

沖縄ハブ抗毒素の製造に関する研究 (I)

- (1) ハブ抗毒素の高度精製について
- (2) 高単位ハブ抗毒素の大量製造法

沖縄県公害衛生研究所：野崎真敏・山川雅延
 外間善次・吉田朝啓
 福村圭介
 財団法人 化学及血清療法研究所：六反田藤吉・野中実男

序

(現況及び問題点)

我国の南西諸島にはハブ (T. Flavoviridis) が生息し人畜に著しい被害を与えている。ハブは世界でも屈指の毒蛇でその被害状況を人口比で比較すると他に類例を見ない程であると言われ、同地域住民が被っている心身の被害は計り知れないものがある。即ち、ハブ咬症は沖縄、奄美地方だけが背負う特異な問題であり、農林業開発の面でも常に留意されなければならない重要な課題である。従って同地域住民にとって、その対策強化は切実な要望である。沖縄県では毎年約400件のハブ咬症が発生し、死亡者や多数の痛ましい後遺症者を出している。1960年以来ハブ対策事業が進められて来たが、ハブ咬傷の発生件数はあまり減少していないのが現状である。

表1. 沖縄県のハブによる被害状況

	発生件数	死亡	壊死
昭和39年	358	4	14
" 40年	400	7	12
" 41年	357	2	16
" 42年	393	5	16
" 43年	351	6	12
" 44年	321	4	8
" 45年	323	1	14
" 46年	326	2	
" 47年	239	0	
" 48年	374	6	

近年、主なハブ対策として

- 1) ハブ抗毒素による受傷者の治療
- 2) ハプトキソイドによる予防
- 3) ハブの防除を目的とした生態的研究
- 4) 環境整備
- 5) 医療体制の充実

などが必要とされそのための努力が続けられている。しかし、現状では「ハブ抗毒素によって受傷者を治療する」ことが最も重要な対策であろう。

言うまでもなく、現在の治療用ハブ抗毒素は馬の免疫グロブリンであり多量に使用すると血清病（発生率、約 10 %）やアレルギー等の副作用が懸念され、その投与量には限界がある。他方、ハブ咬症は他の疾病と異り受傷時に多量の毒が一回に注入されることがあるので出来るだけ良質の抗毒素を多量に、しかも早期に投与する必要がある。

近藤等（文献 24）はウサギ筋肉をハブに咬ませてその注入された毒量をウサギ背皮法による出血活性定量法で推定した。

その結果、生毒の容量で 0.016 ml ~ 0.203 ml（平均 0.082 ml）が注入されたと推定した。

我々の実験では生毒の 26.3 % が乾燥収率として求められているので推定排毒量を乾燥重量に換算すると 4.2 mg ~ 53.4 mg（平均 21.6 mg）と算出される。一方、外間（文献 33）はビニール袋に PBS 生理食塩水を封入して加温し、ハブに功撃させた後、この毒量を光電比色法で定量して注入毒量を推定した。

その結果によると、乾燥重量にして 50 mg ~ 105.5 mg の注入毒量が測定された例が全実験例（111 例）の 16 % もあった。

ところで沢井等（文献 34、35）はハブ粗毒と同抗毒素を試験管内で混合し、これをマウス大腿部筋肉内に注射して局所の出血壊死防御の効果を観察し、治療血清の力価を決める試みをした。

その結果、現行治療血清の 0.1 ml はハブ粗毒 0.3 mg ~ 0.6 mg を完全に中和することを明らかにした。さて、ハブ咬症の治療に際しては通常の場合 20 ml（1 バイアル）の治療血清が投与されるが特に重症と思われるときは 40 ml を注射する場合もある。

これを上記実験結果にあてはめて見ると治療血清 20 ml ~ 40 ml はハブ粗毒 30 mg ~ 120 mg と等量になる。但し、これは全く単純な計算であって実際のハブ咬症は多数の要因が絡み合って複雑な諸条件の上に成り立っているため、その真相は容易に把握し難い。

しかし、前述の咬牙実験を概ねハブ咬症のモデルとするなら最も好条件と思われる試験管内中和法と比較しても等量、又はそれ以下の治療血清が投与されるケースも起り得ることになる。実際のハブ咬症では受傷後に治療血清が注射され、しかも生体内で既に浸入したハブ毒を追跡して中和することなどを考えれば現行治療血清の投与量に疑問を抱かざるを得ない。

沢井等（文献 36）はハブ咬症患者の受傷時間と予後との関係を詳細に調査した結果、治療まで 10 分 ~ 90 分要した患者 49 例中 11 例の壊死患者を発見しており、死亡又は壊死等の重症患者は必ずし

も治療時間の遅延に帰することは困難で、むしろ不幸にして多量の毒が入ったためであろうと述べている。

実際のハブ咬傷では軽くひっかく程度からがっぷり咬まれるケースまで様々であろう。

そして不幸にして多量の毒を注入された者の中から重症者が出ていることは容易に想像できる。我々の調査(文献31)によると治療期間が3日以内の受傷患者は全体の41%であり、4日~7日40%であった。従って現在の治療態勢でも全発生件数の90%は7日以内に完治している。

残る10%の受傷者から後遺症が発生し、又たとえ完治しても長期の治療に苦痛を強いられているわけである。

もし、更に有効な治療手段が開発されれば壊死患者を救うだけでなく治療期間の短縮にも大きく貢献するであろう。

以上、述べた様に現行の治療用ハブ抗毒素はその「安全性」と「有効性」の両面で更に検討を要すると同時に、治療血清の投与量を含むハブ咬症全般の治療方法を再検討する必要があると考え本研究に着手した。

(研究目的)

我々は上述の実情に鑑み、より少ない蛋白量でより高単位のハブ抗毒素を開発しハブ咬症の治療の改善に寄与することを目的とした。本研究ではハブ毒中の主な毒成分とされるHR-I及びHR-IIを分離精製し、これらを別々に馬を使用して免疫を行った。

即ち、1) 高単位抗毒素の大量製造法の研究。

2) 抗HR-I血清及び抗HR-II血清を製造してハブ毒の免疫学的、薬理学的、病理学的研究のための実験材料を得る。

ことなどが今回の目的である。

これまで馬血清中の免疫グロブリンを高度に精製する方法は多くの研究者によって試みられ、その成果は広く知られるとおりである。しかし、その多くは研究室内に於ける小規模な装置によるものであった。

我々は、これらの成果を大型化された装置に活用することを試みた。

従って、単に精製度をよくするだけでなく実用化に伴う諸問題を考慮しながらハブ抗毒素の製造工程全般について再検討することとする。

ハブ粗毒中には種々なる物質が含有されているが、主な毒成分はHR-I及びHR-II(文献7、17、21)であるとされている。

従って現行のハブ抗毒素はHR-I及びHR-IIについてのみ抗毒作用を測定し力価を決めている。

しかし、ハブ毒の生体に及ぼす薬理学的、病理学的研究は極めて不十分である。

実際のハブ咬症で人体内に侵入したハブ毒がどのようにその毒作用を展開して行くかを具体的に究明することは、治療対策上もっとも重要なことである。

我々は、これらの課題を含めて治療用ハブ抗毒素の質的改良を旨としている。

今回はその実験材料として必要な抗HR-I及び抗HR-II血清の製造を試みた。

実験材料及び実験方法

- (1) ハブ粗毒の採集：メートルガラス（200 CC）の口にビニール製の膜（厚さ約0.3 mm）を張って固定し、これに沖縄本島産ハブ（*T. Flavoviridis*）を咬ませて自然に排毒させた。
一回の採毒作業ではハブ15～20匹より生毒液約10 mlを採集した。生毒は2000 rpm、8 mm、遠心して白色不溶性沈澱物を除去した後凍結乾燥した。
総量50 gの乾燥毒をプールして褐色瓶に入れ、デシケータ中に保存しながら必要に応じて適量を分割使用した。
- (2) ハブ粗毒の精製：大森—佐藤等の方法（文献7, 17, 21）によりHR-I及びHR-II画分を精製した。
即ち、ハブ粗毒をセファデックスG-100で分画してHR-I及び粗HR-II画分を得た。粗HR-II画分はアンバーライトCG-50で更に精製した。
操作は全て低温で行った。
これらの精製毒は凍結乾燥して保存し、試験用毒素及び、馬の免疫用抗原として使用した。
- (3) 蛋白質の測定：ハブ毒及び馬血清の蛋白質をあらかじめケルダール法で測定した後、光電光度計によりOD₂₈₀で定量直線を作成して以後、未知検体の蛋白質は光電比色法による定量グラフより求めた。
- (4) 毒力試験：出血作用の測定は近藤等のウサギ背皮法によった（文献3）。
致死作用の測定はマウス尾静脈注射法によった。又、LD₅₀はLeed & Muench法で計算した（文献5）。
- (5) 免疫用トキシイドの調製：貞弘等の方法（文献38）によって調製した。
即ち、約0.5～1%の精製毒及び粗毒液にホルマリンを1日おきに0.2%宛分割添加して、総添加量を1%とした。
不活化は37℃の孵卵器中に約2週間放置して行った。
各液は $\frac{M}{30}$ PBSに透析してホルマリン除去した後ミリポアGSフィルターで除菌した。最終製品の蛋白質はHR-I、トキシイド = $7.5 \frac{mg}{ml}$ 、HR-II、トキシイド = $4.7 \frac{mg}{ml}$ 、粗毒トキシイド = $10 \frac{mg}{ml}$ 、とした。

更に、ウサギ皮内、マウス大腿筋肉内、マウス尾静脈内に各 0.2 ml を注射した結果ウサギ皮内で 10 mm 以下の小さな出血を認めマウス筋注では多少出血を認める程度であった。

又、マウス尾静脈注射では 5 匹全部が生残った。

- (6) 馬の免疫及び全採血：3 頭の馬 (No 15、No 21、No 22) に各々(5)で調整した免疫用トキソイドを用いた。

各馬に対する免疫方法は表 3～5 に示してあるが主として、基礎免疫はフロイントのアジュバントとトキソイドを混合して注射し、40 日～50 日後に 1～3 回トキソイドによる追加注射を行い更に不活化前の同種毒による注射を行った。全採血は 1 ℓ のメスシリンダーに、約 800 ml 宛血液を採集した後真鍮製のオモリをのせ、3 日後に分離した上清を集めた。各血清は分離後直ちに抗毒素の精製を行った。但し、No 15 は抗凝固剤を添加して血漿を分離した。

- (7) 抗毒素の精製：抗毒素の精製は種々の方法を併用しながら、これらの方法を比較検討した。即ち、Lot 14 (粗毒免疫血清) はペプシン消化、硫安分画、流水透析を行ったもので他の精製法の比較対照とした。

Lot 19 (HR-I 免疫血清) は硫安分画の段階で飽和硫安と固型硫安を使用した場合を比較しながら、ペプシン消化はセファデックス G-25 の大型カラムによって脱塩した場合と脱塩しないで直ちに消化した場合を比較した。

次に、ペプシン消化した液は塩化亜鉛を添加した場合と添加しない場合を比較して更に、飽和硫安又は固型硫安による再分画を比較した。

最後に DEAE-セルローズによって精製した。Lot 20 (HR-II 免疫血清) は Lot 19 の精製法で検討した結果を参考にして最もよいと思われる方法を採用して精製した。

Lot 21 (粗毒免疫血清) は Lot 14 と同様にペプシン消化、硫安分画法で精製した抗毒素でこれまで検定不合格品や他の実験に使用した残品等をプールして保存してあったもので、カビなどが発生して力価も著しく低下していたものを材料として DEAE-セルローズによる再精製を行った。

Lot 21 は DEAE-セルローズによる精製の際、大型カラムを使用せずバッチ法を行った場合を比較した。

- (8) 抗毒素価の測定：抗毒素価の測定は生物製剤製造基準に示された方法で行った。即ち、国立予防衛生研究所より分与された常用標準ハブ抗毒素及び各試験用毒素を用いて Lot 14 の抗致死価、抗出血価 (I) 及び抗出血価 (II) を測定した。但し、試験検体の種類が多数あったので Lot 20 の抗出血価 (II) 以外の検体については(2)で製造した自家製の試験用毒素を使用し、常に Lot 14 を対照としながら力価を決めた。

各試験毒素の 1 試験毒素量は次のとおりとした。

抗致死価 (HR-I) 測定用 : 5 LD 50

抗出血価 (I) 測定用 : 100 MHD

抗出血価 (II) 測定用 : 13 MHD

又、これとは別に HR - I 及び HR - II の 100 MHD を中和するのに必要な抗毒素の最少量を測定し、1ml中に含まれるその抗毒素の最少中和量(中和終末価)の数を計算した。

- (9) 電気泳動: 各抗毒素検体の純度を比較するために電気泳動(東京光電社製)を行った。セルローズアセテート膜によってペロナールバッファー (PH 8.6) を使用し 3 m² Sample 40 mm、泳動した後ボンソー 3 R で染色しデンシメトリーを行った。

実 験 成 績

I ハブ毒の精製と試験用毒素の製造

ハブ粗毒約 40 g を 8 回に分けてセファデックス G - 100 (ゲルベッド 5 × 80 cm、^M/200 Tris HCl buffer, PH 8.5) カラムによって分画した。

この操作によって HR - I 画分 1350 ml (蛋白 2.85 ^{mg}/ml)、粗 HR - II 画分 1900 ml (蛋白 7.53 ^{mg}/ml) を得た。

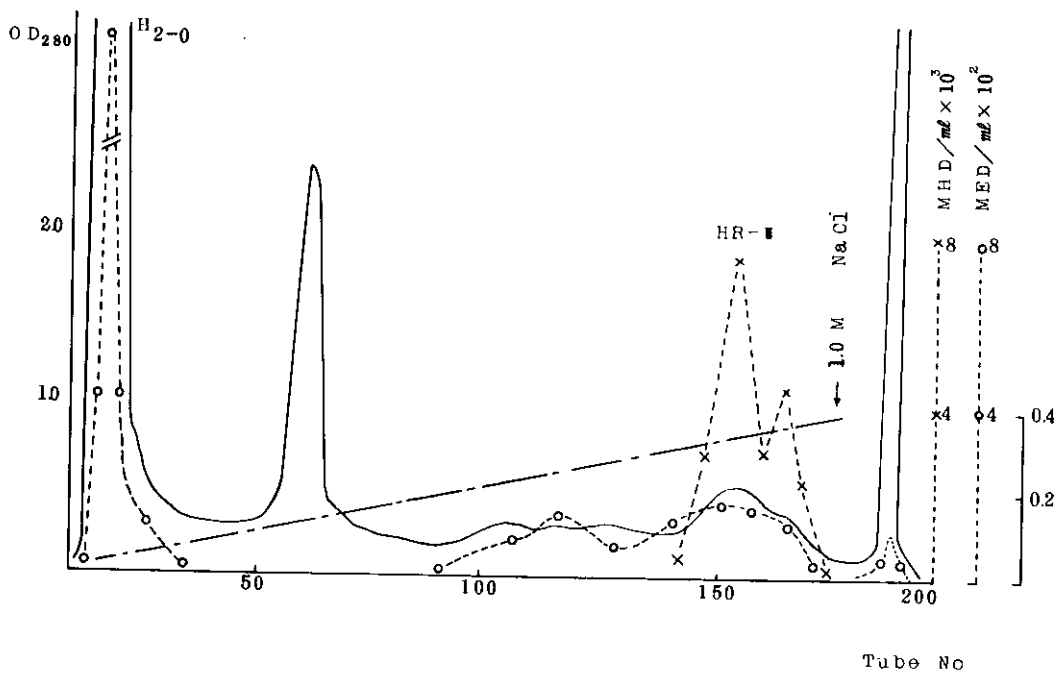
次に粗 HR - II 画分は更にアンバーライト CG - 50 (2.5 × 45 cm) によって精製した。即ち、粗 HR - II 液を凍結乾燥法で濃縮した後、10 mM borax buffer PH 9.0 に透析しその 1500 mg 蛋白を 1 回の精製に使用した。総量 14000 mg の蛋白を 10 回に分けて操作し、精製 HR - II 画分 1700 ml を得た。この精製 HR - II 画分は更に濃縮して、400 ml とした。これらの精製毒はバイアルに小分けして凍結乾燥した。

最終製品の製造量及び毒力試験の結果は表 2 に示した。これらの精製毒の一部はトキシイド化し、免疫用抗原とした。又、図 1 に示す様にアンバーライト CG - 50 による精製操作で腫脹作用を示す H₂-0 画分も同時に得たが、これについては報告 4 で述べた。

表 2 HR - I 及び HR - II の製造量と毒力

	精製液量	分注及び凍結乾燥	蛋白量 mg/バイアル	毒 力	
				LD50/バイアル	MHD/バイアル
HR - I	1350 ml	2.5 ml × 300 本	7.13	375	2.5 × 10 ⁴
HR - II	400 ml	2.5 ml × 120 本	4.13		5 × 10 ⁴

図1 粗HR-II 画分のアンバーライト
C G 50による精製



II 馬の免疫及び全採血

№15の馬に対しては粗毒トキソイドで基礎免疫を2回行った後、粗毒による追加注射を6回行った。

№21の馬はHR-I トキソイドで基礎免疫を行い、65日後にHR-I トキソイドで3回追加注射し更に不活前のHR-I 毒を1回注射した。№22の馬はHR-II トキソイドで基礎免疫した後、同トキソイドを3回注射し更に不活前のHR-II 毒を8回追加注射した。

№22は3000 mlの血液を一部採血した後、約2ヶ月間休養期間をおいて改めてHR-Iによる免疫を開始した。

各馬の免疫表及び採血量は表3～5に示した。馬№21はブースター4回目でアナフィラキシー症状(発汗、畜舎内で横転して起立困難)を呈したので追加注射を中止して全採血した。

又、抗HR-II価は測定レベル以下であった。馬№15の全採血は5%クエン酸ソーダ液を血液量の1/10に加えて凝固防止を行いながら頸静脈から除々に、採血して血漿を分離した。

又、馬№21は頸動脈から急激に約800 ml宛メスシリンダーに採血した。

表3

馬 No.15

ハブ粗毒免疫

免疫日数	注射量 mg 蛋白	試血 (u/ml)		備 考
		抗HR-I	抗HR-II	
1 日	200			アジバント+粗毒トキソイド
26 "	200			"
95 "	10			"
102 "	20			ハブ粗毒
109 "	40	360	280	"
120 "	70			"
129 "	100	450	350	"
146 "	100	400	300	"
158 "	全採血	400	300	

表4

馬 No.21

HR-I 毒免疫

免疫日数	注射量 mg 蛋白	試血 (u/ml)			備 考
		抗HR-I	抗HR-II	抗致死	
1 日	114				アジバント+HR-Iトキソイド
66 "	3.75	300		225	HR-Iトキソイド
78 "	7.5	500		269	"
81 "	23	750		759	"
92 "	1	750	< 6.3	672	HR-I毒
101 "	全採血	750		675	

表5 馬 No 22 HR - II 免疫

免疫日数	注射量 mg 蛋白	試 血		備 考
		抗HR-I	抗HR-II	
1 日	92			アジバント+HR-IIトキソイド
66	2.4			HR-IIトキソイド
73	4.7			〃
81	14.0		20	〃
92	0.4		35	HR-II 毒
98	1.7		130	〃
107	3.3		170	〃
115	5.0		250	〃
135	5.0		300	〃
146	10.0		350	〃
153	13.0		500	〃
161	19.0	< 6.3	750	〃
172	一 部 採 血			
205	73.0			アジバント+HR-Iトキソイド
252	3.7			HR-I トキソイド
261	7.5			〃
267	22.5			〃
273	37.5	420	90	〃
282	1.4	440	90	HR-I 毒
免 疫 継 続 中				

表6 採 血 量

	採 血 量	血 清 量	力 価 (u/ml)		
			抗HR-I	抗HR-II	抗一致死
馬 No 15	29000	17800 [※]	400	300	320
馬 No 21	18000	8000	750	-	675
馬 No 22	3000	1200	-	750	-

※ は血漿量

馬の大きさはほぼ同程度であったが、表6に示したように両者の採血量には大きな差があった。馬No.22は抗HR-II価が750単位になったところで、3000mlの血液を一部採血した後、HR-Iによる免疫に変更した。

免疫は継続中であるがHR-Iによるブースター4回目以後から抗HR-I価が急に上昇し抗HR-II価が急落していることが観察された。

ところで、抗HR-Iを測定する際の試験用毒素の1試験毒素量は100MHDであるのに対して、抗HR-II測定用の1試験毒素量は13MHDであるから両者の毒力レベルは約1/8の差がある。

No.21の全採血後の血清は、HR-I毒100MHDを中和してウサギ皮内に10mmの出血斑を起させる最少血清量は0.00133mlである。従ってanimal unitで表わすと752u/mlである。これに対してNo.22の一部採血後の血清はHR-II毒100MHDを中和してウサギ皮内に10mmの出血斑を起させる最少血清量は0.02mlであり、50animal units/mlであった。このように馬No.22は実際に産生された抗体活性量で比較すると著しい差があった。

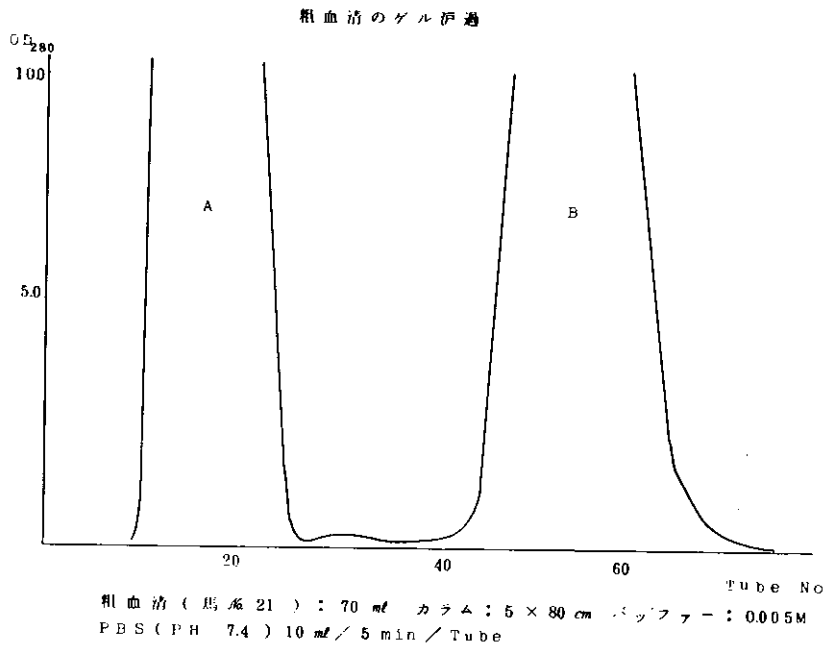
即ち、HR-IとHR-IIは共にウサギ皮内で出血作用を示すが免疫学的に異った物質であり、しかもHR-IIの抗原性はHR-Iに比して著しく弱いことが認められた。

III 抗毒素の精製

(1) 馬抗毒素のDEAE-セルロースによる精製

馬No.21の粗血清70mlを0.005M 磷酸バッファー(PH 7.4)で平衡にしたセファデックスG-25(5×80cm)を通過させて図2の様にA、B二つのピークを示すパターンを得た。

図2 セファデックスG-25による

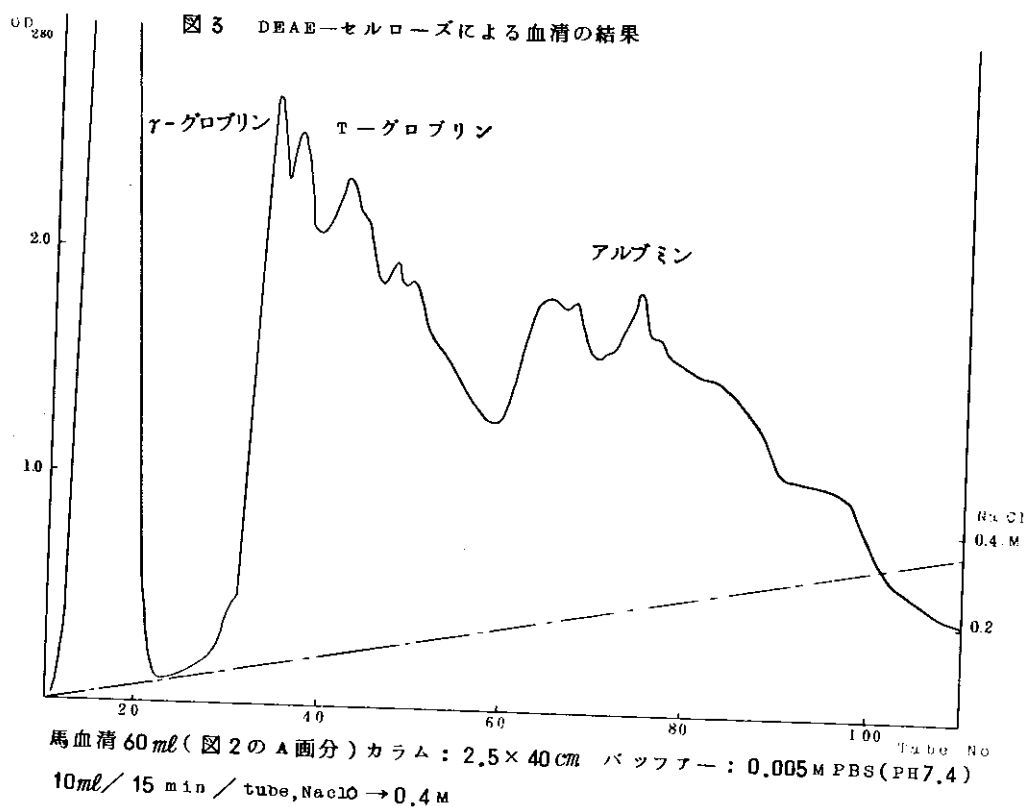


A画分はゲル内沈降反応で沈降線を認め、ウサギ皮内テストで抗出血作用を示したので抗体はA画分に含まれていることを確認した。

B画分は沈降線及び抗出血作用が認められず、透析膜を通過するので低分子の不活性物質であると考えられる。

次にDEAE-セルローズを0.1 M NaOH及び0.1 M HClで交互に洗浄して活性化した後、これを0.005 M 磷酸バッファー (PH 7.4)で平衡にしてカラム (2.5 × 40 cm)に充填した。

A画分 60 mlを流入させた後、NaCl濃度を0から0.4 Mまで直線的に変えて溶出した。その結果、図3に示すとおりγグロブリンの流出に続いて抗体蛋白のT-グロブリンが溶出することが認められた。



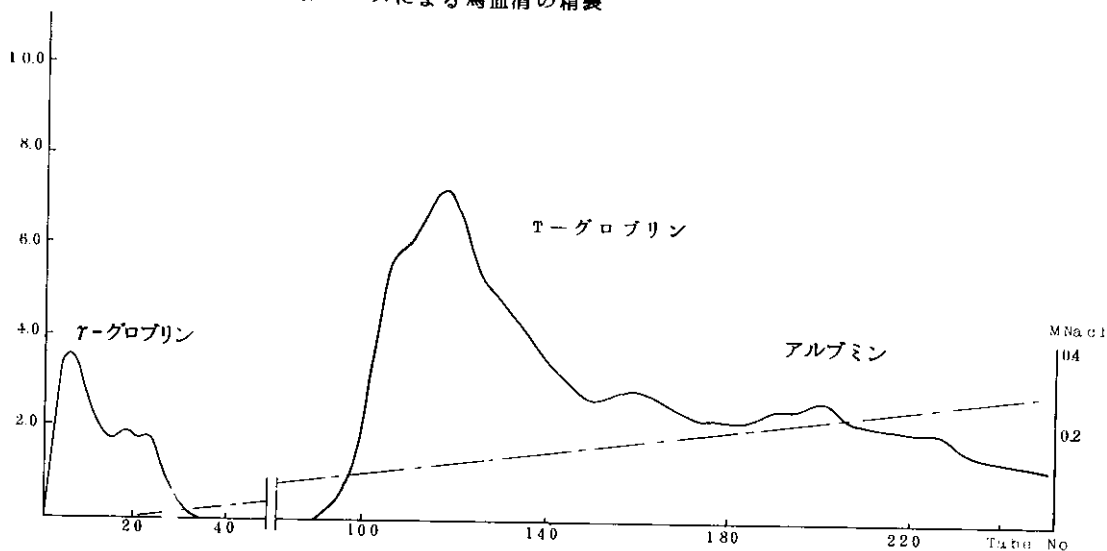
一方、馬No 21の粗血清をあらかじめ硫酸 30% ~ 50% で分画して得た粗製のT-グロブリン液を同様にカラムクロマト法で精製して図4の結果を得た。即ち、硫酸分画法による精製ではまだ可成りの不活性蛋白が共存しておりアルブミンや他の蛋白は相当除去されているが、あまり精製されていない状態が認められる。

図5は硫酸分画して得た粗製T-グロブリンをペプシン消化した後、硫酸で再分画して得た消化T-グロブリン液のクロマトグラムである。

ペプシン消化をすることによってT-グロブリンはDEAE-セルローズに吸着されずフリーパスで最初に流出して来ることが認められた。

又、粗血清を硫酸で分画しペプシン消化した後、硫酸で再分画すると比較的よく精製されていることが認められる。以上の実験結果を参考にして、更に大量の抗毒素を精製することを試みた。

図4 DEAE-セルローズによる馬血清の精製

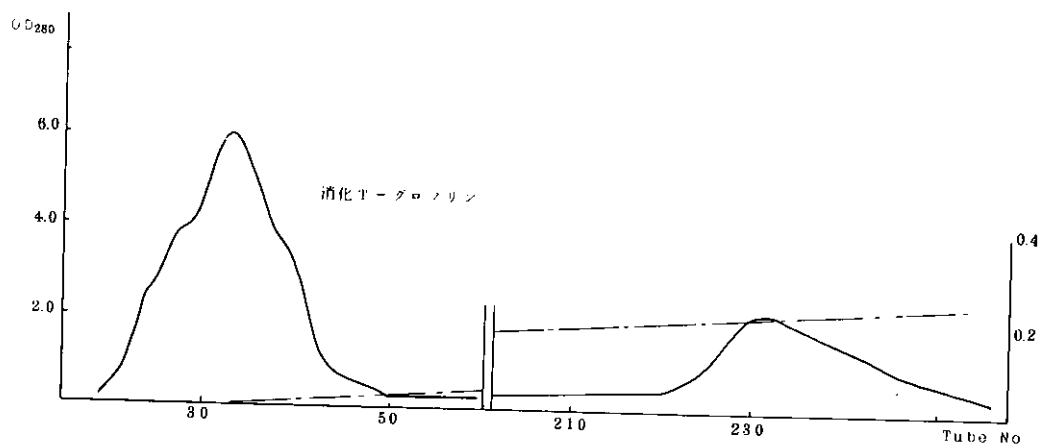


馬 No. 21 血清 : 250 ml (硫酸分画→脱塩) カラム : 5 × 75 cm バッファー : 0.005 M PBS (PH 7.4)

NaCl 0 → 0.4 M, 20 ml / 15 min / tube

図5

DEAE-セルローズによる血清の精製



馬血清 250 ml (硫酸分画→脱塩→ペプシン消化→脱塩) カラム : 5 × 70 cm

バッファー : 0.005 M PBS (PH 7.4) 20 ml 10 min / tube, NaCl 0 → 0.4 M

(2) Lot 14 の精製：馬Na 15 の血漿 17000 ml を蒸留水で3倍に希釈し PH 4.0 でペプシン0.25 % に加え、室温に一夜放置した後 PH 7.0 に修正して固型硫安を 150 g/l の割合で添加した。生じた沈澱を濾紙濾過した後、濾液に更に固型硫安 250 g/l の割合で加えて濾過し、沈澱を流水透析した。

次にグリシン4%、NaCl 0.85%、マーゾニン0.01%を加えた後、無菌濾過し、分注及び凍結乾燥した。

最終製品の製造量及び力価は表8に示したが、精製度は原血清の約1.4倍で殆ど精製されていなかった。

(3) Lot 19 の精製：馬Na 21 の血清 4000 ml を表7に示したようにいろいろな方法で精製しながら各操作段階における収量、精製度を比較した。

但し、抗毒素価は全て抗致死価のみを測定して比較した。Step 1 は硫安分画の方法を飽和硫安と固型硫安を使用した場合について比較した。即ち、飽和硫安による分画では精製度 (SP : Specific activity) が原血清に対して1.7であったのに対し、固型硫安による分画法では $SP = 1.3$ であった。

従って、Step 1 では飽和硫安分画法がやや良好であったが、全体としてあまり精製されなかった。Step 2 はセファデックス G-25 カラム (10 × 100 cm) で硫安を除去した場合と硫安が共存したままの場合でペプシン消化し、これを更に各々2分して計4種のコースを作り、 $ZnCl_2$ 液、飽和硫安、固型硫安などで分画した。

その結果、飽和硫安と固型硫安による差はなく $SP = 2.2 \sim 2.7$ であった。

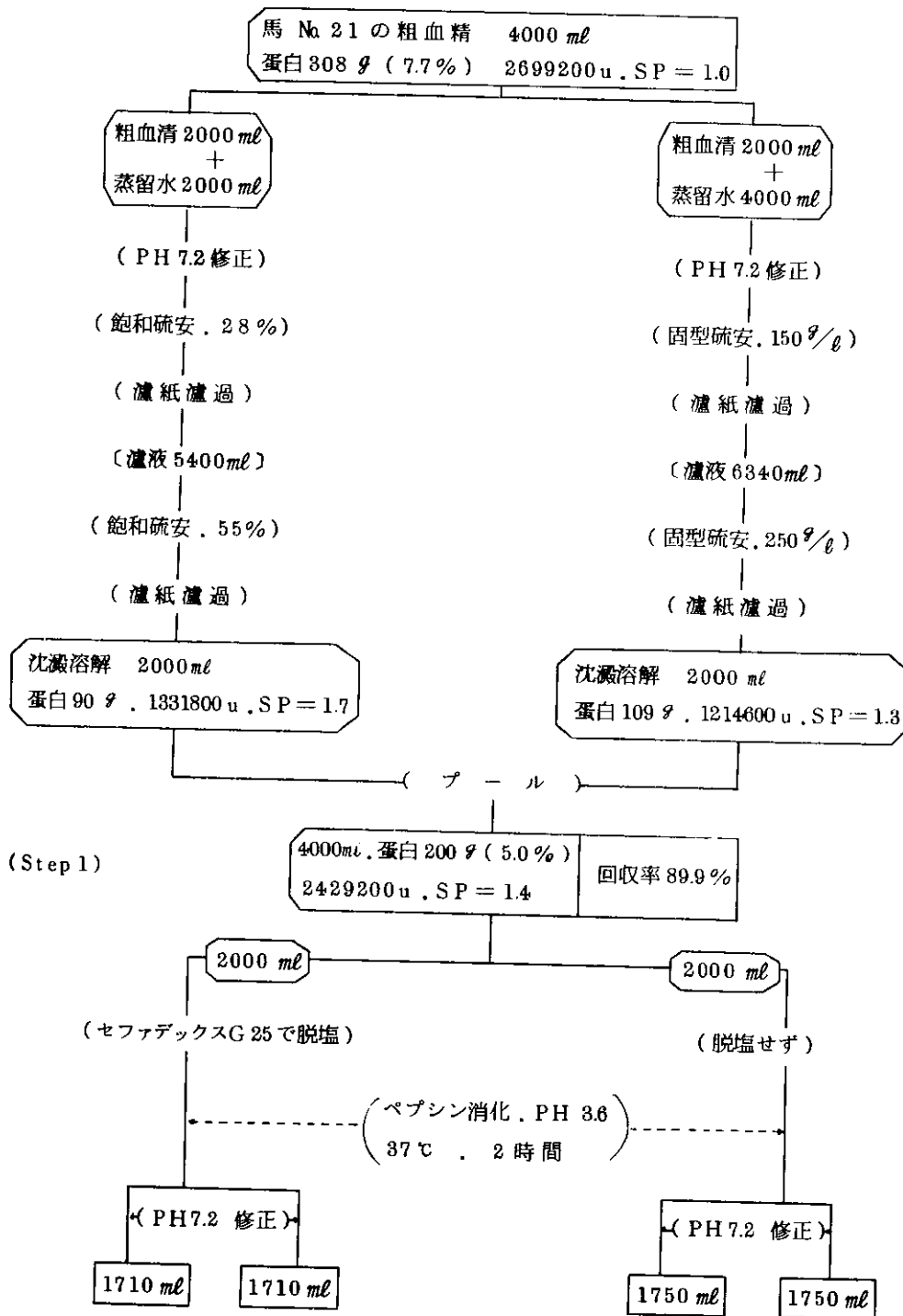
しかし、 $ZnCl_2$ 液を使用した方は $SP = 3.5$ でより良好な成績を得た。又、脱塩しなくてもペプシン消化が可能であった。

しかし、Step 2 の段階ではせいぜい約3倍の精製度を得るに過ぎなかった。

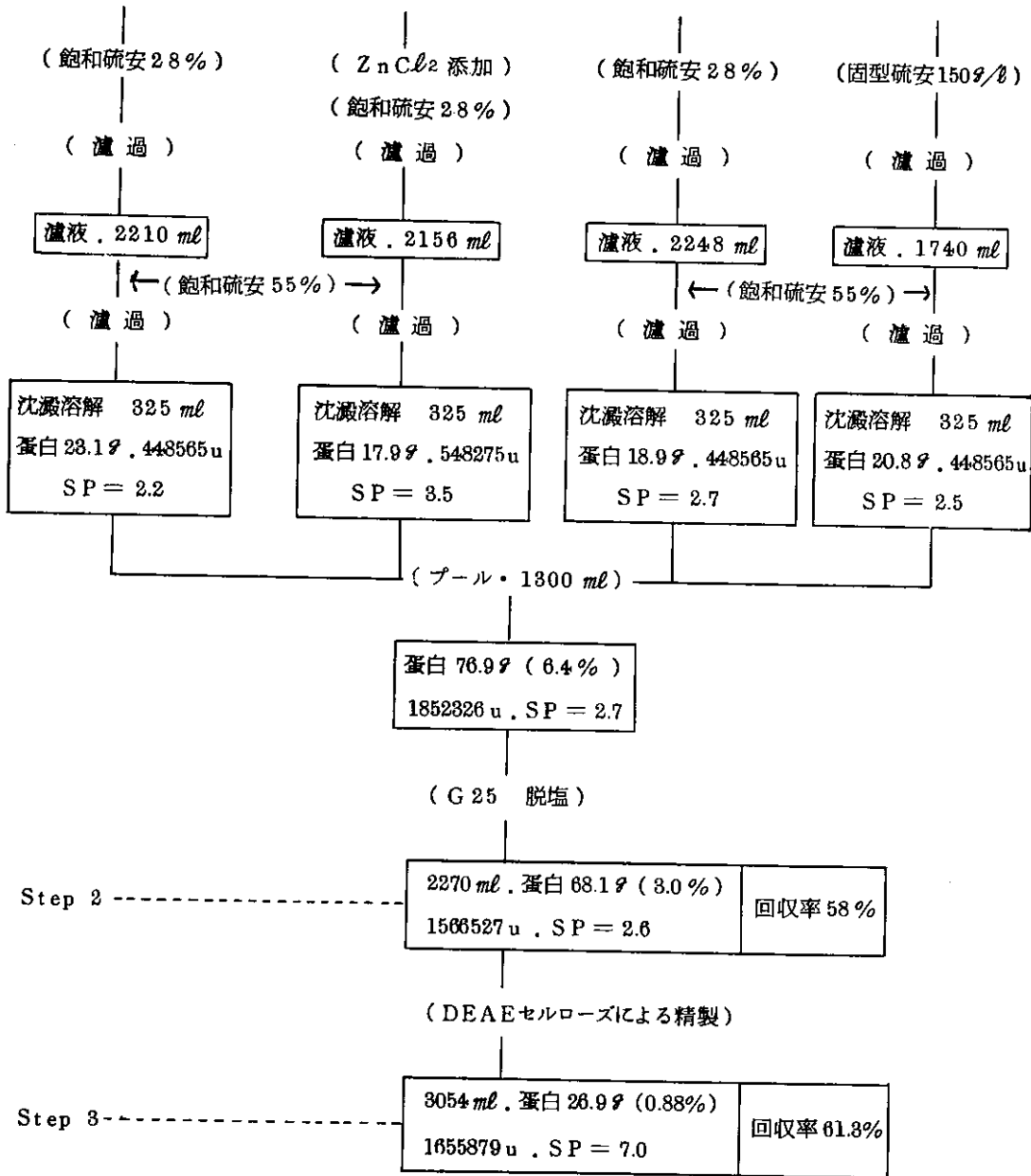
セファデックス G-25 による脱塩法は資料の容量がほぼ2倍に増えたが損失はほとんどなく、一回の操作は数時間で終わった。

表 7

馬抗毒素の精製経過

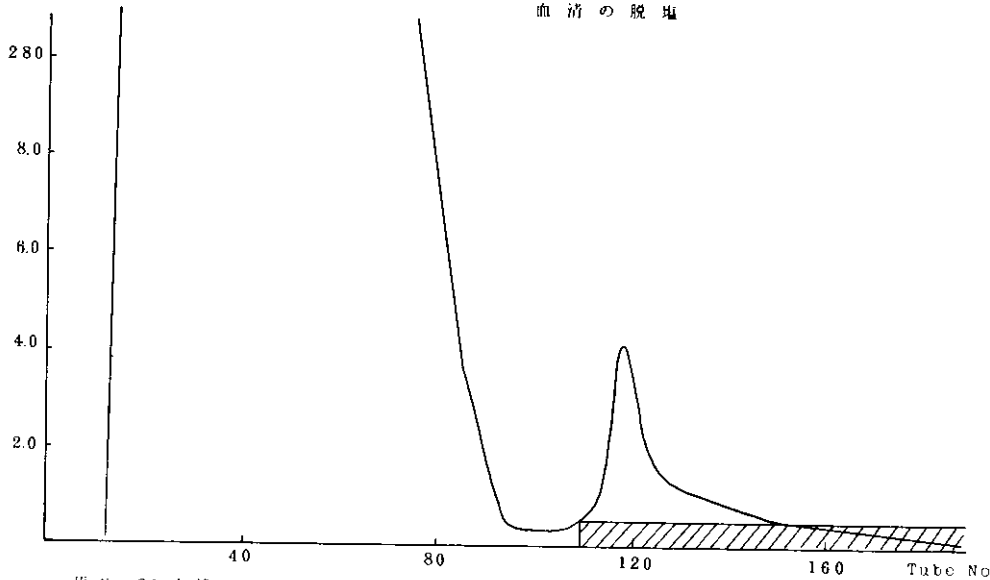


— (表7のつづき) —



一回に適用できる試料容量は約 1000 ml と少ないが、同時に Step 3 のための磷酸バッファーへの平衡化も行うことが出来る利点があった。(図 6)

図 6 セファデックス G-25 による
血清の脱塩



馬 No. 21 血清 : 1000 ml (硫安分画 → 脱塩 → ペプシン消化 → 硫安分画) カラム : 10 × 85 cm
 バッファー : 0.005M PBS (pH 7.4) 20 ml / 50 sec / tube
 [斜線] : 硫安検出

次に、Step 3 として DEAE-セルローズによる精製を行った。

(1) で述べたように、塩酸と苛性ソーダで活性化した DEAE-セルローズを大型カラム (10 × 85 cm) に充填して 0.005M 磷酸バッファーに平衡化した後、Step 2 で得た 2270 ml (蛋白 3%, 68.1 g) の抗毒素液を注入した。

最初に流出した非吸着分画 2054 ml の蛋白濃度は 0.88% (26.9 g) であった。

即ち、Step 3 ではカラム通過前後の活性量の損失は殆どなく、原血清に対する回収率がほぼ 60% 台であるのに対して蛋白は 1/2.5 に減少して SP = 7.0 となった。

これまでの精製実験を参考にして馬 No. 21 の残りの粗血清 2000 ml も同様に精製した。即ち、Step 1 は飽和硫安で分画し、Step 2 でペプシン消化、ZnCl₂ 処理、固型硫安による分画を行い、Step 3 で DEAE-セルローズによる精製を行って前回の精製抗毒素液とプールした。この精製抗毒素液は蛋白濃度が希薄化 (0.9%) していたので Step 4 として硫安による濃縮を行った。

即ち、固型硫安を 450 g/l の割合に加えて生じた沈澱を濾取しセファデックス G-25 カラムで脱塩して蛋白濃度を 2.3% にした。これにグリシン 2%、NaCl 0.85%、マーズン 0.01% を加えて無菌濾過 (ミリポアフィルター GS) を行った後凍結乾燥した。最終製品の製造量及び力価は表 8 に示したが精製度は原血清の 7 倍であり可成り高単位の抗毒素を得ることができた。

(4) Lot 20 の精製

馬Na 22 から一部採血して得た粗血清 1000 ml を硫酸分画 → ペプシン消化 → 硫酸分画 → DEAE-セルローズ → 硫酸濃縮の順で精製した。結果は表 8 に示したとおり精製度が 5.3 倍で回収率は 60% であった。

蛋白濃度 1.9% はあまり濃縮されたとはいえないが抗 HR-Ⅱ価が 1000 u/ml で Lot 19 と同様に高単位の抗毒素を得ることができた。

(5) Lot 21 の精製

原料は一度ペプシン消化 → 硫酸分画法で精製したものであるが力価が低過ぎたので長期間（約 8 年）低温室に放置してあった。この間、既にカビや沈澱物など発生して多少変性していたと思われる。

これに各種実験などに使用した他の抗毒素液の残品など廃棄すべき不良品をプールして約 10 l とした。

これを原料としてカラム法とバッチ法を比較する一方、大量の血清処理を経験する目的で精製実験を行った。

まず、硫酸分画で得た沈澱をセファデックス G-25 で脱塩（1 l × 10 回）して 20 l の溶液を得た。この液を 2 分してその 10 l を大型の DEAE-セルローズカラム（5 l × 2 回）を通過させた後、非吸着画分を硫酸濃縮、脱塩、凍結乾燥した（Lot 21-A）。

残液 10 l は 10 ケのグラスフィルター・ロート（径 10 cm）に活性化した DEAE-セルローズを入れておき、1 ケのロートに対して 1 l 宛加えた後磷酸バッファーを流して洗浄した。各濾液及び洗液を合して硫酸濃縮、脱塩、凍結乾燥したものを Lot 21-B とした。結果は表 8 に示されたとおり、精製度がせいぜい 2 倍になった程度であった。

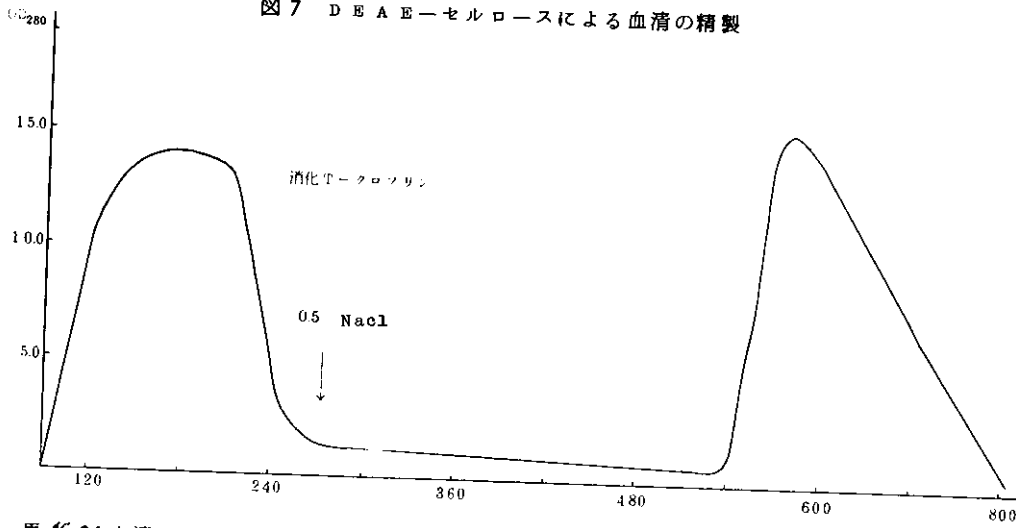
又、カラム法とバッチ法では前者がややよい成績を示したものの大きな差は認められなかった。原料血清とその精製度が不良であったため、改めて実験を繰返す必要があるが、装置の工夫をすればバッチ法でも十分精製可能であることを示している。

IV 電気泳動による観察

実験材料の一部をセルロース、アセテート膜による電気泳動を行って T-グロブリンの挙動や精製状況を観察した。

図 8 は、馬 Na 21 の免疫開始前の血清の泳動像である。即ち、正常馬血清のアルブミン含有率をデンシトメトリーで測定すると、全体の 44.8% であった。

図7 DEAE-セルロースによる血清の精製



馬No. 21血清: 2270 ml (硫酸処理→脱塩→ペプシン消化), カラム: 10×85cm, バッファー:
0.005 M PBS (PH 7.4), Tube No. 260 で 0-5 M NaCl Step wise, 20 ml / 5 min / tube

表8 ハブ抗毒素の製造量及び力価

Lot No.	原血清				分注及び凍乾量	精製抗毒素				備考
	蛋白 mg/ml	力価. u/ml. (u/mg)				蛋白 mg/ml	力価. u/ml. (u/mg)			
		抗出血I	抗出血II	抗致死			抗出血I	抗出血II	抗致死	
Lot 14	78	400 (5.1)	300 (3.8)	320 (3.8)	20ml×205	67	400 (6.0)	350 (5.2)	396 (5.9)	ハブ粗毒免疫
Lot 19	77	750 (9.7)	< 6.3	675 (8.8)	10×110	23	900 (39.1)	8.0	1296 (56.3)	HR-I 免疫
Lot 20	76	< 6.3	750 (9.9)	-	10×42	19	10	1000 (52.6)	-	HR-II 免疫
Lot 21-A	86	300 (3.5)	330 (3.8)	202 (2.3)	20×94	49	315 (6.4)	270 (5.5)	228 (4.7)	ハブ粗毒免疫
Lot 21-B	86	300 (3.5)	330 (3.8)	202 (2.3)	20×96	39	220 (5.5)	200 (5.1)	160 (4.1)	"

図8 馬血清の電気泳動

馬 No 21 正常血清

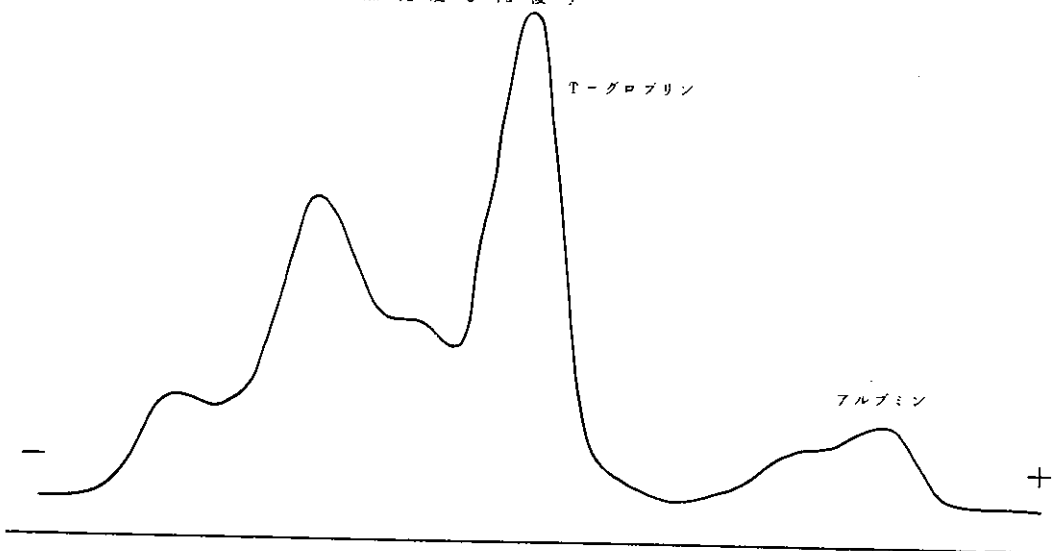


図9は、馬No 21の免疫後期（HR-1で追加免疫8回目）の血清の泳動像である。
このころになるとアルブミン含有率が全体の12.8%に低下し、T-グロブリンが全体の89%
を占める様になり、免疫が可成り進行している様子がよくわかる。

図9 馬血清の電気泳動

馬 No 21-4 試血清

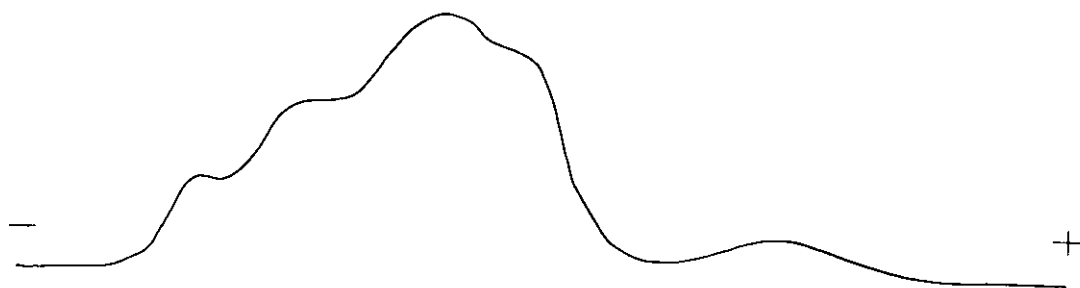
（追加免疫3回後）



次に馬No 21 の全採血後の粗血清を硫酸で分画して図10のような泳動像を得た。
即ち、硫酸分画だけの精製では多量の不純物が共存していることを示している。

図10 馬血清の電気泳動

馬No 21: 硫酸分画による精製



更に図11に示す様にペプシン消化して硫酸分画を行うと消化後の半型T-グロブリンは陰極側に移動していることが図9及び図13の比較でわかる。しかし、このレベルでもT-グロブリン以外の蛋白が約50%含まれている。このことは、DEAE-セルローズによって更に精製すると比活性が約2倍に上昇する事実とよく合致する。

図11 馬血清の電気泳動

馬No 21 = ペプシン消化、硫酸分画による精製



図 12 は、同レベルの精製を行った Lot 14 の泳動像であるが、やはり精製不十分であることが認められる。

図 12 馬血清の電気泳動

Lot 14: ペプシン消化、硫酸分画
による精製

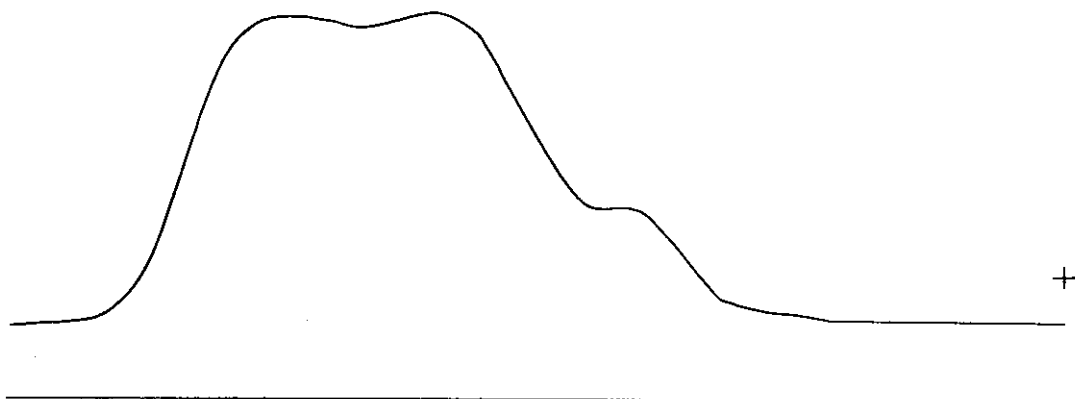
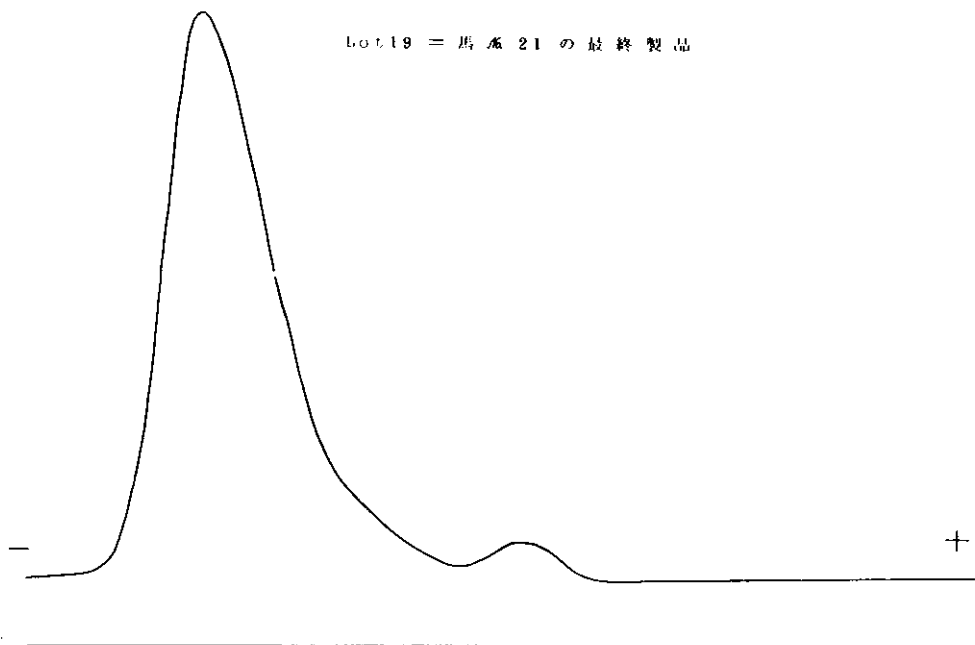


図 13 は最終製品 Lot 19 の泳動像であり、DEAE-セルローズで精製すると僅かに夾雑物が認められるがかなりよく精製されている。

図 13 馬血清の電気泳動

Lot 19 = 馬血清 21 の最終製品



同様に、馬No 22 の免疫6回目の泳動像を図14、図15で比較した。

図14 馬血清の電気泳動

馬No 22 = 正常血清

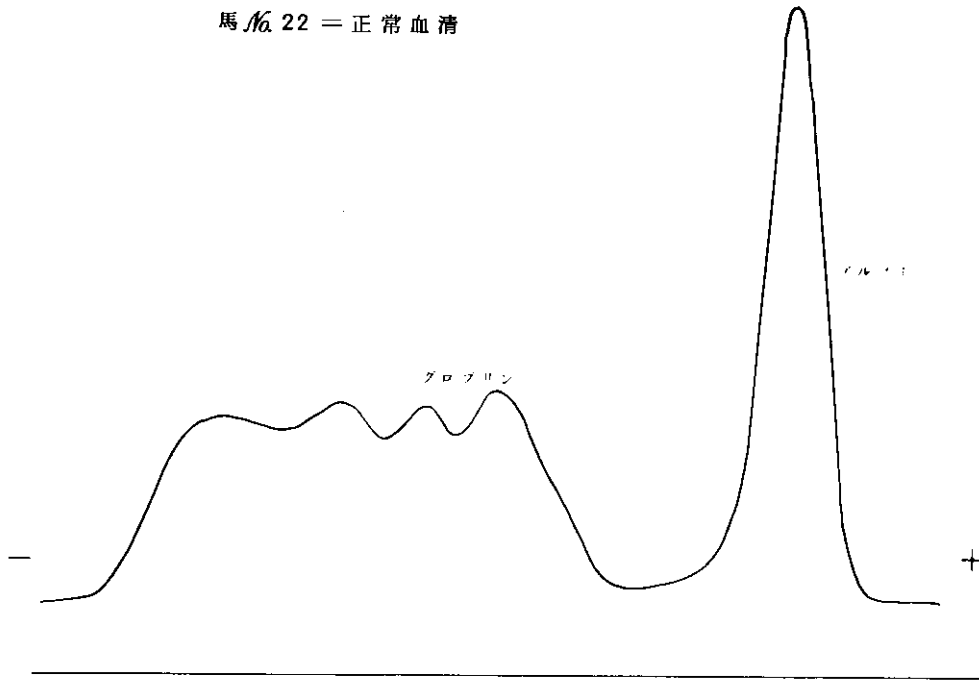
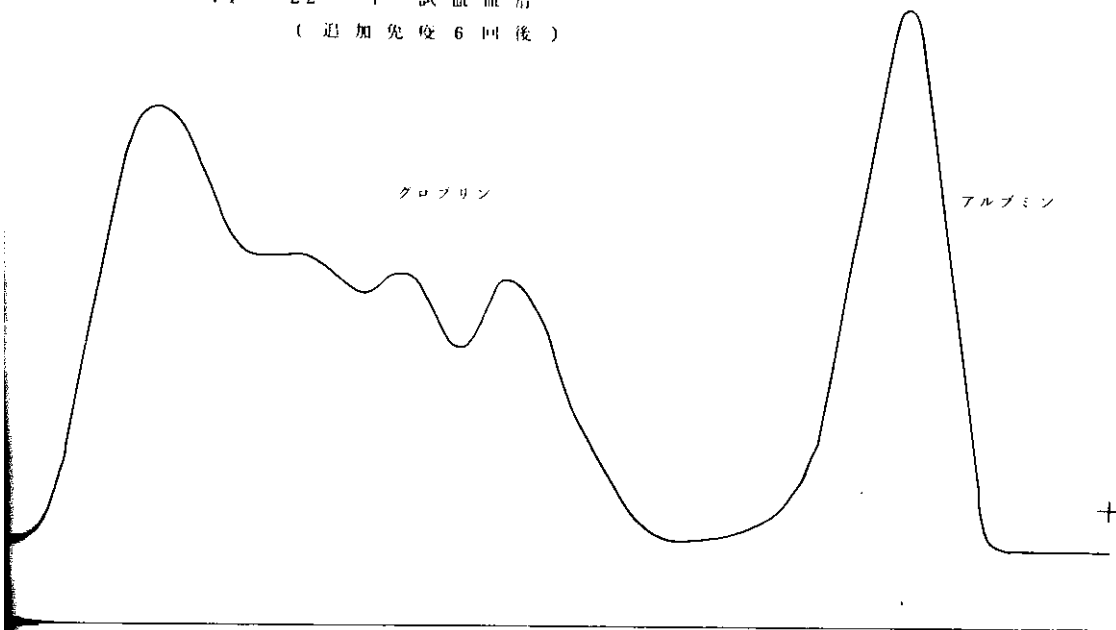


図15 馬血清の電気泳動

74 - 22 - 7 試血血清
(追加免疫6回後)



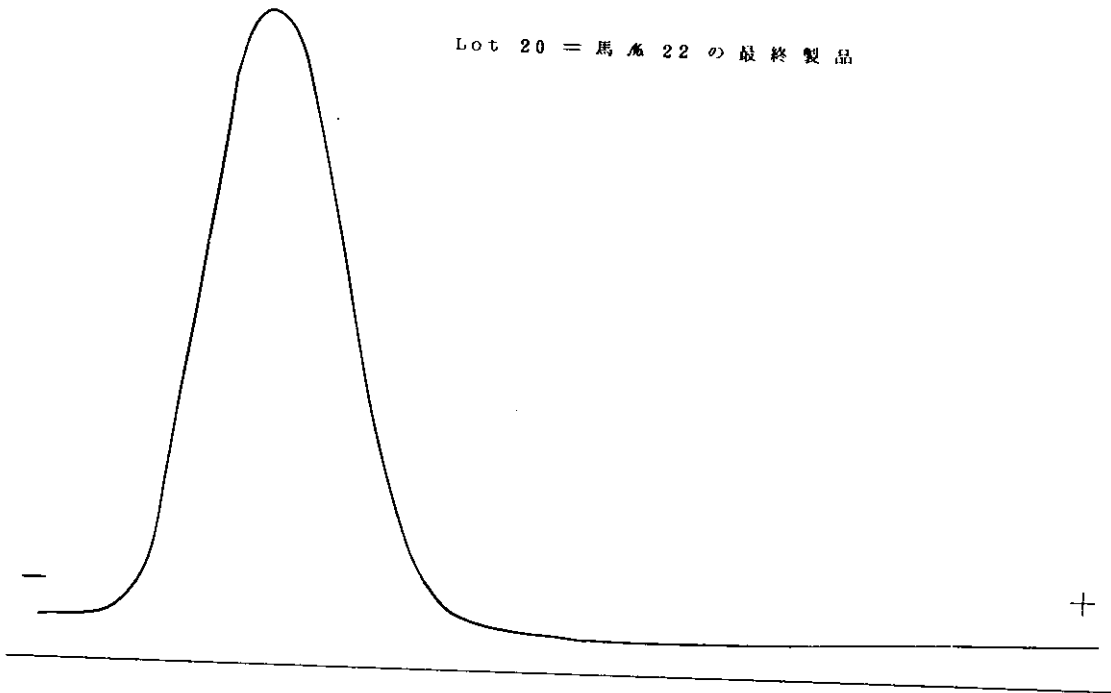
この場合アルブミン含有率が35.4%から28.8%に僅かながら低下しているが馬No.21のように著しい差は認められなかった。

これはγ-グロブリンがあまり産生されていないことを示しておりAnimal unitによる力価測定でも裏付けられた。

しかし、図16に示す様に最終製品Lot 20はよく精製されて単一のピークを示している。

図16 馬血清の電気泳動

Lot 20 = 馬No. 22 の最終製品



総 括 及 び 考 察

ハブ抗毒素の精製法を改良してより高度に精製された免疫グロリンを能率的に抽出する方法を研究した。又、抗HR-I血清及び抗HR-II血清を試験的に製造した。

これらの因子血清は製造法の検討に使用する一方、治療実験や病理学的研究のための実験材料とした。本研究では手始めに試験用毒素の製造から行った。ハブ粗毒をセファデックスG 100で分画した場合のHR-I：粗HR-IIの致死活性量はほぼ1：1であった。

又、両画分のウサギ背皮法による出血活性量はほぼ1：0.7の割合であった。

更に、マウス足蹠法による腫脹活性の分布比率も1：0.7であった。粗HR-II画分は比活性が低いためアンバーライトCG 50で再精製してH₂-0とHR-II画分に分離した。この精製レベルでは収量が著しく悪くなり、試料も希薄化しているためH₂-0とHR-IIの致死活性量を比較することはできなかったが、可成りの腫脹活性がH₂-0画分に含まれていることが認められた。(報告4参照)。

次に精製したHR-IIを単独で馬No 22に免疫したが抗体産生量は馬No 21より不良であった。

即ち、HR-IとHR-IIの1試験毒素量を100 MHDにそろえて、馬No 22の中和終末価を測定すると、馬No 21の抗出血-Iの中和終末価は0.00133 ml ($1/0.00133 = 752 \text{ u/ml}$)であるのに対して、馬No 22の抗出血-IIの中和終末価は0.02 ml ($1/0.02 = 50 \text{ u/ml}$)であり、両者の抗体産生状況は $50/752 = 1/15$ である。

そこで馬No 22をHR-I免疫に変更したところ抗出血-Iの中和終末価0.00227 ml ($1/0.00227 = 441 \text{ u/ml}$)となり良好に上昇することから、再現性の問題は残るとしてもHR-IIの抗原性はもともと弱いと考えられる。(表5参照)

馬の全採血の方法は血液を凝固させて血清を分離する方法と抗凝固剤の添加によってプラズマとして分取する方法を比較したが、後者の方がよい収量を上げることが出来た。

馬の個体差や動脈採血又は静脈採血によっても大きな影響はあるが、我々の経験では静脈より除々にプラズマとして分取した方が収量の点でよい成績を得ている。

抗毒素の精製法は従来ペプシン消化 → 硫安分画法で精製していたが、この方法ではせいぜい粗血清の3倍に精製される程度である。

しかし、DEAE-セルローズによって更に精製すると6～8倍に精製することが出来た。

本実験で行った精製法を略記すると

硫安分画 → ペプシン消化 → 硫安分画 → 脱塩 → DEAE-セルローズ精製 → 濃縮の順に精製して収量は約61%であった。

本法はDEAE-セルローズの活性化又は再生に用する労力と時間を無視できないので、これを能率的に行う器具の考案が必要である。Tグロブリンはペプシン消化によってDEAE-セルローズに吸着されず、他の不活性蛋白は逆によく吸着されるのでカラムより最初に流出する。この性質を利用して大量処理に有利なバッチ法を行ったが材料が不良品であったためよい結果を得ることは出来なかった。これについては、バッチ法に適した器具を考案し、追って実験を重ねる予定であるがバッチ法

による精製は十分可能であると考え。本法では硫安分画後の脱塩を大型カラムによるゲル濾過法で行った。

1回の操作は数時間で終了するが取扱量が約1ℓであり大量の血清を処理するには何回も同様な操作を繰り返すことになる。

結局、流水透析より多少早くなる程度であるがDEAE-セルローズに適用する前の磷酸バッファ-透析を同時に行える利点がある。

次にセルローズアセテート膜によって電気泳動を行いデンストメトリーによってT-グロブリンの挙動をみた結果、精製が進むに従って単一の山になり精製状況の検討に役立った。又、ペプシン消化によって消化T-グロブリンが陰極側に移動しているのが観察された。

同様に試血検体を泳動すると、初めアルブミンの含有率が高い状態から免疫の進行に伴ってT-グロブリンの山が現れアルブミン含有率が低下している状態が観察された。

これによって、免疫の進展状況を参考的に知ることが可能であると考え。

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。

ま と め

沖縄ハブ抗毒素の製造を目的として抗毒素の製造法を再検討しながら従来の精製法と比較した。又、ハブ粗毒中の主要毒成分とされるHR-I及びHR-IIを分離精製して試験用毒素を製造する一方、これらの因子血清を作った。

- (1)ハブ粗毒を分画して試験用毒素を製造した。
- (2)抗HR-I血清及び抗HR-II血清を製造した。
- (3)馬による免疫ではHR-IIの免疫原性がHR-Iに比較して著しく弱い結果を得た。
- (4)ペプシン消化-硫安分画法では抗毒素の比活性が1.5~3倍に上昇する。
- (5)硫安分画後ペプシン消化を行い、更にDEAE-セルローズによって精製した結果、抗毒素の比活性を6~8倍にすることができた。
- (6)カラム法とバッチ法を比較した。
- (7)電気泳動法によってT-グロブリンの精製度を観察した。

参 考 文 献

- 1) 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-XI)。1965-1971。
- 2) Yoshio Sawai, Masaaki Makino, Shonosuke Miyasaki, Koichi Kato, Hideo Adachi, Susumu Mitsuhashi, 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.

- 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, 佐和慎三, 藤本政晴, 今泉 清: ハブ毒のLD₅₀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-Satoh, 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) Hisashi Kondo, Satoru Kondo, Seiji Sadahiro, Kiyosumi Yamauchi, Akira Ohsaka, Ryosuke Murata Zenji Hokama and Masanobu Yamakawa.: Estimation by a new method of the amount of venom ejected by a single bite of *Trimeresurus* species; *Japan J. Med. Sci. Biol.* 25 123-131, 1972.
- 8) 照屋寛善: 衛生動物 10, 115~127, 1959.
- 9) 曾良忠雄: シフテリア抗毒素の免疫化学的研究. *生物物理化学*, 2(3), 193~198, 1955.
- 10) 中村 弘: 抗体の構造に関する実験法, T-グロブリン, 免疫の生化学, 159~167, 1973.
- 11) 中村 弘, 尾上 薫: 抗体の構造に関する実験法. 抗体の精製. 免疫の生化学, 181~196, 1973.
- 12) 逢坂 昭: 出血のメカニズムへの1つのアプローチ. 蛇毒出血因子の研究. *生体の科学*, 24(6), 1~29. 1973.
- 13) Omori-Sato T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65, 1970.
- 14) 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.
- 15) 沖縄県公害衛生研究所報, 第5号, 137~145, 1970.
- 16) 沖縄県公害衛生研究所報, 第7号, 17~19, 1973.
- 17) 外間善次: ハブ(*T. Flavoviridis*)の咬牙実験. 沖縄ハブ抗毒素開発研究報告書, 昭和47
- 18) 牧野正顕: 抗ハブ毒血清の力価測定および2, 3の薬剤の抗ハブ毒作用について, *日新医学*, 47(2), 120~129, 1960.
- 19) Yoshio Sawai, Hiroshi Chinzei, Yoshiharu Kawamura, Tamio Fukuyama and Takashi Okonogi.: Studies on the improvement of treatment of Habu Snake bite. Studies on the improvement of Habu Snake antivenine. *J. Exp. Med.*, 31. 137-150, 1961.
- 20) 沢井芳男: 人と大島とハブと. *日本医事新報*, 1793号, 57~60, 1958.
- 21) 沢井芳男: ハブ毒と死. *東京医事新誌*, 77(9), 501~505, 1960.
- 22) 貞弘省二: ハプトキシイドに関する研究. I. ホルマリンによるトキシイド化. *日本細菌学雑誌*, 26(5,6), 214~220, 1971.