

シマリス血清中の抗出血因子の精製

野崎真敏・富原靖博

The Purification of an Antihemorrhagic Factor in the Serum of the Siberian Chipmunk (*Tamias sibiricus*)

Masatoshi NOZAKI and Yasuhiro TOMIHARA

Abstract

Many investigators have reported that both venomous and nonvenomous snakes were resistant to snake venoms. In addition antihemorrhagic factors have already been purified from the serum of the venomous snake Habu (*Trimeresurus flavoviridis*), non-venomous snake Akamata (*Dinodon semicarinatus*) and others.

A remarkable resistance to the snake venoms have also been observed in several species of mammals, and antihemorrhagic factors have already been purified from the serum of Cotton Rat (*Sigmdon hispidus*), Manguse (*Herpestes edwardsii*) and others.

We are studying antihemorrhagic factors of various kind of animals in order to improve methodology of treatment of snakebite and other hemorrhagic diseases, and recently found that Siberian Chipmunk (*Tamias sibiricus*) serum was remarkably resistant to snake venom.

This paper reports the purification of an antihemorrhagic factor of Siberian Chipmunk serum.

An antihemorrhagic factor in the serum of Siberian Chipmunk was purified by combining used of gel filtration on Sephadex G-200 (3×70cm), high performance liquid chromatography (HPLC) on Protein pak G-DEAE (8.2×75mm) and Protein pak 300 (7.8×300mm)×2.

The antihemorrhagic activity of the final product increased to 25.82 times as that of the original crude serum. It's antihemorrhagic potency was approx. 30 times higher than that of antivenom used in snakebite treatment.

A yield of final product was approx. 12%.

The molecular weight of an antihemorrhagic factor was estimated to be approx. 235,000 by gel filtration on Protein pak 300 (7.8×300mm)×2. It was approx. 3 times larger than those of ready purified Habu, Akamata, Manguse and others.

I はじめに

ハブ自身の血液の中にはハブ毒を非常によく中和する成分が含まれているため、お互いに咬み合ってもハブ咬症特有の症状を示すことは殆どない。佐藤(1982)はハブの血液中の抗毒蛇因子の精製を行い、分離された抗毒蛇因子は分子量=約70,000, 等電点=約4の

酸性蛋白で、免疫グロブリンではなく、毒蛇の出血作用を非常によく中和する天然の抗出血因子であることを明らかにした。最近では同様な物質が他の有毒蛇(Ovadia, 1978)や無毒蛇(Tomihara, 1988)はもちろん、マングース(Tomihara, 1988)、コットンラットなどの哺乳動物(Pichyangkul, 1981; Menchaca,

1981) からも次々に分離されている。

著者等は抗毒素以外のハブ咬症治療薬の開発を目的にいろいろな動物の抗ハブ毒作用を検索中であるが、スクリーニングテストの結果、シマリスの血液の中に強い抗出血作用を認めたのでその精製を行った。

II 方法

1. 採血

クロロホルムで深麻酔したシマリス (*Tamias sibericus*) から心臓穿刺法で採血を行った。10匹分の血液20mlから血清10mlが分離された。

2. 血清の精製

Sephadex G-200 (3×70 cm) によるゲル濾過、Protein pak G-DEAE (8.2×75 mm)、Protein pak 300 (7.8×300mm)×2本による高速液クロ (HPLC) で順次精製を行った。

HPLCにはウォーターズ全自動セミ分取システム (302システム構成) を使用した。

3. 抗体価の測定

生物学的製剤基準 (厚生省, 1985) に基づいて抗HR-1価を測定した。標準抗毒素と試験毒素は沖縄ハブ毒で作った自家製のものを使用した。

4. 蛋白量の測定

蛋白濃度は分光光度計で280mμの吸光度を測定し、シマリス血清mg/ml=1.25 OD₂₈₀として計算した。

III 結果

1. Sephadex G-200 による精製

まずSephadex G-200 (ゲルベット:3×70 cm) を用いてゲル濾過を行った。図1にその結果を示す。

fra-1はマクログロブリン、fra-2はグロブリン、fra-3はアルブミンに相当するピークであるが、抗出血作用はfra-2 tube No.45~60のグロブリン画分に含まれていた。

すでに分離されているハブやマンガース血

清の抗出血因子はfra-3のアルブミン画分に溶出されるので、シマリス血清の抗出血因子は分子量がそれより数倍大きいことになる。

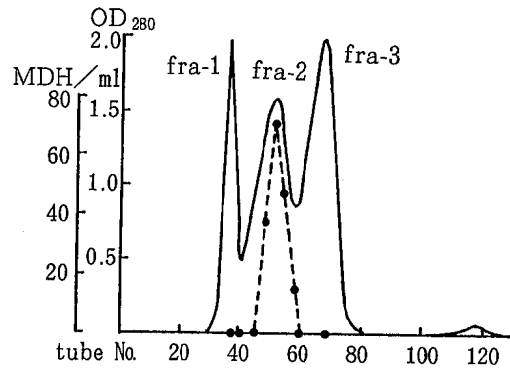


図1. Sephadex G-200によるシマリス血清の精製
 Sample: シマリス血清: 5.0 ml
 Column: Sephadex G-200 3.0×70 cm
 Buffer: 5mM, pH=8.5 tris-HCl(0.15M NaCl)
 15 ml/hour, 5 ml/tube

2. Protein pak G-DEAEによる精製

Sephadex G-200のfra-2画分は、メンブランフィルター分子量10,000カットを用いて限外濾過濃縮後、イオン交換用カラム Protein pak G-DEAE (8.2×75 mm) を用いて液クロ

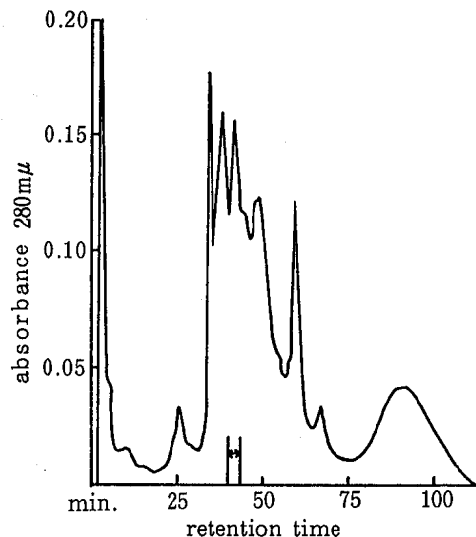


図2. シマリス血清のHPLC (イオン交換)
 Sample: Sepha. G-200, 200 μl (4.6 mg)
 Column: Protein pak G-DEAE 8.2×75 mm
 BufferA: 20mM, pH=5.3 Acetate
 BufferB: A+0.5M NaCl
 0 → 5 min: A100%
 5 → 100 min: B: 100% (linear gradient)

(HPLC) を行った。図2にその結果を示す。

溶出する順に fra-1 ~ 8 とすると、抗出血作用は fra-4 (retention time : 40.0~43.5) に含まれていた。同様な実験を5回行い fra-4 を pool して以下の実験に供した。

3. Protein pak G-DEAE による再精製

Protein pak G-DEAE で得られた抗出血画分は、前回と同様にメンブランフィルター分子量10,000 カットで限外濾過濃縮した後、Protein pak G-DEAE で再クロマトを行った。溶出は前回と同じく0.02M, 5.3 Acetate buffer を用いたが、分離をよくするためにグラジェントのスロープを前回より緩やかにした。

図3にその結果を示したが、左右対象のシングルピークでかなり高純度に精製されていることが確認された。

retention time : 39~46 を採取しゲル濾過法で更に精製をおこなった。

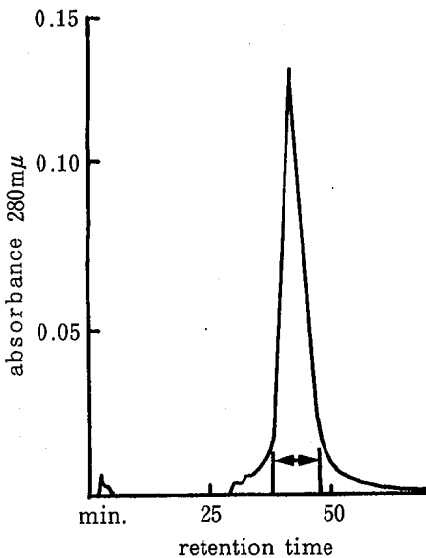


図3. シマリス血清のHPLC (再クロマト)
 Sample : Protein pak G-DEAE fra-4, 150 μ (1.0mg)
 Column : Protein pak G-DEAE 8.2 × 75mm
 BufferA : 20mM, pH=5.3 Acetate
 BufferB : A+0.5M NaCl
 Flow : 1.0ml/min
 0→60min : B (linear gradient)

4. Protein pak 300 による精製

Protein pak G-DEAE の再クロマトで得られた抗出血画分は、限外濾過濃縮した後ゲル濾過用カラム Protein pak 300 (7.8×300mm) を2本接続してHPLCを行った。図4にその結果を示したが、イオン交換法ではシングルピークであったにもかかわらず、ゲル濾過法では分子サイズの異なる大小5つのピークに分離された。

抗出血作用を示す retention time : 13.5 ~ 14.7 を採取し、純度のチェックと分子量の測定を行った。

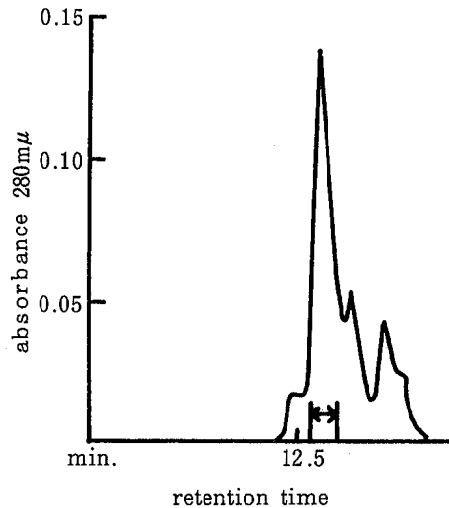


図4. シマリス血清のHPLC (ゲル濾過)
 Sample : Protein pak G-DEAE fra-4, 25 μ (1mg)
 Column : Protein pak 300 (7.8×300mm) × 2
 Buffer : 10mM, pH=7.0 phosphate+0.2 M NaCl
 Flow : 1.0ml/min

5. Protein pak 300 による再クロマト

Protein pak 300 × 2 によるゲル濾過によって得られた抗出血画分は限外濾過濃縮後、前回と同じ条件で再クロマトを行った。

図5にその結果を示すが、左右対象のシングルピークで高純度に精製されていることが確認された。

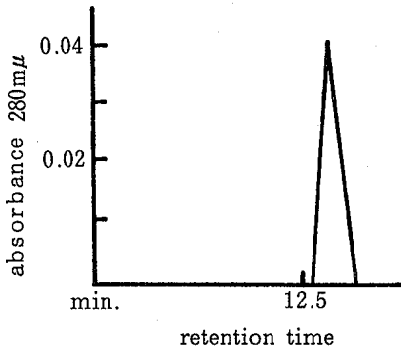


図5. シマリス血清のHPLC (再クロマト)
 Sample : Protein pak 300×2 main peak,
 20 μl(200 μg)
 Column : Protein pak 300 (7.8×300mm) ×2
 Buffer : 10mM, pH=7.0, phosphate+0.2M NaCl
 Flow : 1.0ml/min

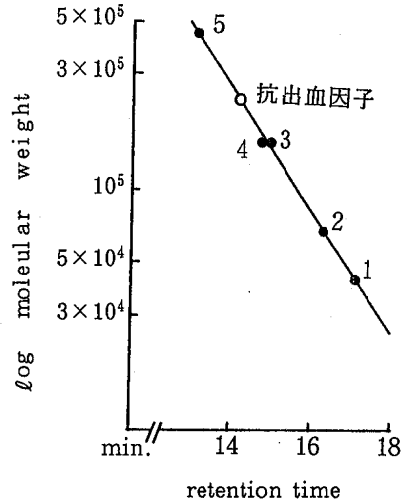


図6. ゲル濾過による分子量の測定
 Sample : シマリス抗出血因子
 Column : Protein pak 300 (7.8×300mm) ×2
 Standard proteins :
 1. ovalbumin (43,000) 2. B.S.A (67,000)
 3. aldolase (158,000) 4. γ-globulin (160,000)
 5. ferritin (440,000)

6. 分子量の測定

Protein pak 300 (7.8×300mm) ×2 によるゲル濾過法で分子量の測定を行った。マーカーには retention time が近い ovalbumin (43,000), bovine serum albumin (67,000), aldolase (158,000), γ-globulin (160,000), ferritin (440,000) の5種を使用した。

図6に retention time と分子量との関係を示す。分離されたリス血清中の抗出血因子は retention time が14.3で、検量線から分子量が約 235,000 と推定された。

7. 各画分の抗出血作用

表1に各 step の比活性と回収率をまとめた。活性は step - 1 の Sephadex G-200 によるゲル濾過で3.6倍, step - 2 の Protein pak G-DEAEによるHPLCで18.2倍, step - 3 の Protein pak G-DEAEの再クロマトで20.9倍, step - 4 の Protein pak 300×2 によるHPLCで26.1倍にそれぞれ上昇した。

表1. シマリス血清の精製 (精製前後の抗体価の比較)

精製方法	total mg	抗HR-1価			
		u/mg	R.A	total u	%
粗血清	650	9	1.0	5,850	100.0
1. Sepha G-200	117	32	3.6	3,744	64.0
2. Pro.DEAE(1st)	12	164	18.2	1,968	33.6
3. Pro.DEAE(2nd)	9	188	20.9	1,504	25.7
4. Pro.300x2(1st)	5	200	22.2	1,000	17.1
5. Pro.300x2(2nd)	3	235	26.1	705	12.1

最終標品の抗HR-1価は235u/mgで回収率は12.1%であった。これを生物学的製剤基準に定められた蛋白量あたりの力価基準に換算すると、抗HR-1価=9,400u/40mgになり、最終標品は現用抗毒素の31.3倍の抗HR-1価を有していた。

IV 考察

ハブ咬症のおもな特徴は、出血、腫脹、壊死などの激しい局所病変であるが、ハブ同士が咬み合っても同様な病状を示さないことから、ハブ自身にはハブ毒を非常によく中和する成分が含まれているであろうことが以前から予想されていた。

八板(1968)は、有毒蛇や無毒蛇の血清には著名な抗ハブ毒作用があることを明らかにした。佐藤(1972)は、ハブ血清の中から抗出血因子を分離し、分離された物質は同種のハブ毒はもちろん、同一科(マムシ科)に属する他の毒蛇の出血作用も非常に良好に中和することを明らかにした。

著者等も、ゲル濾過やイオン交換法でハブ血清中の抗出血因子を部分精製して、ハブ毒中の主要な出血因子であるHR-1に対する中和力を測定したところ、最終標品の蛋白当たりの抗HR-1価は現在治療に使用されている馬血清の約20倍であった。

仮にこの物質がハブ咬症の治療に使えれば、抗毒素の投与量が現在の10~20分の1に減る

ことになり、1904年北島がハブ抗毒素を開発して以来ずっと続いてきた抗毒素によるハブ咬症治療の概念を大幅に改善することができるであろう。

著者等は、昭和62年以降抗ハブ毒剤の研究に取り組み、その手始めとして天然に存在する抗ハブ毒物質の検索とその活用法を検討しているが、本報では、スクリーニングテストの結果強い抗ハブ毒作用を示したシマリス血清の抗出血因子について調査した。

シマリスの粗血清をSephadex G-200によるゲル濾過、Protein pak G-DEAE、Protein pak 300によるHPLCで順次精製を行った結果、抗HR-1価は粗血清の26.1倍に上昇し、最終標品の抗HR-1価は235u/mgだった。これは生物学的製剤基準に定められた蛋白40mgあたりの力価に換算すると、9,400u/mgになり、現用抗毒素(300/40mg)の約30倍の力価に相当する。

しかし1ステップの操作を行うごとに活性の回収率は50~60%に減少するため、最終標品の回収量は約10分の1であった。

表2にすでに蛇類や哺乳類から分離された抗出血因子の分子量と等電点をまとめたが、今回シマリスから分離された抗出血因子の分子量は約235,000で他の抗出血因子よりはるかに大きかった。等電点は未だ調べてないが、Protein pak G-DEAEによるHPLCのretention timeがハブの抗出血因子とほぼ一致

表2. 抗出血因子の分子量と等電点

	分子量	等電点	備考
<i>Trimeresurus favoviridis</i>	70,000	4.0	ハブ
<i>Vipera palaestinae</i>	80,000	4.7	
<i>Sigmodon hispidus</i>	90,000	5.4	コットンラット
<i>didelphis virginiana</i>	68,000	4.1	ふくろねずみ
<i>Trimeresurus elegans</i>	75,000	4.3	サキシマハブ
<i>Herpestes edwardsii</i>	65,000		マンガース
<i>Dinodon semicarinatus</i>	59,000		アカマタ

することなどから、ハブの抗出血因子と同様にpH=4.0~4.5の酸性蛋白と考えられる。

分子量がハブの抗出血因子の3倍もあることからサブユニットの存在も予想されるが、熱またはpHに対する安定性や活性に影響を及ぼすと思われる各種試薬の影響なども含め、物理学的な諸性質については次回に報告する。

リスの抗出血因子はハブの抗出血因子と同様に強い抗出血作用を有するが、ハブの抗出血因子に比べて分子量が3倍と大きく、また原料の入手も困難なことなどから、抗ハブ毒剤の原料にはハブ自身の血清の方が有利と思われる。

V まとめ

ゲル濾過とHPLCを組合せた方法でシマリス血清中の抗出血因子の精製を試みた。

1. 分離された抗出血因子の抗HR-1価は235u/mgだった。これは現在治療に使用されている抗ハブ馬抗毒素の約30倍に相当する。
2. ゲル濾過法 (Protein pak 300x2) で分子量を測定した結果、分離された抗出血因子の分子量は約235,000と推定された。これはハブ血清中の抗出血因子の分子量の約3倍に相当する。

VI 参考資料

厚生省 (1985) 生物学的製剤基準. 87

Menchaca J. M. and Perez J. C. (1981)

The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*) serum.

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*, a crotalid.

Biochem. Biophys. Acta, 285 : 414-426.

Ovadia M. (1985)

Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera palaestinae*,

Toxicon, 16 : 661-672

Pichyangkul S. and Perez J. C (1981)

Purification and characterization of a naturally occurring antihemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*).

Toxicon, 19 : 205-215.

Tomihara Y., Yonaha K., Nozaki M.,

Yamakawa M., Kamura T., and

Toyama S. (1987)

Purification of three antihemorrhagic factor from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*).

Toxicon, 25 : 685-689.

—, —, —, —, —, Kawamura Y.,

Kamura T., and Toyama S., (1988)

Purification of an antihemorrhagic factor from the nonvenomous snake *Dindon semicarinatus*,

Toxicon, 26 (4) : 420-423.

八板宗哉, 藪原直子 (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。鹿児島大学医学雑誌. 18 : 973-976.