血作用を示し、また、馬を用いた免疫実験では抗体の産生が著しく悪い。H₂-0に相当するものは奄美大島産ハブ毒には全く含まれていないか、含まれているにしても非常に少量と思われる。(10)

③ HR-I画分を高度に精製すると奄美大島産ハブ毒はHR-Ia、HR-Ibの2つに分かれるが、沖縄本島産ハブ毒はHR-IaのみでHR-Ibは含まれない。Sephadex G-100より得られた粗HR-I画分をDEAE-Sephadex A-50、GE-Cellulose、Sephadex G-200、

Superfineの順に精製すると、奄美大島産ハブ毒はHR-Ia、HR-Ibに分かれるが、沖縄本島産ハブ毒はHR-IaのみでありHR-Ibは含まれない。(9)

これらの毒素のちがいが“抗毒素の中和作用にどの程度影響を及ぼすか”ということは患者の治療の面からも非常に重要であり、本報では沖縄及び奄美ハブの毒素、抗毒素交叉中和試験を行ない、それぞれの毒素に対する両抗毒素の中和効果を比較した。

実験材料及び実験方法

(1) 沖縄本島産ハブ粗毒及び奄美大島産ハブ粗毒

沖縄本島産ハブ粗毒は、メートルガラス(200 ml)の口にビニール製の膜(厚さ0.3 mm)を張って固定し、それをハブに咬ませ人為的に頭部毒線を圧迫せず自然に排出させた。

生毒液は3,000 rpm、10 min 遠心して不溶性沈殿物を除去した後凍結乾燥した。乾燥毒は1年分をP 00I して褐色瓶に入れデシケータ ー中に保存し必要に応じて適量を分割使用した。

奄美大島産ハブ粗毒は、採毒に伴う諸条件を一定にするために奄美大島名瀬保健所及び奄美観光ハブセンター(名瀬市)より奄美大島産の生ハブを取り寄せ、沖縄産ハブと同じ方法で採毒し、凍結乾燥した。これらのハブ毒も昭和51年度に採毒したものを使用した。

それぞれの試験用毒素の毒力及び1試験毒素量は表-1に示した。

表-1 沖縄、奄美両ハブ毒の毒活性及び1試験毒素量

毒 素	毒 活 性		I 試 験 毒 素 量	
	出 血 mcg/MHD	致 死 mcg/LD ₅₀	抗出血価 測定用	抗致死価 測定用
沖縄本島産ハブ毒	0.174	34.8	100 MHD	3 LD ₅₀
奄美大島産ハブ毒	0.172	47.8	"	"

(2) 毒活性の測定

出血活性は近藤等(1)のウサギ背皮法により測定し、出血斑の直径の平均値が10 mmになるような毒の最少量を1 MHDとした。致死活性はマウスの尾静脈注射法により測定し、LD₅₀はLeed & Muench法(2)で計算した。

(3) 蛋白質の測定

抗毒素の蛋白質量は、生物学的製剤基準、一般試験法の蛋白質定量法により測定した。(12)。すなわち、一定量の抗毒素液にその1/10容量の50 W/V %トリクロール酢酸液を加え、100℃、15分間加熱した時に生ずる沈殿の蛋白質量をマイクロキールダール法により測定し、窒素mg=蛋白625mgとして蛋白濃度を算出した。

ハブ粗毒の蛋白質量はOD₂₈₀を測定しハブ粗毒mg/ml=1.54 OD₂₈₀として計算した。

(4) はぶ抗毒素製品

奄美はぶ抗毒素は、現在治療に使用されている化学及び血清療法研究所製の Lot 12 (昭和49年10月23日検定合格)、Lot 13 (昭和50年2月18日検定合格)、Lot 14 (昭和51年1月27日検定合格)の3種を使用した。これは奄美大島産ハブ粗毒を用いて免疫した馬の血清をペプシン消化→硫安分画法により精製したものである。但し、免疫に使用された毒素が奄美大島本島産のものか、徳之島産のものであるかは確認することができなかった。

沖縄はぶ抗毒素は、沖縄県ハブ対策研究会が昭和52年度に試験製造した Lot 25、T-77、T-78の3種を使用した。これは沖縄本島産ハブ粗毒を用いて免疫した馬の血清を硫安分画→ペプシン消化→塩化亜鉛処理→硫安再分画法により精製したものである。

それぞれの抗毒素の抗体価は表-2に示した。

表-2. 各抗毒素製品の免疫抗原、精製法、抗毒素価

Lot No	免疫抗原	精製法	蛋白濃度 mg/ml	抗毒素価 (U/ml)			製造主体
				抗致死	抗出血-I	抗出血-II	
Lot 12	奄美ハブ粗毒	硫安分画法	50.79	366	354	586	化血研
Lot 13	"	"	56.74	351	330	521	"
Lot 14	"	"	35.35	343	441	330	"
Lot 25	沖縄ハブ粗毒	塩化亜鉛法		743	990	825	ハブ研究会
T-77	"	"	60.25	1020	940	1150	"
T-78	"	"	61.25	740	644	1091	"

(5) 中和実験

それぞれの抗体価は、基本的に生物学的製剤基準に基いて測定した。

即ち、抗致死価の測定は、被検血清をM/60 磷酸緩衝液PH=7.0を用いて125倍間隔の5段階に稀釈し、注射量0.2 ml中に1 T Dの試験毒素を含むように混合、室温に1時間放置した後マウス尾静脈に注射し、48時間後の生死を観察した。ED₅₀はLeed & Muench法で計算し、1 T Dを中和するのに必要な抗毒素量を10.0単位とした。

同様に、抗出血価の測定は、0.2 mlの毒素-抗毒素混合液をウサギ背皮皮肉に注射し、近藤等の方法でMHD価を測定した。1 T Dを中和するのに必要な抗毒素量を1.0単位として抗体価を計算した。

沖縄本島産ハブ毒、奄美大島産ハブ毒のいずれも1試験毒素量は、抗致死価測定用=3 LD₅₀、抗出血価測定用=100 MHDとした。

筋肉内における中和効果は、M/60 磷酸緩衝液PH=7.0を用いて2倍間隔の8段階に稀釈した粗毒液の0.1 mlを体重20g前後のマウス大腿部筋肉に注射し、直後に抗毒素液0.1 mlを尾静脈より投与して24時間後の生死及び局所の病変を観察した。

実 験 成 績

1. 毒素、抗毒素交叉中和実験

抗出血価測定の場合、国立予防衛生研究所より分与される部分精製HR-I、HR-IIを試験用毒素として使用すれば、鮮やかな出血斑ができるため測定が比較的容易であるが、今回のように試験用毒素が粗毒の場合は境界がはっきりせず出血斑の大きさの測定が非常に困難である。また、動物実験では、同じ毒素及び抗毒素を使用しても個体差やその日の状態で結果にかなりのバラツキが生じるため、今回の実験では5検体を同一のウサギに接種し、動物の個体差や判定の時の出血斑の境界の判断を平均化するように努めた。

同様に、抗致死価測定の場合も、予研より分与される試験用毒素(Toxin-1)を使用すれば4/4~0/4とシャープな結果を一般に得るが、試験用毒素が粗毒の場合は、4/4、2/4、2/4、3/4、1/4のように統計的な処理が困難な結果ができることもしばしばある。したがって、今回は同一の実験を2~4回行ない、統計的に処理可能な2回分の結果を平均した。

沖縄本島産ハブと奄美大島産ハブの毒素、抗毒素交叉中和実験の結果は表-3に示した。

表-3 沖縄(OH)及び奄美ハブ(AH)の毒素、抗毒素中和実験

Lot No	試験毒素	抗出血価		抗致死価		免疫抗原
		u/ml	比活性	u/ml	比活性	
Lot 12	O:HC	286	1.00	160	1.00	奄美産ハブ毒 (A:HC)
	A:HC	375	1.31	455	2.84	
Lot 13	O:HC	198	1.00	113	1.00	"
	A:HC	282	1.42	253	2.24	
Lot 14	O:HC	148	1.00	97	1.00	"
	A:HC	282	1.91	215	2.22	
Lot 25	O:HC	309	0.77	471	2.68	沖縄産ハブ毒 (O:HC)
	A:HC	401	1.00	176	1.00	
T-77	O:HC	725	1.75	552	1.34	"
	A:HC	964	1.00	413	1.00	
T-78	O:HC	514		457		"
	A:HC					

O:HC = 沖縄本島産ハブ粗毒

A:HC = 奄美大島産ハブ粗毒

今回測定した5検体のうち沖縄本島産ハブ毒に対して最も高い抗体価を示すのはT-77、次にLot 25、つづいてLot 12、Lot 13、Lot 14の順であった。これは抗出血価、抗致死価の双方に共通していた。

また、奄美大島産ハブ毒に対しては、抗出血価は沖縄本島産ハブ毒同様T-77、Lot 25、Lot 12、Lot 13、Lot 14の順であったが、抗致死価はLot 12が最も高く、つづいてT-77、Lot 13、Lot 14、Lot 25の順であった。

すなわち、抗致死価に関しては同種毒に対する中和効果の方がはるかに高く、抗出血価に関しては沖縄本島産ハブ毒、奄美大島産ハブ毒のいずれに対しても沖縄はぶ抗毒素の方が高かった。

それぞれの抗体価を統計的に処理した結果、各抗毒素の両毒素に対する抗体価には明らかに有意の差があった。

表中の比活性の欄には、異種毒に対する抗体価を1.00とした時のそれぞれの抗体価を示した。

奄美はぶ抗毒素 Lot 12、Lot 13、Lot 14 では、抗出血価 1.00: 1.31~1.91、抗致死価 1.00 : 2.22~2.84 といずれも同種毒に対する中和効果の方が高く、特に抗致死価においてその傾向が強かった。

沖縄はぶ抗毒素 Lot 25、T-77では、抗出血価は 0.75~0.77 : 1.00 とむしろ異種毒である奄美ハブ毒に対する抗体価の方が高かったが、抗致死価は奄美はぶ抗毒素の時と同様に同種毒に対する抗体価の方が高かった。

2. 抗毒素の生体内中和実験

沖縄、奄美両はぶ抗毒素の筋肉内における中和効果を比較するために、粗毒液 0.1 ml を体重 20 g 前後のマウスの大腿部筋肉内に注射した後、すぐに抗毒素液 0.1 ml を尾静脈より投与し、24 時間後の生死及び局所の病変を観察した。結果は表-4 に示したが、Ⓜ：死亡、Ⓜ：大腿部全域に著しい出血、Ⓜ：大腿部の 1/2 に出血、+：大腿部の 1/3 に出血、-：出血を認めない、である。

今回は沖縄本島産ハブ粗毒に対する中和効果のみを測定したが奄美はぶ抗毒素 Lot 12 の 0.1 ml は 15.6 mcg、Lot 13 は 7.8 mcg の局所病変を中和し、沖縄はぶ抗毒素 T-77、T-78 の 0.1 ml は 31.3 mcg の局所病変を中和した。

また、奄美はぶ抗毒素の 0.1 ml は 353.5 mcg、Lot 13 は 176.8 mcg の致死作用を中和し、沖縄はぶ抗毒素 T-77 の 0.1 ml は 594.7 mcg、T-78 は 707.2 mcg の致死作用をそれぞれ中和した。

結局、マウスの筋肉内中和においても同種毒免疫によって造った抗毒素の方がはるかに高い中和効果を示した。

表-4 マウス筋肉内攻撃時の中和効果

粗毒 (mcg)	Lot 12 (0.1 ml) 奄美はぶ抗毒素	Lot 13 (0.1 ml) 奄美はぶ抗毒素	T-77 (0.1 ml) 沖縄はぶ抗毒素	T-78 (0.1 ml) 沖縄はぶ抗毒素
1,000	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ
500	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ
250	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ
125	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ
62.5	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	Ⓜ + +	Ⓜ + +
31.3	+ + +	Ⓜ Ⓜ Ⓜ	+ ± ±	- - -
15.6	± ± ±	Ⓜ + ±	- - -	- - -
7.8	- - -	- - -	- - -	- - -

① 毒液 0.1 ml をマウス筋肉内に注射直後、抗毒素 0.1 ml をマウス尾静脈に注射した。

② Ⓜは死亡、Ⓜ：大腿部全域に著しい出血、Ⓜ：大腿部の 1/2 に出血、+：大腿部の 1/3 に出血、-：出血を認めない。

総 括 と 考 察

現在沖縄県では、ハブ咬傷患者の治療に奄美ハブ抗毒素を使用しているが、最近の研究で沖縄ハブ毒と奄美ハブ毒の間には多少の違いのあることが明らかになって来たため、毒素、抗毒素交叉中和試験を行ない、それぞれの毒素に対する両抗毒素の中和効果を比較した。

その結果、抗出血価に関しては、沖縄はぶ抗毒素、奄美はぶ抗毒素いずれにおいても奄美ハブ毒に対する中和効果の方が高かった。

それはハブ粗毒で免疫した血清では、HR-Iに比べHR-IIに対する抗体の絶対量が少ないため(8)、奄美はぶ抗毒素ではもちろん、沖縄はぶ抗毒素でもHR-II含量の少ない奄美ハブ毒の方に高い抗体価を示したのである。

はぶ抗毒素の力価測定、特に抗出血の滴定終末点に関しては、タンパク毒素(下)“抗血清の力価測定上の問題”の項にわかりやすく説明されているのでそれを参考にしながら今回の結果を考察してみたい。以下はタンパク毒素(下)の一部である。

ハブ毒の中には2つの出血因子(HR-I、HR-II)が含まれており、また、粗毒免疫で製造した抗毒素の中にはそれぞれの出血因子に対応する特異抗体(抗HR-I、抗HR-II)が含まれている。しかし、これらの2つの出血因子はウサギの皮内にひきおこす出血反応(生体反応)のうえでは区別することができない。

したがって、ハブ粗毒を試験用毒素として抗毒素の力価を滴定する場合、得られた値が抗HR-Iの力価を示すのか、それとも抗HR-IIの力価を示すのか、すなわち、滴定の終末点が①HR-Iと抗HR-Iの中和反応によって決まるのか、②HR-IIと抗HR-IIの中和反応によって決まるのが明らかでない。

このような場合、滴定の終末点は試験毒素中の2つの出血因子の量比と抗毒素中の2つの抗体の量比の両方によって決まることをモデルを使って説明してみよう。

図-1. 中和反応の終末点をいずれの抗原抗体反応が決定するかについてのモデル

	試験毒素中に含まれるHR-IとHR-IIの量比		
	HR-I	HR-II	
試験毒素	○ ○	● ●	
	○ ○		
	抗毒素中に含まれる抗HR-Iと抗HR-IIの量比		中和の終末点を決定する抗原抗体反応
	抗HR-I	抗HR-II	
抗毒素A	◎ ◎	● ●	HR-I : 抗HR-I
	◎ ◎	● ●	
抗毒素B	◎ ◎ ◎	● ●	HR-II : 抗HR-II
	◎ ◎ ◎	● ●	

○は抗HR-Iの一定量(◎)と免疫学的に相当なHR-Iの量を示す。

●は抗HR-IIの一定量(◎)と免疫学的に相当なHR-IIの量を示す。

タンパク毒素(下)“抗血清の力価測定上の問題”より

それは沖縄ハブ毒には、HR-I、HR-II以外にも主要な致死活性成分(H₂-0)が存在しているように、粗毒中における致死活性の分布の割合が両毒素間で大きく異なっているためであろう。

今回の実験では1試験毒素量(TD)=3LD₅₀として抗致死価を測定したが、精製された試験毒素を使用した時のように生死の境界がシャープに出ないため、試験毒素の強弱を少し変化させたところ全部生存したり、全部死亡したりでむしろ抗体価の測定が困難であった。

このように毒力のちょっとした変化でマウスの生死が大きく変動するのは、ハブ粗毒の致死作用がいろいろな毒成分の共同作用であり、その中には抗体のできにくい成分が含まれているからであろう。

精製された試験毒素では1TD=5LD₅₀であるのに対し、粗毒の試験毒素では1TD=3LD₅₀とかなり弱くしているにもかかわらず精製毒素に対する抗体価の方が高いのは、滴定の終末点がToxin-1(HR-I画分)以外の毒成分と抗毒素の中和によって決まっているからであろう。

我々は過去に沖縄本島産ハブ毒と奄美大島産ハブ毒の分析を行ない①HR-IとHR-IIの分布の割合が両毒素で大きく異なること、②沖縄ハブ毒にはHR-I、HR-II以外にも主要な致死活性成分であるH₂-0が含まれていること等を明らかにしたが(8)、今回の中和実験の結果はそれをほぼ裏付けるものであった。しかし、出血活性に関してはHR-IとHR-IIの量比の違いはあるが、山内等の報告(4)にもあるように血清学的特異性には殆んど差がないものと思われる。

今回使用した5種の抗毒素では、抗出血価に関しては沖縄はぶ抗毒素、奄美はぶ抗毒素のいずれにおいても奄美大島ハブ毒に対する中和効果の方が高く、抗致死価に関しては、同種毒に対する中和効果の方がはるかに高かった。抗出血価と抗致死価の両方をまとめて考えれば、やはり沖縄ハブ咬傷患者には沖縄ハブ毒免疫で造った沖縄はぶ抗毒素を、奄美ハブ咬傷患者には奄美ハブ毒免疫で造った奄美はぶ抗毒素を使用した方がより効果的だと思う。また、沖縄、奄美両はぶ抗毒素のマウス筋肉内における中和効果についても検討したが、生体内中和においても同種毒免疫によって造った抗毒素の方がはるかに有効であった。

今回の結果からも明らかのように生物学的製剤基準に定められた力価試験の結果では大きな差がないにもかかわらず、粗毒に対する中和効果にはかなりの開きのあることもあり、抗毒素の抗体価を測定する場合には、反応が不鮮明で測定の困難さはあるが、粗毒に対する中和効果も併せて測定し参考にした方がよいと思う。

ま と め

沖縄はぶ抗毒素の有効性の一環として、沖縄及び奄美ハブの毒素、抗毒素交叉中和実験を行ない、それぞれの毒素に対する両抗毒素の中和効果を比較した。

- (1) 抗出血価に関しては、沖縄はぶ抗毒素、奄美はぶ抗毒素共に奄美ハブ毒に対する中和効果の方が高く、粗毒の出血作用に対する滴定の終末点はHR-IIと抗HR-IIの中和によって決定されているようであった。
- (2) 抗致死価に関しては、沖縄はぶ抗毒素、奄美はぶ抗毒素のいずれにおいても同種毒に対する中和効果の方が高く、粗毒の致死作用に対する滴定の終末点はToxin-1(HR-I画分)以外の毒成分と抗毒素の中和によって決定されているようであった。
- (3) 沖縄ハブ毒と奄美ハブ毒では、出血活性に関してはHR-IとHR-IIの量比の違いだけで血清学的特

異性には殆んど差がないが、致死活性については共通の抗原にはかなり得ない部分がかなりの割合で含まれているようであった。

(4) 沖縄、奄美両はぶ抗毒素の Maus 筋肉内における中和効果についても検討したが、生体内中和においても同種毒免疫によって造った抗毒素の方がはるかに有効であった。

おわりに、奄美大島産ハブを提供して下さった奄美大島名瀬保健所及び奄美観光ハブセンターの方々に深く感謝申し上げます。

なお、本研究に要した研究費は昭和52年度国庫補助より支出された。

紙上より深謝します。

参 考 文 献

1. Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. & Ohsaka, A: Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of HABU snake venom. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43-51, 1960.
2. L. J. Reed and H. Muench: A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Amer. J. Hyg.* 27, 493-497, 1938.
3. 貞弘省二、山内清澄、近藤 了、近藤 久、村田良介: 蛇毒の免疫学的研究、*日本細菌学雑誌* 20(1) 21~25、1965
4. 山内清澄、貞弘省二、近藤 了、村田良介、近藤 久、松井清治: 沖縄産はぶ毒中の毒性因子の研究、とくに奄美はぶ毒との比較、*沖縄ハプトキソイド開発研究報告書*、昭和47年度
5. 佐藤 保、貞弘省二: はぶ毒毒性因子精製法の改良について、*はぶトキソイド研究報告書*、昭和50年度
6. 貞弘省二、佐藤 保: 高純度はぶトキソイドに関する研究(IV)、奄美産および沖縄産はぶ毒HR-I トキソイドの免疫原性の検討、*はぶトキソイド研究報告書*、昭和50年度
7. 沖縄ハブ抗毒素開発研究報告書、昭和48年度
8. 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書、昭和49年度
9. 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書、昭和50年度
10. 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書、昭和51年度
11. 鈴木友二、村田良介、田宮信雄、逢坂 昭、船津 勝、大橋 誠: タンパク毒素(下)、1971
12. 生物学的製剤基準: 厚生省