

琉球大学学術リポジトリ

ハブ毒免疫したマングースの血中抗体価に関する実験

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2007-08-02 キーワード (Ja): ハブ毒, 出血因子 1, 出血因子 2, マングース, ハブ抗毒素 キーワード (En): habu venom, HR-1, HR-2, mongoose, habu antitoxin 作成者: 櫻井, 秀樹, 川島, 由次, 小倉, 剛, 野崎, 真敏, 香村, 昴男, Sakurai, Hideki, Kawashima, Yoshitugu, Ogura, Go, Nozaki, Masatoshi, Kamura, Takao メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/1227

ハブ毒免疫したマンガースの血中抗体価に関する実験

櫻井秀樹,^{1*}川島由次,¹小倉剛,¹野崎真敏,²香村昂男²

¹琉球大学農学部生産環境学科, ²沖縄県衛生環境研究所

An Experiment on the Antibody Titer in the Blood of Mongoose Immunized with Habu Venom

Hideki SAKURAI,^{1*} Yoshitugu KAWASHIMA,¹ Go OGURA,¹
Masatoshi NOZAKI,² Takao KAMURA²

¹Department of Environmental Sciences and Technology, Faculty of Agriculture,
University of the Ryukyus, ²Okinawa Prefectural Institute of Health and
Environment

Abstract: A hemorrhagic toxin from habu venom was separated into hemorrhagic factor-1(HR-1) and hemorrhagic factor-2(HR-2) based on the molecular weight of the protein. It is known that the natural inhibitor affecting the neutralization of HR-1 is present in the mongoose serum. However, this natural inhibitor has negligible neutralization activity against HR-2. Therefore, by using habu venom to carry out an immunity test in mongoose, we examined whether any component in the immune serum could be sufficiently effective in neutralizing both HR-1 and HR-2. The habu venom was administered into 10 mongooses for a period of 16 weeks. We drew blood 6 times of during this period and performed exsanguinations 16 weeks later. In this study, we used ELISA to measure the antibody titer for HR-1 and HR-2 in the collected serum. Further, we which we examined habu venom sensitivity in the 10 mongooses and the levels of anti-HR-2 antibody. We compared the results for each mongoose, and, found that there was considerable difference in sensitivity toward the habe venom in each mongoose. In order to evaluate the sensitivity, we used habu antitoxin, which was prepared at the Okinawa prefectural institute of health and environment, in horses and goats. To detect the immune serum component that effectively neutralizes both HR-1 and HR-2 we need to separate the immune serum into its functional components during further investigations, and examine the neutralization activity of the refined serum components in terms of the protein content.

キーワード：ハブ毒, 出血因子1, 出血因子2, マングース, ハブ抗毒素

Key Words: habu venom, HR-1, HR-2, mongoose, habu antitoxin

* Corresponding author(E-mail : sakuraih@pref.okinawa.jp)

緒 言

ハブ咬症患者に対する有効な治療法は血清療法であり、治療薬として乾燥はぶウマ抗毒素（乾燥はぶ抗毒素）が使用されている。これは、ウマをハブ毒で免疫して得られるハブ抗

毒素を含むウマ免疫グロブリンの乾燥製剤である。この乾燥はぶウマ抗毒素の使用によるアレルギー反応は、アナフィラキシーショック、発疹、掻痒感など軽重全ての血清病を加えると全患者の18.8%に及ぶとの報告がある。⁵⁾

ハブ咬症治療の際に、過去に抗毒素を使用したことがある

人が再びハブ咬症を受け抗毒素を使用する場合、アレルギーに対する細心の注意が必要である。血清療法による死亡事故の主たる原因はアナフィラキシーショックであるが、この病態生理として、以前に注射された抗毒素に対し抗体が生成され、新しく同一の抗毒素が注射されると、直後に抗原抗体反応を起こすと考えられる場合がある。⁹⁾

アナフィラキシーショック、血清病の原因となる抗原抗体反応はきわめて特異性の高い反応であり、免疫する動物種を変えることで防ぐことができる。⁹⁾ そこで、沖縄県衛生環境研究所ハブ研究室では免疫動物に山羊を用いて、はぶウマ抗毒素に過敏反応を示すハブ咬症患者に投与することができ、かつ十分な力価を有するハブ山羊抗毒素を作製した。

免疫動物としてのウマ、山羊は、ハブ毒に対し比較的感受性が高く、また血液量が多く、入手、管理が比較的容易であるといった利点がある。野崎らは牛、豚、鶏でも同じようにハブ毒免疫を行い、それらのハブ毒感受性の調査を行っているが、牛、豚、鶏はウマ、山羊ほど抗体価が上昇しなかったと報告している。¹⁰⁾ しかし、ウマ、山羊でもハブ毒に対する感受性は個体差があり、抗体産生能の低い個体では免疫期間が長期に及ぶ場合があること、また、ウマでは抗体価が上昇する免疫後期に体調を崩してしまうこともあるという。⁴⁾

そこで本研究ではマンガースをハブ毒免疫し、マンガースのハブ毒に対する免疫感受性を検討した。

また野崎らは、投与量が少なく治療効果の高い特殊抗毒素開発を目的とし、様々な植物抽出液や動物血清の抗ハブ毒作用スクリーニングを行った結果、数種の動物血清でハブ毒の出血作用に対し、きわめて高い抑制作用を有したと報告しており、マンガース血清はハブ毒による出血作用を強く抑制する免疫抗体ではない天然のインヒビターを持っていることを明らかにした。^{11, 10)}

ハブ毒の主要毒性因子の1つである出血毒素はその蛋白分子量の大きさ等により2つの主要な毒性因子(出血因子1: HR-1、出血因子2: HR-2)に分けられるが、マンガース血清に存在する天然のインヒビターはHR-1に対する中和能力は高いもののHR-2に対する中和作用を有していないことが分かっている。¹¹⁾ そこで、マンガースにハブ毒を免疫して得られた免疫抗体が、天然のインヒビターの抗出血作用を補い又は増強し、HR-2に対する中和力を上昇させて、少量の蛋白量でHR-1とHR-2をバランス良く中和する免疫血清が得られるかどうかを検討した。

実験材料および方法

1. 免疫および採血

1) 実験動物

沖縄県西原町小橋川で捕獲したジャワマンガース(*Herpestes javanicus*) 13匹を10~30日の予備飼育の後、実験に使用した。マンガースは42cm×35cm×19cmのステンレス製金網ケージに収容し、ネコ用固形飼料(日本クレア株式会社)と水(水道水)を自由摂取させた。

2) 免疫抗原の調整

(a) ハブ毒

免疫には平成1995年に沖縄県衛生環境研究所ハブ研究室で採毒した毒素を使用した。採毒に使用されたハブ(*Trimeresurus flavoviridis*)は沖縄島で捕獲されたものである。この乾燥ハブ毒をM/60、pH=7.0リン酸緩衝液で溶解し、0.45 μm Filter Unitでろ過したものを1%ハブ粗毒溶液とした。

(b) ハブ粗毒のトキシド化

1%ハブ粗毒溶液に0.2% (v/v) ホルマリンを2日間隔で3回加えた後、透析により遊離ホルマリンを除去し、さらに0.45 μm Filter Unitでろ過したものを免疫用トキシド溶液とした。ホルマリン添加の際のpHの変動は0.1N 水酸化ナトリウムで修正した。トキシドの毒性はマウスLD50 (Leed and Muench法)¹¹⁾ で1%ハブ粗毒溶液と比較し、抗原性は寒天ゲル内沈降反応(Orchterlony法)⁶⁾ で確認した。また、1%ハブ粗毒溶液のトキシド化による蛋白分子の変化をみるため、Protein pak300×2カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行った。

3) 免疫と採血

(a) 免疫

基礎免疫はトキシド溶液とフロイントアジュバント・コンプリートを等量ずつ混合した溶液をホモジナイザーで攪拌、乳化した後、腹腔内注射した。注射量は0.2ml/bodyになるように調節した。

基礎免疫35日後から1週間隔で追加免疫を行った。追加免疫の免疫抗原により、トキシドを用いるトキシド群(T群, n=5)と粗毒を用いる粗毒群(R群, n=5)、また、免疫を全く行わない対照群(C群, n=3)に分けた。

(b) 試験採血と全採血

免疫開始第1, 6, 8, 10, 12, 15週目に外頸静脈から一部試験採血(試血)し、免疫開始16週目に腹大動脈採血による全採血を行った。血液は室温中で3~12時間放置した後、遠心分離(3000rpm, 15min)を行い、血清を分取した。試血の順に血清1~6とし、全採血で得た血清を血清7とした。

(c) 麻酔

マンガースの免疫と採血はペントバルビタールナトリウム(商品名:ネプターール注射液)を35mg/kgB.W.で腹腔内に注射し、全身麻酔下で行った。

2. 試血血清(血清1~6)の抗体価測定

1) ELISA (酵素免疫吸着法)^{2), 3)}

試血血清の抗HR-1価と抗HR-2価をELISAにより測定した。HR-1またはHR-2をコーティングしたEIAフラットプレートII(三光純薬)の各ウェルに検体100 μlを分注し、37°C, 30min, シェーカーインキュベーターで攪拌した後、Auto mini washerで5回の洗浄を行った。洗浄液は0.15M食塩加0.01Mリン酸緩衝液(pH=7.4)にTween20を加えたものを使用した。

次に各ウェルに適当な濃度に希釈した酵素標識抗原を100 μl加え37°C, 30min, シェーカーインキュベーターで攪拌

した後、前回と同様に5回の洗浄を行った。酵素標識抗原の希釈には1%牛血清アルブミンと0.05%Tween20を加えた0.15M食塩加0.01Mリン酸緩衝液 (pH=7.4) を使用した。また、酵素標識抗原はHR-1またはHR-2に標識酵素であるペルオキシダーゼ (horsoradish type, 10000u, sigma) を結合したものを作製し用いた。

最後に、各ウェルに基質液100 μ lを加えて約10分間遮光条件下で反応させた後、1N硫酸100 μ lを加えて反応を停止させた。基質液はo-フェニレンジアミン塩酸塩35mgと30%過酸化水素水30mlを加え、それを0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸水素2ナトリウム緩衝液 (pH=4.8) 100mlに溶解したものを使用した。吸光度はMicroplate reader MPT-32 (Corona) で492nmの波長を測定した。

3. 血清の分離精製と抗出血価の測定

血清1~6をProtein pak G-DEAE(Waters, ゲルベット: 8.2mm \times 75mm)を用いてHPLCを行い分離精製した。得られた各fractionの抗出血価 (抗HR-1価、抗HR-2価) をELISAで測定した。

4. 蛋白量の測定

分光光度計 (日立U-4000) で280nmの吸光度を測定し、血清mg/ml=1.25OD₂₈₀として計算した。

結果および考察

1. 免疫抗原の調整

高度に免疫を行う場合、一般的に基礎免疫としてアジュバントと混合した抗原を1回または2回に分けて注射し、その1~2ヵ月後から追加免疫を最初は少量の抗原を注射していく方法がとられる。追加免疫の注射量は、免疫動物の体調と抗体価の上昇に合わせて徐々に増やしていく。⁹⁾ 基礎免疫と追加免疫初期の免疫抗原には、免疫動物の負担を軽減するため、トキシイドを用いることが多い。今回マングースのハブ毒免疫は、注射する抗原量を多くする目的で基礎免疫と追加免疫共にトキシイドを使用する方法と、一般的な免疫方法である基礎免疫にトキシイド、追加免疫にハブ粗毒抗原を用いる2通りの方法で行った。

トキシイド使用の目的は基礎免疫にできるだけ多量の抗原を注射するためである。そのため、免疫に使用するトキシイドは抗原性を保持しつつ毒素活性を低下させる必要がある。使用したトキシイドは1%ハブ粗毒溶液に0.2% (v/v) ホルマリンを2日間隔で3回添加し、トキシイド化したものである。ホルマリン添加前の一部をサンプリング (TD1~3とする) し、寒天ゲル内沈降反応 (Orchterlony法) で抗原性を確認したところ、ハブ粗毒、Td1~3の全てが沈降線を形成したことから、ハブ粗毒と全てのトキシイドは抗原性を有するものと証明できた (Fig.1)。また、ハブ粗毒で3本見られた沈降線が3回のホルマリン添加後 (Td-3) では太い1本の沈降線になっており、さらにProtein pak 300 \times 2 (ゲル濾過用カラム) でHPLCを行ったところ、主要な毒性因子の溶出位置

が前方移動していた (Fig.2)。これらのことからTd-3はハブ粗毒の蛋白質がホルマリンの架橋で蛋白質の重合を生じ、その結果、蛋白分子量の増大により抗体産生能が上昇するものと考えられる。

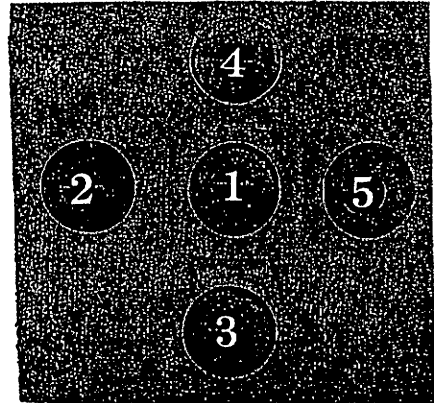


Fig. 1. Ability for immuneantigen of toxides.

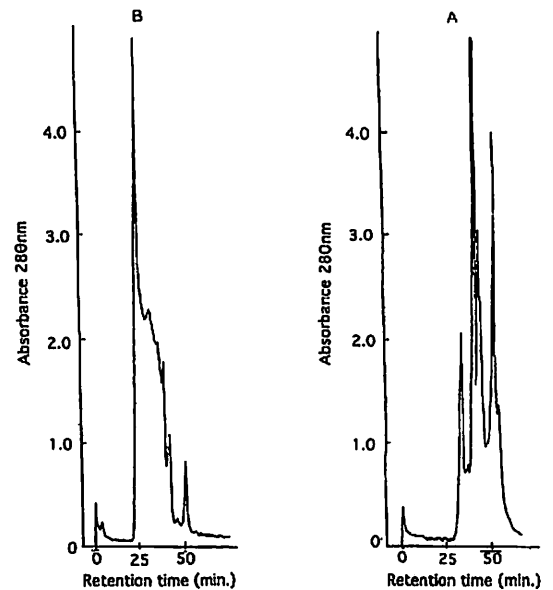


Fig. 2. 1% habu crude venom and Td-3 (HPLC).

次に毒素活性をマウス尾静脈注射による半数致死量 (LD₅₀) で算出したところ、1%ハブ粗毒溶液は50.0 μ gであったが、1回のホルマリン添加によって595.5 μ gとなりハブ粗毒致死活性の約1/12になった。3回のホルマリン添加をしたトキシイドのLD₅₀は1415.0 μ gとなり、ハブ粗毒致死活性の約1/28となった (Table 1)。このトキシイドとハブ粗毒をマングースの免疫に使用した。

Table 1. Mice LD₅₀ of habu crude venom and toxides

		LD ₅₀				
		25	50	100	200	50 μ g
1% habu crude venom	amount of injection (μ g)	25	50	100	200	50 μ g
	Lethal rate of mice	0/4	1/4	3/4	4/4	
Td-1	amount of injection (μ g)	250	500	1000	2000	595.2 μ g
	Lethal rate of mice	0/4	3/4	4/4	4/4	
Td-3	amount of injection (μ g)	500	1000	2000	3000	1415 μ g
	Lethal rate of mice	0/4	1/4	3/4	4/4	

マンガース免疫の結果をFig. 3に示す。

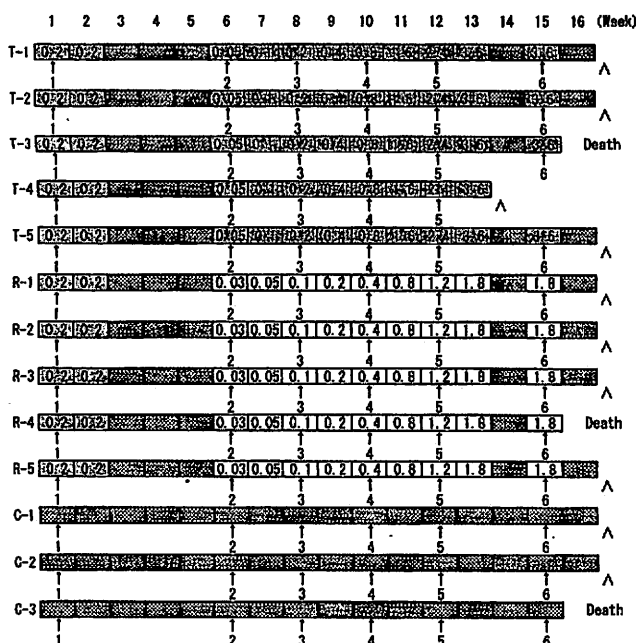


Fig. 3. Immunity of mongooses.

Table 2. Antibody titer for HR-1 in the experimental serum of mongoose.

	experimental serum 2	experimental serum 4	experimental serum 6
T-1	6.3 (0.13)	5.8 (0.11)	10.9 (0.21)
T-2	45.0 (0.77)	60.0 (1.21)	66.0 (1.14)
T-3	0.9 (0.02)	5.2 (0.10)	32.0 (0.46)
T-4	7.0 (0.13)	4.8 (0.09)	
T-5	5.7 (0.11)	7.4 (0.13)	21.0 (0.36)
R-1	10.9 (0.18)	10.5 (0.18)	33.0 (0.58)
R-2	2.4 (0.05)	2.0 (0.04)	8.6 (0.15)
R-3	4.1 (0.07)	70.0 (1.25)	75.0 (1.61)
R-4	33.0 (0.62)	28.0 (0.59)	57.0 (1.04)
R-5	9.6 (0.17)	6.1 (0.12)	21.0 (0.41)
C-1	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)
C-2	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)
C-3	15.0 (0.25)	10.0 (0.20)	12.2 (0.19)

antibody titer: u/ml, (u/mg)
ND: Not Detected

2. ELISAによる試血血清の抗HR-1価

ELISAで試血血清2, 4, 6の抗HR-1価を測定した結果をTable 2に示す。これらの結果からマンガースのハブ毒に対する感受性は個体差が大きく、T-2, R-3のように抗体産生能の高い個体とT-1, R-2のように16週間の免疫で抗体価がほとんど上昇しない個体があった。

野崎らは馬, 山羊, 牛, 豚, 鶏にハブ毒免疫を行い, 抗HR-1価の測定を行った。その結果, 最も抗体産生能が高かったのは馬であり24~25週間の免疫期間で350~400u/ml, 次に高かったのが山羊で18~25週間の免疫期間で100~200u/mlであった。また, 牛は30週間の免疫で最高63u/mlまでしか上昇せず, 豚では12週間の免疫で30~35u/ml程度であり, 鶏は15週間の免疫で平均10~20u/mlで, 牛, 豚, 鶏は免疫動物として適当ではないと結論づけている。⁴⁾ 今回のマンガースのハブ毒免疫は16週間行い, 試血血清6は免疫開始から15週目に採血したものである。この時点で最も抗

HR-1価が上昇したのはR-3の75u/mlであり, 馬, 山羊ほどのレベルには達していなかった。しかし, マングース血清は生得的に抗HR-1作用を持つインヒビターを持っているので, 免疫抗体は天然のインヒビターが有する抗HR-1作用を補強するものと考えられ, さらに免疫血清を精製することで抗HR-1価は十分に現用の抗毒素のレベルまで達するものと考えられる。

Table 3. Antibody titer for HR-2 in the experimental serum of mongoose.

	experimental serum 2	experimental serum 4	experimental serum 6
T-1	5.0 (0.10)	7.7 (0.15)	5.7 (0.11)
T-2	32.0 (0.60)	88.0 (1.80)	100.0 (1.72)
T-3	6.8 (0.12)	17.0 (0.33)	54.0 (0.77)
T-4	5.0 (0.10)	8.0 (0.15)	
T-5	3.6 (0.06)	11.5 (0.20)	47.0 (0.80)
R-1	50.0 (0.83)	70.0 (1.20)	74.0 (1.31)
R-2	1.4 (0.03)	4.9 (0.09)	9.0 (0.16)
R-3	18.0 (0.31)	100.0 (1.79)	100.0 (2.14)
R-4	17.0 (0.32)	16.0 (0.34)	16.5 (0.30)
R-5	3.6 (0.06)	9.0 (0.18)	4.6 (0.09)
C-1	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)
C-2	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)	N.D.(N.D.)
C-3	13.0 (0.22)	18.0 (0.35)	13.0 (0.20)

antibody titer: u/ml, (u/mg)
ND: Not Detected

3. ELISAによる試血血清の抗HR-2価

ELISAで試血血清2, 4, 6の抗HR-2価を測定した結果をTable 3に示す。最も抗HR-2価が上昇したのはR-2とT-2で共に100u/ml, 次にR-1が74u/mlまで上昇したがT-1, R-2, R-4のように15週間の免疫でほとんど抗HR-2価が上昇しない個体もあり, 抗HR-1価同様, マングースのハブ毒感受性は個体差が大きいと云える。比較的HR-2に感受性の高かったR-2, T-2でもウマ, ヤギのレベルにまでは至らなかったが, 免疫期間の延長, 精製したHR-2で免疫する等, 免疫の方法を工夫することでHR-1, HR-2をバランスよく中和する免疫血清を得ることができるかもしれない。また, 免疫していないC-3では抗HR-1価, 抗HR-2価共に10~18u/mlの抗体価であった。

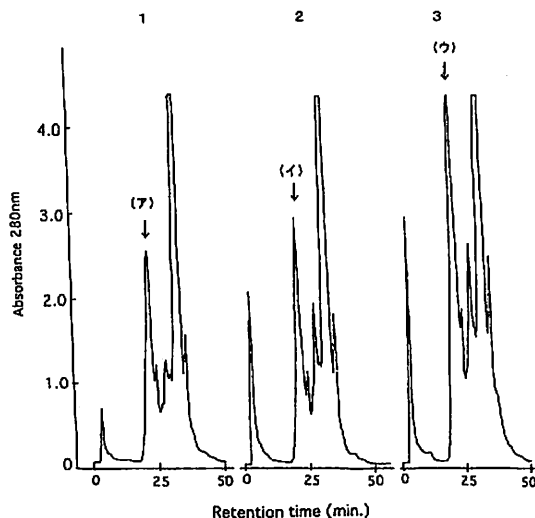


Fig. 4. Dividing experimental serum 6 by HPLC.

Table 4. Antihemorrhagic titer of devided mongoose experimental serum

	antibody titer for HR-1			antibody titer for HR-2		
	u/ml	u/mg	u/40mg	u/ml	u/mg	u/40mg
(ア)T-2+R-3	1.10	2.72	108.80	2.60	6.30	252.00
(イ)C-1	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	
(ウ)C-3	0.37	0.85	28.00	0.36	0.83	25.20

4. 試血血清の分離精製と抗出血価 (抗HR-1価, 抗HR-2価)
比較的抗体価が良好に上昇したT-2とR-3の試血血清6をブールし, HPLCを行い分離精製した. C-1とC-3の試血血清6もそれぞれ同様に分離精製を行った (Fig. 4). さらに各検体で検出した全ての分画について溶出液の抗出血価をELISAにより測定した. その結果T-2+R-3試血血清6とC-3試血血清6ではFig. 4の矢印 (ア), (ウ) で示す分画で各検体の抗体価は最高値となり, これらの分画に免疫抗体が含まれるものと考えられる. C-1は全ての分画で抗体価は測定レベル以下であった.

Fig. 4の矢印 (ア), (イ), (ウ) で示す分画の抗出血価測定結果 (Table 4) から, 抗HR-1価が108.8u/40mg, 抗HR-2価は252.0u/40mgで, 生物学的製剤基準⁷⁾に規定される蛋白量40mgあたり抗HR-1価, 抗HR-2価がそれぞれ300単位以上という条件は, 15週間の免疫で最も抗体価が上昇したマンガース免疫血清を1回分離精製することでは満たすことができなかった. 今後は, 全採血したマンガース免疫血清を用いて分離精製することによって蛋白量あたりの抗体価をどれくらい上昇させることができるかを調査し, マンゴース免疫血清の有用性について検討したい.

要 約

ハブ毒の主要毒性因子の1つである出血毒素はその蛋白分子量の大きさ等により2つの主要な毒素因子である出血因子1 (HR-1) と出血因子2 (HR-2) に分けられる. マンゴースの血清中にはHR-1を中和するインヒビターが生得的にあることが知られている. しかしこの天然のインヒビターはHR-2に対しては中和能力をほとんど持たない. そこでマンガースをハブ毒で免疫することによってHR-1とHR-2をバランスよく中和することのできる免疫血清ができるかどうかを検討した. 免疫血清は10匹のマンガースに対して16週間ハブ毒を接種して作製した. 接種期間中に6回の部分採血を行い, 初回接種から16週後に全採血を行った. 本実験では免疫期間中に採血した血清中のHR-1とHR-2に対する抗HR-1価と抗HR-2価を酵素免疫吸着法 (ELISA)によって測定し, マン

ゴースのハブ毒感受性と抗HR-2価の上昇について検討した. その結果, マンゴースのハブ毒感受性は個体差が大きく, 現在使用されているハブ抗毒素の免疫動物であるウマあるいは沖縄県衛生環境研究所で作製されたハブ抗毒素の免疫動物である山羊に比較し, マンゴースのハブ毒感受性は低いということが分かった. 今後はマンガースをハブ毒免疫し全採血で得られた免疫血清を分離精製することによって, HR-1とHR-2をバランスよく中和し蛋白量あたりの中和活性が高い免疫血清が得られるかどうかを検討する.

謝 辞

本実験の遂行にあたり, 沖縄県衛生環境研究所ハブ研究室の野崎真敏博士, 香村昂男研究員, 同研究所スタッフの皆様は大変お世話になりました. 厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) 沖縄県衛生環境研究所. 1987. 昭和62年度抗毒素研究報告書, 53-61.
- 2) 沖縄県衛生環境研究所. 1989. 平成元年度抗毒素研究報告書, 15-23.
- 3) 沖縄県衛生環境研究所. 1991. 平成3年度抗毒素研究報告書, 47-73.
- 4) 沖縄県衛生環境研究所. 1992. 平成4年度抗毒素研究報告書, 3-15.
- 5) 沖縄県ハブ対策研究会. ハブ咬症 (緊急処置と治療方針), 6.
- 6) 木村一郎. 1971. 免疫アレルギー実験法, 進堂宙二監修, 文光堂, pp. 266-271.
- 7) 厚生省薬務局監修. 1985. 生物学的製剤基準, 87-90.
- 8) 近藤久, 村田良介. 1967. 日本のワクチン, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, pp. 237-250.
- 9) 森 眞章. 1991. 日本産蛇類カラー写真図譜並びに日本産毒蛇咬症の治療I, 第1版第2刷, 医学書院, pp. 63-66.
- 10) K. Yonaha, M. Nozaki, Y. Kawamura, M. Yamakawa, T. Kamura, S. Toyama. 1987. Antihemorrhagic activity in the sera of *DINODON SEMICARINATUM* and *HERPESTES EDWARDSII*. *THE SNAKE*, 19: pp19-25.
- 11) Leed, L. J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Hygiene*, 27: 493-497