

微生物産生物質および植物成分の抗毒作用に関する研究

富原 靖博 野崎 真敏 山川 雅延
 宮城 智¹⁾ 当山 清善¹⁾ 与那覇和雄¹⁾
 大城 哲哉²⁾ 比嘉 松武²⁾ 与儀 誠一²⁾

Studies on Detoxifying Effect of the Substances Produced by Microorganisms and the Extracts of Plants Against Habu Venom

Yasuhiro TOMIHARA, Masatoshi NOZAKI, Masanobu YAMAKAWA,
 Satoshi MIYAGI,¹⁾ Kazuo YONAHARA,¹⁾ Seizen TOYAMA,¹⁾
 Tetuya OSHIRO,²⁾ Matsutake HIGA²⁾ and Seiichi YOGI²⁾

1) Department of Agricultural Chemistry, University of the Ryukyus

2) Department of Chemistry, University of the Ryukyus

Abstract

We have studied on detoxifying effect of the substances produced by microorganisms and the extracts of plants against habu venom. There was no substance which neutralizes the hemorrhagic and edema-forming activity of habu venom in molds tested *in vitro*. but the cultured fluid of *Streptomyces aureus* contained a factor which neutralize the hemorrhagic activity of habu venom *in vitro*. Protease inhibitor such as Elastinal, E-64, Leupetin, Pepstatin, Chymostatin and Antipain could not neutralize habu venom *in vivo*. Inhibition of papain- and protease-activity of habu venom in the substances produced by microorganisms did not correlate to their detoxifying effect. Habu venom inhibition by plant extracts from 31 species was studied by means of antihemorrhagic assay *in vivo*. All of the samples could not neutralize hemorrhagic activity in habu venom. Some of the plant-extracts showed the toxicity to mouse and to *Poecilia reticulata*.

I はじめに

現在、ハブ咬症患者の治療にはハブ抗毒素（馬免疫抗体）が使用されているが繰り返し使用することにより血清病などの過敏反応が起こる。ハブ抗毒素以外にこれまで多くの研究者によって抗蛇毒作用があるいくつかの物質が報告されているが¹⁻⁶⁾ほとんどは治療薬として実用化されていない。これらの物質は *in vitro* では強力な抗毒作用を示すが *in vivo* では満足すべき結果は得られてない。

自然界にはきわめて多種類の微生物が存在し、

その生化学的性質はきわめて変化に富んでおり、微生物菌体中あるいはその培養液中にはさまざまな物質が生産され、抗がん作用や種々の生理活性をもつ物質が見いだされている。今回、微生物産生の抗ハブ毒剤を探索するためカビや放線菌を培養し、菌体及び培養液のハブ毒中のプロテアーゼ阻害活性やパパイン阻害活性及び腫脹阻害効果や出血阻害効果などを調べた。又、既知の微生物起源蛋白質分解酵素阻害剤などによるハブ毒阻害効果についても検討した。

当研究所ではハブ抗毒素以外の抗ハブ毒剤探求の一環として昭和58年度抗毒素研究報告書で植物由来成分の抗毒作用について報告した。⁷⁾ 今回、

1) 琉球大学農学部農芸化学科

2) 琉球大学理学部化学科

それらの結果を検討し、抗ハブ毒作用を持つ可能性がある植物および古くから民間治療薬として抗ハブ毒作用を持つと伝えられている植物、31種類について抗ハブ毒作用の有無を検討した。又、抗ハブ毒作用試験中に実験に使用したマウスが死亡することからいくつかの植物についてはマウスに対する毒性試験およびグッピーに対する魚毒試験も試みたので報告する。

実験材料

実験に供したカビ及び放線菌の菌株は琉球大学農芸化学科応用微生物室保存菌株を使用し、微生物由来の蛋白質分解酵素阻害剤(MK-I, Thiolstatin, S-SI, S-MPI, S-PI および MAPI)は、大阪府立大学農学部農芸化学科微生物利用学教室の村尾澤夫教授から分与されたものを使用した。また、Elastinal, E-64, Leupeptin, Pepstatin, Chmo-statin および Antipain は蛋白質研究奨励会のもを使用した。

実験に使用した植物は1988年4～5月に県内各地で採取した。

II 実験方法

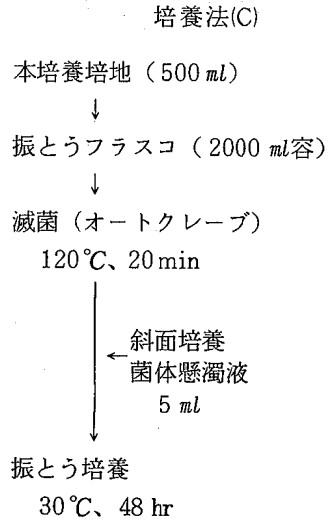
1. 微生物の培養、菌体抽出液の調製及び酵素阻害活性の測定法

培養条件、培養方法、菌体抽出液の調整および酵素活性測定は以下の方法で行った。

1) 培地組成と培養法

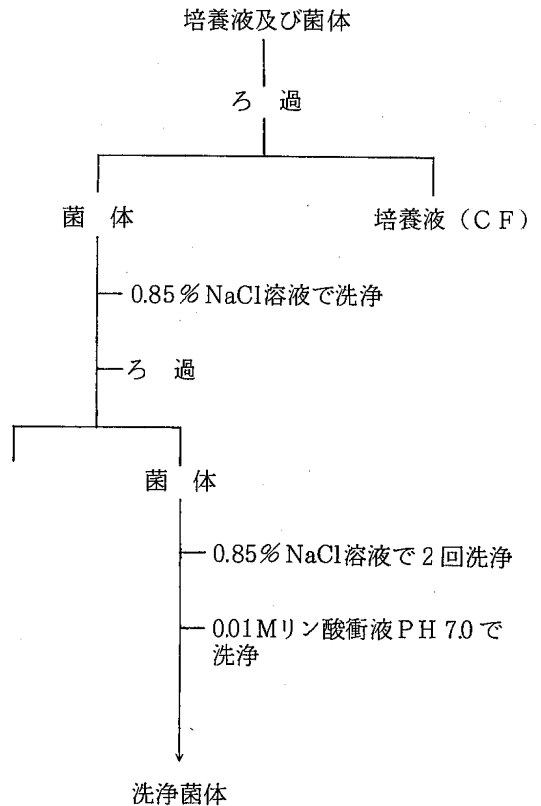
カビの培養には培地組成(A)、放線菌の培養には培地組成(B)を使用し、培養は(C)の通り行った。

培地組成(A)		培地組成(B)	
Glucose	3.0%	Glucose	2.0%
NH ₄ NO ₃	0.2	Peptone	0.5
K ₂ HPO ₄	0.1	K ₂ HPO ₄	0.1
KH ₂ PO ₄	0.1	KH ₂ PO ₄	0.1
NaCl	0.1	NaCl	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Yeast Extract	0.01	Yeast Extract	0.05



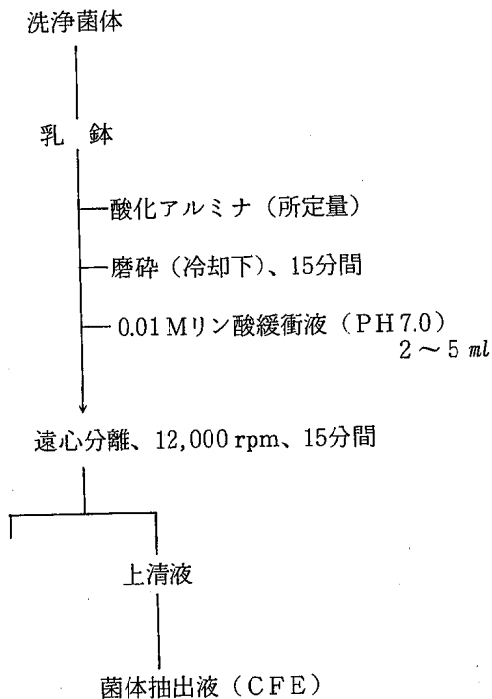
2) 微生物培養液及び培養菌体の調製

カビ及び放線菌を培養したのち培養液及び培養菌体の調製は次の通り行った。



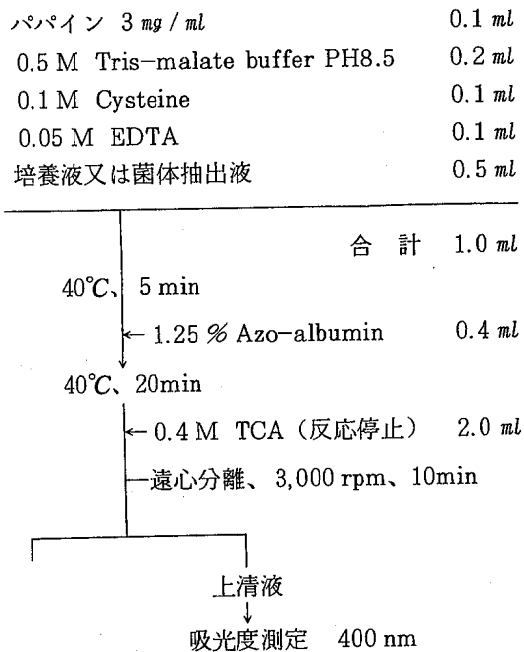
3) 菌体抽出液の調製

洗浄菌体から菌体抽出液の調製は次の通り行った。



5) パパイン阻害活性の測定法

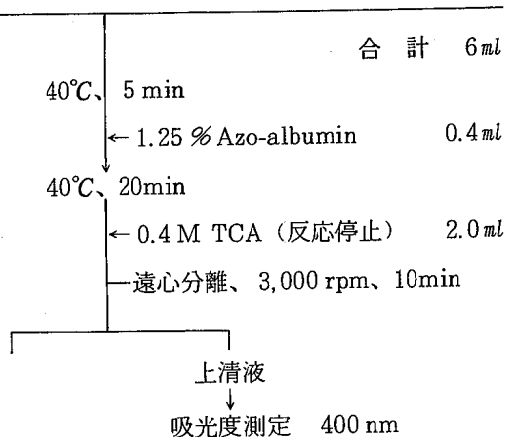
微生物培養液及び菌体抽出液によるパパイン阻害活性は次の通り行った。



4) ハブ毒プロテアーゼ阻害活性の測定法

微生物培養液及び菌体抽出液によるハブ毒プロテアーゼ阻害活性は次の通り行った。

ハブ毒	5 mg/ml	0.2 ml
0.5 M Tris-malate buffer	PH8.5	0.2 ml
培養液又は菌体抽出液		x ml



阻害活性 =

$$\frac{\left(\begin{array}{c} \text{阻害剤処理前} \\ \text{のプロテアーゼ活性} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{阻害剤処理後} \\ \text{のプロテアーゼ活性} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} \text{阻害剤処理前の} \\ \text{プロテアーゼ活性} \end{array} \right)} \times 100$$

阻害活性表示

阻害度	表示
0 %	—
1 ~ 10	+
11 ~ 30	++
31 ~ 50	+++
51 ~ 90	++++

2. 植物成分の調製法

1988年4～5月に県内各地で採取した植物を葉、茎、実に分け、それぞれEtOH (95%)で1～2週間抽出後、水溶部とEtOAc可溶部とに分けた。水溶部は約5 mlをとり、pHを7.0に調製して活性テストに使用した。EtOAc可溶部は1/10～1/20量をとり、減圧濃縮後、DMSO 5 mlに溶かして活性テストに使用した。各サンプルは遠心分離し、その上清を使用した。

3. 腫脹及び出血阻害効果試験

1) *in vitro* 試験

微生物培養液及び菌体抽出液の検体をPH7.0に調整し、その遠心上清0.8 mlに20倍希釈の毒液0.2 ml (ハブ毒100 µg)を加え室温に2時間放置後、1群2匹のマウス右足蹠および後肢筋肉内に20 µl注射し、2時間後に抗腫脹作用および抗出血作用を測定した。

2) *in vivo* 試験

検体をPH7.0に調整し、その遠心上清0.2 mlをマウスの腹腔内に注射した。

注射2時間後にマウス右足蹠および後肢筋肉内にハブ粗毒2 µgを注射し、2時間後に抗腫脹作用および抗出血作用を測定した。

3) 抗腫脹作用の測定

試料をマウス右足蹠に注射したのち2時間後にマウスの左右両足蹠を切断してそれぞれの重量を測定し、左健足の重量を100%とし右腫脹足の重量増加率を算出した。

in vitro および *in vivo* とも腫脹率130%以下を有効性有りとした。

4) 抗出血作用の測定

検体0.2 ml (pH 7.0)をマウス腹腔内に注射し、1時間後にハブ毒2 µgをマウスの右足蹠および後肢筋肉内に注射し2時間後に注射局所の出血の有無を肉眼的に観察し病変の程度を一、十、十で表した。即ち、注射部位周辺に出血病変が全く認められない場合一、ほぼ全域に出血病変が及んでいる場合十とし、その中間的な病変を十とした。*in vitro* および *in vivo* とも一～十の場合を有効性有りとした。

4. マウス毒性試験

検体0.2 ml (pH 7.0)をマウス腹腔内に注射し

24時間後の生死を見た。マウスが全部死亡した場合は十、一部死亡した場合は十、全部生存した場合は一とした。

5. 魚毒試験⁸⁾

一晩よく空気を通した水道水150 mlを200 mlのビーカーに入れ、試料検液1 mlを加えてその中に試験日の前日に餌止めした体長3～3.5 cmのグッピー1尾を入れた。グッピーは当研究室でしばらく飼い慣らした野生のグッピー(雄)を使用した。判定は24時間後の生死を見た。すなわち死亡した場合十、生存している場合一、供試魚が弱っている場合十とした。

III 結果と考察

1. 菌体抽出液の抗毒作用及びパバイン、プロテアーゼ活性阻害

カビ及び放線菌の培養は30°C、48時間振とうして行った。培養物をろ別し、ろ液を培養液試料(CF)とし、洗浄菌体を磨砕し、遠心分離して得られる上清を菌体抽出液試料(CFE)とした。CF及びCFEの適量を取り、ハブ毒中のプロテアーゼ阻害活性及びパバイン阻害活性を調べた。

また、PH7.0に調整したCF及びCFE(0.8 ml)にハブ毒(0.2 ml)を混合し、2時間放置したのち、マウスの右足蹠及び後肢筋肉内に20 µl注射し、抗腫脹作用及び抗出血作用を測定した。

カビのCF及びCFEについて検討した結果、*ASP. oryzae* (3101)、*ASP. flavus* (3106)、*ASP. sojae* (3111)、*ASP. oryzae* (3117)、*ASP. sojae* (3118)、*ASP. NRRL 1988* (3150)、*ASP. Higuchi* (3151)はCF及びCFEのいずれも*in vitro*でパバイン活性を強く阻害したが、ハブ毒中のプロテアーゼ活性にはまったく阻害がみられなかった。(表1)

パバイン活性を強く阻害する菌株のCF及びCFEの抗腫脹作用及び抗出血作用について検討したが、どの菌株についても抗腫脹作用及び抗出血作用が見られなかった。次に放線菌のCF及びCFEについて検討した結果、*Mycobacterium avium* (1520)、*Nocardia corallina* (1531)及び*Streptomyces flavus* (1573)のCFEはパバイン及びハブ毒中のプロテアーゼ両活性

10~30%程度阻害したが、抗腫脹作用及び抗出血作用は見られなかった。(表2)

Mycobacterium avium (1521)、*Actinomyces auranticus* (1540)、*Streptomyces albus* (1563) 及び *Streptomyces halstedii* (1574) のCFEはパパイ活性を10%程度阻害したが、ハブ毒中のプロテアーゼ阻害活性、抗腫脹作用及び抗出血作用はまったく見られなかった。

Streptomyces aureus (1571)のCFEはパパイ活性を10%程度阻害したが、ハブ毒中のプロテアーゼ活性には阻害が見られなかった。

次に抗ハブ毒作用について検討した結果、抗腫脹作用は見られなかったが、*in vitro* でマウス

の筋肉内出血を強く阻害した。

以上の結果から判断するかぎりパパイ阻害活性及びハブ毒中のプロテアーゼ阻害活性と抗ハブ毒作用(抗腫脹作用や抗出血作用)には相関関係は見られなかった。

微生物の培養ろ液から調製されているプロテアーゼ阻害剤であるMK-I、Thiolstatin、S-SI及びS-MPIについて抗ハブ毒作用を調べた。

(表3) これらの阻害剤による *in vitro* での抗腫脹作用及び抗出血作用は見られなかった。次にMK-I、Thiolstatin、S-SI、S-MPI、S-PI及びMAPIは *in vivo* でいずれも抗腫脹作用及び抗出血作用が見られなかった。(表4)

表1-1. 微生物産生物質の酵素阻害作用および抗ハブ毒作用.

菌株No.	菌 株 名	酵素阻害活性		in vitro	
		パパイン	ハブ毒 プロテアーゼ	腫脹率	筋肉出血
3100	<i>Aspergillus oryzae</i>	CF	—	160	++
		CFE	+	158	++
3101	" "	CF	+++	157	++
		CFE	+++	160	++
3106	" <i>flavus</i>	CF	+++	157	++
		CFE	++	145	++
3107	" <i>japonicus</i>	CF	—	160	++
		CFE	+	158	++
3108	" <i>usamii</i>	CF	—	154	++
		CFE	—	158	++
3109	" "	CF	—	152	++
		CFE	—	149	++
3111	" <i>sojae</i>	CF	+++	148	++
		CFE	+++	154	++
3112	" <i>tamari</i>	CF	—	156	++
		CFE	—	148	++
3114	" <i>oryzae</i>	CF	—	148	++
		CFE	+	145	++
3115	" "	CF	—	143	++
		CFE	+	153	++
3116	" "	CF	—	151	++
		CFE	+	163	++
3117	" "	CF	++	160	++
		CFE	+++	154	++
3118	" <i>soyae</i>	CF	+++	163	++
		CFE	+	150	++
3119	" <i>cellulosae</i>	CF	—	162	++
		CFE	+	163	++
3120	" <i>niger</i>	CF	—	150	++
		CFE	—	155	++
3134	" <i>awamori</i>	CF		151	++
		CFE		155	++
3135	" "	CF		152	++
		CFE		155	++
3140	" "	CF		149	++
		CFE		152	++
3141	" <i>kawachi</i>	CF		157	++
		CFE		158	++
3142	" <i>awamori</i>	CF		155	++
		CFE		155	++
3150	" NRRL 1988	CF	++	150	++
		CFE	+++	158	++
3151	" <i>Higuchi</i>	CF	+	160	++
		CFE	+	161	++
3152	" W-1	CF	—	158	++
		CFE	—	163	++
対照	ハブ粗毒 2 μ g			155	++

表1-2. 微生物産生物質の酵素阻害作用および抗ハブ毒作用.

菌株No.	菌 株 名	酵素阻害活性		<i>in vitro</i>	
		パパイン	ハブ毒 プロテアーゼ	腫脹率	筋肉出血
3153	<i>Aspergillus aculeatus</i>	CF	—	152	++
		CFE	—	153	++
3200	" <i>usamii</i>	CF		156	++
		CFE		150	++
3205	" "	CF		153	++
		CFE		157	++
3280	" <i>niger</i> P-2	CF		158	++
		CFE		160	++
A-100	" <i>awamori</i> SP	CF	—	151	++
		CFE	—	149	++
B-101	" " "	CF	—	149	++
		CFE	—	147	++
D-103	" " "	CF	—	152	++
		CFE	—	146	++
D-104	" " "	CF	—	150	++
		CFE	—	147	++
D-105	" " "	CF	—	153	++
		CFE	—	145	++
E-106	" " "	CF	—	156	++
		CFE	—	148	++
E-107	" " "	CF	—	152	++
		CFE	—	157	++
E-108	" " "	CF	—	150	++
		CFE	—	155	++
E-109	" " "	CF	—	155	++
		CFE	—	149	++
F-51	" " "	CF	—	142	++
		CFE	—	155	++
F-110	" " "	CF	—	155	++
		CFE	—	154	++
F-114	" " "	CF	—	155	++
		CFE	—	163	++
F-115	" " "	CF	—	142	++
		CFE	—	152	++
F-117	" " "	CF	—	142	++
		CFE	—	155	++
G-12	" " "	CF	—	156	++
		CFE	—	152	++
G-119	" " "	CF	—	150	++
		CFE	—	154	++
G-120	" " "	CF	—	154	++
		CFE	—	154	++
G-121	" " "	CF	—	150	++
		CFE	—	155	++
G-122	" " "	CF	—	150	++
		CFE	—	152	++
対照	ハブ粗毒 2μg			155	++

表1-3. 微生物産生物質の酵素阻害作用および抗ハブ毒作用.

菌株No.	菌 株 名	酵素阻害活性		in vitro	
		パピイン	ハブ毒 プロテアーゼ	腫脹率	筋肉出血
G-126	<i>Aspergillus awamori</i> SP	CF	—	152	++ ++
		CFE	+	158	++ ++
G-128	" " "	CF	—	153	++ ++
		CFE	—	148	++ ++
3301	<i>Penicillium notatum</i>	CF	—	148	++ ++
		CFE	—	150	++ ++
3303	" <i>variabel</i>	CF	—	145	++ ++
		CFE	—	150	++ ++
3304	" <i>citrinum</i>	CF	—	147	++ ++
		CFE	—	153	++ ++
3305	" <i>nigricans</i>	CF	—	151	++ ++
		CFE	—	150	++ ++
3050	<i>Rhizopus oryzae</i>	CF	—	149	++ ++
		CFE	—	149	++ ++
3051	" <i>chinensis</i>	CF	—	149	++ ++
		CFE	—	145	++ ++
3054	" <i>javanicus</i>	CF	—	147	++ ++
		CFE	—	145	++ ++
3055	" <i>usamii</i>	CF	—	149	++ ++
		CFE	—	149	++ ++
3056	" <i>oryzae</i>	CF	—	147	++ ++
		CFE	—	148	++ ++
3057	" <i>niger</i>	CF	—	143	++ ++
		CFE	+	151	++ ++
3058	" <i>delemar</i>	CF	—	150	++ ++
		CFE	—	160	++ ++
3059	" <i>peika</i>	CF	—	151	++ ++
		CFE	—	149	++ ++
3060	" <i>delemar</i>	CF	—	153	++ ++
		CFE	—	155	++ ++
3063	" <i>javanicus</i>	CF	—	151	++ ++
		CFE	—	152	++ ++
3021	<i>Mucor javanicus</i>	CF	—	166	++ ++
		CFE	—	152	++ ++
3600	<i>Trichoderma viride persex</i> F	CF	—	154	++ ++
		CFE	—	155	++ ++
3604	" No. 353	CF	—	155	++ ++
		CFE	—	157	++ ++
3450	<i>Neurospora sitophila</i>	CF	—	149	++ ++
		CFE	—	153	++ ++
3451	" <i>crassa</i>	CF	—	156	++ ++
		CFE	—	155	++ ++
3403	<i>Monascus</i> IA	CF	—	158	++ ++
		CFE	—	153	++ ++
3705	<i>Gibberella fujukuroi</i>	CF	—	155	++ ++
		CFE	—	158	++ ++
対照	ハブ粗毒 2 μ g			155	++ ++

表2. 微生物産生物質の酵素阻害作用および抗ハブ毒作用.

菌株No.	菌株名	酵素阻害活性		in vitro	
		パパイヤ	ハブ毒 プロテアーゼ	腫脹率	筋肉出血
1520	<i>Mycobacterium avium</i>	CF	—	150	++
		CFE	+	154	++
1521	"	CF	—	163	++
		CFE	+	145	++
1531	<i>Nocardia corallina</i>	CF	—	153	++
		CFE	+	150	++
1532	<i>" asteroides</i>	CF	—	144	++
		CFE	—	142	++
1540	<i>Actinomyces auranticus</i>	CF	—	150	++
		CFE	+	153	++
1562	<i>Streptomyces griseus</i>	CF	—	153	++
		CFE	—	150	++
1563	<i>" albus</i>	CF	—	158	++
		CFE	+	159	++
1564	<i>" olivaceus</i>	CF	—	145	++
		CFE	—	145	++
1567	<i>" griseus</i>	CF	—	147	++
		CFE	—	150	++
1571	<i>" aureus</i>	CF	—	148	++
		CFE	+	148	—
1573	<i>" flavus</i>	CF	—	142	++
		CFE	+	143	++
1574	<i>" halstedii</i>	CF	—	155	++
		CFE	+	152	++
対照	ハブ粗毒 2 μ g			155	++

表3. 微生物由来蛋白質分解酵素阻害剤の in vitroでの腫脹作用及び出血作用におよぼす効果.

検体名	腫脹率	筋肉出血
MK-I ¹⁾	152	++
Thiolstatin ¹⁾	153	++
S-SI ¹⁾	155	++
S-MPI ¹⁾	151	++
対照	155	++

表4. 微生物由来蛋白質分解酵素阻害剤の in vivoでの腫脹作用及び出血作用におよぼす効果.

検体名	腫脹率	筋肉出血
MK-I ¹⁾	150	+++
Thiolstatin ¹⁾	145	+++
S-SI ¹⁾	151	+++
S-MPI ¹⁾	150	+++
S-PI ²⁾	150	+++
MAPI ²⁾	146	+++
対照	155	+++

1) 0.4 mg/ml, 0.01 M KPB, PH 7.0を使用した。
阻害効果試験には1群2匹のマウスを使用した。

1) 0.4 mg/ml, 0.01 M KPB, PH 7.0を使用した。
2) 1.0 mg/ml, 50% DMSOを使用した。
阻害効果試験には1群3匹のマウスを使用した。

市販の微生物由来プロテアーゼ阻害剤である Elastinal、E-64、Leupeptin、Pepstatin、Chymostatin 及び Antipain について抗ハブ毒作用を調べた。(表-5)

いずれの阻害剤も *in vivo* で抗腫脹作用及び抗出血作用が見られなかった。

表 5. 微生物由来蛋白質分解酵素阻害剤の *in vivo* での腫脹作用及び出血作用におよぼす効果.

検 体 名	腫脹率	筋肉出血
Elastinal	140	++ +
E-64	138	++ +
Leupeptin	144	++ +
Pepstatin	140	++ +
Chymostatin	142	++ +
Antipain	138	++ +
対 照	155	++ +

阻害剤はすべて DMSO に溶解し、 5×10^{-5} M の濃度を使用した。

阻害効果試験には 1 群 3 匹のマウスを使用した。

今回行った微生物産生物質から抗ハブ毒作用をもつ物質を探索するための *in vitro* のスクリーニングにより *Streptomyces aureus* の菌体抽出成分が抗出血作用をもつことがわかった。

今後、本菌体の菌体抽出液について *in vivo* の実験を行い、抗出血作用活性を確かめる必要がある。

2. 植物抽出成分の抗出血作用

今回 31 種類の植物についてマウスの足蹠と後肢筋肉での抗出血作用を調べた。表 6-1 ~ 表 6-4 に示すように *in vivo* でソウシジュ枝 (DMSO)、サンゴジュ (水溶部)、ゲットウ葉 (DMSO) およびシチヘンゲ葉 (DMSO) に抗出血作用が認められただけで期待されたような抗ハブ毒成分を持つ植物は見つからなかった。しかもこれら 4 種の植物成分の様に *in vivo* で抗ハブ毒作用を持つと認められる検体でも被検マウスの全身症状悪化 (検体投与による副作用と思われる) がある場合はハブ毒に対して応答不良が考えられ、見かけだけの

抗毒効果を示す可能性も考えられる。この場合には植物中の抗ハブ毒成分と毒成分を分離し、それぞれの活性をチェックする必要があると思われる。

3. マウス毒性試験

抗ハブ毒作用試験中にマウスが死亡することから幾種類かの植物には毒成分が含まれることが予想されたのでマウス毒性試験を行なったところ表 7-1 ~ 表 7-2 に示すように 31 種類中 23 種類の植物にマウス毒性が認められた。

<強い毒性が確認された植物>

水 溶 部

ギシギシ葉、ハマボッス葉・実、コバナヒメハギ全、イジュ枝、ソクズ葉・枝、オモト茎などがある。

EtOAc 部

キダチハマグルマ茎、センダン葉・茎、ソウシジュ葉、ツワブキ葉・茎、ホソバワダン全、サンゴジュ葉・実、ソクズ葉・枝・花、ゲットウ茎、タビオカ葉・茎、オモト葉・茎、クロツグ葉、ボタンウキグサ根、ハママンネングサ全、レイシ葉、シチヘンゲ葉などがある。

4. 魚毒試験

表 8-1 ~ 表 8-2 にグッピーに対する毒性の結果を示した。

<魚毒性のある植物>

水 溶 部

ギシギシ茎・実、アフリカハウセンカ茎、メヒルギ葉・茎・実、ノボタン葉・茎、オヒルギ・茎・実・ハマボッス葉・茎・実、イジュ葉・枝・花、ソウシジュ葉、ハウロクイチゴ葉、ツルグミ茎、サンダンカ葉、サンゴジュ葉・枝・実、ゲットウ葉・実、オモト茎、チョウセンアサガオ全、ボタンウキグサ葉、ハママンネングサ全、レイシ葉に毒性が認められた。又、ホソバワダンとオモト葉に弱い毒性が確認された。

EtOAc 部

ギシギシ実、キダチハマグルマ葉・茎、ノボタン葉、オヒルギ葉、コバナヒメハギ全、イジュ葉・花、ソウシジュ葉、キダチアサガオ葉、サンダンカ葉、サンゴジュ葉、ゲットウ葉・実、オモト茎、レイシ葉、シチヘンゲ葉に毒性が確認された。又、キジキジ茎、メヒルギ茎、イジュ枝、ハマユウ全、

ワブギ葉、ゲットウ茎、オモト葉に弱い毒性が認められた。

毒性の比較

表7-1～表7-2にマウスに対する毒性と魚に対する毒性の結果を示した。

マウス、グッピーともに毒性を示したものには以下のような植物がある。

水 溶 部

ヒルギ実、ハマボス茎・実、イジュ枝、サンゴジュ枝、オモト茎。

EtOAc 部

ギンギシ実、キダチハマグルマ茎、オヒルギ葉、ソウシジュ葉、サンゴジュ葉、ゲットウ葉・実、オモト茎、レイシ葉、シチヘンゲ葉。

<マウスにだけ強い毒性を示した植物>

水 溶 部

ギンギシ葉、コバナヒメハギ全、ソクス葉・茎がある。

EtOAc 部

センダン葉・茎、ツワブキ茎、ホソバワダン全、サンゴジュ実、ソクス葉・花、タピオカ葉がある。

表6-1. 抗出血活性と毒性.

サンプル名	足蹠出血	筋肉出血	生・死
1. P B S	++	++	2 生
2. D M S O	++	++	2 生
3. 馬血清	—	—	2 生
4. ギシギシ葉 W	++	++	2 死
5. 茎	++	++	2 生
6. 実	++	++	2 生
7. アフリカホウセンカ葉	++	++	2 生
8. 茎	++	++	2 生
9. キダチハマグルマ葉	++	++	2 生
10. 茎	++	++	2 生
11. メヒルギ葉	++	++	2 生
12. 茎	++	++	2 生
13. 実	+	+	1 死
14. ノボタン葉	++	++	2 生
15. 茎	++	++	2 生
16. オヒルギ葉	++	++	2 生
17. 茎	++	++	2 生
18. 実	++	++	2 生
19. ハマボックス葉	++	++	2 死
20. 茎	++	++	2 生
21. 実	++	++	2 死
22. コバナヒメハギ全	++	++	2 死
23. イジユ葉	++	++	2 生
24. 枝	++	++	2 死
25. 花	++	++	2 生
26. センダン葉	++	++	2 生
27. 茎	++	++	2 生
28. ソウシジュ葉	++	++	2 生
29. 枝	++	++	2 生
30. 実	++	++	2 生
31. キダチアサガオ葉	++	++	2 生
32. 茎	++	++	2 生
33. シマニシキソウ全	++	++	2 生
34. ホウロクイチゴ葉	++	++	2 生
35. 茎	++	++	2 生
36. ツルマオ葉	++	++	2 生
37. 茎	++	++	2 生
38. ツルグマ葉	++	++	2 生
39. 茎	++	++	2 生
40. サンダンカ葉	++	++	2 生
41. ハマユウ全	++	++	2 生

W：水溶部、全：葉、茎、実の全部。

全体に出血あり ++、一部分に出血あり +、出血なし —。

毒性試験には1群2匹のマウスを使用した。

表6-2. 抗出血活性と毒性.

サンプル名	足蹠出血	筋肉出血	生・死
42. P B S	++ ++	++ ++	2 生
43. D M S O	++ ++	++ ++	2 生
44. 馬血清	- -	- -	2 生
45. ギシギシ葉 D M S O	++	++	1 死
46. 茎	++ ++	++ ++	2 生
47. 実	++	++	1 死
48. アフリカホウセンカ葉	++ ++	++ ++	2 生
49. 茎	++ ++	++ ++	2 生
50. キダチハマグルマ葉	++ ++	++ ++	2 生
51. 茎	++ ++	++ ++	2 死
52. メヒルギ葉	++ ++	++ ++	2 生
53. 茎	++ ++	++ ++	2 生
54. 実	++ ++	++ ++	2 生
55. ノボタン葉	++ ++	++ ++	2 生
56. 茎	++ ++	++ ++	2 生
57. オヒルギ葉	++	++	1 死
58. 茎	++	++	1 死
59. 実	++	++	1 死
60. ハマボッサ葉	++ ++	++ ++	2 生
61. 茎	++ ++	++ ++	2 生
62. 実	++ ++	++ ++	2 生
63. コバナヒメハギ全	++ ++	++ ++	2 生
64. イジュ葉	++ ++	++ ++	2 生
65. 枝	++ ++	++ ++	2 生
66. 花	++ ++	++ ++	2 生
67. センダン葉	++ ++	++ ++	2 死
68. 茎	++ ++	++ ++	2 死
69. ソウシジュ葉	++ ++	++ ++	2 死
70. 枝	++ ++	++ ++	2 生
71. 実	++ ++	++ ++	2 生
72. キダチアサガオ葉	++ ++	++ ++	2 生
73. 茎	++ ++	++ ++	2 生
74. シマニシキソウ全	++ ++	++ ++	2 生
75. ホウロクイチゴ葉	++ ++	++ ++	2 生
76. 茎	++ ++	++ ++	2 生
77. ツルマオ葉	++ ++	++ ++	2 生
78. 茎	++ ++	++ ++	2 生
79. ツルグマ葉	++ ++	++ ++	2 生
80. 茎	++ ++	++ ++	2 生
81. サンダンカ葉	++ ++	++ ++	2 生
82. ハマユウ全	++ ++	++ ++	2 生

全：葉、茎、実の全部.

全体に出血あり ++、一部分に出血あり +、出血なし -.

毒性試験には1群2匹のマウスを使用した.

表6-3. 抗出血活性と毒性.

サンプル名	足蹠出血	筋肉出血	生・死
1. P B S	++	++	2 生
2. D M S O	++	++	2 生
3. 馬血清	—	—	2 生
4. ツワブキ葉 W	++	++	2 生
5. 茎	++	++	2 生
6. ホソバワダン全	++	++	2 生
7. サongoジュ葉	++	++	2 生
8. 枝	+	—	1 死
9. 実	++	++	2 生
10. ソクズ葉			2 死
11. 枝			2 死
12. 花	++	++	2 生
13. ゲットウ葉	++	++	2 生
14. 茎	+	+	1 死
15. 実	++	++	2 生
16. タピオカ葉	++	++	2 生
17. 茎	++	++	2 生
18. オモト葉	++	++	2 生
19. 茎			2 死
20. クロツグ葉	++	++	2 生
21. チョウセンアサガオ全	++	++	2 生
22. ボタンウキクサ葉	++	++	2 生
23. 根	++	++	2 生
24. ハママンネングサ全	++	++	2 生
25. レイシ葉	++	++	2 生
26. シチヘンゲ葉	++	++	2 生
27. 茎	++	++	2 生

W：水溶部、全：葉、茎、実の全部。

全体に出血あり ++、一部分に出血あり +、出血なし —。

毒性試験には1群2匹のマウスを使用した。

表6-4. 抗出血活性と毒性.

サンプル名	足蹠出血	筋肉出血	生・死
28. P B S	++	++	2 生
29. D M S O	++	++	2 生
30. 馬血清	--	--	2 生
31. ツワブキ葉 D M S O			2 死
32. 茎			2 死
33. ホソボワダン全			2 死
34. サongoジュ葉			2 死
35. 枝	+	+	1 死
36. 実			2 死
37. ソクズ葉			2 死
38. 枝			2 死
39. 花			2 死
40. ゲットウ葉	+	+	1 死
41. 茎			2 死
42. 実			2 死
43. タピオカ葉			2 死
44. 茎			2 死
45. オモト葉			2 死
46. 茎			2 死
47. クロツグ葉			2 死
48. チョウセンアサガオ全			2 死
49. ボタンウキグサ葉			2 死
50. 根			2 死
51. ハママンネングサ全			2 死
52. レイシ葉			2 死
53. シチヘンゲ葉			2 死
54. 茎	++	+ -	2 生

全：葉、茎、実の全部.

全体に出血あり ++、一部分に出血あり +、出血なし -.

毒性試験には1群2匹のマウスを使用した.

表7-1. 毒性試験 (水溶部).

サンプル名	マウス	魚 毒	サンプル名	マウス	魚 毒
ギ シ ギ シ 葉	++	-	ソ ウ シ ジ ュ 葉	-	+
茎	-	+	ツ ル グ ミ 茎	-	+
実	-	+	サ ン ダ ン カ 葉	-	±
アフリカホウセンカ茎	-	+	ホ ソ バ ワ ダ ン 全	-	+
メ ヒ ル ギ 葉	-	+	サ ン ゴ ジ ュ 葉	-	+
茎	-	+	枝	-	+
実	+	+	実	+	+
ノ ボ タ ン 葉	-	+	ソ ク ズ 葉	-	-
茎	-	+	茎	++	-
オ ヒ ル ギ 葉	-	+	ゲ ッ ト ウ 葉	++	+
茎	-	+	茎	+	-
実	-	+	実	-	+
ハ マ ボ ッ ス 葉	-	+	オ モ ト 葉	-	±
茎	-	+	茎	++	+
実	++	+	チ ョ ウ セ ン ア サ ガ オ 全	-	+
コバナヒメハギ全	++	-	ボ タ ン ウ キ グ サ 葉	-	+
イ ジ ュ 葉	-	+	ハ マ マ ン ネ ン グ サ 全	-	+
枝	++	+	ホ ウ ロ ク イ チ ゴ 葉	-	+
花	-	+	レ イ シ 葉	-	+

全：葉、茎、実の全部。

全部死亡 ++、一部死亡 +、生 - (マウス)。

毒性有り +、魚が弱っている ±、毒性なし - (魚)。

表7-2. 毒性試験 (EtOAc部).

サンプル名	マウス	魚 毒	サンプル名	マウス	魚 毒
ギ シ ギ シ 葉	+	-	サ ン ゴ ジ ュ 葉	++	+
茎	-	±	枝	+	-
実	++	+	実	++	-
ギダチハマグルマ葉	-	+	ソ ク ズ 葉	++	-
茎	++	+	茎	±	-
メ ヒ ル ギ 茎	-	±	花	++	-
ノ ボ タ ン 葉	-	+	ゲ ッ ト ウ 葉	++	+
オ ヒ ル ギ 葉	+	+	茎	++	±
茎	+	-	実	++	+
実	+	-	タ ピ オ カ 葉	++	-
コバナヒメハギ全	-	+	茎	+	-
イ ジ ュ 葉	-	+	オ モ ト 葉	++	±
枝	-	±	茎	++	+
花	-	+	ク ロ ツ グ 葉	±	-
セ ン ダ ン 葉	++	-	チョウセンアサガオ全	+	-
茎	++	-	ボタンウキグサ葉	+	-
ソウシジュ葉	++	+	根	+	-
キダチアサガオ葉	-	+	ハママンネングサ全	+	-
サンダンカ葉	-	+	ハウロクイチゴ葉	+	-
ハマユウ全	-	±	レ イ シ 葉	+	+
ツワブキ葉	+	±	シチヘンゲ葉	++	+
茎	++	-	茎	+	-
ホソバワダン全	++	-			

全：葉、茎、実の全部。

全部死亡 ++、一部死亡 +、生 - (マウス)。

毒性有り +、魚が弱っている ±、毒性なし - (魚)。

表8-1. 魚毒試験.

サンプル名	判定	サンプル名	判定
1. 蒸留水	—	40. D M S O	—
2. ギシギシ葉 W	—	41. ギシギシ葉 D M S O	—
3. 茎	+	42. 茎	±
4. 実	+	43. 実	+
5. アフリカハウセンカ葉	—	44. アフリカハウセンカ葉	—
6. 茎	+	45. 茎	—
7. キダチハマグルマ葉	—	46. キダチハマグルマ葉	+
8. 茎	—	47. 茎	+
9. メヒルギ葉	+	48. メヒルギ葉	—
10. 茎	+	49. 茎	±
11. 実	+	50. 実	—
12. ノボタン葉	+	51. ノボタン葉	+
13. 茎	+	52. 茎	—
14. オヒルギ葉	+	53. オヒルギ葉	+
15. 茎	+	54. 茎	—
16. 実	+	55. 実	—
17. ハマボッサ葉	+	56. ハマボッサ葉	—
18. 茎	+	57. 茎	—
19. 実	+	58. 実	—
20. コバナヒメハギ全	—	59. コバナヒメハギ全	+
21. イジユ葉	+	60. イジユ葉	+
22. 枝	+	61. 枝	±
23. 花	+	62. 花	+
24. センダン葉	—	63. センダン葉	—
25. 茎	—	64. 茎	—
26. ソウシジュ葉	+	65. ソウシジュ葉	+
27. 枝	—	66. 枝	—
28. 実	—	67. 実	—
29. キダチアサガオ葉	—	68. キダチアサガオ葉	+
30. 茎	—	69. 茎	—
31. シマニシキソウ全	—	70. シマニシキソウ全	—
32. ホウロクイチゴ葉	+	71. ホウロクイチゴ葉	—
33. 茎	—	72. 茎	—
34. ツルマオ葉	—	73. ツルマオ葉	—
35. 茎	—	74. 茎	—
36. ツルグミ葉	—	75. ツルグミ葉	—
37. 茎	+	76. 茎	—
38. サンダンカ葉	+	77. サンダンカ葉	+
39. ハマユウ全	—	78. ハマユウ全	±

W：水溶部、全：葉、茎、実の全部。

毒性有り +、魚が弱っている ±、毒性なし —。

表8-2. 魚毒試験.

サンプル名	判定	サンプル名	判定
1. 蒸留水	—	27. D M S O	—
2. ツワブキ葉 W	—	28. ツワブキ葉 D M S O	±
3. 茎	—	29. 茎	—
4. ホソバワダン全	±	30. ホソバワダン全	—
5. サongoジュ葉	+	31. サongoジュ葉	+
6. 枝	+	32. 枝	—
7. 実	+	33. 実	—
8. ソクズ葉	—	34. ソクズ葉	—
9. 枝	—	35. 枝	—
10. 花	—	36. 花	—
11. ゲットウ葉	+	37. ゲットウ葉	+
12. 茎	—	38. 茎	±
13. 実	+	39. 実	+
14. タピオカ葉	—	40. タピオカ葉	—
15. 茎	—	41. 茎	—
16. オモト葉	±	42. オモト葉	±
17. 茎	+	43. 茎	+
18. クロツグ葉	—	44. クロツグ葉	—
19. チョウセンアサガオ全	+	45. チョウセンアサガオ全	—
20. ボタンウキグサ葉	+	46. ボタンウキグサ葉	—
21. 根	—	47. 根	—
22. ハママンネングサ全	+	48. ハママンネングサ全	—
23. ホウロクイチゴ葉	+	49. ホウロクイチゴ葉	—
24. レイシ葉	+	50. レイシ葉	+
25. シチヘンゲ葉	—	51. シチヘンゲ葉	+
26. 茎	—	52. 茎	—

W：水溶部、全：茎、葉、実の全部。

毒性有り +、魚が弱っている ±、毒性なし —。

多くの研究者によって抗蛇毒作用をもつ物質が蛇類や蛇類の周辺に棲む動物の血清の中から分離されている。⁹⁻¹²⁾ 又、筆者らはマングースやアカマタ血清の中から抗出血因子を単離した。¹³⁻¹⁴⁾ これらはいずれもその動物が本来保有している物質で分子量が70,000前後のタンパク質である。今回、動物の血清以外から抗蛇毒作用をもつ物質を検索する目的で微生物産生物質や植物成分の

クリーニングを行った。

Bioassayなどの動物を用いた抗ハブ毒剤の検索には多くの実験動物を必要とし、実験実施には一定の限界があり、より効果的な *in vitro* の実験系を確立する必要がある。又、植物抽出成分をDMSOに溶解し、抗毒作用を測定するのが妥当かどうかなど今後、溶媒の選択を検討する必要がある。今回の抗ハブ毒剤検索の過程でマウスに

毒性を示すがグッピーには毒性を示さない植物を見つけだした。このことは動物種を変えるとその種に対する毒性も異なることを意味し、動物を用いた抗ハブ毒剤の検索には実験動物の選択も重要となろう。そして、これらのデータを積み重ねることにより今後、人間と周辺に生存している動物たちに対する毒性物質が明らかになることが期待される。又、今後、免疫グロブリン以外の治療薬が開発され、現在使用されている馬血清と併用すればハブ咬症の治療法は飛躍的に改善されるであろう。

本研究を実施するに当たり、貴重な試料を提供してくださいました大阪府立大学農学部、村尾澤夫教授ならびに植物を採集して下さいました琉球大学理学部大学院生松橋学氏に深謝申し上げます。

V 参考文献

- 1) Sawai Y., Makino M., Miyasaki S., Kawamura Y., Matsuhashi S., and Okonogi T., "Studies on the improvement of Habu Snake (*Trimeresurus flavoviridis*) bite. Antitoxic action of monocalcium disodium ethylenediamine tetraacetate on Habu venom". *Japan. J. Exp. Med.*, 31, 267 (1967)
- 2) 長谷川秀治、高橋金彌、"セファランチンによる毒蛇咬傷の治療"、最新医学、7巻6号、108 (1952)
- 3) 沢井芳男、牧野正顕、川村善治、"Glycyrrhizine(グリチルリチン)の抗ハブ毒作用について"、*Minophagen Medical Review*, 6, 78 (1961)
- 4) 沢井芳男、牧野正顕、川村善治、"テトラサイクリンの抗ハブ毒作用について(抄録)"、*日本細菌学雑誌*、16, 235 (1961)
- 5) 小此木丘、服部善八郎、"柿タンニンの抗蛇毒作用について"、*Snake*, 9, 91 (1978)
- 6) Jung-Hwn Seu and Sawai Y., "Effect of microbial venom proteinase inhibitory substance (ISV) on some enzymes in snake venoms". *Snake*, 13, 38 (1981)
- 7) 山川雅延、富原靖博、野崎真敏、昭和58年度抗毒素研究報告書
- 8) 河津一儀、"20魚毒植物に含まれる生理活性物質の単離"、天然有機化合物実験法、P290~302 (1987)
- 9) Omori-Satoh T., Sadahiro S., Ohsaka A. and Murata R., "Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flaviviridis* a crotalid", *Biochim. Biophys. Acta*, 285, 414 (1972)
- 10) Ovadia M., "Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera palaestinae*" *Toxicon*, 16, 661 (1978)
- 11) Menchaca J.M. and Perez J.C., "The Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*) serum".
- 12) Pichyangkul S. and Perez J.C., "Purification and characterization of a naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*)". *Toxicon*, 19, 205 (1981)
- 13) Tomihara Y., Yonaha K., Nozaki M., Yamakawa M., Kamura T. and Toyama S., "Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of *Herpastes edwardsii*" *Toxicon*, 25, 685 (1987)
- 14) Tomihara Y., Yonaha K., Nozaki M., Yamakawa M., Kamura T., and Toyama S., "Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of *Dinodon semicarinatus*". *Toxicon*, 26, 420 (1988)