

## ハブ、マングースおよびアカマタ血清に関する研究

富原靖博・与那覇和雄<sup>1)</sup>・野崎真敏

Studies on the sera of *Trimeresurus flavoviridis*,  
*Herpestes edwardsii* and *Dinodon semicarinatus*

Yasuhiro TOMIHARA, Kazuo YONAHARA and Masatoshi NOZAKI

### Abstract

The sera of *T. flavoviridis*, *H. edwardsii* and *D. semicarinatus* neutralized the toxicity of the hemorrhagic venoms of various snakes of *T. flavoviridis*, *T. elegans*, *T. okinavensis*, *T. tokarensis*, *T. mucrosquamatus*, *T. purpureomaculatus* and *T. albolabris*. The lethal toxicity of *T. flavoviridis* venom was also neutralized by the serum of *T. flavoviridis*. But *T. flavoviridis* venom was not neutralized by the sera of *H. edwardsii* and *D. semicarinatus*. The antilethal factor was not separated from the serum of *T. flavoviridis*. Three antihemorrhagic factors of *H. edwardsii* and one of the same factor of *D. semicarinatus* were purified, respectively. Each of the purified antihemorrhagic factors showed a single band on polyacrylamide gel disc electrophoresis. The antihemorrhagic factors in the sera of *H. edwardsii* and *D. semicarinatus* were stable at the temperature ranging from 0 to 60 °C and at pH between 2.0 and 11.0. The molecular weights were calculated to be 69,000 and 52,000 for the antihemorrhagic factor of *H. edwardsii* and *D. semicarinatus*, respectively. None of precipitin line was found in the sera of both animals with the *T. flavoviridis* venom or its hemorrhagic principles, HR 1 and HR 2. The amino acid sequence of three antihemorrhagic factors were not significantly different. The sequence of *H. edwardsii* was not similar to that of *D. semicarinatus*.

### I はじめに

蛇毒の血清中には出血、致死、プロティナーゼ等の活性を阻害する因子が含まれていることが Rosenfeld (1940), philpot (1950, 1956), Deoras (1963), Bonnett (1971) 等により報告されている。一方八板ら (1967) はハブおよびアカマタ血清はハブ毒に対して抗毒作用を示すと報告し、又、Ovadia and Kochva (1977) はマングース血清は *Vipera palaestinae* 毒に対して抗毒作用を示すと報告している。木原ら (1977) は各種動物血清中の抗ハブ毒因子の分布を調べ、ハブ血清はハブ毒中のプロティナーゼ活性やハブ毒中の致死作用を阻害すると報告している。

多くの研究者によって抗出血作用をもつ物質が蛇類や蛇類の周辺に棲む動物の血清中から分離精

製されていて、これらは免疫グロブリンではなく、その動物が本来保有している物質であると報告している (Omori-Satoh et al., 1972; Ovadia, 1978; Menchaca, 1981; Pichyangkul, 1981)。又、筆者らはマングースおよびアカマタ血清中から抗出血因子を単離し報告した (富原ら 1987, 1988)。

今回、ハブ、マングースおよびアカマタ血清の抗毒作用について紹介し、免疫グロブリン以外の治療薬開発の話題の提供としたい。

### II 結果及び考察

1. ハブ、マングースおよびアカマタ血清の *in vitro* での各種出血毒にたいする抗出血作用  
いろいろな出血毒に対するハブ、マングースおよびアカマタ血清の抗毒作用を調べた (Table 1)。

<sup>1)</sup> 琉球大学農学部農芸化学科

Table 1. Neutralization of hemorrhagic and lethal toxicities of the venoms of various snake by sera of *Trimeresurus flavoviridis*, *Herpestes edwardsii* and *Dinodon semicarinatus* *in vitro*.

Venom (μg)	Serum					
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		<i>Herpestes edwardsii</i>		<i>Dinodon semicarinatus</i>	
	(A)*	(B)*	(A)*	(B)*	(A)*	(B)*
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (4)	—	7/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. elegans</i> (10)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. okinavensis</i> (10)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. tokarensis</i> (10)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. mucrosquamatus</i> (4)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. purpureomaculatus</i> (2)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>T. albolabris</i> (2)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Agkistrodon b. blomhoffi</i> (2)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>A. blomhoffi brevicaudus</i> (10)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>A. rhodostoma</i> (8)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>A. piscivorus</i> (10)	—	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>A. blomhoffi siniticus</i> (3)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>A. saxatilis</i> (12)	—	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>A. controx</i> (60)	—	0/8	+	0/8	+	0/8
<i>A. halys caucasicus</i> (8)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>A. acutus</i> (12)	—	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>A. caliginosus</i> (4)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Bothrops jararaca</i> (3)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>B. atrox</i> (12)	—	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>Crotalus h. horridus</i> (10)	—	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>C. v. viridis</i> (9)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Sistrurus militarius barbouri</i> (4)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Bitis a. arietans</i> (2)	+	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>Echis carinatus</i> (6)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Vipera r. russellii</i> (24)	—	0/8	+	0/8	+	0/8
<i>V. a. ammodytes</i> (9)	—	0/8	—	0/8	—	0/8
<i>Rhabdophis tigrinus</i> (40)	+	0/8	+	0/8	—	0/8
<i>Amphiesma pryeri</i> (30)	—	0/8	+	0/8	—	0/8

\*: Bleeding; ++, overall bleeding; +, partial bleeding; —, no bleeding.

\*: Number of surviving mice/Number of injected mice.

ハブ血清はパファダー (*Bitis a. arietans*) の毒をまったく阻害せず、又ヤマカカシ (*Rhabdophis tigrinus*) の毒を一部阻害した。それ以外の26種の出血毒を完全に阻害した。マングース血清はハブ (*T. flavoviridis*)、サキシマハブ (*T. elegans*)、ヒメハブ (*T. okinawensis*)、トカラハブ (*T. tokarenensis*)、タイワンハブ (*T. mucrosquamatus*)、マングローブハブ (*T. purpureomaculatus*)、シロクチハブ (*T. albolabris*)、ヘイチマムシ (*Agkistrodon b. blomhoffi*)、ニホンマムシ (*A. blomhoffi brevicaudus*)、マライマムシ (*A. rhodostoma*)、ヨウスコウマムシ (*A. blomhoffi siniticus*)、イランマムシ (*A. halys caucasicus*)、チョウセンマムシ (*A. caliginosus*)、ハララカハブ (*Bothrops jararaca*)、プレイリーガラガラヘビ (*C. v. viridis*)、セイブヒメガラガラヘビ (*Sistrurus militarius barbouri*)、エキスクサリヘビ (*Echis carinatus*)、およびヨーロッパスナクサリヘビ (*V. a. ammodytes*) の毒を完全に阻害した。しかしヌママムシ (*A. pisciborus*)、サンガクマムシ (*A. sacatilis*)、アメリカマムシ (*A. controx*)、ハッポダ (*A. acutus*)、ヨコシマガラガラヘビ (*Crotalus h. horridus*)、パファダー (*Bitis a. arietans*)、ラッセルクサリヘビ (インド) (*Vipera r. russellii*)、ヤマカカシ (*Rhabdophis tigrinus*) およびガラスヒバ (*Amphiesma pryeri*) の毒をまったく阻害せず、フェルドランス (*B. atrox*) の毒を一部阻害した。アカマタ血清はアメリカマムシ (*A. controx*) およびラッセルクサリヘビ (インド) (*Vipera r. russellii*) の毒をまったく阻害せず、それ以外の26種の出血毒を完全に阻害した。それらの毒に共通する活性基は何か、又、それらの毒を *in vitro* や *in vivo* で阻害するのに必要な動物血清の必要最少量などを調べることにより免疫グロブリン以外の治療薬の開発および毒蛇周辺に生息する動物の出血阻害のメカニズムを解明するのに新しい知見が得られるものと思われる。又、今回、調べた28種の出血毒の阻害作用に一定の規則性があるのかどうかを断定することができなかったが今後、もっと毒の種類を増やすことによりその問題も可能になるにちがいない。

2. ハブ、マングースおよびアカマタ血清の各種出血毒にたいする抗致死作用

ハブ血清は2LD<sub>50</sub>のハブ毒の致死作用を阻害したがその他の蛇毒の2LD<sub>50</sub>の毒量は阻害することができなかった。又、マングースおよびアカマタ血清は測定したどの蛇毒の2LD<sub>50</sub>の毒量も阻害することができなかった (Table 1)。

3. ハブ血清中の抗致死作用物質

ハブ血清は2LD<sub>50</sub>のハブ毒の致死作用を阻害したので筆者らは抗致死作用をもつ物質の単離精製にとりかかった。ハブ粗血清には抗致死作用が認められたがそれらをSephadex G-200で分画したピーク I, II, III, IVのいずれの画分 (粗血清より高濃度のタンパク量をもつ試料を調製) にも抗致死作用は認められなかった (Table 2 ; Fig 1)。又、それらの成分フラクションをハブ粗血清と同じような含有比に再構築したサンプルにも抗致死作用は認められなかった。抗致死作用をもつ物質が分離できなかった理由として考えられることは1つにはSephadex G-200に抗致死作用をもつ物質が bind として溶出されなかったためか、2つには抗致死作用は280 mμのタンパクの吸収をもたない物質が関与しているためか、3つにはマングース、アカマタ粗血清およびピーク IIIは抗出血作用は示すが、抗致死作用は示さないというデータから判断して抗致死作用と言うのは単純に抗出血作用と pararell なものではなく、又、各種の動物血清中から分離・精製された抗出血因子のような単一な因

Table 2. Neutralization of *T. flavoviridis* venom by serum of *T. flavoviridis*.

	No. surviving mice/ No. injected mice
Crude serum	7 / 8
Sephadex G-200	
Peak I	0 / 8
" II	0 / 8
" III	0 / 8
" IV	0 / 8
Sephadex G-200	
Peak I : Peak II	
Peak III : Peak IV	
= 2.5 : 3 : 1.5 : 2	0 / 8

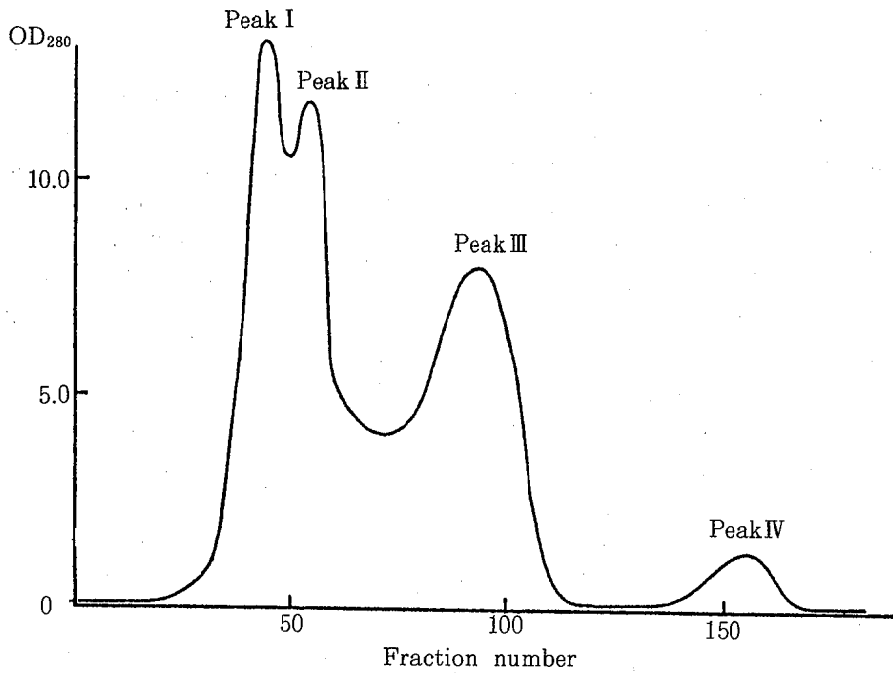


Fig.1. Sephadex G-200 Column Chromatography of the serum of *Trimeresurus flavoviridis*

The serum (1500 mg of protein per 15 ml) of *T. flavoviridis* was applied to a Sephadex G-200 column (3.3×70cm) equilibrated with 5 mM Tris- HCl buffer (pH 8.5) supplemented with 0.15 M NaCl. The column was developed with the same buffer and 4.2 ml fractions were collected at a flow rate of 40 ml/hr.

Table 3. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of *Herpestes edwardsii*.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude serum	1310	19,000	14.4	100.0
Sephadex G-200	460	12,500	27.2	65.8
1 st HPLC	70	9,500	135.7	50.0
2 nd HPLC	25	8,100	324.0	42.6
3 rd HPLC				
AHF- 1	5.8	2,500	431.0	13.2
AHF- 2	4.8	2,000	416.6	10.5
AHF- 3	5.0	1,900	380.0	10.0
4 th HPLC				
AHF- 1	2.1	2,000	952.4	10.5
AHF- 2	1.6	1,600	1000.0	8.4
AHF- 3	1.3	1,400	1076.9	7.4

AHF: Antihemorrhagic factor.

子でもなく、ハブ毒がひきおこす炎症を阻害する各種抗炎症因子などの相乗的な作用の結果のためか、以上3つの原因が考えられる。

今後の問題点として致死因子の有無や抗致死因子の存在についての研究が期待される。

4. ハブ血清中の抗出血因子

ハブ血清中の抗出血因子についてはすでにOmori-Satoh et al.(1972)は分子量70,000, 熱安定性0~55°CおよびpH安定性2~11であると報告している。

5. マングース血清中の3種の抗出血因子

マングース血清中の3種の抗出血因子をSephadex G-200 およびTSK-gel DEAE-5 PWを用いた高速液体クロマトグラフィーで約70倍に精製した(Table 3)。収率は約7%~10%であった。各種精製標品はポリアクリルアミドディスク電気泳動的に均一であった。各標品の分子量はゲル濾過法により65,000と求められた。またSDS-ディスク電気泳動により求められた分子量は69,000であることからマングース血清中の3種の抗出血因子は単一のサブユニットから構成されていることがわかった。各精製抗出血因子はハブ毒の出血因子であるHR 1およびHR 2の出血毒作用を阻害した。精製抗出血因子は60°Cまで安定であり、また、pH 2~11で安定であった。ハブ毒との間に沈降反応が認められないことからそれらの因子はイムノグロブリンではなくその動物が本来保有している物質であることがわかった。

6. アカマタ血清中の抗出血因子

アカマタ血清中の抗出血因子をTSK-gel DEAE-5 PWを用いた高速液体クロマトグラフィーで約30

倍に精製した (Table 4)。収率は2.3%であった。精製標品はポリアクリルアミドディスク電気泳動的に均一であった。精製標品の分子量はゲル濾過法により59,000と求められた。またSDS-ディスク電気泳動により求められた分子量は52,000であることからアカマタ血清中の抗出血因子は単一のサブユニットから構成されていることがわかった。精製抗出血因子はハブ毒の出血因子であるHR 1およびHR 2の出血毒作用を阻害した。精製抗出血因子は60°Cまで安定であり、また、pH 2~11で安定であった。

7. マングースおよびアカマタ血清中の抗出血因子と他の抗出血因子との比較

ハブ血清中の抗出血因子, *Vipera palaestinae* 血清中の抗出血因子, フクロネズミ血清中の抗出血因子, コットンラット血清中の抗出血因子などについてはすでに報告されている (Table 5)。熱安定性に関してはマングースおよびアカマタ血清中の抗出血因子はハブおよびコットンラット血清中の抗出血因子と同様に0~55°Cで安定であった。pH安定性に関してはハブ血清中の抗出血因子と同様にpH 2~11で安定であった。分子量に関してはマングース血清中の抗出血因子はハブおよびフクロネズミ血清中の抗出血因子と類似した分子量(≒70,000)が得られたが、アカマタ血清中の抗出血因子は他のいずれの血清中の抗出血因子の分子量よりも小さい値を得た。

8. マングースおよびアカマタ血清中の抗出血因子アミノ酸組成

マングース血清中から分離された3種の抗出血

Table 4. Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of the nonvenomous snake *Dinodon semicarinatus*.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude serum	2,700	7,500	2.8	100.0
1st HPLC	570	5,100	8.9	68.0
2nd HPLC	70	2,500	35.7	33.3
3rd HPLC	25	1,250	50.0	16.7
4th HPLC	5	370	74.0	4.9
5th HPLC	2	170	85.0	2.3

Table 5. A comparison of isolated antihemorrhagic factors.

Animals	Characteristics		
	Thermo stability	pH stability	Molecular weight
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (Omori-Satoh et al 1972)	0 - 55°C	2 - 11	70,000
<i>Vipera palaestinae</i> (Ovadia, 1978)	0 - 85°C	4 - 9.5	80,000
<i>Sigmondon hispidis</i> (Pichyangul and Perez 1981)	0 - 55°C	3 - 10	90,000
<i>Didelphis virginiana</i> (Menchaca and Perez 1981)	0 - 37°C	3 - 10	68,000
<i>Herpestes edwardsii</i> (Tomihara et al 1987)	0 - 60°C	2 - 11	69,000
<i>Dinodon semicarinatus</i> (Tomihara et al 1988)	0 - 60°C	2 - 11	52,000

Table 6. Amino acid composition of *Herpestes edwardsii* and *Dinodon semicarinatus*.

Amino acid	Number of residues			
	<i>Herpestes edwardsii</i>			<i>Dinodon semicarinatus</i> AHF
	AHF-1	AHF-2	AHF-3	
Asp	52	51	46	47
Thr	42	40	42	21
Ser	39	36	37	31
Glu	74	75	77	59
Pro	67	70	72	28
Gly	71	68	70	67
Ala	48	51	49	34
Val	56	53	55	28
Met	10	8	9	4
Ile	12	11	12	20
Leu	72	70	73	30
Tyr	17	17	16	13
Phe	28	29	25	12
His	12	12	13	38
Lys	15	14	14	33
Arg	42	41	42	16
Cys	10	10	10	8
Trp	—	—	—	—

AHF : Antihemorrhagic factor.

因子 (AHF-1, AHF-2, AHF-3) のアミノ酸組成を (Table 6) に示した。いずれの標品もアスパラギン酸, スレオニン, セリン, グルタミン酸, プロリン, グリシン, アラニン, バリン, ロイシン, フェニールアラニンおよびアルギニンの含量が多く, メチオニン, イソロイシン, チロシン, ヒスチジン, リジンおよびシステインの含量が少なくトリプトファンは確認されなかった。今回のアミノ酸組成のデータから判断してこれら3種の抗出血因子のアミノ酸組成はほとんど同一であった。

アカマタ血清中から分離された抗出血因子 (AHF) のアミノ酸組成を (Table 6) に示した。アスパラギン酸, スレオニン, セリン, グルタミン酸, プロリン, グリシン, アラニン, バリン, イソロイシン, ロイシン, ヒスチジンおよびリジンの含量が多く, メチオニン, チロシン, フェニールアラニン, アルギニンおよびシステインの含量が少なく, トリプトファンは確認されなかった。

マングースとアカマタ由来の抗出血因子のアミノ酸組成を比較した場合, アカマタはマングースにくらべてスレオニン, プロリン, バリン, ロイシン, フェニールアラニンおよびアルギニンの含量が少なくイソロイシン, ヒスチジンおよびリジンの含量が多かった。又, リジンとアルギニンの含有量の比に大きなちがいが見られた。以上の結果からマングースおよびアカマタ由来の抗出血因子のアミノ酸組成に類似性は認められなかった。

今後の問題点としてマングースおよびアカマタ血清中の抗出血因子の一次構造の決定およびハブ毒を阻害する活性基の決定などが残されている。これらの抗出血因子が臨床面でハブ咬症患者の治療に応用されることが期待される。

### III 参考文献

Bonnett, D. E. and Guttman, S. I. (1971) Inhibition of Moccasin venom proteolytic activity by the serum of the Florida King snake. *Toxicon*, 9:417-425.  
 Deoras, P. J. and Mhasalka, V. B. (1963) Antivenine activity of some snake sera. *Toxicon*, 1:89-90.

木原大, 松田貞幸, 八板宗哉 (1977) 各種血清中のハブ毒因子の分布. *The Snake* 8:115-120.  
 Menchaca, J. M. and Perez, J. C. (1981) The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*). *Toxicon*, 19:623-632.  
 Omori-Satoh, T., Sadahiro, S., Ohsaka, A. and Murata, R. (1972) Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 285:414-426.  
 Ovadia, M. (1978) Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera palaestinae*. *Toxicon*, 16:661-672.  
 ——— and Kochva, E. (1977) Neutralization of *Viperidae* and *Elapidae* snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, 15, 541-547.  
 Philpot, V. B. and Deutsch, H. F. (1956) Inhibition and activation of venom proteases. *Biochim. Biophys. Acta*, 21:524-530.  
 ——— and Smith, R. G. (1950) Neutralization of *Pit Viper* venom by King snake serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 74:521-523.  
 Pichyangkul, S. and Perez, J. C. (1981) Purification and characterization of naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Toxicon*, 19:205-215.  
 Rosenfeld, S. and Glass, S. (1940) The inhibiting effect of snake bloods upon the hemorrhagic action of viper venoms on mice. *Amer. J. Med. Sci.*, 199:482-486.  
 Tomihara Y., Kawamura Y., Yonaha K., Nozaki M., Yamakawa M. and Yoshida C. (1990) Neutralization of hemorrhagic snake venoms by sea of *Trimeresurus flavoviridis*, *Herpestes edwardsii* and *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon* 28:989-991.  
 ———, Yonaha K., Nozaki M., Kamura T.

and Toyama S. (1987) Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of *Herpestes edwardsii*. *Toxicon* 25 : 685-689.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, Yamakawa M., Kamura T. and Toyama S. (1988) Purification of an antihemorrhagic factor from the

serum of *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon* 26 : 420-423.

八坂宗哉, 萩原直子 (1967) 無毒蛇ならびにハブ体中の抗ハブ毒物質に関する研究, (その2) 毒蛇ならびに無毒蛇血清の抗ハブ毒作用. 鹿大医誌, 18 : 973-976.