

サキシマハブ (*Trimeresurus elegans*) 毒トキシイド に関する基礎的研究

外 間 善 次

Experimental Study on the Toxoid against the Venom of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*)

Zenji HOKAMA

The venom of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) is less toxic than that of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) in their hemorrhagic, necrotic and lethal effects, although the swelling effect of both venom was the same degree. The habu venom could be inactivated with the same amount of dihydrothioctic acid, whereas Sakishima-habu venom was detoxified by the half amount of dihydrothioctic acid.

The toxicity of the venom rose by the treatment of ethanol precipitation in low temperature. The antigenicity of toxoids of crude and purified Sakishima-habu venom which were inactivated by formalin and the crude venom inactivated by dihydrothioctic acid was tested. The results indicated that the neutralizing effect of the sera against the venom was the best in the sera of mice and rabbits which were immunized with the purified toxoid, and the local lesions caused by the challenge of the venom were also the slightest in the rabbits which were immunized with purified toxoid.

Some cross neutralization was observed between the sera of immunized rabbit and the local lesion of actively challenged rabbits which were immunized with both purified Sakishima-habu and habu toxoid.

ま え が き

わが国におけるハブ咬症の治療を強化するための予防トキシイドの研究は近年になつて大きな進歩を見せている。すなわち沢井等(1966a, 1967, 1969b)はジヒドロチオクト酸(以下DHTA)で不活化されたハブ(*Trimeresurus flavoviridis*)毒がマウスあるいはウサギに対して抗毒原性のあることをのべた。さらに沢井等(1966b, 1969c)及び宮城等(1966c)はDHTAにより不活化されたトキシイドを試作し、奄美大島及び沖縄において野外実験を行なつた。また一方において沢井等(1968)はDHTAがハブ毒ばかりでなくCrotalidae, Viperidae及び

Elapidae科の蛇毒をも不活化することをのべた。その後、清水(1967)はマムシ(*Agkistrodon halys*)毒のトキシイドに関する基礎的研究を行ない、マムシ毒をDHTAで不活化したトキシイドがハブ毒トキシイドと同様に動物に対して抗毒原性のあることを示した。また沢井等(1968)は台湾産の毒蛇タイワンハブ(*Trimeresurus mucrosquamatus*)、アオハブ(*Trimeresurus stejnegeri*)、百歩蛇(*Agkistrodon acutus*)、タイワンコブラ(*Naja naja atra*)及びアマガサヘビ(*Bungarus multicinctus*)毒をDHTAで不活化し、動物を免疫した結果、これ等の動物がそれぞれの毒の攻撃に対して防御することを示した。一方において小此木等(1968)はハブ毒をエタノールで処理

し、その沈澱にホルマリンを加えて不活化したトキシイドの抗原性がすぐれていることをのべ、さらに若干の人体接種成績について報告した。また貞弘(1971)はハブ毒を精製分画して得た IHR 1 及び HR 2 の出血因子を混合し、ホルマリンで不活化したトキシイドの抗毒原性のすぐれていることをのべ、さらに人体接種を試みている。

ところで沖縄八重山群島に棲息するサキシマハブによる咬症は臨床的にはハブ咬症より軽いが、その咬症率の高いのが特徴的である。そこで今回はサキシマハブ毒トキシイドの基礎的研究として、DHITA あるいはホルマリンによる不活化、低温エタノール沈澱によるトキシイドの精製、ハブ毒トキシイドとの抗毒原性の比較等について検討を行なつたのでここに報告する次第である。

実験方法及び材料

1. 蛇毒：サキシマハブ毒及びハブ毒(沖縄本島産)はいずれも琉球血清製剤研究所において採取されたものを用いた。

2. ジヒドロチオクト酸：藤沢薬品工業株式会社より供給された0.5%溶液で重炭酸ナトリウム0.23%、磷酸ナトリウム0.023%、磷酸2水素ナトリウム0.848%を含有し、pHは7.5である。

3. サキシマハブ毒及びハブ毒のマウスの後肢筋肉内注

射による病変の観察：一定量のサキシマハブ毒及びハブ毒をマウスの後肢大腿部に筋注射し、24時間後に殺し、局所の皮膚をはぎとり、大腿部を露出し、出血が全くないか、注射割の痕のわずかな点状出血のある場合を0、出血が後肢の $\frac{1}{3}$ 以内のものを1、同じく $\frac{2}{3}$ 以内のものを2、同じく下腹部にまで及ぶものを3とし、各観察動物の病変の点数の平均値によつてあらわした。

ウサギの後肢大腿筋肉注射による病変：一定量のサキシマハブ毒及びハブ毒をウサギの後肢大腿筋肉内に注射し、24時間後に殺し、皮膚をはぎとつた後出血が淡赤色または赤色で、注射局所周囲に限局するものを0、赤色または暗赤色で注射局所より拡がり、大腿部全部に及んでいるものを1、出血が下腹部にまで及んでいるものを2とした。

4. 血抗毒素の測定：被検血清0.1mlに倍数称釈したサキシマハブ毒及びハブ毒0.1mlを混合し、37°C 1時間放置後、マウスの右後肢の筋肉内注射を行ない、24時間後に前述のように局所の病変の平均の点数を計算し毒のみの対照群の病変と比較した。

5. マウスの足蹠注射による腫脹の測定法：20gのマウスの左後肢足蹠皮下に被検液0.05mlを接種し、24時間後に殺し、足関節より切断して秤量した。非接種側を100%とした時の接種側の重量を求め、用いたマウスの平均値を計算した。

Table 1. The fatal toxicity of Sakishima-habu venom and habu venom on mice.

Venom of <i>T. f.</i> (mg/kg)*	Died/Used Mice	Venom of <i>T. e.</i> (mg/kg)*	Died/Used Mice
3.3	5/5	5.0	5/5
3.2	4/5	4.8	3/5
3.1	3/5	4.6	2/5
3.0	0/5	4.4	1/5
		4.2	1/5
		4.0	0/5
LD ₅₀ 3.05 mg/kg (2.88-3.23 mg)**		LD ₅₀ 4.66 mg/kg (4.40-4.95 mg)**	
16.25	5/5	22.5	5/5
15.0	4/5	21.25	2/5
13.75	3/5	20.0	2/5
12.5	2/5	18.75	1/5
11.25	0/5	17.5	0/5
LD ₅₀ 13.25 mg/kg (11.75-15 mg)***		LD ₅₀ 22 mg/kg (20.5-23.6 mg)***	

* Weight of dried venom. ** Intravenous injection. *** Intramuscular injection.

T. f. : *Trimeresurus flavoviridis.* *T. e.* : *Trimeresurus elegans.*

実験成績

1. マウスに対するサキシマハブ毒の致死性

マウスの静脈内接種：サキシマハブ毒0.1mg, 0.096mg, 0.092mg, 0.088mg, 0.084mg, 0.08mgの6段階の濃度の溶液を0.2ml ずつ5匹の ddy 系のマウス(22g±2g)の尾静脈に注射し、24時間後の生死から Litchfield Wilcoxon (1949)の方法で LD₅₀ を計算した。対照としてハブ毒0.066mg, 0.064mg, 0.062mg 及び 0.06mg を、それぞれ同様な方法でマウスに注射して LD₅₀ を計算した。それ等の結果は表1にまとめられているが、サキシマハブ毒の LD₅₀ は4.66mg/kg (信頼限界は4.4mg~4.95mg)で、ハブ毒の LD₅₀ 3.05mg/kg (信頼限界は2.88mg~3.22mg)に比べると大きい値を示し、その毒性の弱いことを示している。

マウスの筋肉内接種：サキシマハブ毒の濃度を0.45mg, 0.425mg, 0.4mg, 0.375mg, 0.35mg, の5段階にわけ、それぞれの濃度の溶液を前と同様な方法でマウスの後肢筋肉内に注射した結果、表1に示されたようにサキシマハブ毒の LD₅₀ は22mg/kg (信頼限界は20.5mg~23.6mg)、ハブ毒の場合は13.25mg/kg (信頼限界は11.75mg~15mg)で両者の毒ともに静脈内注射によるよりも毒性が減弱していた。

2. サキシマハブ毒の出血及び壊死効果

マウスの筋肉内注射：サキシマハブ毒の8r, 4r, 2r, 1r, 0.5r, 0.25r, 0.125r の0.1ml ずつをマウスの後肢筋肉内に注射し、24時間後に殺して局所における出血を観察した。対照としてハブ毒を前と同じ方法でマウスに注射して観察した。それ等の結果は表2にまとめら

Table 2. Hemorrhagic effect of Sakishima-habu and habu on mice and rabbits.

Venom (r)	Sakishima-habu		Habu	
	im	ic	im	ic
8	3.0	26 mm	2.5	19.8 mm
4	2.0	21.6	1.5	14.5
2	1.5	17	1.5	13.8
1	1.5	15	1.0	13.8
0.5	1.0	10	1.0	10
0.25	0.5	9.3	0.5	9
0.13	0	8.8	0	8.8

im : Intramuscular injection of venoms in mice.

ic : Intracutaneous injection of venoms in rabbits.

The numbers in mm represent the mean value of larger and smaller diameters of hemorrhages.

Table 3. Hemorrhagic and necrotic effect of Sakishima-habu and habu venom on rabbit.

Venom (mg)	Sakishima-habu		Habu	
	H. (cm)	S.	H. (cm)	S.
5	4×0.8	(-)	5×1.2	++
1	4×1.5	(-)	5×1.2	+
0.1	4×0.8	(-)	5×1.2	+

The size of hemorrhage indicated by cm.

H. : Hemorrhage.

S. : Softening of muscle tissues.

れているが、サキシマハブ毒の最小出血量は0.5rでハブ毒のそれと殆んど差が認められなかった。

ウサギの皮内注射：前記と同じ毒量をウサギの皮内に注射して出血の程度を比較した結果は表2に示されているが、2r以下の毒量では両者の毒の強さにあまり差は認められなかったが4rないし8rの毒量ではサキシマハブ毒はハブ毒よりも小さい出血斑を示した。

ウサギの筋肉内注射：サキシマハブ毒の5mg, 1mg, 0.1mg 溶液0.2ml ずつをウサギの左後肢の筋肉内に注射し、24時間後に殺し、局所における出血および筋肉組織の軟化を観察した。対照としてハブ毒を前と同様な方法でウサギに筋注した。それ等の結果は表3に示されているが、0.1mgのサキシマハブ毒では出血の大きさは4cm×0.8cmで赤褐色を呈し、筋膜下に及んでいるが筋組織の軟化は認められなかった。これに対してハブ毒では出血の範囲は5cm×1.2cmに及ぶ暗赤色を呈し、全筋肉と筋膜下にも出血が及び、部分的に軟化していた。1mgの攻撃群ではサキシマハブ毒では4cm×1.5cmに出血が著明で一部暗赤色を呈しているが、軟化はみられなかった。これに反してハブ毒では5cm×1.2cmにわたる出血が下腿にまで及び、大腿の内側には軟化がみとめられた。次に5mgの注射群ではサキシマハブ毒は4cm×0.8cmに及ぶ出血が認められたが、組織の軟化は認められなかった。これに反してハブ毒では出血は5cm×1.2cmに及び組織の軟化が著明であつた。このようにしてサキシマハブ毒の注射局所における出血あるいは筋肉組織の軟化を起す作用は、ハブ毒にくらべると弱いことがうかがわれた。

3. マウスの足蹠皮下接種によるサキシマハブ毒の腫脹効果

サキシマハブ毒の10r, 2.5r 及び 0.6rの0.05mlを5匹ずつのマウスの左足蹠に接種し、24時間後の腫脹をみ

Table 4. Swelling effect of Sakishima-habu venom and habu venom on mice.

Venom (r)	Sakishima-habu	Habu
10	138.3 (±6.1)	145.1 (±5.0)
2.6	133.0 (±5.2)	122.5 (±1.7)
0.6	118.4 (±1.4)	108.5 (±1.2)

ると表4に示されたように、2.5rまでは出血を伴った腫脹がみとめられ、0.6rでは腫脹のみが認められた。対照として同様な実験をハブ毒で行った結果と比較すると、ハブ毒でも2.5rまでの腫脹は出血を伴っていた。これらの結果から両者の毒の腫脹効果にはあまり著しい差は認められなかつた。次に10rのサキシマハブ毒とハブ毒とをそれぞれ5匹ずつのマウスの足蹠の皮下に注射し、日を追って腫脹の経過をたどつてみると、注射後第3日目までは著明な腫脹がみとめられたが、それ以降は急速に回復し第6日目には殆んど正常にもどつた。

4. DHTA によるサキシマハブ毒の不活化

マウスの筋肉内注射：0.5mgのサキシマハブ毒に同量、1/2, 1/5, 1/10, 1/20量のDHTA溶液を混合し、37°Cに1ないし3, 6, 24時間、2日、3日、5日間放置したのち、それぞれの0.1mlを2匹ずつのマウスの後肢の筋肉内に注射し、24時間後に殺して局所における出血の有無を検討した。実験成績は表5にまとめられているが、サキシマハブ毒と同量のDHTAを混合した場合には6時間で出血性は失なわれた。またDHTAが1/2量では24時間後に出血性は失なわれた。しかしDHTAが1/5ないし1/10量では出血阻止効果は不完全であ

るかあるいは全く無効であつた。また対照では24時間放置後までの毒で致死性がみとめられたが、DHTAが添加されたものでは致死性はすべて阻止された。

マウス腹腔内注射：同様な方法でDHTAを添加したサキシマハブ毒をマウスの腹腔内に注射した場合は表5に示されたように対照のマウスがすべて死亡したのに対し、DHTAを同量あるいは1/2量に加えた群のマウスはすべて生残つた。またDHTA1/5量を量に加えたマウスでは37°C、1時間放置の群が死亡した外は全部生残つた。また1/10, ないし1/20のDHTA量では3時間ないし28時間放置までの群のマウスが死亡した外は生残つた。

ウサギの皮内注射：250rのサキシマハブ毒を前と同様な方法でDHTAを添加し、37°C、1時間ないし5日放置後に、それぞれの0.1mlずつをウサギの皮内に注射し、24時間後に出血の有無をしらべた。実験成績は表5に示されているが、DHTAを等量に添加した場合には6時間で出血性は全く失なわれ、それ以下の1/2, 1/5, ないし1/10の添加量ではいずれも24時間で全く消失していた。これに反して1/20量の添加ではその出血性は時間とともにやや減弱する傾向がみとめられたが、120時間の放置後でもなお明瞭な出血斑が認められた。

マウスの足蹠注射：前と同じ方法で125rのサキシマハブ毒をマウスの足蹠に注射した結果は表6にまとめられているが、同量または1/2量にDHTAを添加した群のマウスでは3時間放置までは出血を伴つた強い腫脹が認められ、それ以後は急速に正常値に近づいた。また出血を伴つた強い腫脹は1/5量のDHTAを添加した群では6時間ま

Table 5. Inactivation of Sakishima-habu venom by DHTA.

DHTA	1 : 1			1 : 2			1 : 5			1 : 10			1 : 20			0	
	im	ip	ic	im	ip	ic	im	ip	ic	im	ip	ic	im	ip	ic	im	ip
1 h	3	S	17.5	3	S	14.5	3	D	17	3	D	16.5	3	D	24.5	D	D
3	3	S	11	3	S	12.5	3	S	13.5	3	D	14.5	3	D	16.5	D	D
6	0	S	0	2	S	9	3	S	12	3	S	10.5	3	D	12.5	D	D
24	0	S	0	0	S	0	1	S	0	3	S	0	3	D	12.5	D	D
48	0	S	0	0	S	0	1	S	0	3	S	0	3	D	12.5	3	D
72	0	S	0	0	S	0	1	S	0	3	S	0	3	S*	12.5	3	D
120	0	S	0	0	S	0	1	S	0	3	S	0	3	S*	12.5	3	D

im : Intramuscular injection in mice. The numbers indicate the score of hemorrhage.

ip : Intraperitoneal injection in mice. S : survived. D : died. ic : Intracutaneous injection in rabbit.

The numbers indicate the mean values of large and small diameter of hemorrhage in mm.

* One of the two mice died.

Table 6. Swelling effect of Sakishima-habu venom treated by DHTA and injected into the sole of mice.

DHTA	1 : 1	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 20	0
1 h	169 +++	174 +++	182 +++	186 +++	191 +++	191 +++
3	157 +++	163 +++	169 +++	157 +++	194 +++	173 +++
6	113 (-)	121 +	162 +++	173 +++	196 +++	179 +++
24	114 (-)	116 (-)	118 +	179 +++	202 +++	189 +++
48	108 (-)	112 (-)	107 (-)	135 ++	160 +++	206 +++
72	109 (-)	110 (-)	113 (-)	153 ++	187 +++	187 +++
120	105 (-)	106 (-)	108 (-)	158 ++	172 +++	203 +++
DHTA*	101	102	100	104	103	

125 γ of the venom was mixed with varying amount of DHTA and incubated at 37°C for one or 120 hours. 0.1 ml of the treated venom was injected into the sole of mice. + Degree of hemorrhage, * Swelling effect by DHTA alone. Number indicated the weight of swollen feet compared with that of healthy ones which were fixed as 100.

で、1/10以上の量では120時間放置しても認められた。

これ等の結果をまとめてみると DHTA を加えることにより致死活性は同量または 1/2 量の添加では 37°C, 1 時間でなくなる。また 1/5 量の添加では 3 時間後に、また 1/10 量では 6 時間後になくなっていく。1/10 量では致死を阻止することは困難であった。次に出血は同量混合では 6 時間の放置で阻止されるようになり、1/2 量の混合では 24 時間後に完全に出血はなくなった。それ以下の DHTA の量では出血の阻止は完全には行なわれなかった。また腫脹と出血は並行しており、出血が強く起るようなばあいは腫脹も著明であった。

5. サキシマハブ毒の部分的精製及びホルマリンによる不活化

低温エタノール沈澱法による精製：沢井等 (1972) はハブ毒トキソイドを精製するために粗毒の 0.5% 溶液に -10°C で 30% の割合で純エタノールを加え、5 時間後に 10,000rpm, 20 分遠心後、沈澱を磷酸緩衝液で原量にもどし、さらにホルマリンを 1% に加え、pH 7, 37°C, 1 週間放置した後にホルマリンを透析によつて取り除き、シャンペラン濾過器を通した精製トキソイドが DHTA トキソイドより勝れていることを述べた。そこで今回はこれと同じ方法でサキシマハブ毒の精製を行なった。精製されたサキシマハブ毒のマウスに対する毒性は表 7 に示されているが、マウス静脈内注射による毒は裂白量に

Table 7. The fatal toxicity of purified Sakishima habu venom on mice.

Venom (mg/kg)***	Died/Used*	Venom (mg/kg)	Died/Used**
9.6	5/5	3.0	5/5
8.8	4/5	2.8	2/5
8.0	3/5	2.6	2/5
7.2	1/5	2.4	1/5
6.4	0/5	2.2	0/5
LD ₅₀ : 7.8 mg/kg (6.9 mg—8.8 mg)		LD ₅₀ : 2.76 mg/kg (2.58 mg—2.95 mg)	

* Intramuscular injection of venom.

** Intravenous injection of venom.

*** Amount of protein in purified venom.

して LD₅₀ は 2.76mg/kg (信頼限界 2.58mg~2.95mg) であり、筋肉内注射では LD₅₀ は 7.8mg/kg (信頼限界 6.9mg~8.8mg) であった。

精製毒のホルマリンによる不活化：精製毒及び粗毒 1 mg, 0.5mg 及び 0.25mg に 0.2% にホルマリンを加え、48 時間ごとにさらに 0.2% ずつ増量し、最終濃度がそれぞれ 0.6%, 0.8%, 1% になるようにし、2 週間放置した後、0.1ml ずつを 3 匹のマウスに筋注し、24 時間後に出血及び致死を観察した。また腫脹は 0.125mg の毒を上述の方法で不活化したものを 0.05ml ずつをマウス足

Table 8. Inactivation of purified Sakishima-habu venom by formalin.

Formalin(%)	Lethality			Hemorrhage			Swelling (%)
	1.0*	0.5*	0.25*	1.0*	0.5*	0.25*	
0.6	S(S)	S(S)	S(S)	1(3)**	1(1.3)**	0(0.3)**	0.125*
0.8	S(S)	S(S)	S(S)	0.3(0)	0(0)	0(0)	114 (111)
1.0	S(S)	S(S)	S(S)	0(0)	0(0)	0(0)	107 (109)
							105 (104)

* Amount of venom in mg used for inactivation. S : Survived.

** Mean score of hemorrhage by the purified venom, the figure in parentheses indicate the scores of hemorrhage by the crude venom.

Table 9. Injection of Sakishima-habu venom into mice immunized with the same kinds of toxoid.

Venom (mg)	DHTA-Td	APF-Td	Crude-Td	0
1.2	—	5/5	5/5	—
1.0	5/5	4/5	5/5	5/5
0.8	4/5	4/5	5/5	5/5
0.6	1/5	1/5	3/5	3/5
0.4	0/5	0/5	0/5	0/5

DHT : Crude venom toxoid inactivated by DHTA.
APF : Purified venom toxoid inactivated by formalin. Crude-Td : Crude venom toxoid inactivated by formalin. Numerators indicate the number of deaths. Denominators indicate the numbers of mice used. The venom was challenged intramuscularly.

臍皮下に注射した。

実験成績は8表に示されているが、精製毒の致死性は0.6%のホルマリンですでに失活したが、出血性は失活が不完全で、1%の濃度ではじめて完全に失なわれた。また腫脹性は0.8%ないし1%でほとんど失なわれた。これに反して粗毒の致死性の失活は精製毒と同程度であったが、出血性の失活は0.6%のホルマリン濃度ではとくに1mgの毒の失活がおくれるのが認められた。

6. サキシマハブ毒トキシイドのマウスに対する免疫原性

つぎに精製ホルマリントキシイドの免疫原性を DHTA 粗毒トキシイド及びホルマリン粗毒トキシイドとの比較を行なった。

それぞれのトキシイド0.1ml (0.5mgの毒量) ずつをマウスの皮内に注射し、4週後に1週間隔で2回、0.1mg ずつの毒量のトキシイド0.1ml ずつを追加免疫し、最終免疫1週後に1.2mg, 1mg, 0.8mg, 0.6mg 及び0.4mgの毒を0.1ml ずつ筋肉内攻撃を行なって生死を観察した。

Table 10. Anti-hemorrhagic effect of immunized mice by Sakishima-habu toxoid against the challenge of the venom.

Venom (r)	DHTA-Td	APF-Td	Crude-Td	0
37.5	3*	3	3	3
18.75	3	1.3	3	3
9.6	3	1.3	3	3
4.8	2	0.6	2	2
2.4	1	0	1	1
1.2	0	0	0	1
0.6	0.3	0	0	0.3
0.3	0	0	0	0

The venom was challenged intramuscularly.

* The numbers are mean score of degree of hemorrhage in three mice.

実験成績は9表に示されているが、ホルマリン精製トキシイド及び DHTA トキシイドがわずかに防御効果を示した外はあまり差がみとめられなかった。

次に同様に免疫されたマウスに、37.5r から0.3r に至る濃度の毒を筋肉内攻撃を行ない、局所の出血ないし壊死防御について観察した。

実験成績は表10に示されているが、局所の病変に対する防御は精製トキシイドが著明で、2.4rの毒(2mld)の出血を完全におさえ、18.75rまでの毒による出血を軽減していた。これに対して DHTA トキシイド及び粗毒トキシイドの防御力はあまり著明ではなかった。

次に同様な方法で免疫されたマウスの最終免疫後1週に採血したプール血清の中和能をしらべたが、その結果は表10にまとめられている。それによると前と同様な傾向がみられ、精製トキシイドの免疫マウスの血清の中和能が最も勝れ、その0.1mlは18.75r (16mhd)rの毒の出血を完全に、また37.5rの毒の出血を軽減していた。これに反してホルマリン粗毒ないし DHTA トキシイドで

Table 11. Anti-hemorrhagic effect of sera of immunized rabbit and mice against Sakishima-habu venom.

Venom (r)	DHTA-Td	APF-Td	Crude-Td	0
75	3.0*	1.3	3	3
37.5	2.7(2)**	0 (1)	2.3(3)	3 (3)
18.75	3.0(2)	0 (0)	1.7(2)	2.3(3)
9.6	1.1(1)	0 (0)	0 (1)	2.3(3)
4.8	1.0(0)	0 (0)	0 (1)	1.7(2)
2.4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.0(1)
1.2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.0(1)
0.6	0	0	0	0 (0)

0.1 ml of serum was added with 0.1 ml of the venom and injected intramuscularly into each mouse. Mean score of degree of hemorrhage in three mice which were injected with the mixture of immunized rabbit* or mice** sera.

は、2ないし 4mhd の毒による出血を抑えているに過ぎなかつた (表11)。

7. サキシマハブ毒トキシイドのウサギに対する免疫原性

3.7kg 前後のウサギ 8羽ずつに精製ホルマリン、粗毒及び DHTA トキシイド 0.5ml (2.5mg の毒量) を皮下接種し、4週後に0.2ml (1mg) ずつを1週間隔で3回、追加免疫し、最終免疫1週後に血中抗体価の測定に一部採血した後に、4.8mg、2.4mg 及び 1.2mg の毒を筋肉内に攻撃注射し、24時間後の局所の出血あるいは壊死防御を観察した。

血清の出血防御力については表11に示されているが、精製ホルマリントキシイドによる中和能が最もよく、0.1ml の血清は37.5r (32mhd) の毒を完全に抑え、また75r の毒の出血を軽減していた。次は粗毒ホルマリントキシイドでは、9.6r (8mhd) の毒を殆んど完全に、また18.75r の毒による出血を軽減していた。一方 DH

TA トキシイドでは、2.4r ないし 9.6r の毒を中和あるいは軽減しているにとどまつた。

次に直接の毒の攻撃による結果は表12に示されているが、精製トキシイドの防御力が最もよく、とくに2.4mg ないし 1.2mg の毒の攻撃による局所の病変をよく抑えていた (Fig. 1.)。粗毒ホルマリンはこれにつぎ、DHTA トキシイドは 1.2mg の毒に対する防御を示したに過ぎなかつた。

8. サキシマハブ毒及びハブ毒トキシイドとの免疫原性の比較

低温エタール沈澱法で精製され、ホルマリンで不活化されたサキシマハブ毒及びハブ毒トキシイドでマウスを免疫した。初回注射は0.5mg、4週後、1週間隔で2回0.1mg の追加注射が行なわれた。

さらに1週後に1群のマウスから血清をプールし、サキシマハブ毒及びハブ毒に対する中和能をしらべた。また他の1群には両者の毒を直接筋肉内に攻撃し、局所病変の観察が行なわれた。

免疫マウス血清の中和能：表13に示されたように、サキシマハブ毒で免疫されたマウスの血清0.1ml は同種毒に対して18.7r までの毒を完全に中和し、37.5r の毒の出血作用を著明に軽減していた。また異種のハブ毒に対しても4.7r までの毒を完全に中和し、18.7r までの毒の出血を軽減していた。

これに対しハブ毒で免疫されたマウスの血清は4.6r の同種の毒を完全に中和し、18.7r ないし37.5r の毒作用を軽減していた。また異種のサキシマハブ毒に対しても4.6r の毒を殆んど完全に中和し、9.3r ないし18.7r の毒作用を軽減していた。

このようにして両者の毒で免疫した血清は、互いに異種の毒に対してもある程度の中和能があることが明らかにされた。

免疫マウスに対するサキシマハブ毒及びハブ毒の攻撃：前項と同様に免疫されたマウスに37.5r から2倍段階

Table 12. Anti-hemorrhagic effect of immunized rabbits against Sakishima-habu venom.

Venom (mg)	DHTA-Td			APF-Td			Crude-Td			0	
4.8	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
2.4	+++	+++	+++	++	+	+	+	++	++	+++	+++
1.2	++	+		+	+		++	+		+++	+++

Softening of the muscle tissue was not observed in all rabbits.

+++ , Hemorrhage extended to the body. ++ , Hemorrhage extended to all the thigh. + , Hemorrhage limited to the locus of injection.

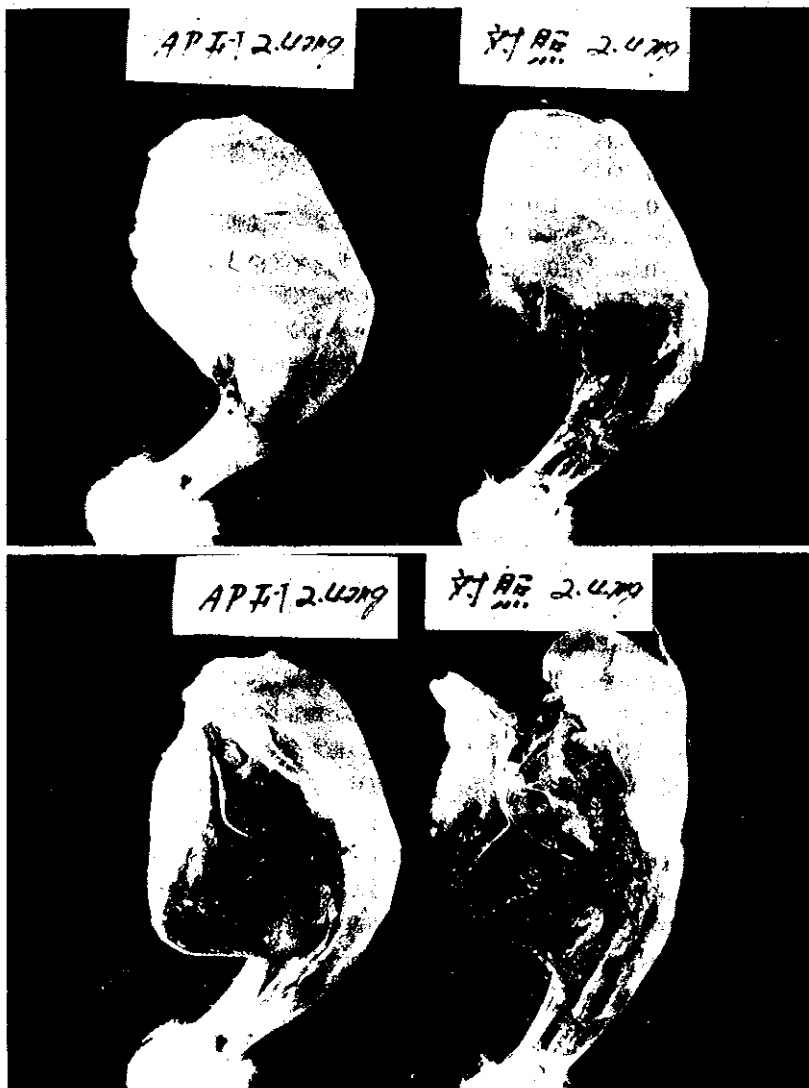


Fig. 1. Protection of the local lesion in the thigh of a rabbit (on the left) which was immunized with the APF toxoid and was injected intramuscularly with 2.4mg of the venom. Severe hemorrhage and necrosis were seen in control (on the right). The upper is the thighs before the incision and the bottom is the thighs after incision.

Table 13. Anti-hemorrhagic effect of sera from mice immunized with Sakishima-habu and habu toxoid.

Venom (γ)	AS+SV	AH+SV	SV	AS+HV	AH+HV	HV
37.5	1*	2.3	3	3	2	3
18.7	0	1	3	2	1	3
9.3	0	1	2.3	1	1	2.3
4.7	0	0	1	0	0	0
2.3	0	0	1	0	0	1
1.2			1		0	1

AS: Antisera for Sakishima-habu venom (SV). AH: Antisera for habu venom (HV). 0.1 ml of serum and venom were mixed and injected intramuscularly into mice. * The number indicate the mean score of hemorrhage in three mice.

Table 14. Anti-hemorrhagic effect of mice immunized with Sakishimahabu and habu venom toxoid against the challenge of the venoms.

Venom (γ)	IS:SV	IS:HV	SV	III:HV	III:SV	HV
37.5	2.7*	3	3	3	3	3
18.9	2.7	3	3	2.3	3	3
9.3	2.0	2.7	2.7	2.0	3	3
4.7	0	1.7	2.7	0	2	2.7
2.3	0	1.3	2.3	0	0	2.3
1.2	0	0	2	0	0	2.0
0.6	0	0	1.3	0	0	1.7
0.3	0	0	0.3	0	0	1

IS: Immunized mice for Sakishima-habu venom (SV).

III: Immunized mice for habu venom. Varying amount of venom were injected intramuscularly.

*The number indicate the mean score of hemorrhage in three mice.

稀釈された両種の毒を筋注し、24時間後に局所の病変を観察した。実験成績は表14に示されているが、サキシマハブ毒で免疫されたマウスは 4.7 γ の同種毒の出血を完全に抑え、9.3 γ の同種の毒作用を軽減していた。

これに対して異種のハブ毒に対しては 1.2 γ の毒を中和し、4.7 γ までの毒の出血を軽減していた。

一方においてハブ毒で免疫されたマウスでは、同種毒の2.3 γ の毒を完全に防御し、9.3 γ の同種毒に対する出血を軽減していた。これに対して異種のサキシマハブ毒の攻撃に対しては、2.3 γ の毒を防御し、4.7 γ の毒の出血を軽減していた。このようにして直接毒を攻撃した場合にも互いに異種毒に対してある程度の交叉免疫のあることが認められた。

考 察

サキシマハブはハブと同じようにマムシ科 Crotalidae

に属し、沖縄の八重山群島にのみ棲息している毒蛇である。サキシマハブによる咬症患者の発生数は年間約150名で、人口1,000人に対して3.1人の割合で、南西諸島のハブ類では発生率の最も高いことが注目されている。しかしハブ咬症にくらべて一般に症状が軽く、この10数年間死亡者がなく、壊死もきわめて少ない。

このことはサキシマハブ毒の毒性がハブに比べて致死性及び壊死性が弱いということと、サキシマハブがあまり攻撃的でない上に咬症時の排毒量の差異にもとずいているものと推測される。しかし出血性ないし腫脹性は両種毒共にあまり差異は認められない。

ハブ毒あるいはマムシ毒が等量あるいはそれ以上のDHTAで37°C、1時間で不活化されるのに反して、サキシマハブ毒は37°C、3時を要した。しかし1/2量でも24時間たてば完全に不活化された。また腫脹に対してもほぼ同様な傾向を示し、等量混合の場合には37°C、3時

間ではほぼ食塩水対照と同程度に下つた。

次に沢井等の低温エタノールによる方法でサキシマハブ毒を精製した結果、致死活性にくらべて出血活性が著しく上昇するのがみられたが、その理由については明らかでない。

精製毒のホルマリンによる不活化は0.6パーセントで致死活性が失なわれるが、出血活性及び腫脹性がなくなるのは0.8パーセント以上であつた。これは粗毒でもあまり著しい差異はみられなかつたが、0.6%ホルマリンでは出血活性の不活化がやや弱かつた。

ホルマリン不活化精製ハプトキシイドのマウスあるいはウサギに対する抗原性は、致死防御力はあまり著明ではなかつたが、局所の出血をよく防止することが明らかにされた。

またハプトキシイドとの交叉免疫をしらべた結果、同種には及ばないが、かなりの程度に異種毒に対する局所の出血を防止していた。現在八重山群島ではサキシマハブ咬症の治療にハブ血清も用いられているが、受傷局所の壊死防御に役立ついると考えられる。

しかし乍らサキシマハブ咬症は沖縄本島などのハブ咬症にくらべて軽症であるにも拘らず、ほとんどの患者が血清注射をうけているので血清病の発生もかなりの数にのぼっている。しかし前述のように咬症率が高いので、将来は血清療法にかえてトキシイドによる予防を試みるのも一法であると考えられる。

総 括

サキシマハブ毒はハブ毒にくらべて致死あるいは壊死活性はひくい、出血あるいは腫脹作用はほぼ同程度にみられる。

ジヒドロチオクト酸に対しては同量または1/2量で6時間または24時間で完全に不活化された。

サキシマハブ毒をエタノール30%で低温で処理して得た精製毒を1%のホルマリンで不活化した後にマウス、あるいはウサギを免疫した結果、局所の出血毒性に対する局所の防御力、あるいは血清の中和力は粗毒ホルマリントキシイドあるいはジヒドロチオクト酸トキシイドより優れていた。

またサキシマハブ毒精製トキシイドはハブ毒トキシイドとの間に交叉免疫が認められた。

稿を終るに臨み、沢井芳男教授の御指導及び御校閲に感謝し、また本研究の遂行に当り御協力を頂いた医科学研究所熱帯疫学特別研究室の各位に深謝するとともに、御援助を頂いた三共株式会社中央研究所の小此木丘博士

及び服部善八郎博士に感謝の意を表す。またジヒドロチオクト酸を提供された藤沢薬品工業株式会社に謝意を表します。

なお本稿の要旨は第12回日本熱帯医学会総会で演述された。又原著は *The SNAKE*, Vol. 4, pp. 23-33, 1972 に掲載された。

文 献

- 1) Litchfield, Jr. J. T. and Wilcoxon, F.: Simplified Method of evaluating Dose Effect Experiment. *J. Pharmacology*, 96, 99~113, 1949.
- 2) 沢井芳男, 川村善治, 牧野正顕, 福山民夫, 清水敏夫, 林貽恵, 栗林久之輔, 石井卓弥, 小此木丘: ハブ蛇毒トキシイドの基礎的研究, 1. トキシイドの免疫原性について, *日本細菌学雑誌*, 21(1), 32~41, 1966a.
- 3) 沢井芳男, 川村善治, 福山民夫, 川井順志, 清水敏夫, 林貽恵, 海老沢功, 小此木丘, 本間学, 下園千春: ハブ蛇毒トキシイドによるハブ咬症の予防に関する研究, 1. 奄美大島におけるトキシイド接種による副作用および血中抗体の上昇について, *日本細菌学雑誌*, 21(2), 88~91, 1966b.
- 4) 宮城善吉, 外間善次, 山川雅延, 宮城英雅, 大西弘道, 上地さえ子, 知花幸貞, 沢井芳男, 川村善治, 福山民夫, 大城清吉, 池宮重雄, 屋嘉勇: ハブ蛇毒トキシイドによるハブ咬症の予防の研究, 2. 沖縄におけるトキシイド接種による副作用について, *日本細菌学雑誌*, 21(4), 206~209, 1966.
- 5) Sawai, Y., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and Keegan, H. L.: Studies on the Inactivation of Snake Venoms by Dihydrothioctic acid. *Japan. J. Exp. Med.*, 87, 121~128, 1967.
- 6) 沢井芳男, 川村善治, 清水敏夫, 小此木丘, 服部善八郎, 五十嵐勇: ハブ蛇毒トキシイドの基礎的研究, 2. マウス足蹠法によるトキシイドの副作用に関する実験的研究, *日本細菌学雑誌*, 22(2), 67~72, 1967.
- 7) 清水敏夫: ジヒドロチオクト酸によるマムシ (*Agkistrodon halys*) 毒のトキシイド化に関する基礎的研究, *日本細菌学会雑誌*, 22, 312~320, 1967.
- 8) 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, 第1報, アルコール処理ハブ毒の毒性およびマウスにおける免疫実験, *日本細菌学雑誌*, 23, 137~144, 1968.
- 9) Sawai, Y., Kawamura, Y.: Studies on the Toxoids against the Venoms of Certain Asian Snakes. *Toxicon*, 7, 19~24, 1969a.
- 10) Sawai, Y., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and Okonogi, T.: Studies on the Improve-

- ment of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Bites. 7. Experimental Studies on the Habu Venom Toxoid by Dihydrothioctic Acid. Japan. J. Exp. Med., 39, 109~117, 1969b.
- 11) Sawai, Y., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and Okonogi, T.: Studies on the Improvement of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Bites. 8. A Field Trial of the Prophylactic Inoculation of the Habu Venom Toxoid. Japan. J. Exp. Med., 39, 197~203, 1969c.
- 12) 貞弘省二：ハプトキシイドに関する研究 1. ホルマリンによるトキシイド化, 2. 精製トキシイドの免疫原性, 日本細菌学雑誌, 26, 214~221, 319~324, 1971.
- 13) Sawai, Y., Chinzei, H., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and T. 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.