

台灣赤尾鮎蛇與越南樹青蛇抗蛇毒血清保護效價之比較

陳村光 繆柏齡 施如妍 黃偉倫 周如文 吳和生

摘要

本研究針對台灣赤尾鮎 (*Trimeresurus stejnegeri*) 及越南樹青蛇 (*Trimeresurus albolabris*) 蛇毒之特性，分別以液相層析、免疫擴散、馬匹免疫等方法試驗，期能了解兩種蛇毒之差異性及相似性，並評估兩種抗蛇毒血清相互間之交叉保護性。經免疫擴散及馬匹免疫研究結果顯示，台灣赤尾鮎與越南樹青蛇具有交叉免疫性。

第一階段單價蛇毒馬匹免疫試驗結果顯示(一)免疫台灣赤尾鮎蛇毒之馬匹，於免疫第七週試血，其血清對台灣赤尾鮎蛇毒中和力價為 80 TU (田中單位)，對越南樹青蛇蛇毒之交叉中和力價為 60 TU。(二)免疫越南樹青蛇蛇毒之馬匹，於免疫第七週試血，其血清對越南樹青蛇蛇毒中和力價為 40 TU，對台灣赤尾鮎蛇毒之交叉中和力價為 60-80 TU。

第二階段多價蛇毒馬匹免疫試驗結果則顯示，以台灣赤尾鮎，越南樹青蛇，台灣龜殼花 (*Trimeresurus mucrosquamatus*) 等多價蛇毒混合後免疫馬匹，僅需使用少量越南樹青蛇蛇毒，即可在短期間內產生力價高達 100 TU 之越南樹青蛇抗蛇毒血清，此一抗蛇毒血清力價水準約為現行國內馬匹部分採血標準 (60 TU) 之 1.6 倍高。

壹、前言

台灣赤尾鮎 *Trimeresurus stejnegeri* (以下簡寫為 *T. stejnegeri*) 與越南樹青蛇 *Trimeresurus albolabris* (以下簡寫為 *T. albolabris*) 皆屬腹蛇科 (Viperidae) 響尾蛇亞科 (Crotalinae) 烙鐵頭屬 (*Trimeresurus*) 的蛇類，兩者外型頗為相似，均為頸部細長，頭呈明顯三角形，身體綠色，紅眼睛，尾末端為赤褐色，體長約 600

mm，卵胎生，喜歡棲息在有水塘、溪流與山溝旁之灌木叢中，靜待蛙、鼠、蜥蜴、鳥類等經過捕食之，多在夜間活動。由於台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 與越南樹青蛇 *T. albolabris* 之蛇毒皆以出血性為主，且兩者咬傷人的症狀也相似，故中國大陸許多期刊會將兩者病例報告均歸為青竹絲 (green bamboo snakes) 咬傷。台灣赤尾鮎早期 (1904-1938) 為台灣咬傷人比例最高 (47%) 的毒蛇，但最近 (1988-1991) 的調查則顯示龜殼花的咬傷率最高 (45%)，赤尾鮎次之 (37%)，被咬傷的情況多發生於不自覺的觸碰干擾或踩壓到牠們所致。本計畫研究越南樹青蛇 *T. albolabris* 與台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 蛇毒之特性，期能了解兩種毒蛇之差異性，並評估 *T. albolabris* 抗蛇毒血清及 *T. stejnegeris* 抗蛇毒血清相互間之交叉保護性，進一步作為我國支援越南抗蛇毒血清生產技術合作計畫之前置參考。

貳、材料與方法

一、蛇毒

毒蛇種類包括台灣赤尾鮎 (*T. stejnegeri*)，越南樹青蛇 (*T. albolabris*)，台灣龜殼花 (*Trimeresurus mucrosquamatus*，以下簡寫為 *T. mucrosquamatus*)。準備 50 毫升燒杯，固定於試管架，放置於採毒桌面上。助手右手取蛇鉗，輕夾毒蛇頸部，左手輕握勾蛇尾，夾鉗及蛇放置採毒桌，取毒人員以右手、大拇指放置毒囊位置，中指壓住蛇頭頂部，使其不會反轉，蛇口會自動張開，上顎兩支毒牙固定於燒杯上，中指與大拇指輕壓兩側毒囊，毒液自然流出，完成後助手放回毒蛇於另一蛇籠。燒杯內蛇毒置於 -14 以下冰櫃，等待冷凍真空乾燥。

二、液相層析

利用 Ion-exchange 方式，以 Resource S column 於 pH6.4、6.8、7.2，0-100% 鹽梯度等不同條件下，層析蛇毒蛋白。另利用 Size Exclusion

方法,以 Sephacryl S-100 進行層析 比較 *T. stejnegeri* 及 *T. albolabris* 兩種蛇毒以不同層析管柱所分離出之成份間之差異,並藉以尋求蛇毒蛋白最佳分離條件。

三、蛇毒粗毒之無毒化

凍結乾燥蛇毒以 0.85 % 氯化鈉溶液 (saline) 溶解之,再慢慢滴入 2.5 % 戊乙醯醛 (glutaraldehyde, GA), 使減毒後蛇毒含 GA 之終濃度為 0.25 % , 待充分作用 30 分鐘,再置於 4 °C , 冷藏 24 小時 (1)。

四、抗蛇毒血清中和效價檢定

將抗蛇毒血清做連續倍數稀釋,分別與等量之相對 4 倍最低致死量 (minimum lethal dose, MLD) 蛇毒液混合後,於 37 °C 恆溫箱靜置作用 1 小時,再皮下注射小白鼠,每隻 0.2 毫升,觀察 24 小時,記錄其存活率,依最高稀釋倍數,乘以 20,求得每毫升抗毒血清所含之田中抗毒單位數 (Tanaka Units, TU) (2)。

五、免疫擴散試驗

- (一) 試驗一:以 2% agar 製備膠片,挖五孔後中心孔置放 0.2ml 台灣赤尾鮫 *T. stejnegeri* 抗蛇毒血清,周圍四孔分別間隔置放 0.2mg *T. stejnegeri* 及 0.2mg *T. albolabris*。
- (二) 試驗二:同前法製備膠片,挖五孔後中心孔置放 0.2ml 越南樹青蛇 *T. albolabris* 抗蛇毒血清,周圍四孔分別間隔置放 0.2mg *T. stejnegeri* 及 0.2mg *T. albolabris*。

六、單價蛇毒馬匹免疫試驗

- (一) 馬匹 4 匹分為兩組,分別免疫台灣赤尾鮫 *T. stejnegeri* 及越南樹青蛇 *T. albolabris*。
- (二) 取蛇毒以 GA 無毒化後與等量佛氏佐劑 (Freund's adjuvant , 初免疫用完全佐劑,以後為不完全佐劑)充分混合,使成乳劑狀 (3),對馬匹施以皮下注射 5 毫升。
- (三) 每匹間隔二週免疫一次,劑量依序由第 1 週 5mg、第 3 週

10mg、第 5 週 12mg、第 7 週 15mg 漸增，並於第 5 週及第 7 週採血 10ml，測試其血清中和抗體力價。

七、多價蛇毒馬匹免疫試驗

- (一) 已免疫台灣龜殼花之馬匹 5 匹，其抗體力價(antivenom titer) 分別為 No.221 : 40 TU， No.223 : 40 TU， No.224 : 20 TU， No.225 : 20 TU， No.226 : 20 TU。
- (二) 每匹間隔二週免疫一次，劑量依序由第 1 週 *T. mucrosquamatus* 20mg、*T. stejnegeri* 3mg、*T. albolabris* 3mg，第 3 週 *T. mucrosquamatus* 25mg、*T. stejnegeri* 3mg、*T. albolabris* 3mg，第 5 週 *T. mucrosquamatus* 25mg *T. stejnegeri* 3mg *T. albolabris* 3mg，並於第 5 週採血 10ml，測試其血清分別中和 *T. mucrosquamatus*、*T. stejnegeri*、*T. albolabris* 抗體之力價。

參、結果

一、液相層析

以 Resource S 及 Sephacryl S-100 兩支管柱於不同條件下，利用 Ion-exchange 與 Size Exclusion 層析技術進行蛇毒分析。分析結果(如圖一~四)顯示，以離子交換管柱分別進行蛇毒 *T. stejnegeri* 與 *T. albolabris* 的分離，在 60 ml 處有共同的蛋白成分；而以分子篩選管柱分別進行 *T. stejnegeri* 與 *T. albolabris* 的分離純化時，可明確的觀測到兩者之間在 100-115 ml 處，越南的 *T. albolabris* 有不同於台灣 *T. stejnegeri* 的蛋白成分，其特性的鑑定需進一步分析。而其餘的蛋白具相類似之分子量，這些蛋白可能是兩種蛇毒交叉反應的主成分。

二、免疫擴散試驗結果

由免疫擴散試驗中，得知台灣赤尾鯧抗蛇毒血清，可中和部分越南樹青蛇蛇毒(圖五)；而越南樹青蛇抗蛇毒血清，亦可中和部分台灣赤尾鯧蛇毒(圖六)。

三、單價蛇毒馬匹免疫試驗結果(如表一)

- (一) 免疫台灣赤尾鮫 *T. stejnegeri* 兩匹馬，以台灣赤尾鮫蛇毒測試檢定力價，第 5 週力價為(60TU 60TU)，第 7 週力價為(80TU 80TU)。如以越南樹青蛇蛇毒測試檢定力價，第 5 週力價為 (40TU、20TU)，第 7 週力價為 (60TU、60TU)。
- (二) 免疫越南樹青蛇 *T. albolabris* 兩匹馬，以越南樹青蛇蛇毒測試檢定力價，第 5 週力價為(20TU 40TU)，第 7 週力價為(40TU 40TU)。如以台灣赤尾鮫蛇毒測試檢定力價，第 5 週力價為 (20TU、40TU)，第 7 週力價為 (60TU、80TU)。

四、多價蛇毒馬匹免疫試驗結果 (如表二)

原已免疫台灣龜殼花 *T. mucrosquamatus* 之五匹馬，經以 *T.*

mucrosquamatus、*T. stejnegeri*、*T. albolabris* 混合蛇毒免疫 5 週後：

- (一) 以台灣龜殼花 *T. mucrosquamatus* 蛇毒測試檢定力價，No.221 力價 60 TU No.223 力價 80 TU、No.224 力價 60 TU、No.225 力價 80 TU、 No.226 力價 60 TU。
- (二) 以台灣赤尾鮫 *T. stejnegeri* 蛇毒測試檢定力價，No.221 力價 120 TU、No.223 力價 120 TU、No.224 力價 100 TU、No.225 力價 120 TU、 No.226 力價 120 TU。
- (三) 以越南樹青蛇 *T. albolabris* 蛇毒測試檢定力價，No.221 力價 100 TU、No.223 力價 100 TU、No.224 力價 100 TU、No.225 力價 100TU、 No.226 力價 120 TU。

肆、討論

由於越南抗蛇毒血清生產困難，供不應求，該國透過我國外交部希望台灣能提供技術支援。蛇毒蛋白之成份複雜，以蛇毒免疫馬匹，為保有其良好的抗原性，製備高效價抗蛇毒血清，依台灣過去研究顯示，使用戊乙醯醛 (GA) 做無毒化處理，無論對出血性或神經性蛇毒，均能達到降低蛇毒毒性並維持高免疫原性，不被破壞 (4-6)。

本研究採用台灣常用之戊乙醯醛 (GA) 無毒化，再輔以佛氏佐劑 (Freund's adjuvant) 混合後免疫馬匹，經第一階段單價蛇毒馬匹免疫試驗結果顯示 (一) 免疫台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 蛇毒之馬匹，於免疫第七週試血，其血清對台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 蛇毒中和力價為 80 TU，對越南樹青蛇 *T. albolabris* 蛇毒之交叉中和力價為 60 TU。(二) 免疫越南樹青蛇 *T. albolabris* 蛇毒之馬匹，於免疫第七週試血，其血清對越南樹青蛇 *T. albolabris* 蛇毒中和力價為 40 TU，對台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 蛇毒之交叉中和力價為 60-80 TU。再者由免疫擴散試驗，則顯示台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 與越南樹青蛇 *T. albolabris* 間，均具有多種交叉反應蛋白質成份

雖然 Kochwa, Christensen 等 (7-8) 報告，動物免疫單一種毒素較同時免疫多種毒素可產生較高力價之抗蛇毒血清，但經本研究第二階段之多價蛇毒免疫試驗，發現如同泰國 Green pit viper 對日本 Habu 及許多中北美洲毒蛇間之情況 (9-10)，台灣龜殼花 *T. mucrosquamatus*、台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 及越南樹青蛇 *T. albolabris*，三者間亦具交叉免疫現象，而且該三種多價蛇毒同時混合後免疫馬匹，可產生高力價之抗蛇毒血清。

伍、結論與建議

經由本研究發現，越南樹青蛇與台灣赤尾鮎具有交叉免疫現象，如以台灣龜殼花 *Tr. m.*、台灣赤尾鮎 *T. stejnegeri* 及越南樹青蛇 *T. albolabris* 三者，以多價蛇毒免疫馬匹，僅需使用少量越南樹青蛇蛇毒，即可短期間生產力價高達 100TU 之抗越南樹青蛇蛇毒血清，此一抗蛇毒血清力價水準高達現行馬匹部分採血標準 (60 TU) 1.6 倍之多，顯示此一免疫方法生產效益頗佳，因此本研究結果，對我國未來協助越南生產抗蛇毒血清之計畫具有重要之參考價值。

陸、參考文獻

- 1.黃瑞禎，陳淑惠，陳村光，繆柏齡，張盛進，廖明一：台灣飯匙倩蛇毒類毒素之製備。行政院衛生署預防醫學研究所研究報告彙編 1990：506-511。
- 2.生物學製劑製造與檢定。行政院衛生署預防醫學研究編印 1980：119-121。
- 3.Huang RJ, Chen TK, Miao BL, Chang SC, Liao MY, Lin JH. A simplified emulsification method for antigens with oil adjuvants. Chinese Journal of Microbiology and Immunology. 1994;27(2):94-97.
- 4.黃瑞禎，陳淑惠，陳村光，廖明一：高效價出血性抗蛇毒血清之製備。行政院衛生署預防醫學研究所研究報告彙編 1986：22-27。
- 5.黃瑞禎，陳淑惠，陳村光，繆柏齡，張盛進，廖明一：台灣飯匙倩蛇毒類毒素之製備。行政院衛生署預防醫學研究所研究報告彙編 1990：506-511。
- 6.黃瑞禎，陳淑惠，陳村光，繆柏齡，張盛進，廖明一：抗鎖鍊蛇毒血清之製備。行政院衛生署預防醫學研究所研究年報 1991：82-89。
- 7.Kochwa S, Gitter S, Strauss A, Vries AD. Immunologic study of *Vipera xanthia palestinae* venom and preparation of patent antivenin in rabbits. J. Immunol. 1957 ; 82 : 107-14.
- 8.Christensen P A The venoms of central and south Africa. P454 In Bucherl W. Buckley E. & Denlofen Y. Venomous animals and their venoms. Academic Press, N.Y.1968
- 9.Pakmanee N, Khow O, Wongtongkam N, Omori-Satoh T, Sitprija V. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venom. Toxicon. 1993 ; 31 (8) : 1051-9.
10. Liao WB, Lee CW, Tsai YS, Liu BM, Chung KJ. Efficacy and cross reactivity of Thai green pit viper antivenom among venoms of *Trimeresurus* species in Thailand and Japan. J. Nat. Toxins.1998 ; 7 (2) : 173-83.

附圖：

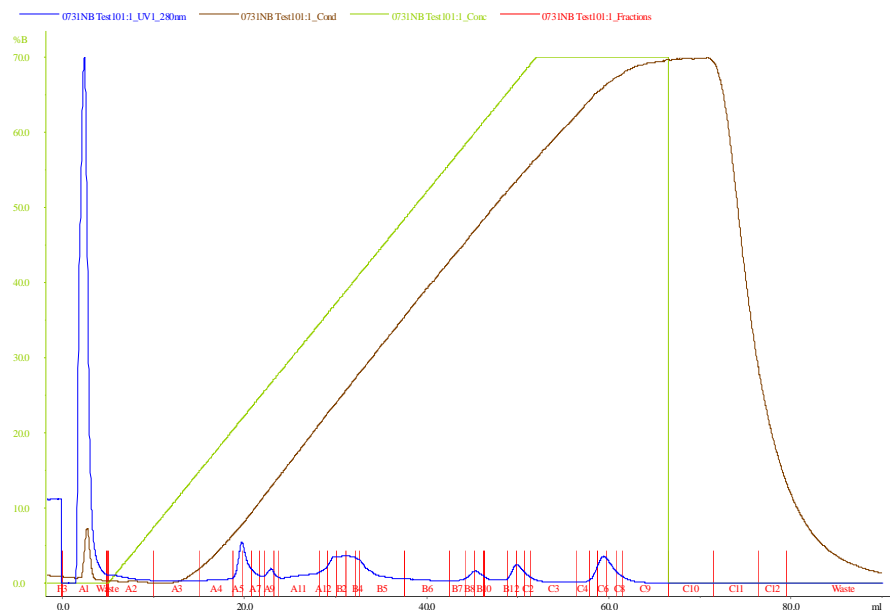


Figure1. FPLC elution profile of the crude venom (台灣赤尾鯧) are separated by ion-exchange chromatography. Conditions :Column: Resource S, Buffer pH:6.8, Buffer A1: 0.03M KH_2PO_4 , Buffer A2: 0.1N HCl, Buffer B1: Water, Buffer B2: 0.8 M NaCl, Target ConcB-1:100(%), Length of gradient -1:60(base), Target ConcB-2:100(%), Length of gradient -2: 20 (base), Flow rate: 1 ml/min.

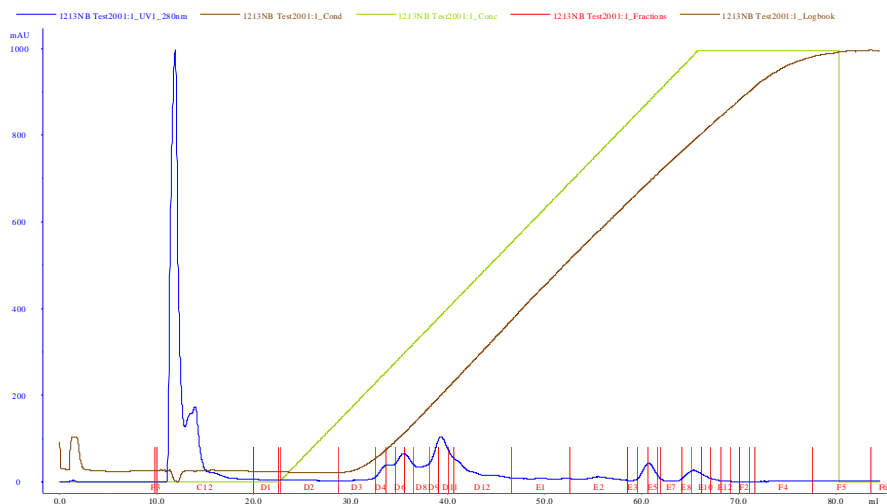


Figure2. FPLC elution profile of the crude venom (越南樹青蛇) are separated by ion-exchange chromatography. Conditions :Column: Resource S, Buffer pH:6.8, Buffer A1: 0.03M KH_2PO_4 , Buffer A2: 0.1N HCl, Buffer B1: Water, Buffer B2: 0.8 M NaCl, Target ConcB-1:100 (%), Length of gradient -1: 60 (base), Target ConcB-2:100 (%), Length of gradient -2: 20 (base), Flow rate: 1 ml/min.

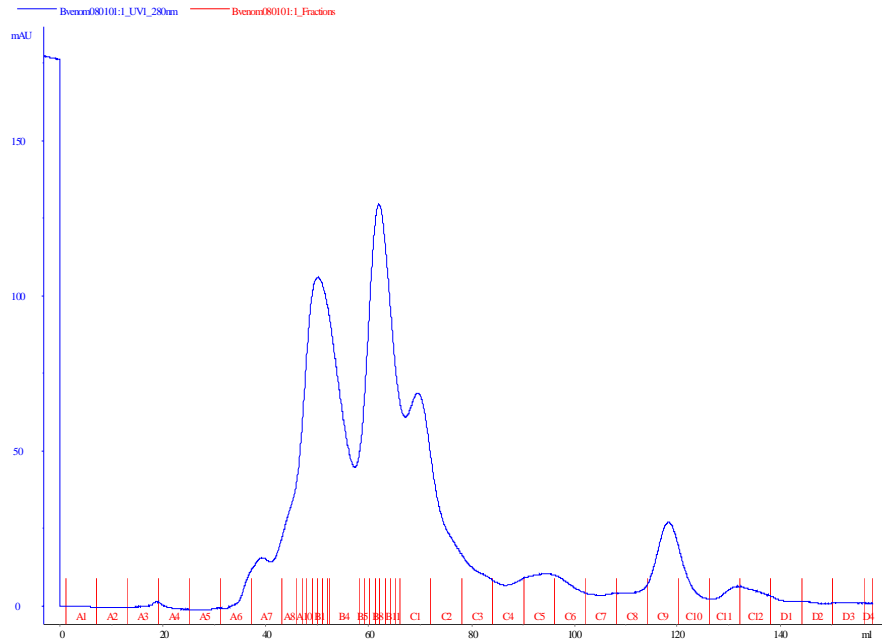


Figure 3. FPLC elution profile of the crude venom (台灣赤尾鮫) are separated by size exclusion chromatography. Conditions : Column: HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, Buffer : phosphate buffered saline(PBS), Flow rate: 1 ml/min, Length of elution : 1.3 (CV).

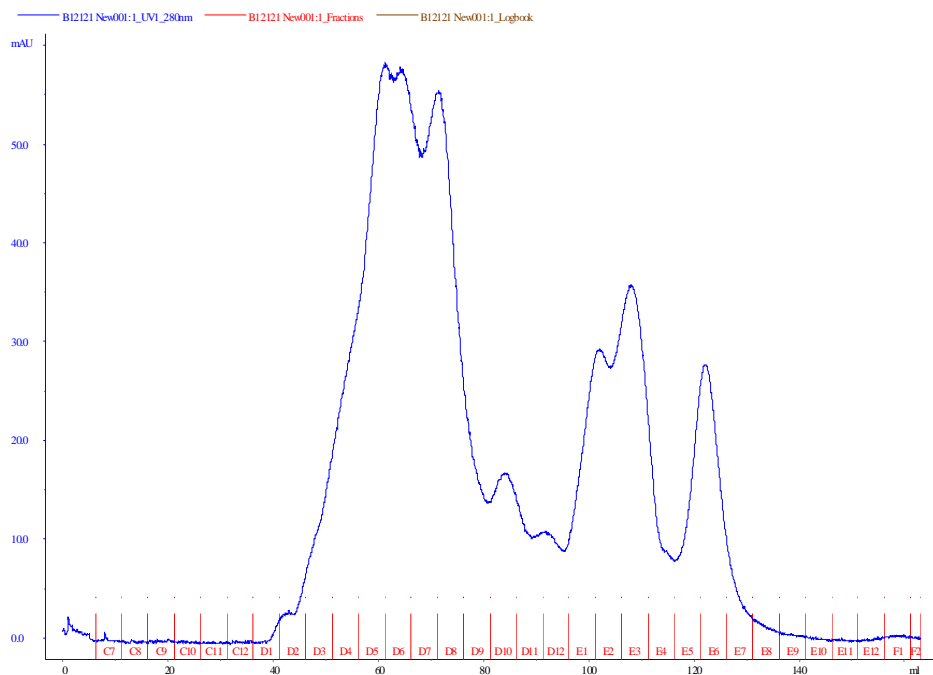


Figure 4. FPLC elution profile of the crude venom (越南樹青蛇) separated by size exclusion chromatography. Conditions : Column: HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, Buffer: phosphate buffered saline(PBS), Flow rate: 1 ml/min, Length of elution : 1.3 (CV).



Figure 5. The immunodiffusion of venoms *T. stejnegeri* (Tr.s, 0.2 mg) and *T. albolabris* (Tr.a, 0.2 mg) with anti-Tr.s antivenin. (S, 0.2 ml).

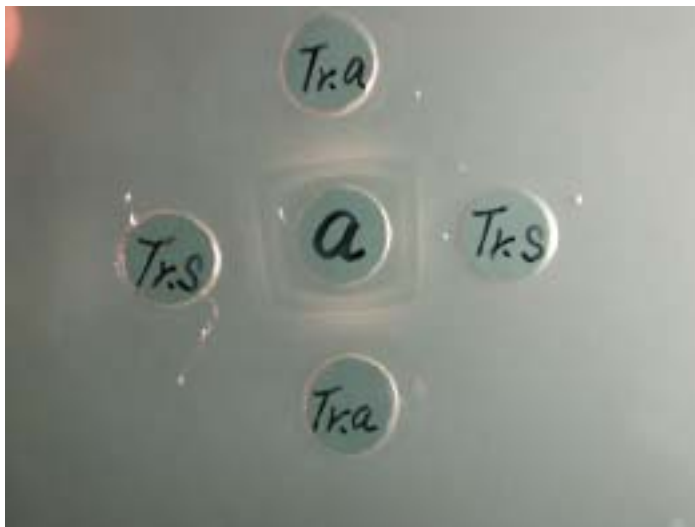


Figure 6. The immunodiffusion of venoms *T. stejnegeri* (Tr.s, 0.2 mg) and *T. albolabris* (Tr.a, 0.2 mg) with anti-Tr.a antivenin. (a, 0.2 ml).

附表：

Table 1. The detection of antivenins titers against *T. stejnegeri* (Tr.s), and *T. albolabris* (Tr.a) at 5, and 7- week intervals after immunization.

4 horses divided into 2 groups, and immunized with Tr.s, and Tr.a		Doses of venoms used for immunization			
		Week 1 5mg	Week 2 10mg	Week 3 12mg	Week 4 15mg
Tr. s	No. 227	Not done	Not done	60TU (Tr. s)	80TU (Tr. s)
		Not done	Not done	40TU (Tr. a)	60TU (Tr. a)
	No. 228	Not done	Not done	60TU (Tr. s)	80TU (Tr. s)
		Not done	Not done	40TU (Tr. a)	60TU (Tr. a)
Tr. a	No. 231	Not done	Not done	20TU (Tr. s)	60TU (Tr. s)
		Not done	Not done	20TU (Tr. a)	40TU (Tr. a)
	No. 232	Not done	Not done	40TU (Tr. s)	80TU (Tr. s)
		Not done	Not done	40TU (Tr. a)	40TU (Tr. a)

Table 2. The detection of antivenins titers against *T. mucrosquamatus* (Tr.m), *T. stejnegeri* (Tr.s), and *T. albolabris* (Tr.a) at 5- week interval after simultaneous immunization with Tr.m, Tr.s, and Tr.a.

5 horses immunized with Tr.m, Tr. S, and Tr. A simultaneously	Previous titer against Tr.m	Doses of venoms used for immunization		
		Week 1 Tr.m:20mg Tr.s:3mg Tr.a:3mg	Week 3 Tr.m:25mg Tr.s:3mg Tr.a:3mg	Week 5 Tr.m:25mg Tr.s:3mg Tr.a:3mg
No. 221	40TU	Not done	Not done	60TU (Tr.m) 120TU (Tr. s) 100TU (Tr. a)
No. 223	40TU	Not done	Not done	80TU (Tr.m) 120TU (Tr. s) 100TU (Tr. a)
No. 224	20TU	Not done	Not done	60TU (Tr.m) 100TU (Tr. s) 100TU (Tr. a)
No. 225	20TU	Not done	Not done	80TU (Tr.m) 120TU (Tr. s) 100TU (Tr. a)
No. 226	20TU	Not done	Not done	60TU (Tr.m) 120TU (Tr. s) 120TU (Tr. a)

Comparison of antivenoms against Taiwan *Trimeresurus stejnegeri*
and Vietnam *Trimeresurus albolabris*

Tsun-Kung Chen, Bor-Lin Miao, Ru-Yan Shih,
Wei-Lun Huang, Ruwen Jou , Ho-Sheng Wu

Two snake venoms from Taiwan *Trimeresurus stejnegeri* and Vietnam *Trimeresurus albolabris* were used to immunize horses, from which two different antivenins were obtained. The results of immunodiffusion between these venoms and antivenins showed that each venom contains several cross reactive protein components. In addition, the elution profiles obtained from both ion-exchange and size exclusion column chromatography depicted that venoms of both Taiwan *Trimeresurus stejnegeri* and Vietnam *Trimeresurus albolabris* did contain cross-reactive protein components at 60 and 100-115 ml respectively. Those protein fractions need to be further characterized.

The antibody titers of the horses immunized with venom of Taiwan *Trimeresurus stejnegeri* was raised to 80, and 60 Tanaka units against venoms of Taiwan *T. stejnegeri*, and Vietnam *T. albolabris* respectively at the seven-week interval. On the other hand, the antibody titer of the horses immunized with venom of Vietnam *Trimeresurus albolabris* was raised to 60-80 Tanaka units against Taiwan *T. stejnegeri*, and 40 Tanaka units against Vietnam *T. albolabris* at the seven-week interval. Further, if immunized horses simultaneously with venoms of Taiwan *Trimeresurus stejnegeri*, Taiwan *Trimeresurus mucrosquamatus*, and Vietnam *Trimeresurus albolabris*, a high titer antivenin (greater than 100 Tanaka units) against above three venoms was obtained at the fifth week after immunization.

Taken together, we have found in this study that there is cross reactivity between antivenins against Taiwan *Trimeresurus stejnegeri* and Vietnam *Trimeresurus albolabris*. Also, the strategy to immunize horse with several snake venoms simultaneously and obtain highly potent antivenins is possible.