

サキシマハブ毒の分画とトキシイドへの試み

山 川 雅 延

I 研究目的

琉球列島の南端に位置する八重山群島にはサキシマハブ (*Trimeresurus elegans*) が棲息し、近年同地域の開発が盛んになるにつれサキシマハブ咬傷の発生件数は急増している。

我々の調査によると全発生件数の約68%が耕地又は山野で農作業中に受傷している。従って同地域に於ける農耕従事者に恐怖を与え、農林業開発の面でも重要な課題を提起している。

表1. 沖縄に於けるハブ及びサキシマハブによる被害

年	ハブ			サキシマハブ 発生件数
	発生件数	死亡	壊死	
1964	858	4	14	61
1965	400	7	12	85
1966	857	2	10	121
1967	898	5	16	160
1968	851	6	12	167
1969	821	4	8	150
1970	828	1	14	187

しかし、サキシマハブ咬症は沖縄及び奄美群島の所謂ハブ (*T. flavovirides*) 咬症に比べて臨床症状が極めて軽いのが特徴である。高度な腫脹と疼痛を伴うが予後は良好であり過去10年に及ぶ我々の調査でも蛇咬症が直接の原因と見られる死亡例は発見できなかった。主として指に軽い壊死を起したものが数例発見されたが重大な運動障害、癩痕形成、四肢切断という後遺症例は殆んど見ることは出来ない。又全発生例の91%が8日以内に治癒しており沖縄群島のハブ

咬傷患者が8日以内に治癒するのは42%に過ぎないことと比べて著しく軽い。

表2. ハブ及びサキシマハブ咬症の治療日数

調査 治療日数	ハブ		サキシマハブ	
	801		249	
8日	339	42%	227	91%
10日	322	40	20	8.5
11日以上	140	18	2	0.5

この様に極めて軽症な蛇咬傷に対して沖縄及び奄美のハブと同様は血清療法を行うことは疑問がある。

例えば血清病などの副作用や他の血清療法を必要とする疾病への悪影響は無視してはならないし、更にはハブ抗毒素の製造は需要が限られていること、動物の免疫期間が長期にわたることなどのため製造原価が著しく高く多大の費用と労力を費やしていることも考慮されるべきであろう。又サキシマハブ咬傷の多発地域で農林業を営む人々に対しては心理的恐怖感を除去すると同時に実際の受傷に当たっても高度の腫脹や疼痛から解放されることが必要である。

我々はこれ等の問題に対処する試みとしてサキシマハブトキシイドによる予防策を導入し従来の血清療法を改善することを期待して本研究に着手した。

もともと蛇毒トキシイドは血清療法が限界に頻し、その限外を補足する目的で出発した。この意味ではサキシマハブトキシイドは沖縄及び奄美で試みられているトキシイド療法とは多少意義を異

にする。

さて、サキシマハプトキソイドを開発するための基礎的研究として我々は次の2点について検討した。

1. サキシマハブ粗毒中の毒活性物質を調べこれを能率的に分離精製する。
2. サキシマハブ粗毒より分離された毒活性物質を用いてサキシマハプトキソイドを試作し動物実験によりその効果を検討する。

II 実験方法

(1) サキシマハブ粗毒及び部分精製毒のゲル漏過
使用したゲルはSephadex G100 (PHARMACIA UPPSALA SWEDEN)で2×80cmのゲルベッドを用いてM/200 Tris Buffer (PH 8.5)を流した。

(2) 硫酸塩析による精製

1%サキシマハブ粗毒液100mlに硫酸を添加して濃度を21%(F3), 28%(F4), 35%(F5), 42%(F6), 49%(F7), 56%(F8)とし各濃度で9000 rpm 15 min 遠心して沈査を20ml 生理食塩水に再溶解し濾水透析した後更にTris Bufferに透析した。F5, F6は更にゲル漏過を行った。

(3) 低温アルコールによる精製

1%サキシマハブ粗毒液200mlを-2°C~-15°Cに保ちながら冷アルコールを徐々に加え濃度を20%(F2), 30%(F3)…70%(F7)にして分画を行った。各分画は9000 rpm 15 min 遠心し沈査は手早く20mlのPBSに溶解した。更にF2, F3はゲル漏過を行った。

各分画の蛋白量はケルダール又はOD280によ

って測定した。出血活性はウサギ背皮注射法によって最小出血量(MHD)を求めて定量した。致死活性はマウス尾静脈注射によってLD50 (Leed & Muench法)を求めた。更にマウス筋肉注射による局所病変も観察した。

(4) サキシマハプトキソイドの試作

材料はサキシマハブ粗毒液(C), 低温アルコール0~30%画分, (FA)60~70%画分(FB)を使用した。これら3種の毒液をホルマリンで無毒化したものを各々C-Td, FA-Td, FB-Tdとする。無毒化には37°Cでホルマリンを3~7日間隔で0.2%×5回分割添加した。次に透析によって脱ホルマリンを行うウサギ皮内, マウス尾静脈注, 及びマウス筋肉内注射によって完全に無毒化していることを確かめた。各トキソイドの最終の蛋白濃度は, 5 mg/mlとした。

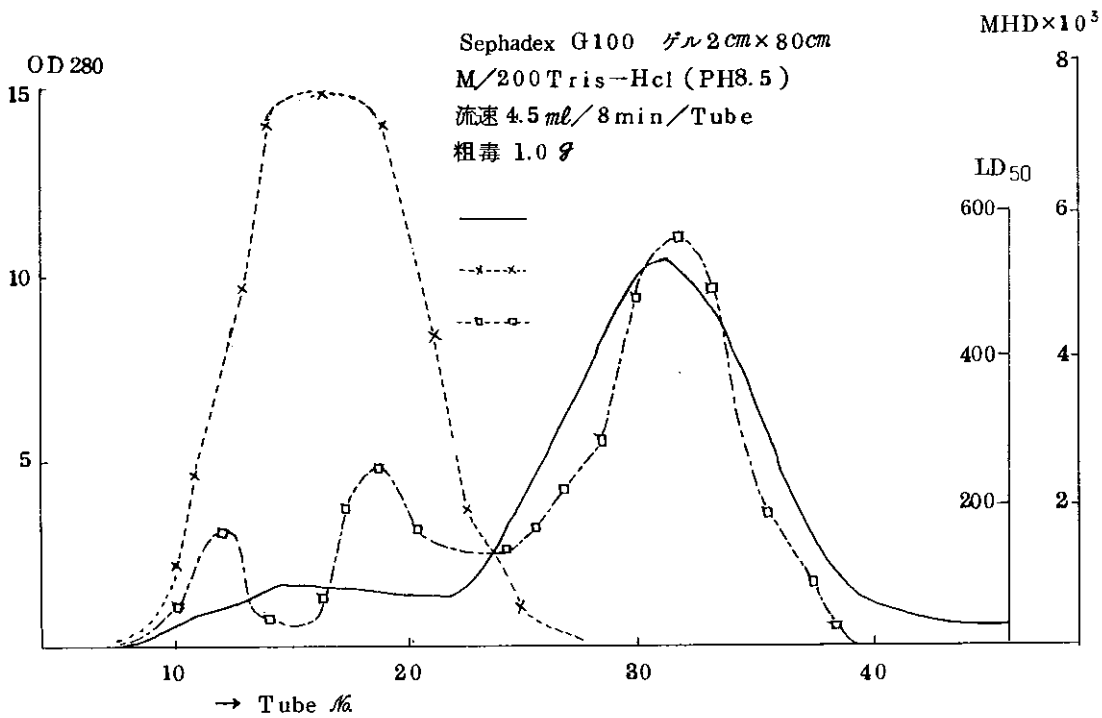
(5) サキシマハプトキソイドによる免疫実験ウサギ(約2kg)を一群3匹, マウスを一群50匹として基礎免疫にはフロイントのアジュバントを使用した。免疫方法は図9に示す方法で行った。抗体価の測定はサキシマハブ粗毒を標準にして抗出血作用及び抗致死作用を測定した。又毒による攻撃を行って局所の病変を観察した。

III 実験結果

1. サキシマハブ粗毒のゲル漏過

サキシマハブ粗毒1.4gを14mlのTris Bufferに溶解しその10mlをゲル漏過してその蛋白量及び各毒活性を調べたのが図3である。大部分の出血活性は蛋白の主ピークから分離しているが蛋白の主ピークと重なっている部分はウサギ皮内で出血斑が極めて不明瞭なため測定が困難である。

図1. サキシマハブ粗毒のゲル漏過



致死活性は三つのピークが認められた。この三つのピークはマウス尾静脈注射により各々特徴のある死を示す。カラムより流出する順に各々第一、第二、第三LD₅₀ ピークとする。

第一LD₅₀ ピークはマウス尾静脈注射により咯血を見る。死亡したマウスを解剖すると肺に大量の出血を起し約3倍に膨張しているのを認めた。この肺出血が死因と思われるが筋肉、腸管等の末梢部では出血を認めず短時間で死亡する。

これに対して第二LD₅₀ ピークはマウス尾静脈注射によって前者の様な咯血を見ることはない。肺に少量の血点を認めることもあるが、殆んど肺出血は起していない。しかし最も特徴的なことはマウスの筋肉、皮下等の末梢部で全身的な出血を起していることである。死亡時間も前者より長くだらだらと死んで行く。

従って第二LD₅₀ ピークは全身性の大量出血が死因と思われる。

写真1. 第一LD₅₀ ピークによるマウスの咯血

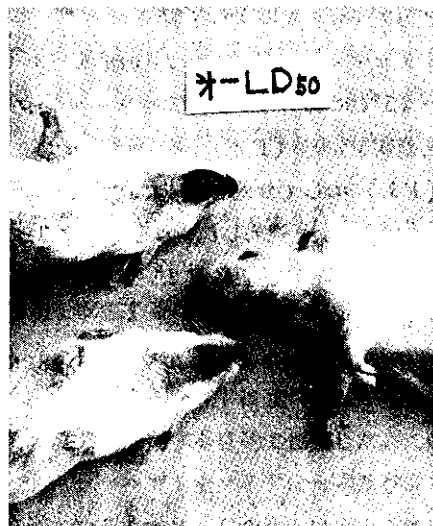


写真2. 第一LD₅₀ピークを注射して死亡したマウスの肺, 正常マウスの肺の約3倍に膨張している。

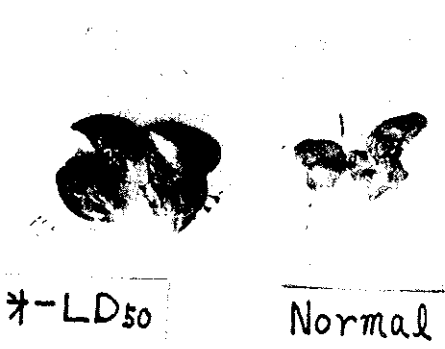
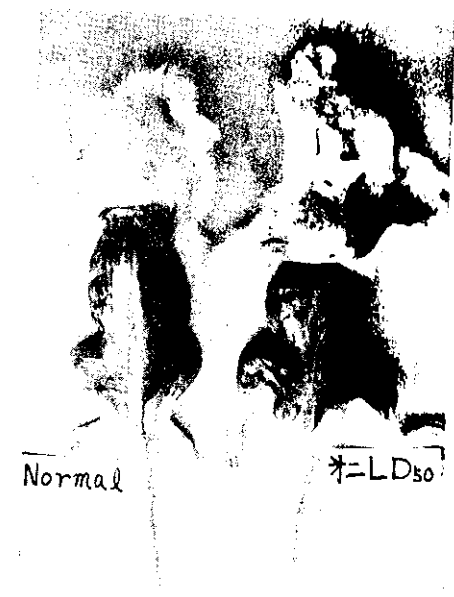


写真3. 第二LD₅₀ピークによるマウスの全身性出血



第三LD₅₀ピークをマウス尾静脈に注射して死亡したマウスは肉眼的には何の変化も認められなかった。従ってその死因は不明である。

る局所病変を肉眼的に観察した結果である。マウス筋肉内で最も強い出血作用を示すのは第二LD₅₀ピークに相当するところである。

表3は各試験管についてマウス筋肉内注射による

表3. サキシマ粗毒ゲル漏過のマウス筋注

希釈×100		1	3	10	30	100	
Tube	No						
	5	-	-	-	-	-	第一LD ₅₀
	8	+	+	-	-	-	
	11	+	+	±	-	-	
	14	++	+	+	-	-	
	17	+++	++	++	+	-	第二LD ₅₀
	20	+++	++	+	+	±	
	23	++	+	±	-	-	
	26	+	±	-	-	-	
	29	+	-	-	-	-	第三LD ₅₀
	32	-	-	-	-	-	
	38	-	-	-	-	-	

出血の範囲, ++ 大腿全般 + 大腿の約50% + 大腿の25%まで

第三LD₅₀ピークはマウス筋肉内で弱い出血を認めるが強い腫脹作用を持っているのが特徴である。

以上の様に3種類の致死活性ピークはマウスに

対して各々異った毒作用を示すことが観察された。

2. サキシマハブ粗毒の硫酸塩析

硫酸を用いてサキシマハブ粗毒を前述の実験方法に従って分画した結果表4の成績を得た。

表4. サキシマハブ粗毒の硫酸分画 (1%粗毒 100ml)

	硫酸%	蛋白質		M H D			LD ₅₀		
		総蛋白質	率	総MHD	率	比	総LD ₅₀	率	比
粗毒	0	660 mg	100	250 × 10 ⁴	100	1.0	10750	100	1.0
F 3	21	18	3	17.7 #	7	2.6	920	9	3.3
# 4	28	32	5	27.5 #	11	2.3	550	5	1.1
# 5	35	184	28	125 #	50	1.8	3190	30	1.1
# 6	42	157	24	8.3 #	3.	0.1	1920	18	0.8
# 7	49	23	4	8.2 #	3.	0.8	150	1.4	0.3
# 8	56	7	1	6.0 #	2	2.4	70	0.6	0.7
# 9	残	6	1	0.7 #	0.2	0.3	—	—	—
計		432	66	193.4 #	76		6800	64	

率は収率，比は比活性

総回収率は蛋白で66%，MHD76%，LD₅₀64%であった。F3，F4は比活性は上昇しているが共に収率が悪い。F5の比活性はMHDで1.8倍で全回収量の64%を占めている。しかしLD₅₀は全回収量の70%を占めながら比活性が1.1で全く精製されていない。

F6は出血活性が粗毒の約 $\frac{1}{10}$ に弱いが多量の蛋白が回収されている。又致死活性は全回収量の28%を占めているが精製されていない。

F7～F9は収率，精製度共に極めて悪い。F3

の致死量をマウス尾静脈に注射すると嗜血を見ることが出来る。又F5をマウス尾静脈に注射すると全身性の出血を起していることが認められる。このこと前述の粗毒のゲル漏過を行った結果から考えてF3は図3に示す第一LD₅₀ピークに相当する部分でありF5は第二LD₅₀ピークを含んでいる。又多量の蛋白が回収されているF6は第三LD₅₀ピークであると思われる。

このことはF5及びF6をSephadex G 100でゲル漏過して見ると明瞭になる。

図2. サキシマハブ毒の硫安分画 F5 のゲル漏過

	総蛋		M H D		L D ₅₀		
	白量	総MHD	MHD/mg	比活性	総LD ₅₀	LD ₅₀ /mg	比活性
粗毒 6.6 mg/ml	66 mg	111×10^3	17×10^2	1.0	1075	1075	1.0
№ 14 ~ № 24	20	271×10^3	134×10^2	7.9	814	814	2.2
№ 28 ~ № 40	139	—	—	—	962	962	0.4

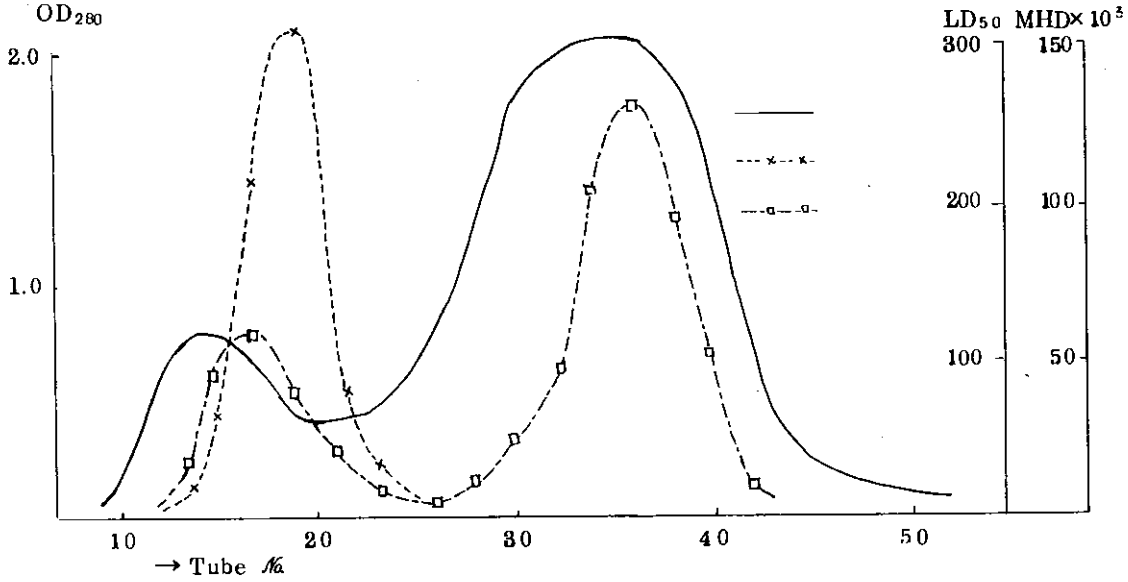
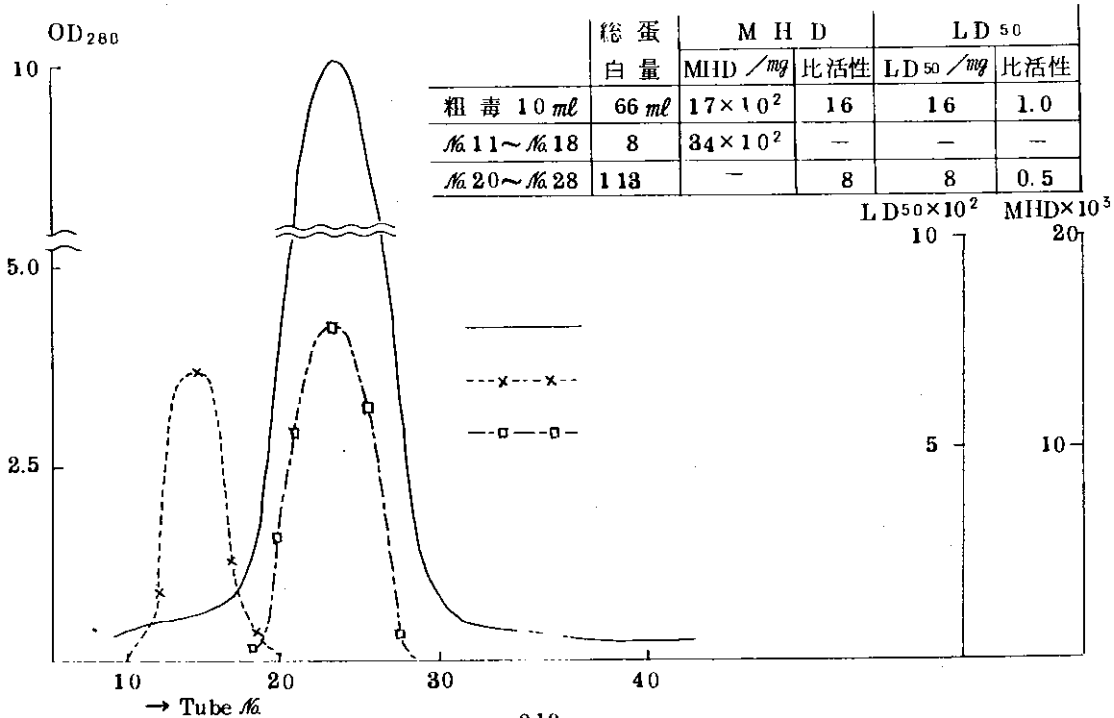


図3. サキシマハブ毒の硫安分画 F6 のゲル漏過



	総蛋 白量	M H D		L D ₅₀	
		MHD/mg	比活性	LD ₅₀ /mg	比活性
粗毒 10 ml	66 ml	17×10^2	16	16	1.0
№ 11 ~ № 18	8	34×10^2	—	—	—
№ 20 ~ № 28	113	—	8	8	0.5

図2, 図3はF5, F6のゲル漏過パターンである。F5は前述の図1で示す第二LD₅₀ピークと第三LD₅₀ピークの一部が含まれているがF6には第三LD₅₀ピークのみが含まれている。F5のMHDの比活性は7.9となりよく精製されている。

表5. F5ゲル漏過のマウス筋注

希釈×100 Tube	1	3	10	30
№ 14	—	—	—	—
17	卅	+	+	—
19	卅	+	+	±
20	卅	+	+	—
24	+	—	—	—
26	±	—	—	—
40	—	—	—	—

(硫酸分画 F5)

表6. F6のゲル漏過のマウス筋注

希釈×10 Tube	1	3	10	30	100
№ 12	卅	+	+	—	—
14	卅	卅	+	+	—
16	卅	+	+	±	—
18	±	—	—	—	—
20	⊖	⊖	—	—	—
22	⊖	⊖	—	—	—
24	⊖	⊖	—	—	—
26	—	—	—	—	—

⊖は出血なく腫脹あり。(硫酸分画 F6)

表5, 表6はゲル漏過後の各試験管についてマウス筋肉内注射による肉眼的所見である。強い出血作用を示している範囲は図2のMHDピークとよく一致している。表6で注目されるのは出血のない腫脹(→)を起しているのが明瞭に認められることである。

3. 低温アルコールによる精製

蛇毒トキシノイドの開発に当って実用化の段階で直面する問題の一つは粗毒の精製法が大量処理の可能な方法か否かということである。この意味で低温アルコール沈澱法について検討した。

Ⅱの(3)で述べた実験方法に従い分画を行った結果, 表7の成績を得た。

表7. サキシマハブ粗毒のアルコール沈澱(1%粗毒200ml)

	アルコ ール %	蛋 白		M H D			L D ₅₀		
		総蛋白	率	総MHD	率	比	総LD ₅₀	率	比
粗 毒	0	1320 mg	100%	392×10 ⁴	100	1.0	215×10 ²	100%	1.0
F 2	20	144	11%	170 #	43	3.9	32 #	15%	1.4
# 3	30	259	20%	95 #	24	2.0	64 #	13%	1.6
# 4	40	173	13%	16 #	4	0.3	22 #	10%	0.7
# 5	50	18	1%	0.4 #	0.1	0.1	—	—	—
# 6	60	109	8%	—	—	—	11 #	5%	0.7
# 7	70	166	13%	—	—	—	43 #	20%	1.6
計		869	66%	281×10 ⁴			172×10 ²	80%	—

率は収率, 比は比活性

総回収率は蛋白で66%, MHD71%, LD₅₀80%である。F2の出血活性は粗毒の3.9倍に精製されており回収率も全体の60%を占めていることが注目される。F3は多量の蛋白が回収されているが出血活性の精製度は粗毒の2倍に過ぎ

ない。又F2とF3のMHDを加えると全回収量の93%を占めることになる。即ち、アルコール30%濃度では粗毒の出血活性物質は殆んど沈澱することになる。

図4. サキシマハブ毒のアルコール沈澱

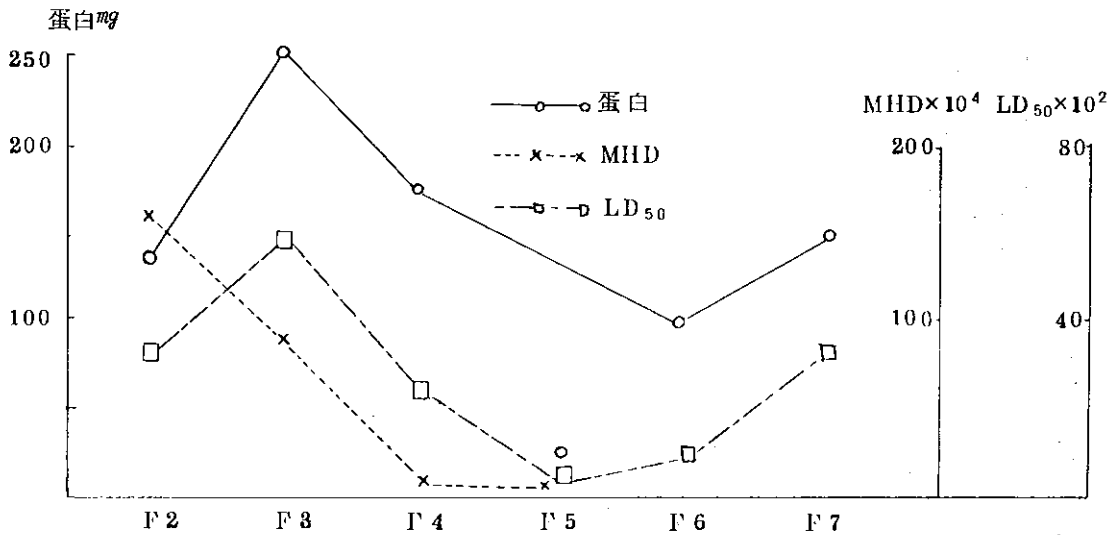


図4は各Fの蛋白, MHD, LD₅₀の回収量を示したものである。蛋白とLD₅₀はF5(アルコール50%)を中心に二峰性を示しているが, MHDはアルコールの低濃度(40%以下)で沈澱することが判る。

各Fの致死活性の精製度は不良であったがF7の様に出血活性を全く含まない致死活性物質が20%も回収されていることが注目される。次にF2, F3, F7の各画分をマウス尾静脈に注射

するとF2は強い肺出血と弱い全身性の出血を, F3は弱い肺出血と強い全身性の出血を起していた。これに対してF7は出血は全くなく肺腫脹を起していた。

F2, F3の各画分12mlをポリエチレングリコールで4mlに濃縮した後 Tris Buffer に48時間透析してゲル漏過を行った結果図5, 図6のパターンを得た。

図 5. ガキシマハブ毒のアルコール沈澱・F2のゲル濾過

	総蛋白量	M H D		L D ₅₀	
		M H D / 70g	比活性	L D ₅₀ / 70g	比活性
粗毒 10 ml	6.6 70g	17×10^2	1.0	1.6	1.0
7/4 ~ 14	5.2 70g	160×10^2	9.5	3.2	2.0

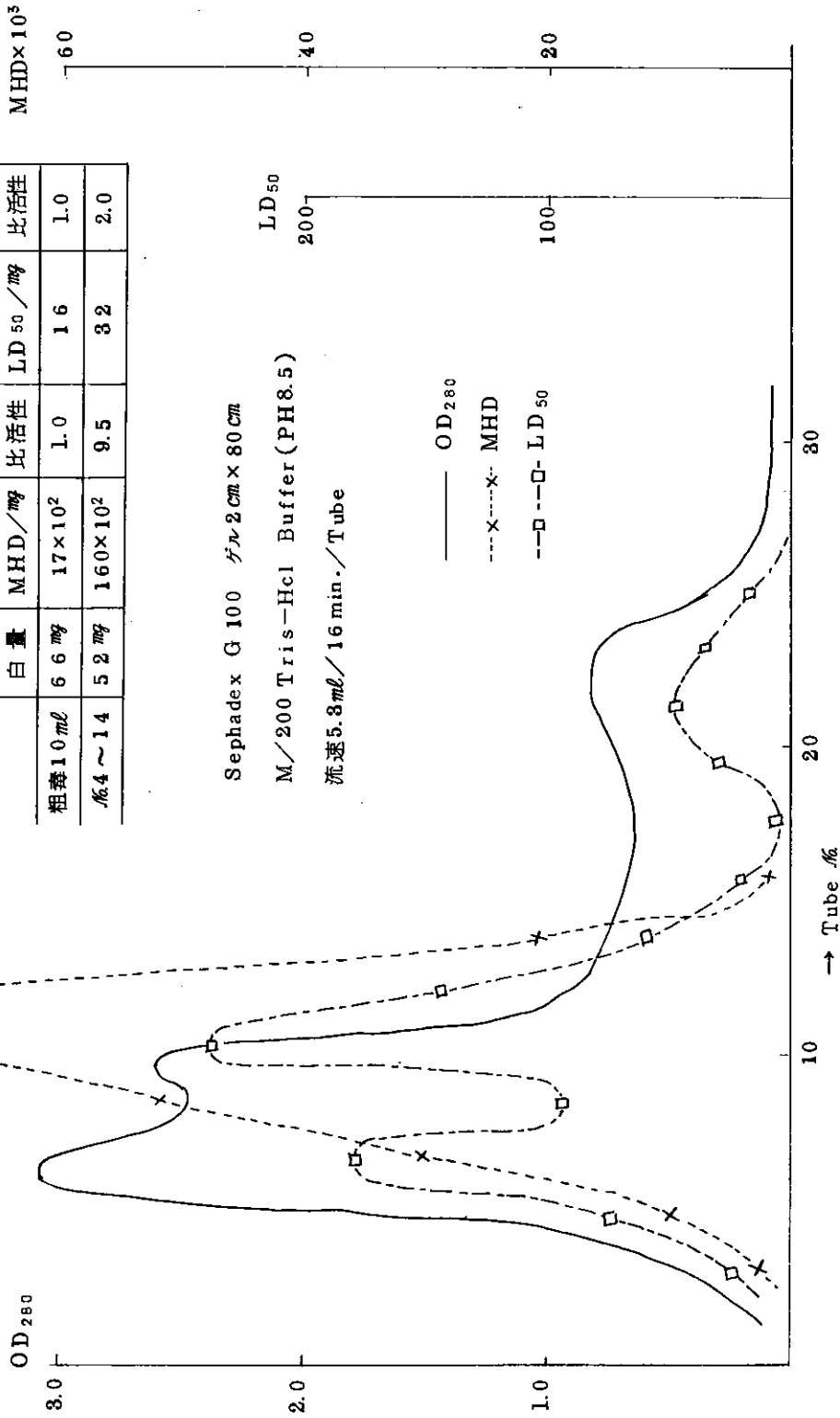


図 6.

サキシマハマハブ毒のアルコール沈殿・F3のゲル濾過

	総 蛋		M H D		L D ₅₀	
	白量	MHD/mg	比活性	LD ₅₀ /mg	比活性	比活性
粗毒 1% 10 ml	66 mg	17×10^2	1.0	16	1.0	1.0
№ 8 ~ 18	44	82×10^2	4.8	19	1.2	1.2
№ 20 ~ 28	126	—	—	19	1.2	1.2

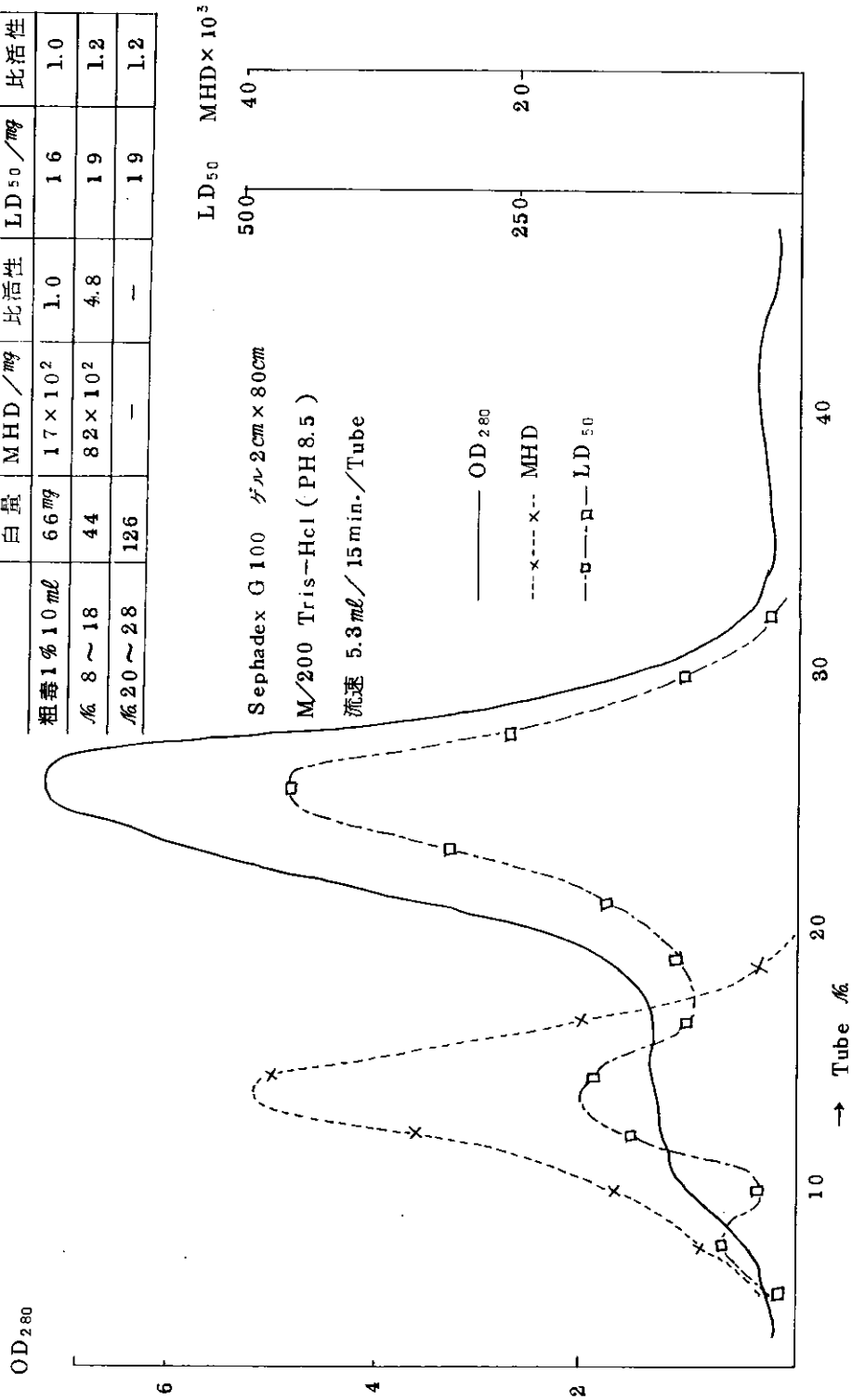


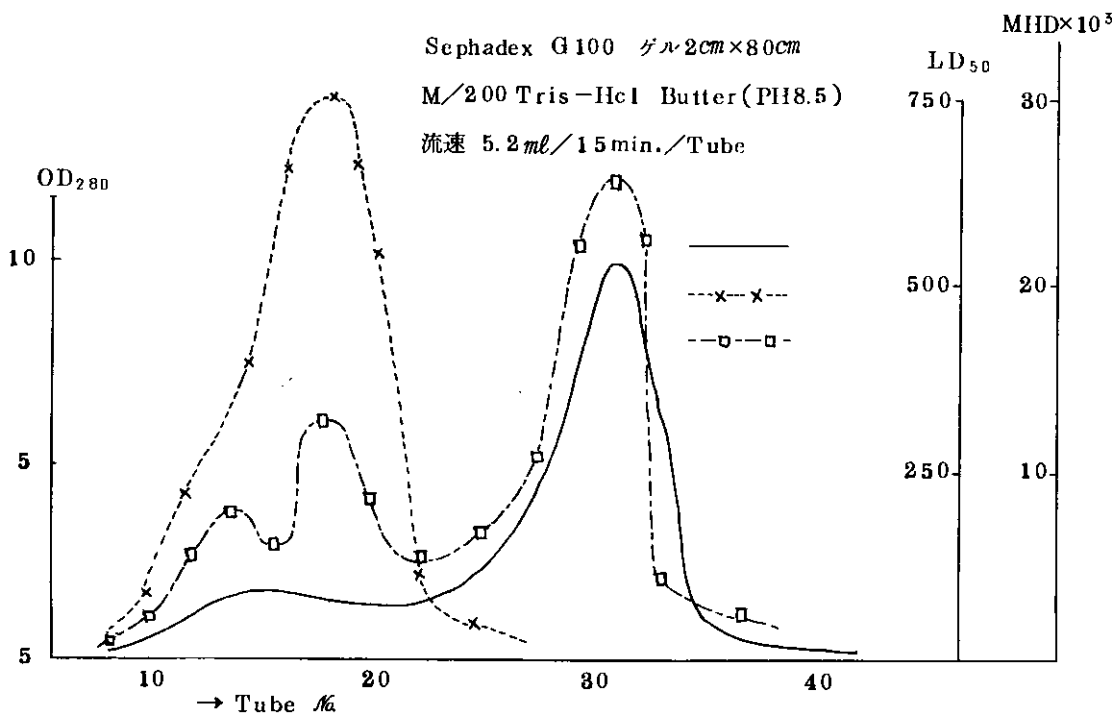
図5よりF2には第一、第二LD₅₀ピークが大部分を占めておりしかもMHDピークは第二LD₅₀ピークと一致していることが注目される。更に試験管No 4~No 14をブールしてそのMHD, LD₅₀を定量した結果, 比活性がMHDで粗毒の9.5倍となりよく精製されているがLD₅₀の比活性は2倍に過ぎない。この様に両者の精製度が平行していないことは両者が異なる物質に由来することを示唆している。図6よりMHDピークは第二LD₅₀

ピークと一致しており比活性も4.8倍である。第三LD₅₀ピークもF3で可成り沈殿することがわかる。

4. サキシマハブトキシノイドの試作

前項の低温アルコール沈殿法によるとアルコール濃度30% (F2+F3)で大半の出血活性と致死活性を回収することが出来たのでトキシノイド試作のための材料にはこのアルコール30%画分を使用した。この画分はゲル濾過によって粗毒とほぼ同様なパターンを示す。

図7. サキシマハブ毒のアルコール30%沈殿(F2+F3)のゲル濾過



又アルコール濃度30%~70%画分は出血活性を殆んど含まないが致死作用を示すのでこの画分も別にトキシノイド試作の材料にした。

更に粗毒のままトキシノイド化したものを前二者と比較した。

〔分画〕 1%サキシマハブ粗毒液200ml (M/30 PBS PH 7.0) を0~-3°Cに冷却

すると不活性白色沈殿物を生じるのでこれを濾別した後濾液に冷アルコール86mlを加え数時間放置した後生じた白沈を遠心分離し、沈査は手早くM/60 PBS (PH 7.0) 200mlに再溶解した。(この画分をFA, そのトキシノイドをFA-Tdとする) 上清には更に冷アルコール380mlを加え-20°Cで一夜放置した後生じた白沈を遠心

分離し沈査は手早くM/60PBS200mlに再溶 B-Tdとする)。各画分の回収率及び比活性
 解した。(この画分をFB,そのトキシノイドをF を表8に示す。

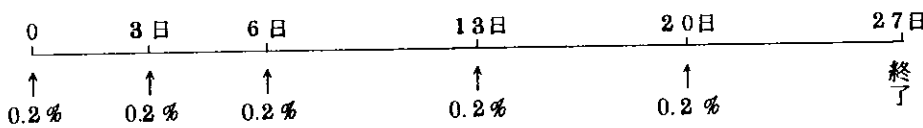
表8. 試作トキシノイド用のアルコール沈澱(1%粗毒200ml)

	アルコ ール %	蛋 白		M H D			L ₂ D ₅₀		
		総蛋白	率	総MHD	率	比	総LD ₅₀	率	比
粗 毒	0	1320 mg	100	43 × 10 ⁵	100	1	215 × 10 ²	100	1
F A	30	346	26	24 × #	58	2.1	113 × #	53	2
F B	70	267	20	—	—	—	64 × #	30	1.5
計		613	46	24 × #	58		177 × #	83	

率は収率, 比は比活性

[不活化] FA, FB, 及び1%粗毒液の各 200mlにホルマリンを8日間隔で0.2% × 3回 7日間隔で0.2% × 2回計5回で1%に加え37℃ で不活化した。この場合FAは多少混濁を生じていた。ホルマリンの最終添加後7日目に透析,濃縮を行い5mg蛋白/mlに調整した。

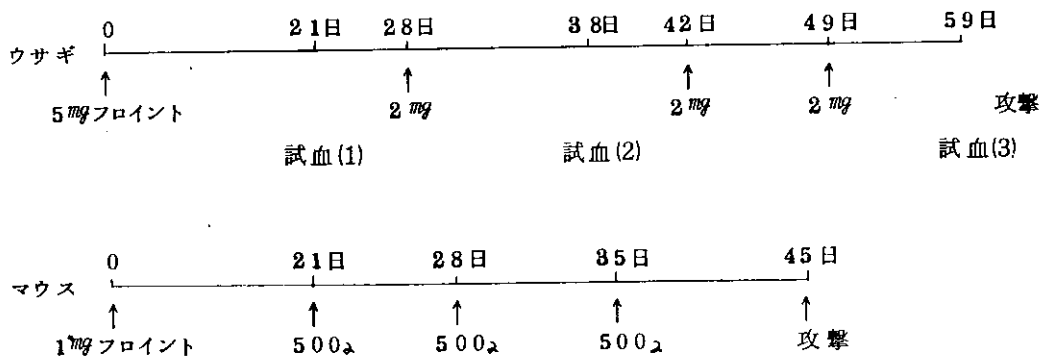
図8. ホルマリン添加法



各トキシノイドの最終製品1mg/0.2mlをウサギ背皮及びマウス尾静脈と筋肉内に注射して完全に無毒化していることを確めた。

5. サキシマハプトキシノイドによる免疫実験
 試作トキシノイドの免疫原性を確めるため図9に示す方法で免疫を行った。

図9. ウサギ及びマウスの免疫表



〔抗出血作用〕

サキシマハブ抗毒素の抗出血作用を見るには次の方法によった。即ち、サキシマハブ粗毒を試験用毒素とし、これと被検血清の0.1mlを混合してウサギ背皮内で直径10mlの出血斑を作るに必要な試験毒素の最少量 X_t を求めた。一方対照とし

て試験毒素の1MHD (X_o) を同時に測定した。 $X_t/X_o = M$ を抗出血作用を示す指標としたがこれは0.1mlの被検血清が中和し得る能力を正しく示すものではない。しかし被検血清の免疫抗体量が少ないこと及び3種のトキシイドを概略的に比較する意味で今回は本法によった。*

表9. トキシイド免疫によるウサギ血清の抗出血作用

トキシイド	試血(I)		試血(II)		試血(III)	
	X_t	M	X_t	M	X_t	M
C-Td 1	0.48	1.0	5.4	9.6	2.4	5.9
" 2	0.85	0.7	3.8	6.8	1.3	3.2
" 3	0.5	1.1	5.4	9.6	1.8	4.4
FA-Td 1	0.48	1.0	22.0	39.3	5.6	13.7
" 2	0.70	1.5	13.0	23.2	8.8	21.5
" 3	0.80	1.7	28.0	50.0	6.8	16.6
FB-Td 1	0.32	0.7	3.1	5.5	1.7	4.1
" 2	0.49	1.0	0.9	1.6	1.4	3.4
対照 (X_o)	0.47		0.56		0.41	

図10. 免疫ウサギ血清の抗出血作用

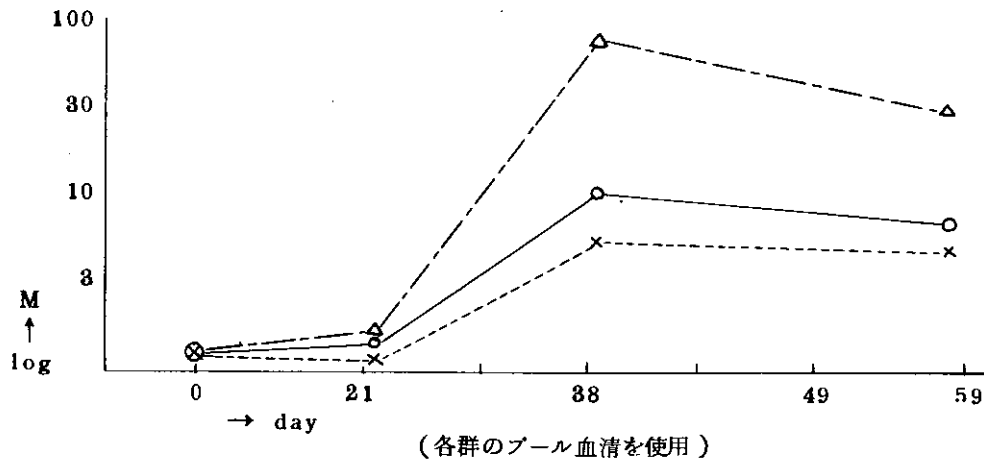


表9は各トキシイドにより免疫したウサギ血清の抗出血作用 (M) を示したものであり、図10はこれを図示したものである。FA-Td 免疫群が他のトキシイド免疫群に比して良好な抗出血作用を示している。

* 多水準 β 法によつて中和能を調べ標準血清との相対力価で抗毒素価を表現する方法については今後詳細な中和実験を行った上で検討する。

表 10. 免疫ウサギ血清のマウス筋注

粗毒 Td	10	3	1	0.3	0.1
C-Td	+++	++±	---	---	---
FA-Td	+++	---	---	---	---
FB-Td	+++	+++	+±-	---	---
対 照	+++	+++	+++	+++	±--

原血清 0.1 ml + 毒液 0.1 ml (各群のブール血清を使用)

表 11. 粗毒による免疫マウスの筋肉内攻撃

粗毒 Td	10	3	1	0.3	0.1
C-Td	+++	+++	±±-	---	---
FA-Td	+++	---	---	---	---
FB-Td	+++	+++	+++	+++	±+-
対 照	+++	+++	+++	+++	+++

注射量 0.1 ml

表 10 は免疫ウサギ血清を粗毒と混合しマウス筋肉内に注射した結果である。又表 11 は免疫したマウスの筋肉内に粗毒で直接攻撃した場合である。表 10, 表 11 共に FA-Td 免疫群が最も強い抗出血作用を示している。

〔抗致死作用〕

各トキソイドにより免疫したウサギの血清を粗毒と混合しマウス尾静脈に注射して得た結果は表 12 のとおりである。

表 12. 免疫ウサギ血清の抗致死作用

粗毒 Td	500	250	125	62.5
C-Td	4/4	4/4	4/4	0/4
FA-Td	4/4	4/4	4/4	0/4
FB-Td	4/4	4/4	4/4	0/4
対 照	4/4	4/4	4/4	0/4

原血清 0.1 ml + 毒 0.1 ml (各群ブール血清)

表 12 に示す様に抗致死作用は全く見ることが出来なかった。

表 13. 免疫マウスの抗致死作用

粗毒 Td	500	250	125	62.5
i				
C-Td	4/4	4/4	4/4	4/4
FA-Td	4/4	4/4	4/4	4/4
v				
FB-Td	4/4	4/4	4/4	4/4
対 照	4/4	4/4	4/4	0/4
i				
C-Td	4/4	2/4	0/4	0/4
FA-Td	4/4	2/4	0/4	0/4
p				
FB-Td	4/4	3/4	1/4	0/4
対 照	4/4	4/4	3/4	1/4

注射量 0.1 ml

表 13 は各トキソイドで免疫したマウスの尾静脈及び腹腔に粗毒攻撃を行った結果である。尾静脈に注射した群はいずれも対照よりも悪い結果を

示してゐるがこれはアナフィラキシーによるショック死の結果と思われる。

腹腔内に注射した群は対照に比べて良好な救命効果を示している。

〔免疫ウサギに対する粗毒の直接攻撃〕

試作トキソイドにより免疫したウサギの後肢筋肉内にサキシマハブ粗毒1mg, 3mgを攻撃してその局所病変を観察した結果F-A-Td免疫群が対照に比べて軽い局所の出血を見るに止ったが他のTd免疫群は対照よりやゝ良好な程度であった。

写真4. 免疫ウサギの粗毒攻撃



総括及び考察

サキシマハブトキソイドを開発する目的でその基礎的研究として粗毒を部分精製しマウス及びウサギに対する毒作用を調べ、更にトキソイドを試作して動物による免疫実験を行った。

サキシマハブ粗毒のゲル濾過によって大部分の出血活性は蛋白の主ピークより分離され、3つのLD₅₀ピークを認めた。

第一LD₅₀ピークはマウス尾静脈注射によって肺に大量の出血を起し咯血を見る。第二LD₅₀ピークはマウス尾静脈注射で全身的な出血、特に末

梢部に著しい出血を起す。第三LD₅₀ピークは出血作用はなくマウス筋肉内で著しい腫脹作用を示す。第二LD₅₀ピークはウサギ背皮及びマウス筋肉内注射で強い出血作用を示す。

サキシマハブ粗毒を硫酸によって部分精製すると硫酸濃度が35%で粗毒の持つ出血活性の約70%が回収される。その比活性は約2倍に過ぎないが更にゲル濾過を行うことにより7.9倍に上げることが出来た。しかし致死活性は全く精製されなかった。

サキシマハブ粗毒を低温アルコール沈澱法で部分精製するとアルコール20%分画では粗毒の持つ出血活性の約40%を回収し比活性は3.9倍になった。致死活性は22%回収されたが殆んど精製されなかった。この分画はゲル濾過によって出血活性の比活性を9.5に上昇させても致死の比活性は2倍に過ぎない。

アルコール20%~30%分画にはなお粗毒の持つ出血活性の約20%が含まれ、致死活性の25%が回収された。大部分の出血活性はアルコール濃度が30%になると沈澱してしまう。

アルコール60%~70%分画は出血作用なく致死活性のみが26%回収され、しかも強い腫脹と壊死作用を持っていることを認めた。

ゲル濾過によって出血活性の比活性を9.5に上げてても致死活性がこれと平行して精製されないのはマウスが死亡するという現象が粗毒中の種々なる物質によって多元的に作用し合った結果であり従って粗毒と精製毒の場合ではマウスの死に致るメカニズムは質的に異っているはずであり各画分の致死活性量を相加的に集計して収量又は精製度を単純に計算することは疑問がある。

ホルマリンによるサキシマハブ毒の不活化はハブ(T. flav.)毒の様にはうまく行かない。最近我々はゲル内沈降反応とマウスに対する致死及び出血作用で不活化の進行状況を追った結果ホルマリン0.6%添加の時点で既にマウスに対する毒

性が消えると同時にゲル内の沈降帯も完全に消滅することを確認した。

又ハブ毒に比べるとホルマリンによる不活化の過程でサキシマハブ毒は非常に混濁を生じ易いことも経験した。この現象は精製毒 (FA) の場合特に著しい。沈降帯が消滅することは不活化された毒の抗原性も消失したことを示唆するものであり従ってハブ毒の不活化法をそのままサキシマハブ毒に適用することは不適である。

アルコール30%画分で試作したトキシイド (FA-Td) による免疫実験では他のトキシイドに比して多少有効な防御能を示したが満足でき

る結果ではなかった。これは上述の如くホルマリンによる不活化の過程で抗原性が可成り消失したためと思われる。

今回の免疫実験は人体用トキシイドへの可能性を探るための予備実験であった。従って実験方法や力価測定法等については多くの問題を残しているが今後更に検討して行きたい。

(この研究は1970年4月～1971年3月の間に東大医科学研究所熱帯疫学室に於て研修中に行ったものである。)

参考文献省略

ハブ及びヒメハブの幼蛇の実験室内に おける飼育 (予報)

ハブ支所：香村 昂 男・具志堅 清 徳

はじめに

蛇類の生態的研究については従来、多くの報告がある。しかし、ふ化から成蛇に至る過程及びその終生については不明な点が多く、その全容ははっきりしない。蛇毒の研究が盛んになり蛇毒の需要も多くなりつつある今日、自然界より捕獲して採取する毒量では需要に応じきれなくなっている。特に蛇毒トキシイドの研究が実用化の段階に入って多量の毒を確保することが大きな問題となって来た。我々は捕獲した成ハブより効率的に採毒する方法を研究する一方、毎年初夏に飼育中のハブが産卵する多数の卵をふ化して成蛇にまで飼育し採毒に給することを目的として本研究に着手した。

ふ化に関する最近の報告では高良、三島、森田、福島、木場等の詳細な報告があるが、ふ化以後の幼蛇飼育に関する記述は少ない。高良(1962)は実験室内でふ化した幼蛇2個体の飼育を試みているが約10ヶ月後には斃死している。その主な原因は自然環境と異なる室内に飼育されるために起る拒食の現象によると思われる。我々は拒食を示す幼蛇に半強制給餌を行って飼育することを試みた。本報告は1970年8月、9月に当所飼育室で産卵したハブ及びヒメハブの卵をふ化して得た幼蛇の12ヶ月及び18ヶ月間の成長過程及び飼育状況に関する概要である。