沖縄島産ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）毒の毒性成分 HR1A の検出方法

大城聡子・松田聖子*・泉水由美子・盛根信也・寺田考紀

Detection of Hemorrhagic Metalloproteinase HR1A from *Protobothrops flavoviridis* Venom

Akiko OSHIRO, Seiko MATSUDA*, Yumiko IZUMI, Nobuya MORINE and Koki TERADA

要旨：Sandwich ELISA の結果，抗 HR1A 中和抗体 0403-035 と HR1A の検出可能な抗体は，抗 HR1A 抗体 0403-041 だった．上記 2 抗体によるイムノクロマトグラフィーを用いて，沖縄島産ハブ粗毒を 5 倍から 500,000 倍希釈し，展開した結果，100 倍から 50,000 倍希釈した溶液で反応が見られた．沖縄島産ハブ粗毒から精製された HR1A をイムノクロマトグラフィーで展開させると，571 ng/ml ~3.6 mg/ml の HR1A が検出できた．上記 2 抗体による Sandwich ELISA において，奄美島産ハブ毒 HR1A の反応は，沖縄島産ハブ HR1A の反応より吸光度の値が低かった．沖縄島産ハブに咬まれたマウスの傷口から血液を拭い，イムノクロマトグラフィーで展開させると，Test line 及び Control line に反応が見られた．ヒト全血 25 µl に HR1A を混ぜ，イムノクロマトグラフィーで展開させた結果，ヒト全血 25 µl 中に混ぜた HR1A 200〜500 ng の反応が目視できた．

Key words: *Protobothrops flavoviridis*, Sandwich ELISA, Immunochromatography, Anti HR1A IgG, Okinawa habu

Ⅰ　はじめに

クサリヘビ科に属するハブやマムシは，出血毒が毒性成分の中心となっている [1]．本研究所では，アナフィラキシー反応が懸念されている「はぶウマ抗毒素」に替わる「抗はぶ毒ヒト抗毒素」の研究を行っている．これまでに沖縄島産ハブ毒 HR1A（以下，HR1A）に対し本研究所で作製され，保管されているヒト抗体の中に，抗 HR1A 中和抗体 0403-035（以下，抗 HR1A 中和抗体）がある [2]．

文献で，1 種類のモノクローナル抗体では，ボツリヌス菌の神経毒の有意な中和は見られなかったが，3 種類の抗体の組み合わせで，ボツリヌス菌の神経毒の 450,000 LD_{50S} を中和した報告 [3]や 3 種類の抗体の混合が type H のボツリヌス症の抑制を示した報告がある [4]．

上記の文献等より，HR1A の中和効果を示さないが，HR1A と抗原抗体反応を示す抗体と抗 HR1A 中和抗体を混合することで，HR1A の出血活性に対する中和効果が増加するのではないかと考え，抗 HR1A 中和抗体と他の抗 HR1A 抗体の HR1A に対する反応を Sandwich ELISA やイムノクロマトグラフィーで調べた．

Ⅱ　材料と方法

タイワンハブ毒の迅速検出方法 [5]に準じて Sandwich ELISA で，HR1A の定量可能な 2 種類の抗 HR1A 抗体の組み合わせを検討した．

イムノクロマトグラフィー法では，HR1A の定量可能な 2 種類の抗 HR1A 抗体の組み合わせで，検出条件の検討を行った．その組み合わせのうち，抗 HR1A 中和抗体をイムノクロマト用金コロイド粒径 42 nm で標識した．

0403-041 抗体は，Test line 抗体として Membrane に塗布した．Control line 抗体には，Anti-human IgG developed in rabbit (SIGMA-Aldrich)および Anti-human IgG developed in goat (SIGMA-Aldrich)を用いた．使用したハブ毒は，本研究所で採毒された各種ハブ粗毒（沖縄島産ハブ，タイワンハブ，サキシマハブ，ヒメハブ）を用いた．

盛根ら [6]の方法及びタイワンハブ毒の迅速検出方法 [5]に準じて沖縄島産ハブ及び奄美島産ハブを精製し，得られた HR1A を用いた．また，Sample pad および Absorbent pad は Cellulose sample/absorbent pad を，Conjugate pad, Glass fiber conjugate pad には，Hi-Flow Plus membrane card HF120 を使用した．ブロッキングに 0.5~1% casein と 1% BSA　in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4 を用いた．Membrane の均一な濡れ性を比較するために，メンブレンの洗浄には，0.05% Tween20 in 5mM リン酸緩衝液 pH 7.4 と 5mM リン酸緩衝液 pH 7.4 を使用した．抗体標識金コロイドの再可溶性のため，0.05% PEG 5% スクロース in 5mM リン酸緩衝液 pH 7.4 で金コロイドを希釈し，Conjugate pad に含浸させた．

Ⅲ　結果と考察

1．HR1A 検出条件検討

HR1A の定量可能な 2 種類の抗 HR1A 抗体の組み合わせを Sandwich ELISA により選んだ. 0403-041 抗体を補足

＊現　中部保健所

抗体，抗 HR1A 中和抗体を標識抗体として，Sandwich ELISA により測定を行ったところ，HR1A の濃度に依存した吸光度が得られた（図 1）．

図 1．で得られた 2 種類の抗 HR1A 抗体を用いて，イムノクロマトグラフィーによる HR1A 検出に供した．

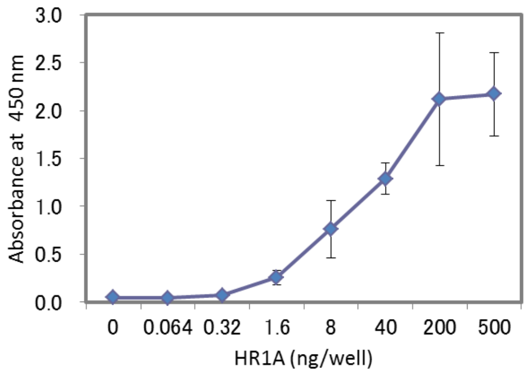

図1．Sandwich ELISAによるHR1A検出（捕捉抗体：0403-041，標識抗体：0403-035）．ブロッキング：1%BSA/PBS, 捕捉抗体：0403-041 250ng/100µl, 0403-035POD標識抗体 ：1:5,000 100µl, 基質：TMB Peroxidase 100µl.

２．HR1A 検出イムノクロマトグラフィーの作製

Hi-Flow Plus membrane card HF120 に捕捉抗体として 0403-041 抗体 3000 ng/0.5 µl，Anti-Human IgG 1000 ng/µl を塗布し，一昼夜自然乾燥させた．Membrane 乾燥後，1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH 7.4 に Membrane をブロッキングした．洗浄には 5mM リン酸緩衝液 pH 7.4，抗体標識金コロイドは，抗 HR1A 中和抗体を 0.1 mg/ml を標識し，希釈せずに 10 µl を Conjugate pad に含浸させたものを使用した．

塗布した Control 抗体に抗ヒト IgG ウサギ抗体を用いたが，抗体がブロッキング溶液をはじき，ブロッキングが不完全になり，抗原抗体反応見られなくなった．

そこで疎水性の高いウサギ由来抗体ではなく，ヤギ由来の抗体を用いることで，Membrane の濡れ性が改善できた．

また，金コロイドに標識した抗 HR1A 中和抗体は，抗原とのモル比より，まだ Capacity があると考え，0.4 mg/ml の中和抗体を標識したが，サンプルと金コロイドが混ざる Conjugate　pad に含浸し，乾燥させると，Conjugate pad 内で抗原と凝集し，金コロイド溶液が流れなくなった．ここでは示していないが，抗原と凝集が小さかった 0.1 mg/ml の抗 HR1A 中和抗体を金コロイドに標識し，10µl を Conjugate pad に含浸させ，乾燥後用いた．

３．イムノクロマトグラフィーによるハブ類粗毒の検出

沖縄島産ハブ毒を「２．HR1A 検出イムノクロマトグラフィーの作製」で作製した HR1A イムノクロマトグラフィーを用いて反応させたところ，100 倍希釈から 50,000 倍希釈した溶液で反応が見られた（図 2）．使用した沖縄ハブ粗毒は，1 個体から採取した毒であり，濃度は UV 法で 1365 mg/ml, Bradford 法で 370 mg/ml だった．

タイワンハブの粗毒には，どの希釈倍率の溶液にも反応せず（図 3），ここでは示していないが，ELISA 法でも反応が見られなかった． また，同様にここでは示していないが，サキシマハブ及びヒメハブの粗毒をそれぞれ希釈した溶液を作成したイムノクロマトグラフィーに反応させた結果，どの希釈倍率の溶液も反応しなかった．その原因として，その他のハブ毒は，抗 HR1A 中和抗体との抗原抗体反応がウエスタンブロット法で確認できた [7] ものから，反応を示さなかった原因として，沖縄島産ハブ以外のハブ毒には，今回の抗体の組み合わせが適切でなかったことが示唆された．

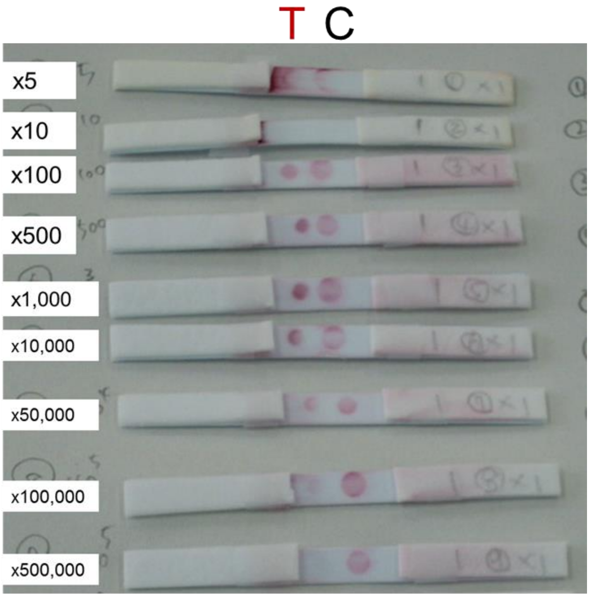

図2.イムノクロマトグラフィーにおける沖縄島産ハブ生粗毒の各希釈液の反応.T: Test line 0403-041, C: Control line Anti－human IgG developed in goat, Conjugate pad: 0.1mg/ml 抗HR1A中和抗体 金コロイド 10µl，ブロッキング：1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4, 10分展開.

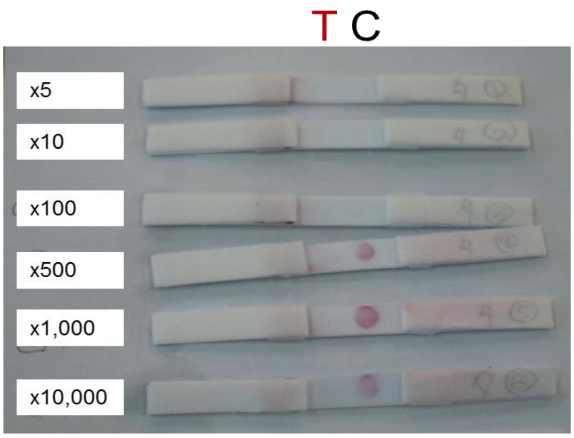

図3.イムノクロマトグラフィーにおけるタイワンハブ生粗毒の各希釈液の反応.T: Test line 0403-041, C: Control line Anti – human IgG developed in goat, Conjugate pad: 0.1mg/ml 抗HR1A中和抗体 金コロイド 10μl，ブロッキング：1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4, 10分展開.

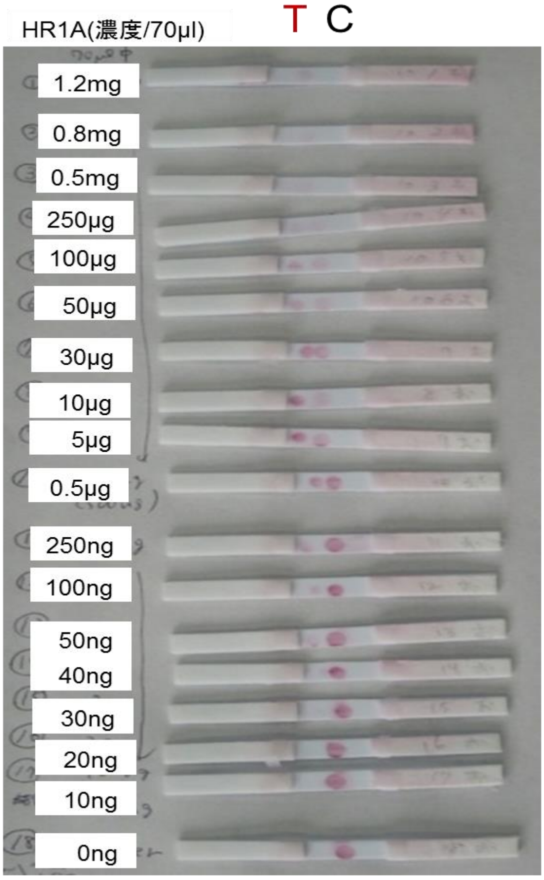

図4.イムノクロマトグラフィーにおける沖縄島産ハブHR1Aの各濃度の反応.T: Test line 0403-041, C: Control line Anti – human IgG developed in goat, Conjugate pad: 0.1mg/ml 抗HR1A中和抗体 金コロイド 10μl，ブロッキング：1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4, 12分展開.

４．イムノクロマトグラフィーによるハブ毒 HR1A 検出範囲

上記イムノクロマトグラフィーで，沖縄島産ハブから精製された HR1A の検出範囲を測定した．展開時間 12 分で，571 ng/ml ~3.6 mg/ml の沖縄島産ハブ由来の HR1A が検出できた（図 4）．また，ここでは示していないが，奄美島産ハブから精製された HR1A の検出範囲は，展開時間 12 分で 1.4 µg/ml ~1.4 mg/ml だった．

この結果より，奄美産ハブから精製された HR1A は，沖縄島産ハブ HR1A に比べ，検出範囲が狭いことがわかった．

Sandwich ELISA 法においても，奄美島産ハブから精製された HR1A は測定できたが，沖縄島産ハブから精製された HR1A より反応が低かった（図 5）．この結果は，奄美島産ハブから精製された HR1A と沖縄島産ハブから精製された HR1A の構造が若干異なることが要因と考える．

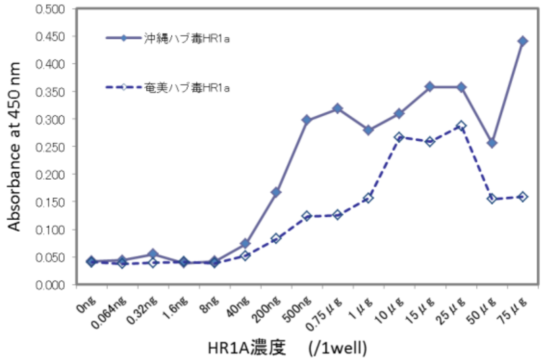

図5. Sandwich ELISAによる沖縄島産ハブHR1A及び奄美島産ハブHR1A検出（捕捉抗体：0403-041，標識抗体：0403-035).ブロッキング：1%BSA　/PBS, 捕捉抗体：0403-041 250ng/100µl, 0403-035POD標識抗体 ：1:5,000 100µl, 基質：TMB Peroxidase 100µl.

５．沖縄島産ハブに咬まれたマウスの傷口拭き取り液から HR1A 検出

ここでは示していないが，モルモットの血液に HR1A を混ぜた溶液をイムノクロマトグラフィーで展開させたところ反応が見られた．そこで，今回の実験では，ハブに咬まれたマウスのその傷口を拭った溶液を HR1A イムノクロマトグラフィーで測定したところ 4 匹中 4 匹のマウスの傷口拭い液から Test line に反応が見られた（図 6）．陰性コントロールとして，マウス血液を 19 倍に希釈した溶液を反応させたが，Control line のみ反応したので，マウス血液中にハブ毒を検出に関わる妨害因子はないと示

唆された．

Sandwich ELISA 法でその拭い液の毒定量を試みたが，Sandwich ELISA 法の測定レンジにあわなかったので，定量できなかった．

６．ヒト全血中に HR1A を混合させた溶液から HR1A 検出

ヒト全血 25 μl に HR1A を混ぜ，イムノクロマトグラフィーで展開させた（図７）．その結果，ヒト全血 25 μl 中に混ぜた HR1A 200〜500 ng の反応が目視できた．

HR1A 200 ng 以下の HR1A は Test line 及び Control line が反応しなかった．また，HR1A 200〜500 ng においても，Control line の反応が薄かった．これらの原因は，Control line に塗布した Anti human IgG がヒト血液中に存在する Human IgG と反応し，金コロイド標識した抗 HR1A 中和抗体との反応を妨害したと考える．

ヒト全血と HR1A を混合した溶液から，0403-041 抗体と抗 HR1A 中和抗体が HR1A 200~500 ng を検出できた結果より，抗 HR1A 中和抗体の HR1A の中和反応条件に，0403-041 抗体が存在することで，さらに中和効果が増加すると考える．

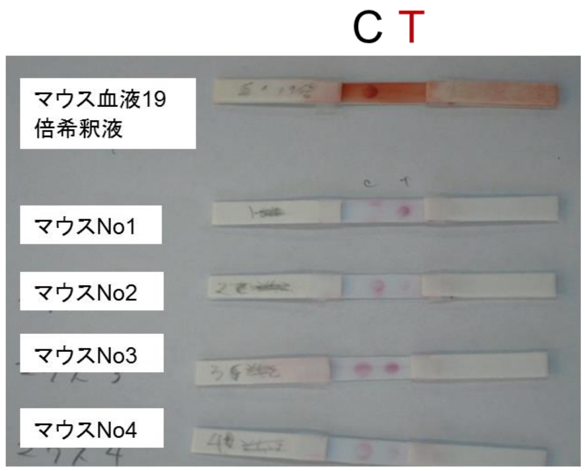

図6.沖縄島産ハブに咬まれたマウスの傷口を拭った液の反応.T: Test line 0403−041, C: Control line Anti − human IgG developed in goat, Conjugate pad: 0.1mg/ml 抗HR1A中和抗体 金コロイド 10μｌ, ブロッキング：1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4, 10分展開.

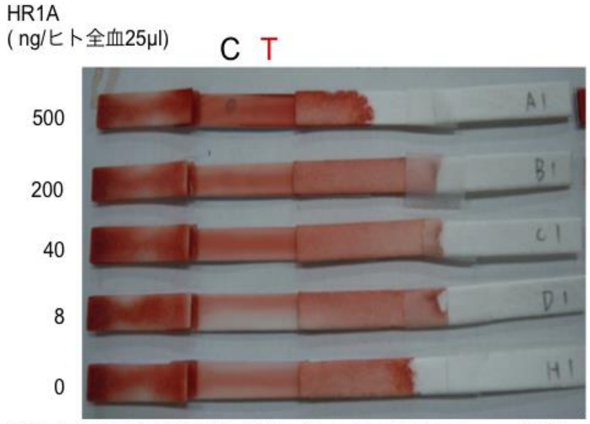

図7.ヒト全血にHR1Aを混ぜた溶液のイムノクロマトグラフィー．反応T: Test line 0403-041, C: Control line Anti - human IgG developed in goat, Conjugate pad: 0.1mg/ml 抗HR1A中和抗体 金コロイド　10μl，ブロッキング：1% casein in 5mM リン酸緩衝液 pH7.4, 10分展開.

Ⅳ 参考文献

1) 上田直子・千々岩崇仁・大野素徳(2004)ハブ毒を科学する　多様な生理機能と加速進化．化学と生物，vol.42 No10:687-693.

2) Morine, N., Matsuda, S., Terada, K., Eto, A., Ishida, I., & Oku, H. (2008). Neutralization of hemorrhagic snake venom metalloproteinase HR1a from Protobothrops flavoviridis by human monoclonal antibody. *Toxicon*, *51*(3), 345-352.

3) Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D. B., Amersdorfer, P., Smith, T. J., Montgomery, V. A., ... & Marks, J. D. (2002). Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(17), 11346-11350.

4) Yongfeng Fan, Jason R. Barash, Jianlong Lou, Fraser Conrad, James D. Marks, and Stephan S. Arnon (2016) Immunological Characterization and Neutralizing Ability of Monoclonal Antibodies Directed Against Botulinum Neurotoxin Type H. *Journal of Infectious Diseases*, 213:10, 1606-1614.

5) 大城聡子・泉水由美子・盛根信也・寺田考紀（2015）タイワンハブ毒の迅速検出の検討．沖縄県衛生環境研究所報，第 49 号：56－60.

6) Nobuya MORINE, Seiko MATUSDA, Koki Terada, Hironori IWASAKI, and Hirosuke OKU(2008)The occurrence of HR1b in the venom of the snake okinawa habu (Protobothrops flavoviridis). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *72*:2, 591-594.

7) 大城聡子・松田聖子・盛根信也(2011)ハブ毒 HR1A ヒト抗体の他ハブ毒との中和反応性．平成 22 年度抗毒素研究報告書，2011，13-17.