

サキシマハブ (*T. elegans*) 毒の研究 — 出血、腫脹及び致死活性について —

ハブ支所

野崎真敏 山川雅延 外間善次

はじめに

出血及び腫脹は毒蛇咬傷の際によく知られた局所病変である。出血作用に関しては、近藤(1)によりすでに定量法も確立され、佐藤(2)及び高橋(3)はハブ (*T. flavoviridis*) 毒の中の2つの出血因子HR-I、HR-IIを高度に精製しているし、佐藤(4)はマムシ (*A. halys*) 毒の2つの出血因子HR-I、HR-IIの単離にも成功している。又、山川(5)は硫酸塩析、冷温アルコール沈殿法、Sephadex G-100によるゲルろ過等によりサキシマハブ毒の出血因子の部分精製を行なった。

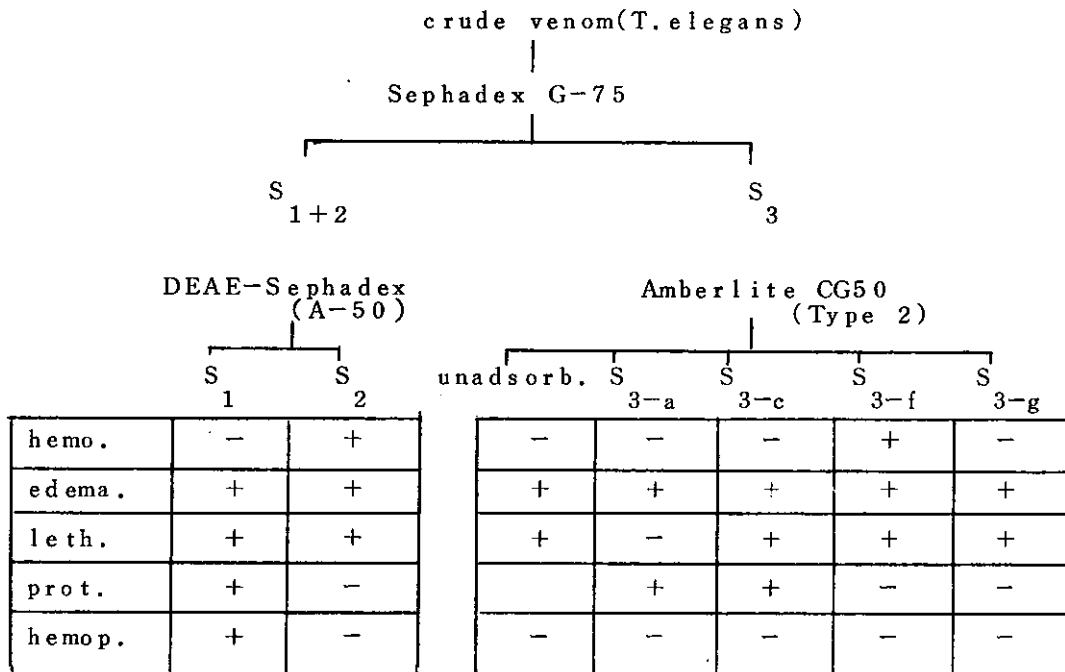
腫脹に関しては、山川(6)は従来沢井、小此木(7)等がハプトキソイドの研究に用いていたマウスの足蹠重量法に若干の改良を加え、統計的な分析を行ない腫脹作用の定量を試みた。この方法を用いることにより腫脹因子の系統的な研究が可能となり、サキシマハブ毒の中には出血を伴う腫脹活性画分と、出血をほとんど含まない腫脹活性画分の存在することが明らかとなった。

本報では、Sephadex G-75、DEAE Sephadex A-50、Amberlite CG50を用いてサキシマハブ毒の分離精製を行ない出血腫脹及び致死作用について検討してみた。

実験材料と方法

サキシマハブ粗毒とその精製

Fig. - 1 Method & characterization of each fraction



サキシマハブ粗毒は1965年沖縄県公害衛研ハブ支所においてサキシマハブ (*T. elegans*) より採毒したものを、精製はFig-1の方法で行なった。粗毒をSephadex G-75を用いて分離すると2つの活性画分 (S_{1+2} , S_3) を得る。出血活性の大部分は S_{1+2} にあり、腫脹活性については凡そ $S_{1+2} : S_3 = 1 : 0.5$ (8時間判定)、致死活性については $S_{1+2} : S_3 = 1 : 2.5$ の割合に分布した。

蛋白量の測定

分光光度計により280mの吸光度を測定し、サキシマハブ粗毒 $1 \text{ mg/ml} = 1.16 \text{ OD}_{280}$ として蛋白量を算出した。

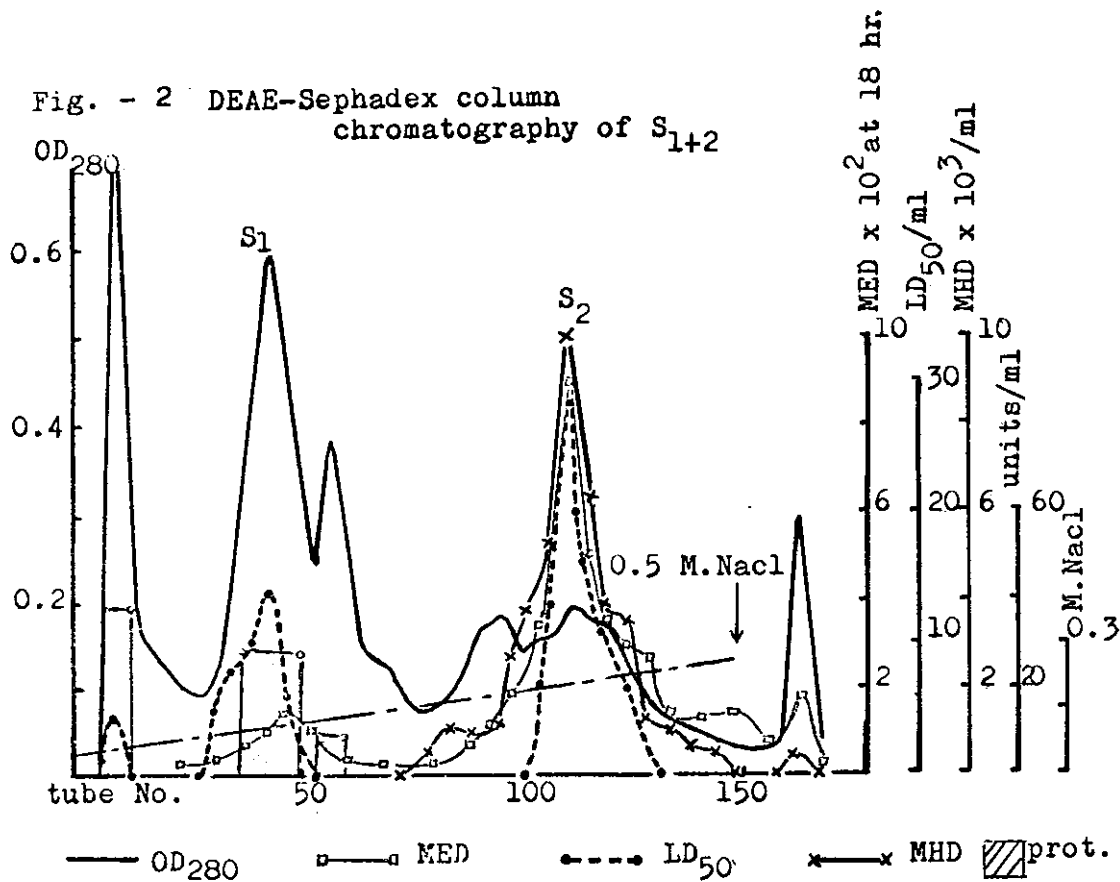
毒活性の測定

出血活性は近藤のウサギ皮内法(1)、腫脹活性は山川の足跡重量法(6)致死活性はマウスの尾静脈注射法をそれぞれ用いた。プロティナーゼ活性はカゼインを基質としてKunitz(8)の方法に従った。

実験成績

DEAE-Sephadexによる精製

Sephadex G-75により分離された S_{1+2} 画分を凍結減圧法により濃縮し、出液緩衝液の6mM硼酸緩衝液 $\text{PH} = 9.0$ に対して透析後生じた沈殿を遠心により除去する。上清250mgをDEAE-Sephadex A-50カラム ($2.5 \times 30 \text{ cm}$) を用いて食塩濃度を0.05→0.25Mへ直線的に変化させながら $10 \text{ ml}/30 \text{ min}/\text{tube}$ の条件で溶出しFig-2を得た。



DEAE-Sephadex A-50 column 2.5 X 30 cm

6mM borax-HCl buffer $\text{pH} = 9.0$, 0.05→0.25M NaCl

S_{1+2} : 250mg, 10ml/30min/tube

その結果、大部分の出血活性はS₂ (試験管番号95~125)にあり、活性は粗毒に比べ約17倍に上昇した。

腫脹活性に関しては18時間後に判定した結果、大部分の活性はS₂にあった。しかし、時間を追って観察した場合、長時間腫脹が持続するS₂に対してS₁の腫脹は速かに減少する性質があり、もっと早い時間に判定すればS₁にも大きな活性のピークができるものと思われる。このことについてはタイムコースを示しながら後で説明する。致死活性はS₁、S₂の両画分に存在し、その割合は約1:3であった。

プロティナーゼ活性は大部分の出血活性のあるS₂画分にはほとんど認められず、ハブ毒同様主要な出血活性とプロティナーゼ活性は明かに分離する

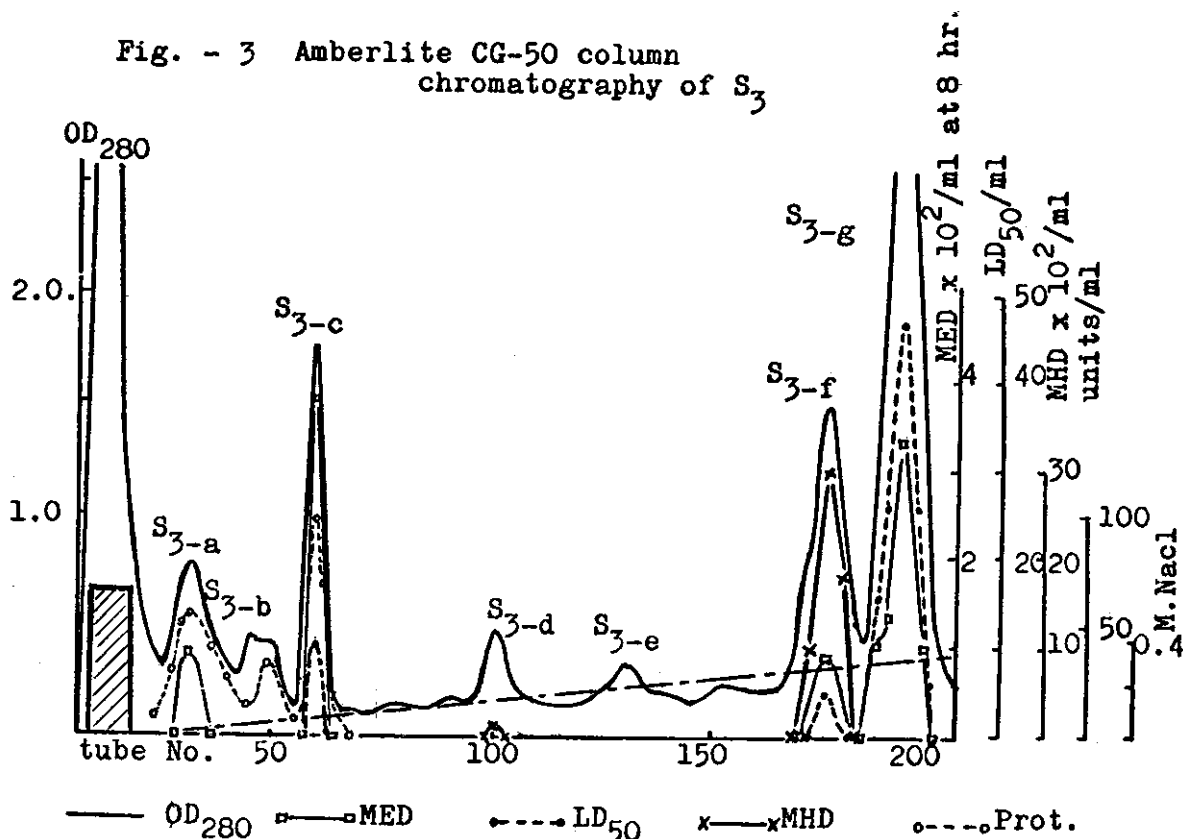
ことができた。

S₁画分をマウスの尾静脈に注射すると喀血を起こして死亡し、肺の膨張及び著しい出血を認めた。S₂画分を同様にマウスの尾静脈に注射すると肺での変化はほとんど認めず、全身性の出血を認めた。

Amberlite CG-50による精製

Sephadex G-75により分離されたS₃画分をS₁₊₂同様に濃縮し、出発緩衝液10mM硼酸緩衝液PH=8.5に透析後生じた沈殿を遠心により除去した。上清1,500mgをAmberlite CG-50 (Type 2)のカラム(2.5×40cm)を用いて、食塩濃度を0→0.35Mまで直線的に変化させFig-3を得た。(10ml/40min/tube)

Fig. - 3 Amberlite CG-50 column chromatography of S₃



Amberlite CG-50 (type 2) column 2.5 X 40 cm
10mM borax-HCl buffer pH=8.5, 0→0.35M NaCl
S₃ : 1500mg, 10ml/40min/tube.

粗 S₃ 画分においては、ウサギの背皮が肥厚するため出血斑が拡がって測定するのは困難だったが精製された S₃-f 画分 (試験管番号 170~180) では鮮かな出血斑を認めた。しかし、S₃-f の出血活性が粗毒に占める割合は極めて少なかった。

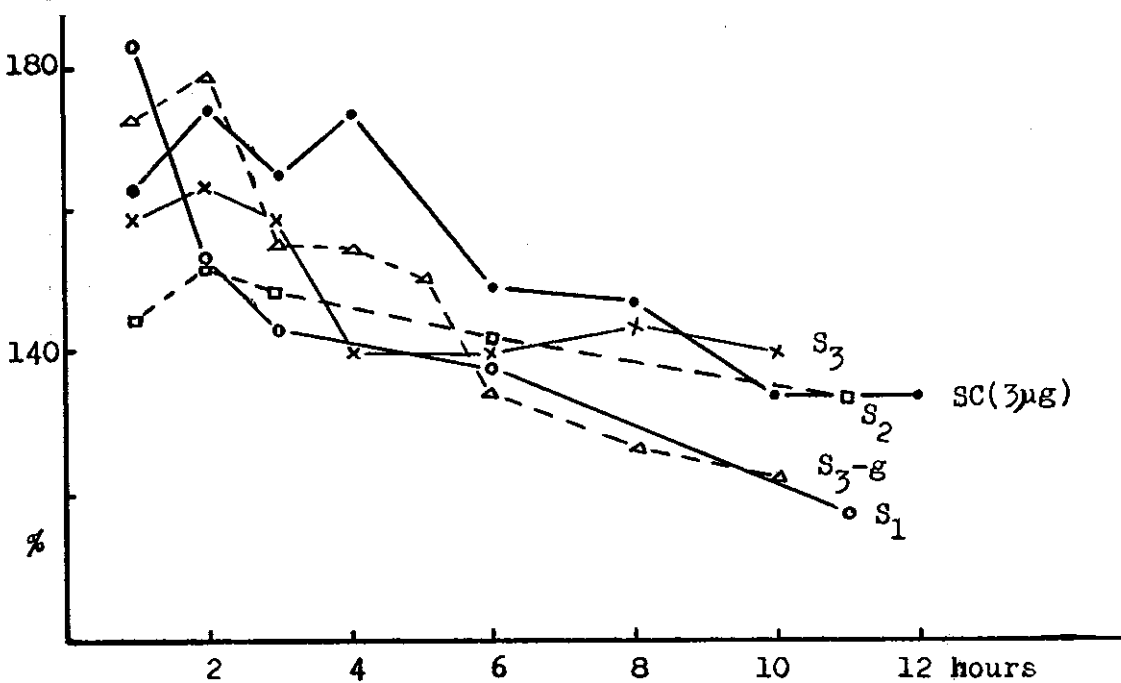
腫脹活性については 8 時間後に測定した結果 S₃-a, c, f, g の 4 つのピークに活性を認めたが、特に S₃-c (試験管番号 60~65)、S₃-g (180~200) において強い活性を示した。

致死活性は S₃-c, f, g, の 3 つのピークに存在するが、その約 6 割は S₃-g にあった。

プロテイナーゼ活性は S₃-a, b, c にあり、出血活性を示す S₃-f には認められず S₂ 同様出血活性とプロテイナーゼ活性は分離された。又、主要な致死活性ピークの S₃-g にもプロテイナーゼ活性は認められなかった。

腫脹活性の経時変化

Fig. - 4 Time course curves of mouse leg edema



粗毒及び各分画毒の腫脹活性のタイムコースを Fig-4 に示した。粗毒 (SC) では約 2 時間後に最高に達し、その後徐々に減少して 6 時間以降では比較的安定した。

S₁ 画分では 1 時間後にすでに最高に達し、その後速かに減少して 6 時間後には腫脹がほとんど認められない程までに快復した。

S₂ 画分では粗毒同様 2 時間後にピークに達し、その後も腫脹はほとんど減少せず長い時間継続した。

S₁ と S₂ を比較した場合、1 時間後には S₁ の方がはるかに高い腫脹率を示しているにもかかわらず、3 時間後にはすでに S₂ より低い値を示した。

Fig-2 の DEAE-Sephadex によるクロ

マトグラフでは18時間後の判定を示したためS₂の方に大きなピークがあるが、3時間以内で判定すればS₁画分にも大きな腫脹活性のピークができることは容易に想像できる。

粗S₃でも2時間後に最高に達しかなり長い時間腫脹は残ったが、粗S₃の中の代表的なS₃-gでは急速に減少した。S₃の中の他の腫脹活性画分でも同様の傾向を示し、精製が進むにつれて腫脹は短時間で快復する傾向を示した。

総括と考察

沖縄における毒蛇咬傷は年間350~500名にも昇り、ハブとサキシマハブの咬傷患者の割合は凡そ3.1である。全咬傷の約4分の1を占めるサキシマハブは、ハブ咬傷に比べ臨床症状は極めて軽いが、高度の腫脹及び出血を示す。

従来、サキシマハブ咬症の治療にもハブ抗毒素を使用してきたが、"ハブ抗毒素はサキシマハブ毒の出血作用はよく中和するが致死作用は中和し得ない"と云う貞弘⁹等の報告にもみられるようにその効果については必ずしも明かでなく、サキシマハブ毒の研究は本県のハブ咬傷対策上極めて重要である。

吾々はSephadex G-75、DEAE Sephadex A-50、Amberlite CG-50によりサキシマハブ毒の分離精製を行ない腫脹、出血及び致死作用について検討してみた。

サキシマハブ粗毒の中には出血作用を示す画分がS₂、S₃-fと2つ存在するが、大部分の活性なS₂にあった。両物質のクロマトグラフィーにおける挙動をみた場合、S₂は分子量5万以上の酸性蛋白質、S₃-fは分子量2万5千前後のアルカリ性蛋白質と考えられ、ハブ毒のHR-I、HR-IIに相当するものと思われる。しかし、ハブ毒のHR-IIIには粗毒の約3割の出血活性が分布するにもかかわらず、サキシマハブ毒のS₃-fの粗毒に占める場合は極めて少なく、Sephadex G-75で分離

された粗S₃ではほとんど出血斑を認めることができない程だった。従って、実際の咬傷時におけるS₃-fの作用は極めて小さいと考えられ、抗毒素の開発及び治療法の研究の際の出血作用についてはS₂のみに焦点を絞った方がよいと思われる。

又、これらの出血活性画分はプロティナーゼ活性を全く示さず、ハブ毒同様出血活性とプロティナーゼ活性は明らかに分離することができた。

腫脹作用はいずれも1~2時間後に最高に達するが、経時変化を観察した場合S₁は急速に減少し、出血を伴うS₂では長時間持続した。又、粗S₃画分では比較的持続する傾向を示すが、精製されたS₃-c、f、gでは速かに減少した。このように腫脹作用は時間のfactorが大きく影響するため、回収率や活性の強さを比較するのは困難であった。

ハブ毒の腫脹作用については未だ十分研究されていないが、マムシ毒¹⁰からはすでに脈管透過性を亢進するAE-1水分解酵素が単離されており、サキシマハブ毒の腫脹活性物質についても、これらの炎症につながると思われる諸酵素活性と関連させて検討してみる必要がある。

致死作用については、S₁、S₂、S₃-gの3つのピークに主な活性があるが、出血作用の全くないS₃-g画分に最も大きな活性があるのは興味深い。ハブ毒の場合、主要な出血活性画分HR-1に大部分の致死活性が含まれており、そこがハブ毒とサキシマハブ毒の大きな相違点となっている。ハブ抗毒素でサキシマハブ毒の致死活性が中和できないのはS₃-g画分によるものと思われる。

結 論

サキシマハブ毒を分離精製し腫脹、出血及び致死作用について検討した。

- (1) サキシマハブ粗毒の中には2つの出血因子S₂、S₃-fが存在する。
- (2) 大部分の出血活性はS₂にあり、S₃-fの粗

- 毒に占める割合は極めて少ない。
- (3) これらの出血活性画分は、カゼインを基質としたプロテイナーゼ活性を全く含まない。
- (4) 腫脹活性は大小6つ認めるが、活性の強さ及び量から考えて S_1, S_2, S_3-g の3つに絞ることができる。
- (5) いづれの腫脹も1~2時間後に最高に達するが、その後 S_1, S_3-g では急速に減少し、 S_2 では長時間持続した。

- (6) 主要な致死活性画分は S_1, S_2, S_3-g と3つ存在し、最も大きな活性は S_3-g にあった。それは出血作用を示さず、プロテイナーゼ活性も認められなかった。

本研究に要した費用は"沖縄はぶ抗毒素開発研究補助金"より援助された。

本稿の大要は第20回毒素シンポジウムで演述された。

参 考 文 献

- (1) Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. and Ohsaka, A. Jap. J. Med. Sci. & Biol., 13, 43-51, (1960)
- (2) Omori-Satoh, T. and Ohsaka, A. Biochim. Biophys. Acta, 207, 432, (1970)
- (3) Takahashi, T., and Ohsaka, A., Biochim. Biophys. Acta, 207, 65 (1970)
- (4) Omori-Satoh, T., Iwanaga, S. and Suzuki, T., Toxicon, 2, 1-4, (1964)
- (5) Yamakawa, M., The Snake, 4, 96-107, (1972)
- (6) Yamakawa, M., The Snake, 5, 168-173, (1973)
- (7) 沢井芳男, 他, 日本細菌学雑誌 22, 67-72, (1967)
- (8) Kunitz, M., J. Gen. Physiol., 30, 291, (1946)
- (9) 貞弘省二, 他, 日本細菌学雑誌 20, (1) 21-25, (1965)
- (10) Sato, T., Sadaaki, I., Mizushima, Y. and Suzuki, T., J. Biochem., 57, 380-391, (1965)