

## 沖縄ハブ抗毒素の有効性の検討 (I)

(抗HR-I血清及び抗HR-II血清のハブ粗毒に対する中和効果)

山川雅延・野崎真敏・外間善次

### 序

ハブ粗毒中に含まれるHR-I及びHR-IIは主要な毒成分といわれ、抗毒素の力価も両毒成分に対する抗毒素価が測定されている。

もし、粗毒を用いず精製されたHR-I及びHR-IIで馬を免疫すると当然、高単位のハブ抗毒素を得ることができる。

しかし、このような精製毒による高単位の抗毒素はHR-I又はHR-IIに対する抗体のみ有しているのであって、粗毒に対しても有効な中和能を示すかどうかは疑問が残る。

今回、我々は高単位の抗HR-I及び抗HR-II抗毒素製品を製造したので、これらの製品のハブ粗毒に対する中和効果を検討した。

### 実験材料及び実験方法

#### 試験用毒素

ハブ粗毒：沖縄本島産ハブ(T. f)より1972年に採毒して凍結乾燥保存されたものをM/30 PBSで10<sup>mg/ml</sup>の毒液に調整しこの液を2.5 ml宛バイアルに分注し、再乾燥してデシケーター中に低温保存した。

HR-I毒素：沖縄本島産ハブ粗毒をセファデックスG 100で分画し、そのHR-I画分を2.5 ml宛バイアルに分注し、凍結乾燥してデシケーター中に低温保存した。

HR-II毒素：沖縄本島産ハブ粗毒をセファデックスG 100で分画し、その粗HR-II画分を更にアンバーライトCG 50で精製、濃縮した後、2.0 ml宛バイアルに分注し、凍結乾燥してデシケーター中に低温保存した。これらの試験用毒素の毒力及び1試験毒素量は表1にまとめて示した。

表1. 試験用毒素の毒力及び1試験毒素量

毒素	毒力	µg/LD <sub>50</sub>	µg/MHD	µg/MED	1 試験毒素量		
					抗致死価 測定用	抗出血価 測定用	抗腫脹価 測定用
粗毒		41	0.67	0.6	5 LD <sub>50</sub>	100 MHD	20 MED
HR-I		19	0.29	0.23	5 "	100 "	20 "
HR-II			0.085	0.19		13 "	5 "

## ハブ抗毒素製品

Lot 14 : 沖縄本島産ハブ粗毒で馬を免疫し、ペプシン消化-硫酸分画法で精製凍結乾燥した。

Lot 19 : HR-I 毒で馬を免疫し、硫酸分画-ペプシン消化-DEAEセルローズによって精製凍結乾燥した。

Lot 20 : HR-II 毒で馬を免疫し、Lot 19 の場合と同様な方法で精製、凍結乾燥した。

Mix A : Lot 19 と Lot 20 を等量混合した。

Mix B : Lot 19 と Lot 20 を混合して抗出血 I、II 価が Lot 14 の力価とほぼ等しくなる様に調整した。これらの各抗毒素製品の抗毒素価及び蛋白濃度は表 2 に示した。

抗致死価の測定 : 粗毒又は HR-I 毒の 1 試験毒素量 (5 LD<sub>50</sub>) が各稀釈抗毒素液 0.2 ml 中に含まれるような毒素、抗毒素混合液を作り室温に一時間放置した後、その 0.2 ml を 1 群 4 匹のマウス尾静脈に注射した。

3 日間生死を観察して ED<sub>50</sub> を求め、これを 1 単位とした。抗致死価は  $\mu/ml$  で示した。

抗出血価の測定 : 粗毒又は精製毒の 1 試験毒素量が各稀釈抗毒素液 0.2 ml 中に含まれるような毒素・抗毒素液を作り、室温に一時間放置した後、その 0.2 ml をウサギ背皮に注射した。24 時間後にウサギを殺して背皮の裏側から出血斑の大きさを測定した。

出血斑が 10 mm になるような抗毒素量を求めて、これを 1 単位とした。

抗出血価は  $\mu/ml$  で示した。

抗腫脹価の測定 : 粗毒又は精製毒の 1 試験毒素量が各稀釈抗毒素液 20  $\mu l$  中に含まれるような毒素、抗毒素液を作り、室温に一時間放置した後、その 20  $\mu l$  を一群 5 匹のマウス右足蹠に注射した。注射 4 時間後に右左両足蹠を切断して各群ごとに足蹠重量を測定した。左健足重量を 100% として右腫脹足重量が 130% (中和終末点) になるような抗毒素量を求めて、これを 1 単位とした。

抗腫脹価は  $\mu/ml$  で示した。(報告 2.4 参照)

## マウス筋注による局所出血の観察

ハブ粗毒 100  $\mu g$  及び 300  $\mu g$  が各抗毒素液 0.2 ml 中に含まれるような毒素・抗毒素液を作り、室温に一時間放置した後、その 0.2 ml を一群 3 匹のマウス大腿部筋肉内に注射した。24 時間後に注射局所の出血を肉眼的に観察して大腿部全域に出血を起している場合を卅とし、大腿部の約  $\frac{1}{2}$  に出血が認められる場合を十、それ以下を十、出血を殆ど認めないものを一とした。

## 実 験 成 績

各抗毒素製品は生物製剤基準に従って抗毒素価を測定し、表 2 の結果を得た。

表 2. 生物製剤基準に従って測定された各抗毒素製品の単位 (U/ml)

抗毒素製品	蛋白量 mg/ml	抗出血 I 価	抗出血 II 価	抗致死 価	備 考
Lot 14	67	400	350	396	ハブ粗毒免疫血清
Lot 19	46	1800	16	2592	HR-I 免疫血清
Lot 20	38	20	2000		HR-II 免疫血清
Mix A	42	990 (900)	900 (1000)	1426 (1296)	Lot 19 と Lot 20 等量混合
Mix B	17	420 (400)	340 (350)	506 (576)	Lot 19 と Lot 20 を混合して Lot 14 の抗出血価に合せた。

( ) は計算値

即ち、Lot 14 は粗毒による免疫血清であり各単位とも約 400 単位付近にある。

これに対し、Lot 19 は HR-I 免疫血清であるため抗 HR-I 価が異常に高いけれど抗 HR-II が異常に低い。又、Lot 20 は HR-II 免疫血清であるから抗 HR-II 価は高いが逆に抗 HR-I 価は低い。

従って、Lot 19 と Lot 20 を混合すれば相互に力価の低い方を補い合うことになる。

Mix A は Lot 19 と Lot 20 を等量混合したもので各力価は約 1000 単位付近にあり Lot 14 のその 2 倍以上を有している。

Mix B は Lot 19 を 2.25 倍に稀釈し、Lot 20 を 2.86 倍に稀釈した後、両者を等量混合して Lot 14 の抗毒素価とはほぼ等しくした。

この場合、Mix A 及び Mix B の力価は計算値と実測値がほぼ一致することを確めた。

このような 5 種類の抗毒素製品の粗毒に対する中和効果を調べた。又、HR-I の毒力を粗毒と同じレベルにしてその抗毒作用を比較した。なお、HR-II の試験毒素量は粗毒又は HR-I のそれより更に低くしなければ力価測定が困難であった。各抗毒素製品の粗毒及び精製毒に対する中和終末価より算出した抗毒素価は表 3 に示した。

表 3. 各抗毒素製品の粗毒及び精製毒に対する中和終末価より算出した抗毒素価 (U/ml)

抗毒素製品	抗毒作用 I 試験毒素量	抗致死 価		抗出血 価			抗種 脹 価		
		粗 毒 5LD50	HR-I 5LD50	粗 毒 100MHD	HR-I 100MHD	HR-II 13MHD	粗 毒 20MED	HR-I 20MED	HR-II 5MED
Lot 14		25	56	105	430	360	460	833	370
Lot 19		<	364	<	2070	8	4550	8700	<
Lot 20		<	<	12	16	2130	100	<	135
Mix A		<	200	210	720	830	2300	4760	<
Mix B		<	71	97	360	325	1000	1920	<

< は測定レベル以下

ここで注目すべきことは、粗毒とHR-Iの毒力を同じレベルにして比較した場合、いずれの抗毒素製品も粗毒に対する中和能が著しく劣ることである。

抗致死作用：粗毒に対する抗致死作用はLot 14が25単位と測定された他は全て測定レベル以下であった。しかし、HR-Iに対してはLot 19が他の製品に比べて著しく高い力価(364 u)を示した。即ち、精製毒による免疫によって得られた製品は粗毒の致死作用に対して殆ど無効であった。

抗出血作用：粗毒に対する抗出血作用はMix Aが他の製品に比較して高い力価(83 u)を示したがLot 19とLot 20の粗毒に対する抗出血作用は著しく低いことから、抗HR-I又は抗HR-II血清のいずれか一方のみでは粗毒の出血作用を殆ど中和しないことを示している。又、Lot 14とMix Bの力価は近似的に等しくなる傾向を示している。

抗腫脹作用：粗毒に対する抗腫脹作用はLot 19が著しく優れていたのに対し、Lot 20は極めて不良であった。又、Lot 19とLot 20を等量混合したMix Aの抗腫脹作用は抗出血作用のように増強されなかった。

Mix BとLot 14の抗出血単位はほぼ同程度であったが腫脹に対してはMix Bの方が明らかに優れていた。次に、Lot 19をLot 20で2倍に希釈したMix Aの単位はLot 19の単位の約 $\frac{1}{2}$ に相当した。  
(Lot 19 : 4550u)  $\div$  2 = 2275  $\approx$  (2300u : Mix A)、又、Lot 19をLot 20とPBSで4.5倍に希釈したMix Bの単位もLot 19の単位の約 $\frac{1}{4.5}$ に相当している。

(Lot 19 : 4550u)  $\div$  4.5 = 1011  $\approx$  (1000u : Mix B)。

これを蛋白量の関係でみると、Lot 19 = 99  $\mu$ /mg、Mix A = 55  $\mu$ /mg、Mix B = 59  $\mu$ /mgである。一方、Mix Aの蛋白濃度は42  $\frac{mg}{ml}$ であり、この内、Lot 19に由来する蛋白は23 mgで残り19 mgはLot 20の蛋白に由来している。

従って、99 u  $\times$  23 = 2277uで、Mix Aの単位2300  $\frac{\mu}{ml}$ にはほぼ一致する。又、Mix Bは17  $\frac{mg}{ml}$ の蛋白濃度を有しており、この内Lot 19に由来する蛋白は10 mgで残り7 mgはLot 20の蛋白に由来している。

よって、99u  $\times$  10 = 990 uでありMix Bの単位1000  $\frac{\mu}{ml}$ にはほぼ等しくなる。

このことはLot 20の単位が無視できるほど低いためにMix A、Mix Bの単位はLot 19の単位に完全に支配され、Lot 20(抗HR-II血清)との相乗効果は全く認められないことを示している。又、Lot 14の6.9  $\frac{\mu}{mg}$ に対してLot 19の抗腫脹単位は著しく高いことがわかる。

Lot 19はHR-I免疫血清であるから抗HR-I・腫脹単位は著しく高い。又、抗粗毒・腫脹単位は抗HR-I・腫脹単位の約半分に相当し、両単位とも、Lot 19の単位がMix A、Mix BにLot 19の希釈倍数とはほぼ同じ割合で分配されている。HR-IIに対してはLot 14がLot 20より有効であったが、他の製品は測定レベル以下であった。

マウス筋肉注射による局所出血及び抗致死作用の観察：各抗毒粗製品のハブ粗毒に対する抗出血作用及び抗致死作用をマウス大腿部筋肉注射法によって比較した。

表 4. 各抗毒素製品のハブ粗毒に対する中和効果, マウス大腿部筋肉内注射による結果

	抗毒素量 毒量	0.1 ml				0.03				0.01				0.003					
Lot 14	100 $\mu$ g	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	300	-	-	±	-	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lot 19	100	⊖	-	-	-	+	+	±	-	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	300	⊖	⊖	⊕	-	⊕	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lot 20	100	±	±	±	-	±	±	±	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	300	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix A	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	-	-	-	-	-	-
	300	⊕	⊕	⊖	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix B	100	⊖	-	-	-	+	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	300	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対 照	100 $\mu$ g	⊕	±	±	±	⊕	±	±	±	⊕	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	300 $\mu$ g	⊕	±	±	±	⊕	±	±	±	⊕	±	±	±	±	±	±	±	±	±

○は死亡マウス 注射量 0.2 ml

即ち、ハブ粗毒 100 $\mu$ g で抗出血作用を観察し、300 $\mu$ g で抗出血と同時に抗致死作用をみた。その結果、表 4 に示したとおり Lot 14 及び Mix A が良好で同程度の抗出血作用を示したが、各製品を 30 倍に稀釈して比較すると Lot 19 だけはなお抗出血作用を認めることができた。又、Mix A 及び Mix B が Lot 19 又は Lot 20 の抗出血作用より優れていることから、ウサギ背皮法の結果と同様に両者の増強作用をみることもできた。

但し、稀釈するに従って増強作用は見られなくなった。次に、マウス筋注による抗致死作用は明らかに Lot 14 が優れており、マウス尾静脈注射の結果と同じであった。

なお、局所出血以外の筋壊死又は、組織の軟化現象などについては肉眼的に識別してランクをつけることは困難であった。

## 考 察

ハブ粗毒による免疫血清及び精製毒 (HR-I HR-II) による免疫血清のハブ粗毒に対する中和効果を検討した。

マウスによる抗致作用は粗毒免疫血清の方が精製毒免疫血清より優れていた。

これはハブ粗毒中の致死成分が HR-I 及び HR-II 以外にも存在しているからであろう。

我々の経験によると、ハブ粗毒をセファデックスG 100で分画した場合、HR-I画分と粗HR-II画分に含まれる致死活性量及び出血活性量はほぼ半々であった。

従ってHR-Iだけに粗毒の致死作用を代表させるのは無理がある。

よって、HR-Iを試験用毒素として抗致死価を決めるのは問題である。例えば、表2に示されたLot 19の抗致死価は1800単位で高い力価を有しているが表3に示す如く粗毒に対しては無効である。これに対して、粗毒免疫血清であるLot 14の抗致死価は400単位であるが粗毒に対しても十分な中和能を有している。更に、重要なことは、粗毒免疫血清であっても一般にHR-IIに対する免疫抗体量が異常に少ないことである。

従って抗HR-II抗体をもっと良好に産生すれば粗毒に対する中和力を強化できるであろうと考える。

我々は、これに関連してもう一つの問題点を提起する。

即ち、G 100分画による粗HR-II画分(H<sub>2</sub>画分と呼ぶことにする)はアンバーライトCG 50で更に分画すると精製されたHR-II以外に致死、腫脹、出血作用を有する画分が存在することである。(報告4参照)

我々はこの画分をH<sub>2</sub>画分の0番目(非吸着画分)に流出したピークとしてH<sub>2</sub>-0と吸ぶことにした。

H<sub>2</sub>-0に関する研究はまだ十分なされていないが、各抗毒素製品の粗毒に対する中和能が不良である原因を考察する場合、H<sub>2</sub>-0の存在も考慮に入れるべきであると考ええる。

これらの疑問への手がかりを得るため抗H<sub>2</sub>-0血清の製造を試みたい。

粗毒の出血作用に対してはMix Aが最も有効であった。従って、抗HR-I血清又は抗HR-II血清のいずれか一方だけでは粗毒の出血作用を中和することはできない。しかし、上述のとおり、抗HR-II抗体量を更に高くすれば抗出血作用はもっと増強されるであろう。

次に、粗毒の腫脹作用に対してはLot 19が最も有効であった。

Lot 19はHR-I免疫血清であり、従って粗毒による腫脹作用はHR-Iによる影響が特に大きいといえる。

一般に毒量が増すに従って抗腫脹作用は急激に弱まる。即ち、粗毒の1試験毒素量を40MEDレベルまで上げると各抗毒素製品の中和能は著しく悪くなり、いくら抗毒素量を増しても中和終末点の130%まで達しなくなる。

1試験毒素量を20MEDに設定したのはこのためである。又、粗毒とHR-Iに対する中和直線のスロープは粗毒の方が低い傾向を示すこと、更に表3に示したとおりHR-IIに対する抗腫脹作用が著しく弱いことなどを考えると常に中和されない部分が残されていることが考えられる。

これらの問題は更に検討した上、後日報告したい。よって、本実験結果ではLot 19が粗毒の腫脹に対して最も有効であったが、中和機構を解明しない限り真の有効性はわからない。次にマウス筋注による比較ではLot 14が最もよい結果を示した。

又、Lot 19は30倍に稀釈してもなお抗出血作用を有しているが、これは明らかに粗毒中のHR-I

Iだけを中和している。

## ま と め

ハブ粗毒に対する各抗毒素製品の有効性を検討した結果、ハブ粗毒の致死作用に対してはLot 14が、出血作用に対してはMix Aが、腫脹作用に対してはLot 19がそれぞれ最も有効であった。即ち、

1. ハブ粗毒より分離したHR - I及びHR - IIで免疫して得られた抗毒素製品はハブ粗毒の出血作用及び腫脹作用に対して有効であったが、マウスによる致死作用に対しては無効であった。
2. ハブ粗毒の致死作用に対しては粗毒免疫による抗毒素の方が有効であった。
3. 粗毒と精製毒(HR - I)の毒力をほぼ同じレベルにして比較した場合、いずれの抗毒素製品も粗毒に対する中和能が著しく劣っていた。
4. 高単位(現行、生物製剤基準による)のハブ抗毒素はかならずしもハブ粗毒の全ての毒性に対して有効とは言えなかった。
5. 抗HR - I血清と抗HR - II血清を混合するとハブ粗毒に対する抗出血作用が増強される。
6. ハブ抗毒素はハブ粗毒の腫脹作用に対しても有効であるが、特に抗HR - I抗毒素が重要な役割を果す。

ハブ抗毒素の有効性の検討は更に継続して行う必要があり、そのためには、効果判定法を改良し、マウス、ウサギ、以外の動物でも実験を繰返すことが望ましい。

本研究に要した研究費は昭和49年度、国庫補助より支出された。紙上より深謝申し上げます。

## 参 考 文 献

- (1) 服部善八郎：腸炎ビブリオの実験的感染法に関する研究（第Ⅲ・第Ⅳ報）．東京獣医学畜産学雑誌，19，1970．
- (2) 外間善次：サキシマハブ (*Trimeresurus elegans*) 毒トキシノイドに関する基礎的研究．*The Snake*, 4, 23-33, 1972．
- (3) 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.
- (4) 近藤 了, 近藤 久, 山本昭夫, 山内清澄, 村田良介, 中野健司, 山本碩三, 藤本政晴, 今泉清 : ハブ毒のLD<sub>50</sub>の測定に関する2~3の問題．*実験動物*, 9(2), 1960．
- (5) L. J. Reed and H. Muench: A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Amer. J. Hyg.* 27, 493-497, 1938.
- (6) Tamotsu Omori-Sato, Akira Ohsaka, Satoru Kondo and Hisashi Kondo: A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Toxicon*, 5, 17-24, 1967.
- (7) 小此木 丘, 服部善八郎：ハブ蛇毒のアルコール処理による弱毒化とその免疫原性について．*日本細菌学雑誌*, 23(2), 1968．
- (8) 沢井芳男, 川村善治, 福山民夫, 清水敏夫, 小此木 丘, 服部善八郎, 五十嵐 勇：ハブ蛇毒トキシノイドの基礎的研究, 2. マウス足蹠法によるトキシノイドの副作用に関する実験的研究．*日本細菌学雑誌*, 22, 67-72, 1967．
- (9) 沢井芳男他：琉球におけるハブ咬症の治療に関する研究報告書 (Ⅳ-Ⅻ) . 1965-1971．
- (10) Yoshio Sawai, Hiroshi Chinzei, Yoshiharu Kawamura, Tamio Fukuyama and Takashi Okonogi : Studies on the improvement of treatment of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) bites. 9. Studies on the immunogenicity of the purified habu venom toxoid by alcohol precipitation. *Japan. J. exp. Med.*, 42, 155-164. 1972.
- (11) Takahashi T. and Ohsaka A.: Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principle from proteolytic activity: *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65-75 1970.



- (12) Tamotsu Omori, Sadaaki Iwanaga and Tomoji Sazuki.: The relationship between the hemorrhagic and lethal activities of Japanesees mamushi venom *Toxicon*, 2, 1-4. 1964.
- (13) Masanobu Yamakawa, Masatoshi Nozaki and Zenji Hokama.: Studies on the quantitative method for determination of edema froming activity of Habu and Sakishima Habu venoms. *The snake*: 5, 168-173, 1973.
- (14) Omori-Sato T.: *Biochim. Biophys. Scta*, 207, 65, 1970.
- (15) 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.