

## ハブ毒による出血と筋肉壊死 (動物実験を中心に)

### Skeletal Muscle Necrosis without a Marked Hemorrhage Induced in the Rat after Envenomation of *Trimeresurus flavoviridis* Venom

北野 元生

Motoo KITANO

鹿児島大学歯学部口腔病理学講座

Department of Oral Pathology, Kagoshima University Dental School

ハブ毒あるいは蛇毒全般によってもたらされる出血と筋肉壊死についての研究は未だ充分であるとはいいがたい。現在奄美諸島から沖縄にかけて棲息するハブによるハブ咬傷の治療に用いられている抗ハブ毒血清の効能は周知のところであるが、咬傷局所に生ずる出血と筋肉壊死については治療効果が十分であるとは言えない状況である。

われわれはハブ毒による筋肉壊死形成のメカニズムを解明する目的で、ハブ毒をラットの骨格筋肉内注射によって投与した後、投与部位の骨格筋に生じた傷害性病変について病理組織学的研究を行った。

実験動物として、生後 6～10 週齢～数月齢の雌雄の Fischer 344系ラット, Dark-Agouti系ラット, Wistar/Furth 系ラット (総数 90 匹) を実験に供した。ラットは、粗毒群, BPI 群, BPII 群, Asp-49-PLA 2 群, コントロール群に群分けされた。すなわち、奄美大島に棲息するハブから採取し凍結乾燥したハブ粗毒および粗毒から抽出した 3 種のホスホリパーゼ A2 アイソザイム, すなわち BPI, BPII, および Asp-49-PLA 2 の 50  $\mu$ g を 100  $\mu$ l の生理的食塩水に溶解し、予めネブタールで全身麻酔を施したラットの大腿前面の横紋筋である骨格筋肉 (大腿四頭筋, 以下大腿筋と省略する) 中に注射した。別にコントロール実験として、100ml の生理的食塩水をラットの大腿筋中に注射した。

共同研究者の大野らによるとホスホリパーゼ A2 のアイソザイムの多くの種は、49 番目のアミノ酸がアスパラギン酸であるのに対し、BPI, BPII ではリジンであることが特徴で、この故に塩基性タンパクを称されている。BPI, BPII は徳之島棲息のハブを含む奄美地方のハブに特徴であるとされ、沖縄のハブには BPI, BPII は欠如しており、これらをコードする遺伝子は pseudo-gene 化していると言われる。

注射 30分, 6時間, 1日, 2日あるいは 3日後, エーテルによる全身麻酔下でラットを屠殺し、屠殺後剖検に付した。解剖諸臓器は 10% 緩衝ホルマリン溶液 (pH7.4) で固定した。大腿の前面をしめる大腿四頭筋は貧血様で透明感があり、融解壊死ないし液化壊死巣の発生を思わせる像がみとめられた。固定後、大腿部骨格筋を含めた全身諸臓器のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して検鏡した。表 1 に

表1 ハブ毒注射により大腿四頭筋に生じた壊死病変

	注射後	ラットの数 (F344*, DA,WF :♂+♀)**	骨格筋 (横紋筋肉)					筋肉周囲 (筋膜、結合織など)				
			壊死	炎症細胞浸潤	出血	浮腫	筋肉再生	炎症細胞浸潤	血管壁の病変***	出血	浮腫	その他の所見#
粗毒	30m	6	-	-	-~+	+	-	-	-	-	+	-
	6h	6	-~+	+	-~+	+	-	-~+	-	-	+	-
	24h	6	++~++++	+++	-~+	++	+	++	-~+ (Th)	-~+	++	-
	48h	6	++~++++	+++	-~+	++	++	++	-~+ (Th)	-~+	++	+
	72h	6	++~++++	++	-~+	++	++	++	-~+ (Th)	-~+	++	+
	計	30										
[Asp49] PLA <sub>2</sub>	24h	6	++	++	-~+	++	+	++	-~+ (Th)	-	++	-
	48h	6	++	++	-~+	++	+	++	-	-	++	-
	計	12										
BPI	24h	6	++	+~+++	-~+	++	+	+	-~+ (Th)	-	++	-
	48h	6	++	+~+++	-~+	+	++	+	-~+	-	+	-
	計	12										
BPII	24h	6	++	+~+++	-~+	+	++	+	-~+	-	++	-
	48h	6	++	+~+++	-~+	+	+++	+	+	-	++	-
	72h	6	+	+	-~+	+	+++	+	-	-	++	-
	計	18										
コントロール (生食水)	30m	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	計	18										
ラット総数		90										

\*There is no strain difference in the histopathological changes among the various kinds of venom and duration of periods.

\*\*There is no sex difference in the histopathological changes among the venom kinds and duration.

\*\*\*Inflammatory changes are noted in the medium-sized vascular walls with or without thrombosis(Th).

# Necrotic changes are noted in the fatty tissue around the fascia.

病理組織学的所見をまとめた。

粗毒群，BPI 群，BPII 群，Asp-49-PLA 2 の 4 群に共通して大腿筋肉内にみられた病理組織学的所見は表 1 にまとめた。すなわち，(1)浮腫を伴った大きな貧血性壊死巣の出現がみられた。(2)壊死に陥った筋線維は核を消失せしめ，細胞質は融解壊死性を示す雲絮状の破壊性変化を示した。(3)壊死巣辺縁部における炎症細胞浸潤，血栓形成のみられる血管炎の像や末梢神経は高度の浮腫を示した。また(4)壊死巣周囲の再生性変化を含む筋肉組織の反応の 3 つがあげられた。浮腫は一般にかなり著明であるが，出血は粗毒の群において局所的かつ軽度に見られるのみで高度のものではなかった。

壊死巣の周辺には，炎症性細胞浸潤が著明であった。炎症細胞浸潤巣では，変性萎縮した筋線維に加えて，旺盛に再生しつつあると考えられる紡錘形の筋原性の幼若細胞が群生しており，壊死を免れた筋線維に近接して存在して，核分裂像が盛んであることから，それらの細胞の多くは再生しつつある筋原性の細胞であろうと推定された。これらの細胞が旺盛な増殖を示す筋原性の細胞であろうことを示すために，免疫染色で HHS35，デスミンと Ki67 などで染めてみた。その結果，紡錘形細胞の多くが筋肉に由来する細胞であることを示している。また，多くの細胞の核が焦げ茶色に染まっているが，これは Ki67 陽性で，増殖活性が活発である証左である。

注射後 3 日経過すると，前の 2 日経過のものと比較すると，再生した筋原性細胞の大きさを増している。細胞質はわずかに塩基好性の傾向を示した。

細胞は単核であり核は細胞のほぼ真ん中に位置しているが，2 核のものも存在する。表 1 で示すように，病変部の出血はほとんどなかったことが分かる。すなわち，本ラットの実験では，系統，性別，年齢，さらにはハブ毒の種類を問わず，出血は全くと言っていいほどみられなかった。

ハブ毒によってヒトやマウスでは極めて出血が高度であると言われている。このことは，ハブ毒は，マウスに対しては出血毒であるが，ラットに対しては出血毒ではないことがわかる。

以上をまとめると，1) 壊死巣周辺に再生性の変化が極めて高度であると思われた。ラットの系統，性別，年齢，毒の種類にほとんど左右されない位に高度にみられた。筋線維の再生については，他の種類のハブ毒と比較してハブ毒においてとくに高度なのかどうかは，くわしく調べる必要があるが，ヒトにおけるハブ咬傷の治療の場で，横紋筋肉の再生性の活力をうまく応用できないものか，少し考えてみる価値はあるように思われる。2) 第二にラットでは，出血が極めて軽いかみられなかったことがあげられる。巷間考えられている筋肉傷害性（筋壊死性）毒素が血管を傷害せしめて出血を招来するだろうと言う説はここでも否定された。ラットについては，出血毒作用機序が他の動物種と異なる理由をやはり精査して，これをヒトの臨床に役立たせる必要があると思われる。

**謝辞：**本日この様な発表の機会をお与え下さいました，本学会大会長の野田伸一先生に厚く感謝申し上げます。本研究は鹿児島大学歯学部口腔病理学講座のスタッフの方々の暖かく積極的なご協力があったの賜物です。心からお礼を申し上げます。なお，本研究は奄美群島振興開発事業費（国土交通省・鹿児島県）及び鹿児島大学総合研究プロジェクト「多島域における小島嶼の自律性」に与えられた鹿児島大学長裁量経費に負っておりますことを付記する。