抗まむし毒血清に関する研究

金子 順一 今井 孝敏 近造 創平

武田薬品工業株式会社光工場細菌部

〔受付：7月20日1953年〕

蛇毒ならびに蛇毒血清に関する研究は世界各地に棲息する毒蛇について広く行われて居り、わが國でも台湾、硫球産毒蛇について従来多くの業績がある。(桑島^{1,2)})

しかるに日本に於ける唯一の毒蛇である「まむし」(*Agkistrodon blomhoffii*) に関しては従来余り重要視されなかつた感があり、田中、三宅、久保田^{3,4,5)}、Burns⁶⁾等の「まむし」治療血清に関する研究が見られるにすぎない。又、抗蛇毒血清、殊に「まむし」毒血清の精製については尙研究が行われていない様である。

昨年来「まむし」血清の必要性が一般に強調されて来たので、われわれはその製品化について研究を進め、若干の知見を得たので報告する。

「まむし」毒を以てする馬、山羊の免疫については、桑島、田中、三宅、久保田^{3,4,5)}、Burns⁶⁾等の業績があり、われわれは馬を「まむし」毒及び「硫球はぶ」毒の混合を以て、田中のいわゆる「微量生毒連続免疫法」に準拠して免疫したが、「まむし」毒に対する抗体のみを目標として実験を進めたので、「はぶ」毒抗体については触れない。本報告は主として抗体價の測定及び血清精製法に関するものである。

実験材料及び方法

免疫及び実験に用いた「まむし」毒は乾燥毒として昭和27年秋に東京都内の蛇店から入手したもので、そのマウス皮下注射によるMLD約0.3mgであり、田中等の記載に比して弱かつた。(昭和28年春に同じ経路で入手したのも同様であつた。)

馬の免疫は、上記の「まむし」毒と硫球那覇から入手した「硫球はぶ」毒との各0.005mgより初め、5日連続注射後約3倍に増量してゆく田中等の方法により、各20mgに到つて(約90日)一部採血を行い、次で毎週2回30mgずつ注射し、約45日毎に一部採血を行つた。(この方法によつて抗体價が漸増する場合があつた。)

「まむし」血清の抗体價の測定には、従来田中⁴⁾の皮下

法、即ちマウス皮下に2MLDの毒と血清稀釈を注射して中和点を求める方法が用いられたが、Burnsは血清の中和する毒のLD₅₀数を用うべき事を示唆して居り、更に近來傳染病研究所細谷研究室に於て宮崎⁷⁾は「はぶ」血清に於て静脈内注射による方法が優れている事を示している。われわれは「まむし」毒血清に於て、これ等の方法を検討したが、更に「まむし」毒がいわゆる壊死毒とよばれる局所作用を主としたものであるのに鑑み、家兔皮内法を試みた。

乾燥毒は食塩水に溶解し、3000 r.p.m. 約20分遠沈し上清を用いた。乾燥毒のマウスに対する致死量を予め概測しておき、皮下法に於ては約2MLDが0.1cc中に含まれる様に稀釈し、血清の倍数稀釈系列の各等量と混じて37°C2時間後0.2ccずつを体重約15gのマウスの腹部皮下に注射し、72時間観察した。試験の都度稀釈毒に血清を加えないものを同様に37°C2時間おいたのち更に稀釈して注射し、試験混合液中の毒の毒性を計算する。計算はThompson⁸⁾の移動平均法によつた。静脈内法ではマウスの尾静脈内注射により、約5LD₅₀量の毒を用いる他は皮下法と同様に操作し、毒血清混合液0.2ccずつを尾静脈内注射した。皮内法では、0.1~0.2mgの毒と血清の種々稀釈量が0.1ccに含まれるようにして37°C2時間おいたものを家兔背部皮内に0.1ccずつ注射した。

血清の塩析分割は硫酸ナトリウム又は硫酸アンモニウムによつて行い、電気泳動像は日立小型セリウス装置を用い、pH7.8, 5°C, イオン強度0.1, バルビタール緩衝液で撮影した。又、血清のペプシン処理に用いたべ

KANEKO, Jun'ichi, IMAI, Takatoshi, KONZO, Sōhei: Studies on the antivenin against *Agkistrodon blomhoffii*. Bact. Dept., Hikari Plant, Takeda Pharmac. Ind. Ltd. (Hikari City, Yamaguchi Prof.)—Jap. J. of Bact., 8(7), 733-737, 1953.

第 1 表 まむし血清抗体価測定 静脈内及び皮下の比較

粗血清 M-220 (1-19)

血清量 cc	静 脈 内		皮 下	
	毒 mg	マウス成績	毒 mg	マウス成績
0.1	0.08	○ ○ ○ ○	0.75	○ ○ ○ ○
0.05	"	○ ○ ○ ○	"	○ ○ ○ ○
0.025	"	● ○ ○ ○	"	● ○ ○ ○
0.0125	"	● ● ○ ○	"	● ● ○ ○
0.0063	"	● ● ● ○	"	● ● ● ○
-	0.04	● ● ● ●	0.75	● ● ● ●
-	0.02	● ● ● ●	0.375	● ● ● ●
-	0.01	○ ○ ○ ○	0.188	○ ○ ○ ○
終末点	ED ₅₀ = 0.0210 cc		ED ₅₀ = 0.0200 cc	
毒 力	LD ₅₀ = 0.0141 mg		LD ₅₀ = 0.315 mg	
単位/cc (1σ範囲)	269.9 (226.7~388.3)		119.0 (69.0~245.2) 40~80 MLD-u	

○ 局所 ● 死

ブシンは米国 "Cudahy" 1:10,000 (粒状) である。

実験成績

A) 抗体価の測定

田中の皮下法を「まむし」血清に應用することは従来の慣例であるが、この方法では、(1) 毒の MLD を正確に標定することが困難であり従つて抗体価には常に「約」と冠せねばならぬ事の他に(2) マウスが著しい局所の壊死を呈しながら生残する事が多いのは、「まむし」毒の如き局所症状を主とするものを対照とする測定には不適当に思われる。又皮下法に於て MLD の代りに LD₅₀ を用いると(1)の欠陥はないにしても(2)の状態は同じことである。

静脈内法ではこれらの欠点が見られなくなるので、血清の抗体価測定は容易である。但し「まむし」毒を静脈内に注射して致死せしめる作用と実際に咬傷されたときの反応との関係については尙問題が残されている。

同じ血清を皮下法と静脈内法とによつて同時に抗体価を測定した1例は第1表の様である。(皮下法は第1表のようにいつもきれいに成績が得られるとは限らず、時に死亡が不規則になることがあり、静脈内法が常に明瞭な終末点が見られるのと異つていた。)

第1表の成績から、1) 静脈内法では、使用毒 0.08mg

=5.67×LD₅₀i.v. となり、ED₅₀i.v. は = 0.021 cc であるから、単位は 5.67×(1/0.021) であらわされる。括弧内は 1σ 範囲を示す。2) 皮下法では、使用毒 0.75 mg=2.38×LD₅₀s.c.=2 MLD で単位は従来のやり方では 40~80, ED₅₀ と LD₅₀ をとると 119 となる。

他の実験に於ても全く同様な関係があり、血清の単位数は静脈内:皮下:皮下 (MLD) で約 4:2:1 の如くであつた。

B) 家兎皮内中和試験

家兎皮内に「まむし」毒を注射すると、約 30 分頃から局所の浮腫が起り、次で発赤が漸次あらわれて 2 時間頃には明瞭になり、次第に範囲が拡大し、数時間後中心部が暗色を呈してくる。24 時間では、大きさは極大となり、中心部は明瞭な壊死を呈しはじめる。発赤は比較的境界明確である。毒の大量(約 1 mg)では、この頃四肢殊に後肢の脱力状態の他、時に斜頸症状を呈

するものがあつた。その後発赤は次第に消褪するが、壊死部の大きなものは遂次痂皮化する。

家兎の皮内反応は個体差が相当に見られたが、0.1~0.2 mg で約 20 mm の壊死を呈するので、最初 0.2

第 2 表 (1) 家兎皮内中和試験 (出血/発赤 mm)

血清 cc	毒 mg	家 兎 No. 6		家 兎 No. 7	
		M-221	NIH-2	M-221	NIH-2
0.09	0.2	—	—	—	—
0.05	"	—	—	—	—
0.025	"	2/3	6/8	—	6/10
0.0125	"	10/12	7/18	5/7	11/22
0.0063	"	10/13	10/23	10/22	20/40
0.0031	"	13/35	13/28	14/30	20/50
0.0016	"	15/40	14/40	18/35	23/60
0.0008	"	15/50	14/50	20/45	25/55
—	0.2	20/40		20/80	
—	0.1	6/20		13/20	
—	0.05	4/6		8/20	
—	0.025	—/5		4/7	

M-221=159 LD₅₀i.v. u/cc

NIH-2=226 " "

第2表 (2) 家兎皮内中和試験 (精製血清)

血 清 cc	毒 mg	家 兎 No. 12		家 兎 No. 13	
		AS-1	Pep-1	AS-1	Pep-1
0.05	0.1	—	—	—	—
0.025	"	—	—	—	—
0.0125	"	—	—/3	—	—
0.0063	"	5/7	3/4	3/6	±/6
0.0031	"	8/16	6/8	6/8	7/10
0.0016	"	10/15	7/10	8/11	8/10
0.0008	"	13/18	10/14	11/14	9/12
—	0.1	15/20		18/22	
—	0.05	8/14		9/13	
—	0.025	5/8		6/8	

AS-1 = 230 LD₅₀.i.v. u/cc

Pep-1 = 499 " "

mg を試験毒量としたが、注射点が多いと時に 24 時間で死亡するので後に 0.1 mg とし、観察は 24 時間目に発赤及び壊死の各平均直径の測定にとどめた。成績は第2表に例示したようであつて、家兎皮内に於ても明かに中和作用を測定することが出来るが、血清の静脈内抗体価とは一致する傾向がなく、又家兎の個体による差がある。例えば、第2表 (1) では、家兎 No. 6 と No. 7 は両血清による中和の傾向が異り、No. 7 は静脈内単位の高い方が逆に中和作用が弱く、又、第2表 (2) で両血清の静脈内単位が約 1:2 であるにもかかわらず中和作用はそれほどの差が認められない。

C) 塩析分劃

粗血清を硫酸ナトリウム及び硫酸アンモニウムを用いて塩析して抗体の分布をしらべた。同時に各分層のチゼリウス像をしらべると、第3表及び第4表の様な結果であつた。

即ち、抗体は硫酸ナトリウム 15~20 %, 硫酸アンモニウム 35~45 % 飽和で沈澱する部分に多く、これをチゼリウス像と比較すると、「まむし」毒抗体がいわゆる β_2 部に存することがわかる。

D) ペプシン処理

粗血清の塩析の実験から、「まむし」毒抗体がジフテリア抗毒素と同じ分層

に存することを知つたので、更に Pope によるペプシン消化法を應用してみた。その1例は第5表に示す様であつて、チゼリウス像もジフテリア抗毒素の場合と同様に $\beta_2 \rightarrow \gamma$ 方向への移動を示すと共に、抗体価を充分に保有している事を見た。(前出の第2表 (2) に於ける Pep-1 は第5表に示す精製品である。)

考 按

「まむし」毒を以て馬を免疫して「まむし」治療血清を得ることは田中等の生毒微量連続免疫法によれば必ずしも困難ではない。この際に生ずる免疫抗体が血清蛋白の何れの部分に存するか、換言すれば、 β 抗体か γ 抗体かによつて、「まむし」血清の精製法が大いに異つてくる。まむし毒の主体が酵素であるという説に従えば、馬の抗蛋白抗体の常に従い β 抗体である様に予想せられ、又われわれの実験によつて之を証明する事ができたが、毒作用を呈するものに蛋白以外の部分があつて之に対する γ 抗体も生じているか否かは尙証明できなかった。われわれの用いた乾燥毒は第1図の如き電気泳動像を興えるが何れの部分が毒作用を呈するものであるかは今後検討したい。まむし毒の抗体が β 抗体である事を明かにしえたので、恐らくジフテリア抗毒素と同様のペプシン処理に耐える事が考えられ、更に実験の結果は之を裏書きするものであつた。

第3表

まむし血清の硫酸ソーダ塩析

硫酸ソーダ %	収 率 %	u / mg Pr.	チゼリウス 像
—	(100)	4.5	M-221-2, 364 u/cc
0 ~ 10	1	1	
0 ~ 15	26.9	4.5
0 ~ 20	55.7	6.4
0 ~ 25	80.8	4.7
10 ~ 15	27.5	4.0
15 ~ 20	36.6	6.2
20 ~ 25	1	1

第 4 表

まむし血清の硫酸アンモン塩析

硫酸 % 飽和	収率 %	u/mgPr	チゼリウス像
—	(100)	1.4	
0 ~ 35	1	1	
0 ~ 45	88.4	2.0	
25 ~ 35	18.1	1.8	
35 ~ 45	49.5	2.8	
45 ~ 55	1	1.5	

静脈内致死作用とは平行している如くで、まむし毒ではこの致死毒と皮内の壊死毒とが別の因子となつていふように考えられる。治療血清として何れの因子の中和能を目標とすべきかは今後の実験にまつ。

今回の実験に用いたのは唯一種の毒であり田中等の記載に比してその毒性が劣つていたが、この事はいわゆるトキソイド部を多く含んでいる事によるかもしれない。即ち、検定に用いる毒によつて血清の抗体価が大いに左右される事が考えられ、将来は標準血清を用いる事により標準化された抗体価の表現を用いる様にせねばならない。

第 5 表

まむし血清のペプシン処理精製

「まむし」治療血清を取扱うに当つては、その抗体価の測定が極めて大きな問題となるが、われわれの実験では家兎皮内注射による出血壊死を中和する能力と、静脈内注射による致死作用を中和する能力とは平行してない。従来如く、皮下注射により局所に起る著明な反應を無視して單に致死作用のみによる方法は、抗体価測定としては優れたものではないが、この際の致死作用と、

第 1 図

まむし毒 No. 2 チゼリウス

結 論

(1) 抗まむし毒血清の抗体価の測定には静脈内注射によるマウス LD₅₀ 中和数をいふがよい。本法と従来の皮下法による LD₅₀ 又は MLD 法とによる抗体価の比は概ね 4:2:1 であつた。

(2) 家兎皮内注射の際の出血壊死作用を中和する能力は上記の静脈内致死作用の中和能とは平行しない。

(3) 抗まむし毒血清 (馬) の抗体は β₂ 分劃にあり硫酸アンモニウム 1/3 ~ 1/2 飽和沈澱部を採ることにより精製せられ、又、この抗体はペプシンの作用により γ に近く移動するがその作用は保持する。

〔種々の点で御援助を頂いた大阪市立医大桑島謙夫教授に深謝する。〕

文 献

- 1) 桑島：蛇毒とその免疫，医学の進歩 1:31，昭 18.
- 2) 桑島：毒蛇免疫血清について，日本医学 No. 3220，昭 16.
- 3) 田中，桑島：はぶ毒を以てせる大動物免疫に関する研究，実験医学雑誌，26:82，昭 17.
- 4) 田中，三宅，久保田：まむし毒治療用血清製造に関する研究，日本医学 No. 3388，昭 19.
- 5) 久保田：蝮毒治療用山羊血清の製造に関する研

- 究, 日本医学, No. 3388, 昭 19.
6) K. F. Burns: Production of polyvalent antivenin against *Trimeresurus flavoviridis* and *Agkistrodon blomhoffii*. Amer. J. Trop.

Med 31:665, 1952.

- 7) 宮崎: 私信
8) W. R. Thompson (1945), from Standard Methods of New York Dept. Health (1947).