

ELISAによる牙痕出血からのハブ毒の検出

野崎 真敏

Venom Detection in Blood Resulting from
a Habu Bite Using ELISA

Masatoshi NOZAKI

Abstract. In order to research the effect of suction after habu bite, the venom detection in blood resulting from habu bites were investigated.

Blood from fang marks were wiped with sponges and venom were extracted from sponges with 0.85% saline solution. Detection of venom was carried out using ELISA. Peroxidase was used as a marker enzyme, and o-phenylenediamine was used as a substrate.

Approx. 6mg venom was detected from the sponge which was used to wipe the blood of patient who was carried out surgical operation. It is approx. one-third of normal habu bite envenomation. The venom was also detected in 9 of the 18 patients.

It shows that suction from the fang marks immediately after habu bites is effective to remove the venom injected to the muscle.

Key words. ELISA, venom detection, fang marks bleeding,

I はじめに

ハブに咬まれた時の応急処置の基本は、注入された毒素を速やかに体外に排出することであり、口または吸引器による吸引が一般に行われているが、その効果については十分に検討されていない。それは、吸い出された血液の中に含まれている微量の毒素を精度よく測定する方法がなかったからである。

著者(1992)は昨年、自ら考案した酵素免疫法(ELISA)で患者の血液が染み込んだガーゼ中の毒素量の測定を行い、受症直後に牙痕から出血する血液の中にはかなりの量の毒素が含まれていることを明らかにしたが、今回は患者の牙痕出血を経時的に採集し経過時間と排出される毒素の量について調査したので報告する。

II 材料及び方法

1. 毒素と抗毒素

基準毒素には1990年に沖縄本島産ハブから採集された沖縄ハブ粗毒を使用した。

抗毒素は、沖縄ハブ粗毒で馬を免疫して製造した抗ハブ馬抗毒素を使用した。蛋白濃度は22mg/ml, 抗体価は抗HR-1価=190u./mlである。

2. コンジュゲートの作製法

ハブ抗毒素とPeroxidase (horseradish type, 10,000 u., sigma)の結合は、Nakane等(1974)の過ヨード酸法で行った。反応液はSephadex G-100 (Pharmacia)でゲル濾過を行い、結合画分を適量づつ分注後凍結保存して必要量をその都度溶解使用した。

コンジュゲートの蛋白濃度は0.27mg/mlである。

3. プレートのコーティング

EIAフラットプレート, 96穴, U底(三光純薬)の各ウェルを抗ハブ馬抗毒素でコーティングした。

プレートの各ウェルに、100倍に希釈された抗毒素液を200μlづつ加え、シェーカーインキュベーター(Dynatech)で37°C, 3時間間攪拌した後、洗浄液で40秒間の4回洗浄し

た。

抗毒素の希釈には0.01M, pH=7.4 PBS (0.15M NaCl) を使用し、プレートの洗浄には、希釈用 PBSに0.05% Tween 20を加えたものを使用した。プレートの洗浄には Auto mini washer (Biotec)を使用した。

4. 毒素量の測定

まずプレートの各ウェルに検体100 μ lを入れ、37°C, 30分間シェーカーインキュベーターで攪拌した後、前回と同様にAuto mini washerで40秒間の4回洗浄を行った。

次に各ウェルに30倍に希釈されたコンジュゲート200 μ lを加え、37°C, 30分間シェーカーインキュベーターで攪拌した後、Auto mini washerで40秒間の4回洗浄を行った。

コンジュゲートの希釈には、希釈用PBSに1% BSA (Sigma) と0.05% Tween 20を加えたものを使用した。

最後に各ウェルに基質液 (0-フェニレンシアミン 2 塩酸塩40mgを30%過酸化水素水10 μ lを加えた0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素 2ナトリウム緩衝液 pH=4.8, 100mlに溶解) 150 μ lを加え、10-15分間遮光しながら反応させた後、3N硫酸50 μ l.を加えて反応を停止させた。

吸光度は、Microplate reader MTP-32 (Corona) で492nmを測定した。

III 結果と考察

1. 毒素量とELISA測定値の相関

0.1ml中に2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200ngが含まれるように0.01M, pH=7.4 PBS (0.15 NaCl) で9段階に希釈した沖縄ハブ粗毒液の0.1mlを、抗ハブ馬抗毒素でコーティングされたEIAプレートの各ウェルに加え、毒素量の測定の項に示された方法で492nmの吸光度を測定し、毒素の量とELISA測定値の相関を調べた。1希釈段階あたり6個のウェルを使用した。

図1に抗毒素量とELISA測定値の相関を示す。全体的にはシグモイド状の曲線になったが10~100ngの範囲では相関係数 $r=0.942$ ($n=30$) で毒素量とELISA測定値との間に

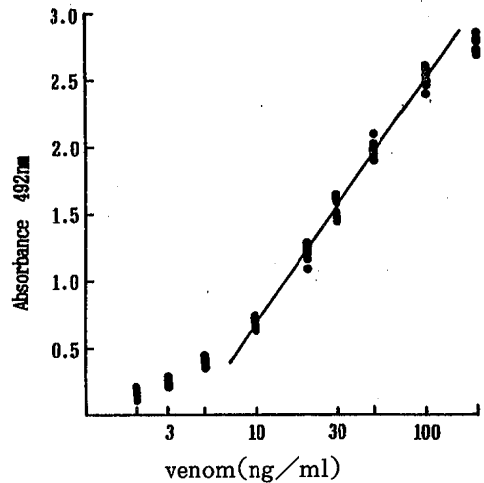


Fig.1 Correlation of absorbance of ELISA and venom

は高い相関がみられ、この範囲ではELISAにより毒素量の測定が可能であった。

しかしコンジュゲートの濃度や他の条件によって発色の程度や用量-反応曲線のスロープが変動することがあるので、より精度の高い測定値を得るには同一プレート上でその都度用量-反応曲線を作成し、それに合わせて測定値を算出する必要がある。また基準毒素の希釈に血液または組織液を使用した時にも夾雑物の影響で発色の程度や用量-反応曲線のスロープに変化が生じるので、用量-反応曲線を作成する時の基準毒素の希釈には、検体と同じ希釈液を使用する必要がある。

2. 局所浸出液中の毒素量の測定

局所浸出液が染み込んだスポンジまたはガーゼからの毒素の溶出は0.01M, pH=7.4 PBS 0.15M NaClで行った。検体は、鹿児島県立大島病院で治療を受けたハブ咬症患者18人から経時的に採集したものである。

測定結果をTable 1に示す。毒素が最も多く検出されたのはNo.6で、血液がたっぷり染み込んだスポンジ5.6gから6mgの毒素が検出された。ハブに咬まれた時の平均的な注入毒量が約20mgであるから、No.6の場合は少なくともその3分の1量が体外に排除されたことになるが、症状はかなり重く、腫脹は右肩関節部まで達した。咬まれた時の状況によ

ては、平均注入毒量の5倍にあたる100mg以上が注入されることもあるので(外間, 1978), この患者は運悪く大量の毒素が注入されたのであろう。

ハブ採取中の事故で、受傷部位は右手第指だった。かなりの重傷ですぐに筋膜切開が行われた。ガーゼに染み込んだ血液は、牙痕と牙痕の間を切開した時に出血したものである。牙痕の幅は約3cmだった。

その後も経時的に局所浸出液が採集されたが、直後に採集されたNo.6以外からは毒素は検出されなかった。

No.6に比べると量は少ないが、15, 30, 52, 60, 61からもそれぞれ9.9 μ g, 41 μ g, 28 μ g, 24 μ g, 31.5 μ gの毒素が検出された。毒素が検出されたスポンジはすべて血液で赤く染まり溶出液も赤黒かったが、9, 37, 48, 57のように真っ赤に染っていても毒素がほとんど検出されない検体もあり、出血の量と排出される毒素の量とは必ずしも一致しなかった。

いずれの患者の場合でも毒素が検出されるのは来院直後に採集された検体だけで、数時間後または翌日に採取された検体からは毒素はほとんど検出されなかった。

数時間後の局所浸出液の中に毒素が検出されないのは、注入された毒素が速やかに周辺の組織に拡散されるからであろう。大腿筋にハブ毒を注射されたウサギでは、局所筋肉中の毒素が3時間で約1/2, 5時間で約1/5に減少し、同様に大腿筋にハブ毒を注射されたマウスでは、30分後には血中から、2時間後には尿中からも毒素が検出された(野崎ら, 1989)

著者は昨年、咬症患者の牙痕出血が染み込んだガーゼの中にかなりの量の毒素が含まれていることを明らかにし、受症直後の吸引は、注入された毒液を体外に排出させるのに非常に効果があることを報告したが、今回の結果はそれを更に裏付けるものであった。

安静、緊縛、切開、吸引など、ハブに咬ま

れた時の応急処置の方法や効果については、研究者の間でも意見が分かれるところであるが、少なくとも受症直後の吸引は注入された毒液の排出に効果があり、症状を柔らげるのにかなりの効果が期待できる。

〈謝辞〉

本研究を実施するにあたり、検体や患者についての情報を提供して下さった鹿児島県立大島病院外科部長朝沼榎先生に深く感謝申し上げます。

IV まとめ

ハブ咬症の応急処置として行う吸引が毒素の排出に効果があるかどうかを確かめるために、牙痕から出血する血液中の毒素の量を調べた。

その結果筋膜切開を行った患者の血液が染み込んだスポンジから約6mgの毒素が検出された。これは咬症時の平均注入毒量の約3分の1に当たる。

また、検査を行った18人の患者中9人の牙痕出血から毒素が検出され、受症直後の吸引は毒素の排出にかなりの効果があることがわかった。

V 参考文献

- 外間善次 (1978) ハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) の牙咬に関する実験的研究。The Snake, 10, 107-113
- Nakane, P.K. and Kawaoi, A. (1974) Peroxidase labelled antibody, A new method of conjugation. J.Histochem. cytochem. 22, 1084-1090
- 野崎真敏 (1992) 牙痕出血からのハブ毒検出の一例。沖縄県公害衛生研究所報, 26:85-86
- 野崎真敏, 富原靖博, 山川雅延 (1989) ELISAのハブ毒研究への応用。抗毒素研究報告書, 15-23

Table 1. Determination of Venom in Blood Resulting from Habu Bites Using ELISA

No	Name	Date	Time	Venom	Color of extracts	local symptoms	Remarks
1	S. T.	6/ 2	6:00	N D	+		
2				N D	-		
3				N D	-		
4				N D	-		
5	M. M.	6/14		N D	+		
6	K. H.	6/14	2:00	6,000	++	++	surgical operation
7		6/15	10:30	N D	+	++	
8		6/16	1:30	N D	+	++	
9	K.	6/14	10:30	N D	++	++	
10		6/14	18:30	N D	+	+	
11		6/15	1:00	N D	+	+	
12		6/15	19:07	N D	+	+	
13	W.	6/15	1:00	N D	-		
14	F. K.	6/17		N D	+		
15	A.	7/ 9		9.9	++		
16		7/10	2:30	N D	+		
17		"	14:30	N D	±		
18		7/11	2:30	N D	-		
19		"	15:00	N D	-		
20		7/12	14:00	N D	±		
21	I.	7/15		1.4	+		
22		7/16	9:00	N D	±		
23		"	10:00	N D	±		
24		"	19:00	N D	-		
25		7/17		N D	-		
26		7/19	10:00	N D	-		
27	M. M.	10/ 9		N D	+		
28		"	12:00	N D	+		
29		10/10	18:00	N D	±		
30	M. M.	10/25	救外	41	+		
31		10/26	4:30	5.4	+		
32		"	10:00	0.5	+		
33		"	16:30	0.4	+		

Table 1. Determination of Venom in Blood Resulting from Habu Bites Using ELISA (continued)

No.	Name	Date	Time	Venom	Color of extracts	local symptoms	Remarks
34	S. T.	10/27	4:30	0.3	+		
35	"	"	16:30	0.3	±		
36		10/28	16:30	N D	-		
37	M. S.	10/27		1.3	⦿		
38		10/28	3:00	N D	⦿		
39		"	15:00	N D	⦿		
40		10/29	3:00	N D	+		
41	S.	10/27	16:00	N D	+		
42				N D	-		
43				N D	-		
44				N D	-		
45				N D	-		
46				N D	-		
47				N D	-		
48	Y. T.	10/29		0.4	⦿		
49	"	"	19:00	N D	±		
50		10/30	10:00	N D	±		
51		10/31	11:10	N D	±		
52	S. K.			28	⦿		
53				N D	±		
54	A.			N D	-		
55				N D	-		
56				N D	-		
57	W.			N D	⦿		
58				N D	-		
59				N D	-		
60	T. S.			24	⦿		
61	T.			31.5	⦿		

The blood resulting from habu bite was wiped with sponges and venom was extracted with 0.85% saline solution.

The color of extracts are, ⦿: dark red, ⦿ : red, +: slightly red. -: colorless