

ハブ (T、flavoviridis) 毒の腫脹作用

ハブ支所 山川雅延 . 野崎真敏 . 外間善次

序

我々は先にマウス足蹠重量法によるハブ及びサキシマハブ毒の腫脹活性の定量的研究について報告した。即ち、マウス右足蹠に毒を注射し左健足側の重量を100%として右腫脹足の重量%を腫脹率とした。この場合の判定時間は注射後8時間であった。今回は判定時間を注射後4時間として同様な検討を行った。4時間判定法でも腫脹活性の定量は可能であり且、短時間で実験出来る長所を有していた。この4時間判定法を利用してハブ毒中の腫脹作用を追求し、併せて致死活性及び出血活性との関係を調べたので報告します。

実験材料及び実験方法

1. ハブ毒 : ハブ粗毒は1971年当研究所で採毒し、凍結乾燥保存したものをを用いた。
2. 粗毒のゲル濾過 : 大森等の方法によってハブ粗毒をゲル濾過した。即ち、ハブ粗毒1300mg (蛋白質として1170mg) をM/200 Tris-HCl buffer (PH 8.5) に溶解し、Sephadex G 100 カラム (2.5 × 90 cm) によってH₁ 及びH₂ 画分に分けた。H₁ 及びH₂ はウサギ皮内注射によって出血作用を示すことからHR-I 及びHR-II ともいわれる。我々は腫脹作用を追求するので出血作用とは別にH₁ 及びH₂ と呼ぶことにする。
3. DEAE-Sephadex による精製 : 粗毒のゲル濾過を数回行ってH₁ 画分を集め、これをプールして凍結減圧法により濃縮しその374mg 蛋白質をDEAE-Sephadex カラム (2.5 × 30 cm) によって更に精製した。出発緩衝液は5 mM

borax-HCl buffer (PH 9.0) で食塩濃度を0.05 → 0.25 Mへ直線的に変化させながら20 ml/hr. の条件で溶出した。

4. Amberlite CG 50による精製 : 粗毒のゲル濾過を数回行ってH₂ 画分を集め、これをプールして凍結減圧濃縮し、その1100mg 蛋白質をAmberlite CG 50 カラム (2.5 × 40 cm) によって精製した。10 mM borax-HCl (PH 9.0) の食塩濃度を0.05 → 0.3 Mまで直線的に変化させながら15 ml/hr. の条件で溶出した。
 5. 蛋白質の測定 : 分光光度計により280 mμ の吸光度を測定し、ハブ粗毒1 mg/ml = 1.16 OD 280として蛋白質を算定した。
 6. 腫脹活性の定量、マウス右足蹠に10 μl の毒液を注射し左健足側の重量を100%として右腫脹足の重量%を腫脹率とした。判定は注射4時間後に後肢距骨関節を約90°に曲げ45°の角度にハサミを入れて切断し、直ちに両足蹠の重量を測定した。(山川等、ハブ及びサキシマハブ毒の腫脹活性の定量的研究、The SNAKE, Vol. 5, PP 168-173, 1973)
 7. 致死活性の測定 : マウス尾静脈注射法により48時間生死を観察した。LD₅₀はLeed & Muench 法によって計算した。
 8. 出血活性の測定、近藤等の方法によって測定した。即ち、ウサギ背皮に希釈毒液を各0.1 ml 宛注射し24時間後に背皮の裏側から出血斑の大きさを測定した。出血斑の直径の平均値が10 mmになるような毒の最少量を1 MHDとした。(近藤 et al 1960)
- 分画操作は全て低温で行った。又毒の希釈は

M/30PBS (PH7.0ゼラチン加)を用いた。

画して得たH₁及びH₂画分を用いて毒量と腫脹率との関係を調べた。

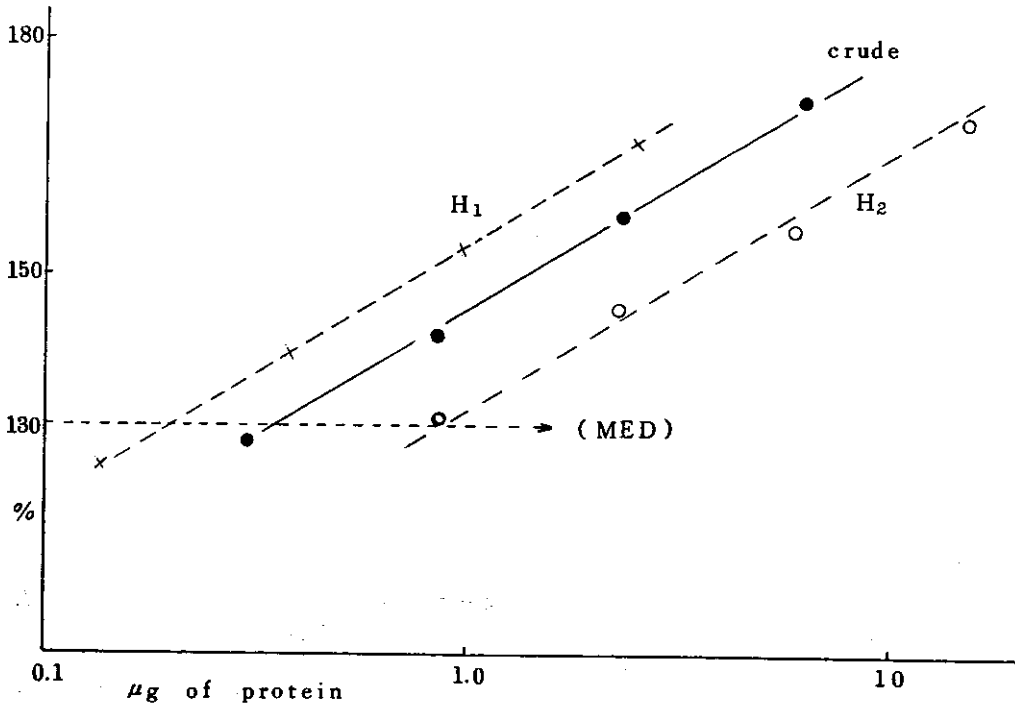
実験成績

1. 腫脹活性の定量

ハブ粗毒及びこれをSephadex G 100で分

1群10匹のマウスを使用して得られた腫脹率の測定値を統計的に分析した結果、Fig.1に示す様に毒量の対数値と腫脹率との間には腫脹率が130

Fig. 1. Dosage response line (at 4 hours)



%以上の範囲で直線関係が成立し且、H₁及びH₂は粗毒と互に平行であることが認められた。この時のvariance $s^2 = 61.7$ 、slope $b = 27.1$ であった。腫脹率130%を示すに必要な毒の最少量を1最少腫脹量(MED)と定義して、粗毒、H₁、及びH₂の1MEDはFig.1から読取るか又は次式によって計算出来る。

$$X = \bar{X} - (\bar{Y} - 130) / b$$

(Xは130%の腫脹率を示すに必要な毒量の対数値、 \bar{X} は全ての測定点における毒量の対数値の平均、 \bar{Y} は全ての測定点における腫脹率の平均値、 $b = \text{slope}$)

粗毒及びH₁、H₂画分の最少腫脹量とその信頼限界及び粗毒に対する相対力価はTable.1.にまとめられた。

Table 1. Minimum edema dose and relative potency.

	MED	relative potency
Crude	0.23 (0.19 - 0.29)	1
H ₁	0.14 (0.12 - 0.18)	1.64 (1.18 - 2.25)
H ₂	0.62 (0.5 - 0.85)	0.38 (0.28 - 0.51)

() : fiducial limits.

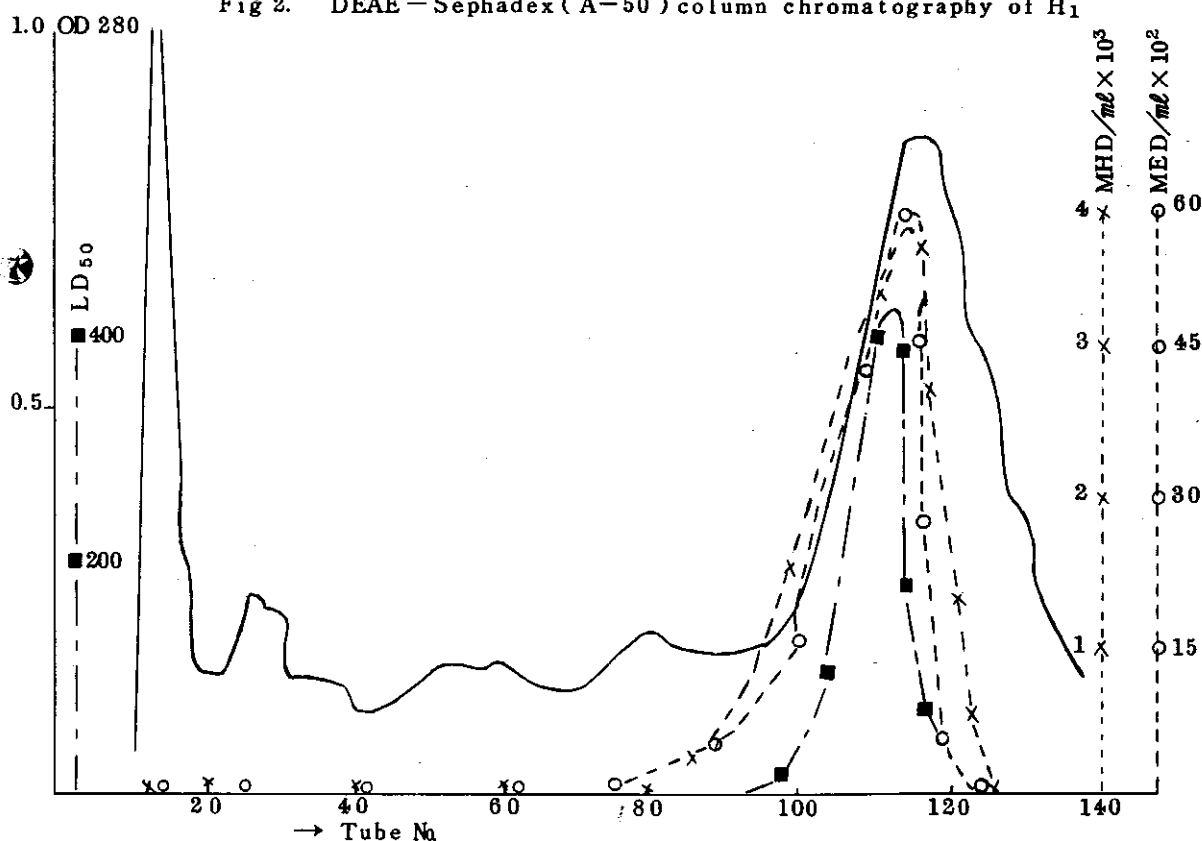
2. DEAE-Sephadexによる精製

ゲル濾過によって得た H₁ 画分を凍結減圧法で濃縮し DEAE-Sephadex (A-50) によるカラムクロマトグラフィーを行った。溶出液は各試験管に 10 ml 宛集め、OD280、MED、

LD50 を測定した。

その結果、Fig. 2. に示す様に腫脹活性、出血活性、及び致死活性は同一蛋白ピーク内ではほぼ一致していた。

Fig 2. DEAE-Sephadex (A-50) column chromatography of H₁



3. Amberlite CG 50 による精製
 ゲル濾過によって得た H₂ 画分を同様に凍結
 減圧法で濃縮した後、10 mM borax-HCl

buffer (PH 9.0) に一夜透析、遠心後、上清
 (1100 mg 蛋白) を Amberlite CG 50 によ
 り分画精製した。その結果を Fig. 3. に示した。

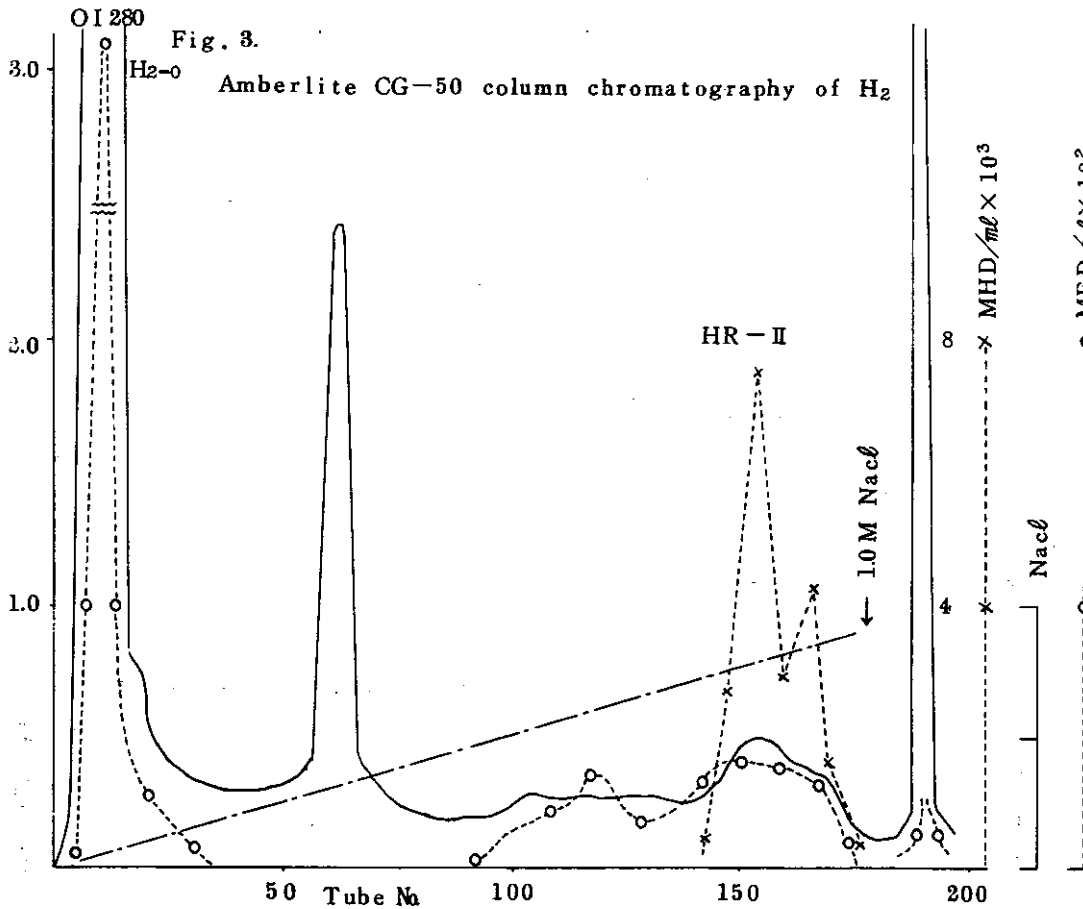


Fig. 3. に示す様に Amberlite に吸着されず最初に出る非吸着画分 (H₂-o と呼ぶことにする) には多量の腫脹活性が含まれていた。又、腫脹活性は Tube No 90 以後でも広く分布していることが認められた。

各精製段階における腫脹活性の収量と比活性は Table 2 にまとめられた。Sephadex によるゲル濾過で H₁ の比活性が 1.64 倍に上昇したが、その他の精製操作によって腫脹の比活性は殆ど上昇せず逆に低下していた。H₂ 画分の Amberlite による精製では腫脹活性の全収量が 27.5% に過ぎなかったが、この内 19.5% は H₂-o 画分に

含まれ残り 8% が HR-I 画分に含まれていた。

次に、ウサギ皮内注射法で出血活性を定量した結果、Tube No 140 - No 175 に強い出血活性が存在することが認められた (HR-II)。

H₂-o 画分はウサギ皮内に原液 0.1 ml を注射すると弱い不明瞭な出血を示すに過ぎず出血活性は測定出来なかった。又、H₂-o 画分の 0.3 ml をウサギ右後肢筋肉に注射し同時に HR-II 画分の 0.3 ml を左後肢筋肉内に注射して 24 時間後に両者の筋肉に対する出血作用を肉眼的に比較した。その結果、HR-II 画分は著しい出血を起させていたのに対し H₂-o を注射した右後肢筋肉は軽度の

Table 2. Edema-forming activity of crude Habu venom and venom fractions.

	venom	protein		edema forming activity			
		mg	recov	MED ug	total MED	recov	r.a.
	crude	1170	100%	0.23	5×10^6	100%	1
G 100	H ₁	260	22	0.14	1.8 "	36	1.64
	H ₂	780	67	0.62	1.25 "	25	0.38
	total	1041	89		2.0 "	61	
DEAE Seph	org-H ₁	374	100	0.2	1.9 "	100	1
	HR-1	180	48	0.18	1.0 "	52.6	1.1
Amberlite CG 50	org-H ₂	1100	100	1.42	7.7×10^5	100	1
	HR-11	92	8	1.66	0.6 "	8	0.86
	H ₂ -o	528	48	3.63	1.5 "	19.5	0.39
	Total	620	56		2.1 "	27.5	

r.a. : relative activity. recov : recoveries.

出血を認めるに過ぎなかった。

ところが、H₂-oはマウス筋肉内に原液0.1mlを注射すると著しい出血を認め、マウス足蹠注射(20 μl)でも暗赤色の出血した足蹠となることが認められた。

これに対してHR-I画分を同様にマウス筋肉内に原液0.1ml注射した結果H₂-o注射群に比してはるかに軽度の出血を認めるに過ぎなかった。即ち、マウスとウサギはH₂-oとHR-Iに対する出血作用の感受性が全く逆の関係にあることが認められた。又、モルモットに対する出血作用はウサギと同様にHR-I画分の方が強かった。

しかしラットに対しては両者とも多量の毒を注射しても殆ど出血を認めなかった。

考 察

マウス足蹠注射法によってハブ毒中の腫脹因子を追求した。本法は注射後4時間で判定出来る長所を有しているが注射量が10 μlの微量であるため適当な濃度以上の毒液についてのみ応用可能である。従って、精製実験等で操作が進むにつれて試料が希薄化した場合には限界がある。今回の実験では概して精製による腫脹活性の比活性は上昇しなかった。これは①、精製操作の過程

で腫脹活性が失活した。(2)、腫脹活性は各成分の相乗作用に依るところが大きい。(3)、本法による腫脹活性定量法にまだ問題が残されている。等々について更に検討を要することを示している。

又精製操作を重ねることにより収量が著しく悪くなった。特にH₂の精製で全収量が悪いのはFig 3からも認められる様に腫脹活性がH₂-oとHR-Ⅱ画分以外にも広く分布しているためであろう。

しかし、ハブ粗毒中の主な腫脹活性はH₁(HR-Ⅰ)でありこの画分は同時に強い出血及び致死作用を有しているのでハブ毒中の毒性を代表する最も重要な成分であろう。

従来ハブ毒中に含まれる主な毒性因子はHR-ⅠとHR-Ⅱであるとされて来た。しかし本実験が示した様にH₂-oも強い腫脹作用を認めるがウサギ皮内又はウサギ筋肉内に対してはHR-Ⅱに較べると感受性が悪いのに対してマウス筋肉内の出血作用と足蹠に対する腫脹、出血作用は逆にHR-Ⅱより強いことが認められた。この実験動物間の分画毒に対する感受性の差は不都合なことであるが、人間のハブ咬症とどの様にかゝり合っているかを究明しなければH₂-o画分の意義づけは出来ないであろう。

ま と め

ハブ粗毒をSephadex G 100 で分画してH₁画分とH₂画分に分けた。次にH₁画分はDEAE-Sephadexで、H₂画分はAmberlite CG

50で精製した。これらの精製毒について腫脹活性を定量し、併せて出血活性と致死活性との関係を調べた。

その結果、H₁(HR-Ⅰ)画分の腫脹、出血及び致死活性は同一蛋白ピーク内ではほぼ一致していた。しかしH₂画分はウサギ皮内注射法で強い出血作用を示す画分(HR-Ⅱ)に同時に腫脹作用を認めたが、これとは別に腫脹作用を有する画分(H₂-o)が認められた。H₂-oはAmberliteによって吸着されず従って最初からカラムより流出する非吸着画分である。

H₂-o画分の腫脹活性量はHR-Ⅱ画分に比してはるかに多量であり腫脹に関する限りHR-Ⅱより重要な画分であると考えられる。

又、H₂-oはマウス筋注によって著しい出血を起すがウサギの皮内又は筋肉内では弱い出血を示すに過ぎない。しかしHR-Ⅱ画分はマウス筋注で弱い出血を示しながらウサギ皮内又はウサギ筋肉内では強い出血作用を示す。即ち、H₂-oとHR-Ⅱの出血作用の強弱はマウスとウサギでは全く逆の結果を示した。

本研究に要した研究費は沖縄開発庁および厚生省細菌製剤課の御支援による“厚生科学研究費”より支出された。紙上より深謝申し上げます。又本稿の概要は第16回日本熱帯医学会総会で演述された。

STUDIES ON THE EDEMA FORMING ACTIVITIES OF HABU
(*Trimeresurus flavoviridis*) VENOM.

M. Yamakawa, M. Nozaki and Z. Hokama.

The crude Habu venom was fractionated as a first step by passing through a Sephadex G 100 column, and separated into two protein fractions of H₁ and H₂ by the method of Omori-Sato et al. Then, fraction H₁ and H₂ was further purified by DEAE-Sephadex and Amberlite CG 50.

The edema forming activity was determined by infection on the mice foot pads. Ten μ l of venom solutions were injected into right pads of the mice weighing 15-18 g. Four hours after injection, both legs were cut off almost at a right angle and weighed. The weight ratio of the injected legs to the healthy legs was calculated as a percentage, to express the severity of the edema.

By statistical analyses of the results obtained, it was found that there is linearity and parallelism between log dose of each venom and the edema ratio. The "Minimum Edema Dose" was defined as "the least quantity of venom causing 130% of the edema ratio."

By the method described above, fraction H₁ had single peak of edema forming activity with intensive hemorrhage and lethal effect.

It was found that there were at least two kinds of edema forming principles in the fraction H₂. One was H₂₋₀ which eluted from column as a first fraction unabsorbed by Amberlite CG 50. And the other was HR-II fraction which reported previously by Ohsaka et al. Fraction H₂₋₀ showed a much amount of edema forming activity than fraction HR-II.

Mice injected intramuscularly with fraction H₂₋₀ was observed severe hemorrhage in spite of minor effect in the rabbit muscles. On the other hand, fraction HR-II showed intensive hemorrhage in the rabbit muscles injected intramuscularly, although lesser extent of hemorrhagic effect was observed in the mouse muscles.

参 考 文 献

P 209 参 照