

沖縄ハブ抗毒素の製造に関する研究

- (1) ハブ抗毒素の高度精製について
- (2) 高単位ハブ抗毒素の大量製造法

沖縄県公害衛生研究所： 野 崎 真 敏
山 川 雅 延
外 間 善 次
福 村 圭 介
照 屋 寛 善
吉 田 朝 啓

財団法人 化学及血清療法研究所： 木 原 伯
今 村 直 彦
山 田 昭
野 中 実 男
六反田 藤 吉

はじめに

本県では、1年間に350～450名の人がハブに咬まれ、そのうち0.5～1.0%が死亡し、5～10%の後遺症患者をだしている。

治療用ハブ抗毒素の普及と、救急医療体制の整備により、近年、死亡率は著しく低下し、重篤な後遺症を残す例も少なくなったが、地域の開発や、ハブ生息地への住宅の進出などいろいろな要因のため、十数年来ハブ咬傷患者の数は一向に減少していない。

また、ハブによる損害は単に咬症患者の肉体的な損傷だけにとどまらず、パイン、砂糖等の第一次産業に及ぼす影響や、観光事業及び教育、文化等に及ぼす潜在的な悪影響は計り知れないものがある。

したがって、本県におけるハブ対策の事業は極めて重要な公衆衛生上の課題である。

主な対策の方法としては

1. ハブ抗毒素による受傷者の治療
2. ハプトキソイドによる予防
3. ハブの防除を目的とした生態的研究

などが考えられ、それぞれの方向から研究が進められているが、本報ではハブ抗毒素による受傷者の治療について考えてみたい。

県内における昭和50年度の抗毒素の使用状況を調査してみると、1回の受傷に1 vial (20ml) 使用した例が全体の92.6%、2 vial が5.4%、3 vial 以上が2.0%であった。

この調査結果からも明らかなように、「患者1人あたり1 vial」がハブ抗毒素の常用量として定

着しているが、最近、県内の咬傷患者のおおよそ $\frac{1}{4}$ の患者の治療を行なっている中部病院では、重篤な患者に対して抗毒素を複数本投与し、死亡及び壊死の防止にかなりの効果をあげているようである。

昨年、我々は現行ハブ抗毒素20～40 mlが、生体内でどの程度のハブ粗毒を中和することができるかを確かめるため、あらかじめ、耳静脈より抗毒素10、20、40 mlを投与した白色ウサギの後肢大腿部筋肉を粗毒12.5、25、50、100 μ gで攻撃して、10日後の局所の病変を観察した。(19)

その結果、現行の抗毒素20 mlは粗毒25 μ g以下はよく抑えていたが50 μ gの攻撃に対しては、かなりの局所病変を残した。しかし、抗毒素40 mlを投与した方は、50 μ gの攻撃に対してもかなりの効果を示し、局所の病変は20 mlの抗毒素を投与した場合よりも明らかに軽度であった。

このことは、50 μ g以上のハブ毒が注入されても、抗毒素の投与量を増やせば、局所の病変はより軽減できることを示している。

さて、ハブに咬まれた時に注入される毒量(排毒量)についてであるが、近藤等(5)は、ウサギ筋肉をハブに咬ませてその注入された毒量を測定し、生毒の容量で0.016～0.203 ml(平均0.082 ml)が注入されたと推定した。

我々の実験では、生毒の2.63 w/v%が乾燥収率として求められているので、近藤等の推定排毒量を乾燥重量に換算すると4.2～53.4 μ g(平均21.6 μ g)と算出される。

また、外間(6)は、PBS、生理食塩水を封入したビニール袋をハブに攻撃させ、分光光度計で蛋白量を測定して、注入毒量を推定した。それによると、乾燥重量にして、50～105.5 μ gの毒が注入された例が全実験例(111例)中16%もあった。

一口にハブ咬傷といっても、軽くひっかかる程度から、がっぷり咬まれるケースまであり、一匹のハブが持っている毒量が乾燥重量にして150～200 μ gであることとも考えあわせると、抗毒素20～40 mlでは抑えきれない程多量の毒が注入される場合も低い確率ではあるが起っているものと思われる。

これらの患者から後遺症が発生したり、また完治しても長期の治療を余儀なくされているのである。

我々は過去2年間①死亡及び壊死患者をなくすること、②治療期間を短縮すること、③血清病を少なくすること等を主な目標に、DEAE-セルロースを用いて抗毒素の高度精製法の研究を行なって来た。(17, 20)

DEAE-セルロースによる精製法の基本的な考え方は、

Step 1: 硫酸30%飽和にして、 γ -グロブリンを除去し、50%飽和にしてアルブミンを除去する。

Step 2: ペプシンで、抗体の大部分を占めていると思われるT-グロブリンを消化分解し、物理化学的な性質を γ -グロブリン様にする。

Step 8 : DEAE-セルロースにより、消化 γ -グロブリンを α -グロブリンと同じ条件で分離採取する。

であり、昭和49年度は精製毒で免疫した血清を、この方法で精製し、かなり良好な成績を得た。

したがって、50年度も操作及び装置の改良を試みながら、引きつづきこの方法で精製を行ったが、得られた抗毒素は、電気泳動像が単一のピークになっているにもかかわらず、抗体価は殆んど上昇せず、回収率も著しく悪かった。

その原因を明らかにするため、それぞれの粗血清をDEAE-セルロースの小さなカラムを用いて系統的に分離し、血清中の抗体の分布状況を検討した結果、精製毒を用いて免疫した血清では、HR-Iに対する抗体は主にfra-1、2の γ 及び γ -グロブリンに、HR-IIに対する抗体は主にfra-3、4の β -グロブリンに分布していた。しかし、粗毒で免疫した血清では、抗HR-I、抗HR-II共にfra-1の γ -グロブリンに分布していた。

一般に、蛋白抗原で高度に免疫された馬の血清では、抗体の大部分は、 γ -グロブリン(β_2 -グロブリン)にできる(8、9)といわれているが、このように、ハブ毒で免疫した血清では、個体ごとに抗体の分布状況が異なるため、今年度は、あらかじめ小型カラムを用いて分画し、血清中の抗体の行く方を確かめた後、大規模な精製を行った。

実験材料及び実験方法

(1) ハブ粗毒の採取：メートルガラス(20ml)の口にビニール製の膜(厚さ0.3mm)を張って固定し、これに沖縄産ハブ(*T. flavoviridis*)を咬ませて自然に排毒させた。

生毒は3000rpm・10min、遠心して白色不溶性沈殿物を除去した後凍結乾燥した。

乾燥毒は1年分をプールして褐色瓶に入れ、デシケーター中に保存しながら必要に応じて適量を分割使用した。

(2) ハブ粗毒の部分精製：佐藤、高橋等の方法(4、14、15)によりHR-I、HR-IIの両面分を分離採取した。

即ち、ハブ粗毒をSephadex G-100により、HR-I及びHR-IIに分離し、HR-IIについては、Amberlite CG-50で更に分離して精製HR-IIを得た。

これらの部分精製毒は適量ずつ分注凍結乾燥し、それぞれの試験用毒素として使用した。

(3) 蛋白量の測定：ハブ毒及び馬血清の蛋白量はOD₂₈₀を測定し、ハブ粗毒 $\mu\text{g}/\text{ml} = 1.54 \text{ OD}_{280}$ 、馬血清 $\mu\text{g}/\text{ml} = 1.24 \text{ OD}_{280}$ として蛋白量を算出した。

(4) 毒力試験：出血活性は近藤等(1)のウサギ背皮法により測定し、出血斑の直径の平均値が10mmになるような毒の最少量を1MHDとした。

致死活性はマウスの尾静脈注射法により測定し、LD₅₀はLeed & Muench法(8)で計算した。

(5) 馬の免疫及び全採血：基礎免疫はフロイントのアジバントと(1)で得た毒素と混合して注射し、49日後から一週間間隔で追加免疫を行った。今回は基礎免疫にもトキソイドは使用せず、毒素そのままを使用した。全採血は1ℓのメスシリンダーに血液を採取し、血清分離用オモリを載せ、2日後に血清を全離採取した。

(6) 抗毒素の精製：基本的には、昨年DEAE-セルロース法(ペプシン消化→硫酸分画→脱塩緩衝化→DEAE-セルロースによるイオン交換処理→濃縮)により精製したが、6/11/99の血清では、小分画の結果から判断して溶出は0.04M, PH=6.0 P.B.Sで行った。

血清中の抗体の分布を検討するための小分画は、Sobor及びPetersonの方法(8, 9, 16)により行った。

(7) 抗毒素価の測定：抗毒素価の測定は、生物学的製剤基準に示された方法で行った。本来、すべての抗毒素の抗体価は、国立予防衛生研究所より分与された常用標準ハブ抗毒素及び各試験用毒素を用いて測定すべきであるが、予備テストや、小規模分画の場合は検体が多いため、試験用毒素は、(2)で製造した自家製のものを使用し、標準抗毒素は、化血研製のLot12を対照として使用した。また、粗毒に対する抗体価の測定には、(1)で採毒した毒素を適度に希釈して使用した。

各試験用毒素の1試験毒素量は次のとおりとした。

抗出血価Ⅰ測定用：100MHD

抗出血価Ⅱ測定用：13MHD

抗致死価(HR-I)測定用：5LD₅₀

粗毒に対する抗出血価測定用：100MHD

粗毒に対する抗致死価測定用：3LD₅₀

しかし、抗毒素の大量処理の時の中間チェックには国立予防衛生研究所より分与された標準毒及び標準抗毒素を使用した。

(8) 発熱試験：発熱試験は生物学的製剤基準に示されている方法で行った。

即ち、体重1.5kg以上のウサギの耳静脈内に、体重1kgにつき3.0mlの割合で抗毒素液を注射し、1, 2, 3時間後の体温を測定して、対照体温との差を求めた。

(9) 電気泳動：各抗毒素検体の精製度を検討するために、セルロースアセテート膜(5×6cm)を用いて電気泳動を行った。

緩衝液は、PH=8.6, イオン強度0.06ペロナルバッファーを使用し、セルロースアセテート膜1枚当たり3mAの割合で40分間通電した。泳動後は、ボンソー3Rで染色しデンシトメトリーを行った。

実 験 成 績

I 馬の免疫及び全採血

沖縄ハブ粗毒を用いて馬3頭(馬1199, 馬1200, 馬1201)を免疫した。免疫のスケジュールは表-1に示したが、粗毒で7回基礎免疫を行い、49日間の休養後、1週間間隔で馬1199は8回、馬1200は10回、馬1201は9回追加免疫を行った。

昨年は基礎免疫にホルモールトキソイドを使用した。今回は、基礎免疫、追加免疫共に粗毒そのままを使用した。

試血血清の抗体価は抗HR-II価のみを測定したが、最終試血血清の抗体価は、馬1199が630 u/ml, 馬1200が346 u/ml, 馬1201が605 u/ml だった。

全採血は、頸静脈よりメスシリンダーに採取し、1昼夜静置した後血清を分離採取した。馬1199は14,000 ml, 馬1200は14,300 ml, 馬1201は16,000 ml の血清を得た。

(表-1) 馬馬1199, 馬1200, 馬1201の免疫表

免疫回数	免疫日数	接種量 mg	馬1199 抗HR-II	馬1200 抗HR-II	馬1201 抗HR-II	抗原
1	1	1				アジバント+(基礎免疫)
2	7	2				"
3	14	5				"
4	21	10				"
5	28	10				"
6	35	15				"
7	42	15	242	220	462	"
1	91	1				粗毒(追加免疫)
2	98	2	60	60	84	"
3	105	5	>70	84	121	"
4	112	10	170	121	181	"
5	118	20	>352	148	242	"
6	127	30	539	179	302	"
7	134	50		242	346	"
8	140	80	630	297	616	"
9	147	100	(全採血)	346	605	"
10	154	120	血清量			
			14,000 ml	(全採血) 血清量 14,300 ml	(全採血) 血清量 16,000 ml	

(5) 図-1、2、3、4は各馬の正常血清と最終試血血清の電気泳動像を比較したものである。

正常血清では、血清蛋白の41.4%はアルブミンであったが、免疫が進み抗体価が上昇するとともに血清中のアルブミン含量は減少し、最終試血血清では20%前後まで低下した。

逆にグロブリン含量は増加し、特に馬1199では α -グロブリン、馬1200ではT-グロブリン、馬1201ではT及び α -グロブリンの割合が増加した。

図-1

馬の正常血清

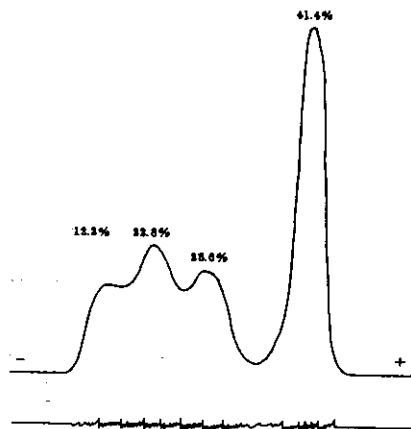


図-2

馬1199, 最終試血血清

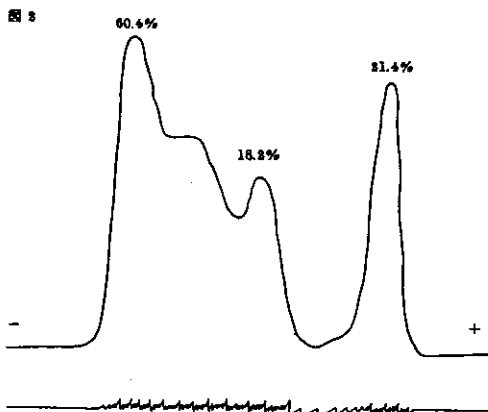


図-3

馬1200, 最終試血血清

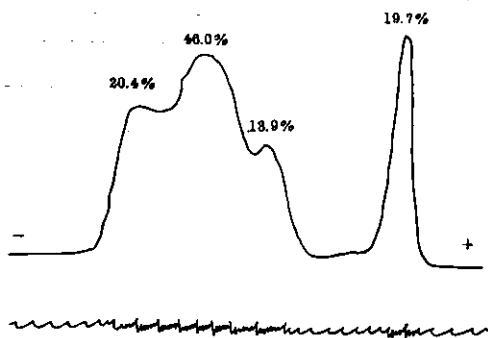
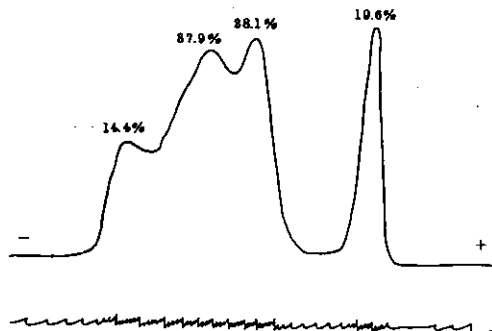


図-4

馬1201, 最終試血血清



I 血清の小分画

(1) 馬系1199血清のDEAE-セルロースによる精製

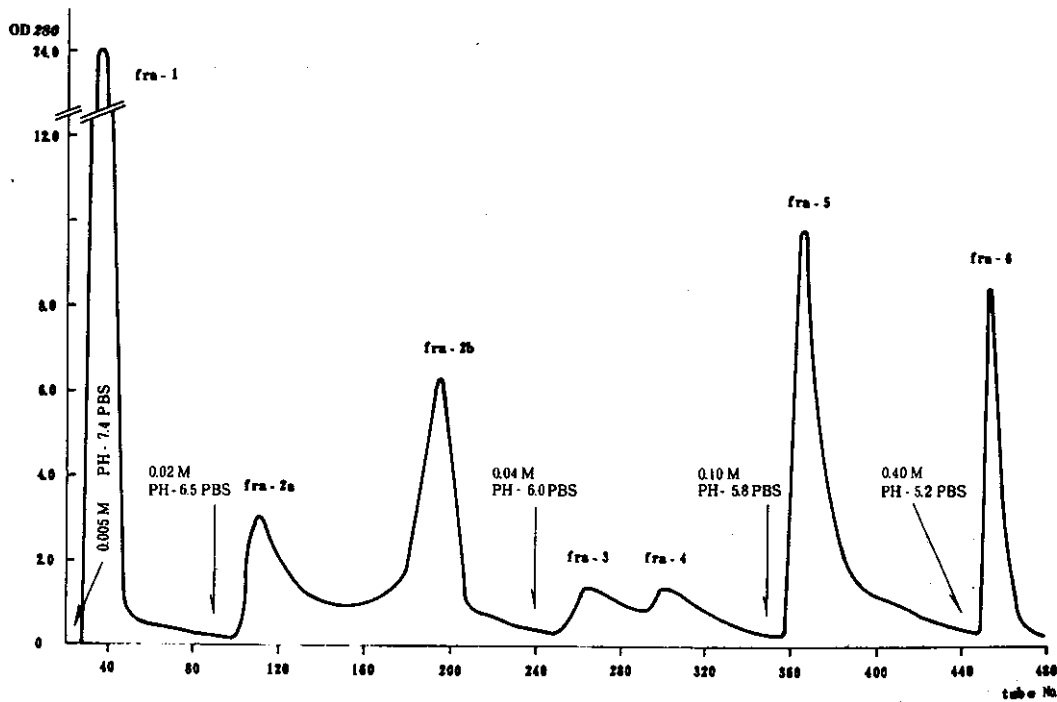
ハブ毒で免疫した馬では、個体ごとに血清中の抗体の分布状況が異なるため、あらかじめ小規模に分画して抗体の存在場所を確かめる必要がある。したがって、馬系1199血清についても、下記のような buffer system で stepwise elution を行った。

精血清120 ml を starting buffer である 0.005M PH=7.4 phosphate butter ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) に一昼夜透析した後、不溶物は8000rpm, 10 min. 遠心して除去し、同bufferで十分に緩衝化されたDEAE-セルロース(5.0×40cm)に注入了。溶出速度は毎時225 ml とし、1試験管あたり15 ml を採取した。

buffer system は次のとおりである。

- step 1 : 0.005M PH=7.4 Phosphate buffer
 - step 2 : 0.02 M PH=6.5 #
 - step 3 : 0.04 M PH=6.0 #
 - step 4 : 0.10 M PH=5.8 #
 - step 5 : 0.40 M PH=5.2 #
 - step 6 : 0.40 M PH=5.2 #
- + 2.0M NaCl

図-5 DEAE-セルロースによる馬系1199血清の精製



その結果得られたのが図-5である。それぞれの peak は昨年同様 fra-1~7 としたが、0.02M, PH=6.5, P.B.S.で溶出した時に peak が2つに分かれたため、今回は fra-2-a, fra-2-b とよぶことにした。fra-2-b が昨年の fra-2に相当する peak である。fra-1は微白濁, fra-2-aは茶褐色, fra-2-bは無色透明, fra-3,4は黄色, fra-5は茶褐色, fra-6は緑色を呈していた。

図-6,7は精製前の血清と各 fraction の電気泳動像を示したものであるが、fra-1は γ -グロブリン, fra-2-bはT(β_2)-グロブリン, fra-3,4は β -グロブリン, fra-5はアルブミン, fra-6は α -グロブリンの位置に泳動していた。抗馬 Ig G 血清や抗馬 Ig A 血清等, それぞれの fraction の抗血清を取り寄せて詳しく調べる必要があるが、後で述べる抗体の分布も含めて考察した場合、昨年、 γ -グロブリンとよんだ fra-2-bは、 γ -グロブリンと β -グロブリンの中間に位置するT-グロブリンに相当するものと思われる。

したがって、本報では、fra-2-bをT-グロブリンとよぶことにした。

図-6 馬 Δ 1199血清精製前

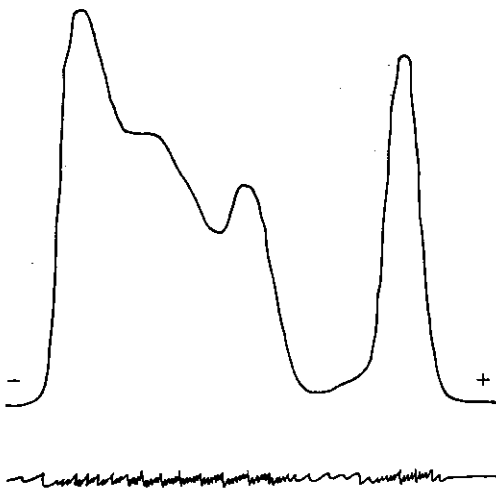
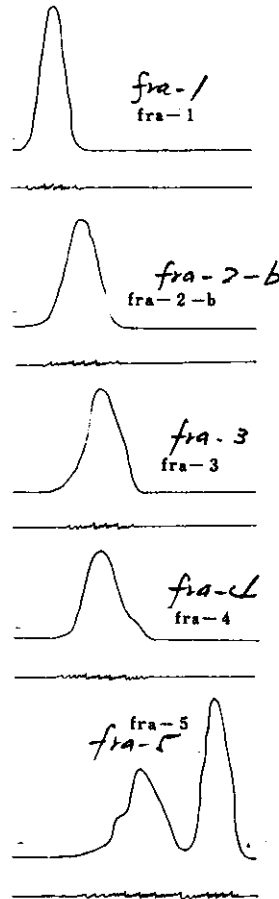


図-7 馬 Δ 1199血清の各 fraction の泳動像



それぞれの fraction は稀薄なため、PAN ホーローファイバー（限外濾過モジュール）で2~2.5倍に濃縮した後抗体価の測定を行った。表-2は各 fraction の抗体価をまとめたものである。

表-2 馬 1199 血清の各画分の抗体価

	protein			抗 HR-I			抗 HR-II		
	vol	mg	%	total units	u/mg	%	total units	u/mg	%
fra-1	400	3,729	32.9	14,880	4.00	69.3	7,440	2.000	25.8
fra-2a	600	1,020	9.0						
fra-2b	940	2,440	21.5	6,588	2.70	30.7	13,176	5.40	45.7
fra-3	500	550	4.9		nd		2,503	4.55	8.7
fra-4	640	640	5.7		nd		5,690	8.89	19.8
fra-5	600	1,980	17.5						
fra-6	210	966	8.5						
total		11,316	100.0	21,468		100	28,809		100

HR-I に対する抗体は、fra-1 の γ -グロブリンと fra-2-b の T-グロブリンの両 fraction に分布していたが、全回収量の 69.3% にあたる 14,880 単位は fra-1 の γ -グロブリンに含まれていた。fra-3, 4 の β -グロブリンも 2~2.5 倍に濃縮して抗体価を測定したが、その濃縮度では測定レベルに達しなかった。

HR-II に対する抗体は、fra-1~4 の 4 つの fraction に分散していたが、全回収量の 45.7% にあたる 13,176 単位は fra-2-b の T-グロブリンに含まれていた。残りは、 γ -グロブリンと β -グロブリンにはほぼ同じ割合に分布していたが、この馬の場合、HR-I に対する抗体の中心は γ -グロブリン、HR-II に対する抗体の中心は T-グロブリンであった。

fra-5 のアルブミン、fra-6 の α -グロブリンについても、2~2.5 倍に濃縮して抗体価を測定したが、抗 HR-I、抗 HR-II 共に測定レベル以下であった。

検体が多かったため、抗体価の測定には自家製の試験用毒素を使用し、1 試験毒素量を中和し得る血清の抗体価を 10 単位として、各 fraction の抗体価を算出した。

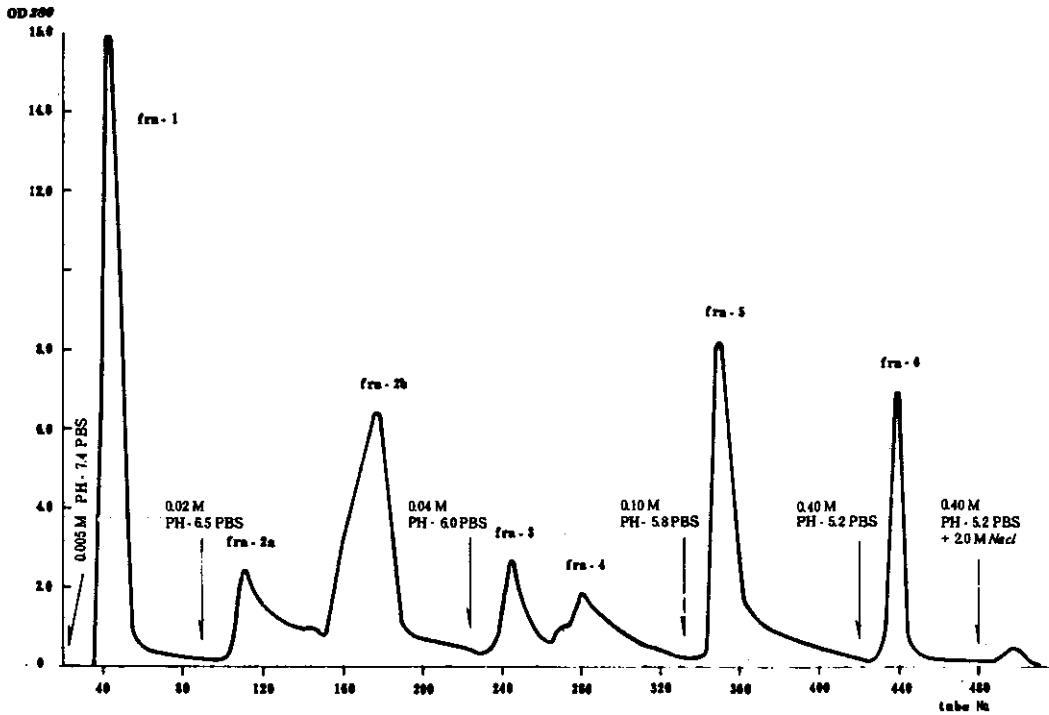
国家基準の常用標準ハブ抗毒素を対照として使用しなかったため、試験用毒素の毒力が少し強く、抗体価は、生物製剤基準に基づいて測定した場合より少し低目にてた。

(2) 馬 1200 血清の DEAE-セルロースによる精製

馬 1200 血清についても抗体の分布状況を詳しく調べるため、DEAE-セルロースを用いて小規模に分画を行った。

分画における諸条件は馬 1199 と同じである。

図-8 DEAE-セルロースによる馬血1200血清の精製



それぞれの fraction は、血1199 同様 PANホーローファイバーで2~2.5倍に濃縮した後、抗体価を測定した。

各 fraction の抗体価は表-3 に示したが、HR-I に対する抗体の大部分は fra-1, fra-2-b の γ 及び T-グロブリンに含まれ、両 fraction を加えると全回収量の 86.4% を占めていた。HR-II に対する抗体は血1199 同様 fra-1~4 の4つの fraction に分散していたが、fra-2-b の T-グロブリンに最も多く含まれていた。

fra-5, 6 についても約 2.5 倍に濃縮して抗体価を測定したがいずれも測定レベル以下であった。

表-3 血1200 血清の各画分の抗体価

	protein			抗 HR-I			抗 HR-II		
	vol	mg	%	total units	u/mg	%	total units	u/mg	%
fra-1	370	2,738	80.8	21,603	7.89	44.0	3,094	1.13	11.1
fra-2a									
fra-2b	870	2,349	26.4	20,718	8.82	42.2	15,198	6.47	54.7
fra-3	390	585	6.6	3,071	5.25	6.3	4,855	8.30	17.5
fra-4	740	740	8.3	3,700	5.00	7.5	4,625	6.25	16.7
fra-5	640	1,728	19.4						
fra-6	280	756	8.5						
total		8,896	100.0	49,092		100	27,772		100

(3) 馬血清1201のDEAE-セルロースによる精製

血清1201についても、DEAE-セルロース(5.0×42cmカラム)を用いて分画を行い抗体の分布を調べた。

図-9 DEAE-セルロースによる馬血清1201の精製

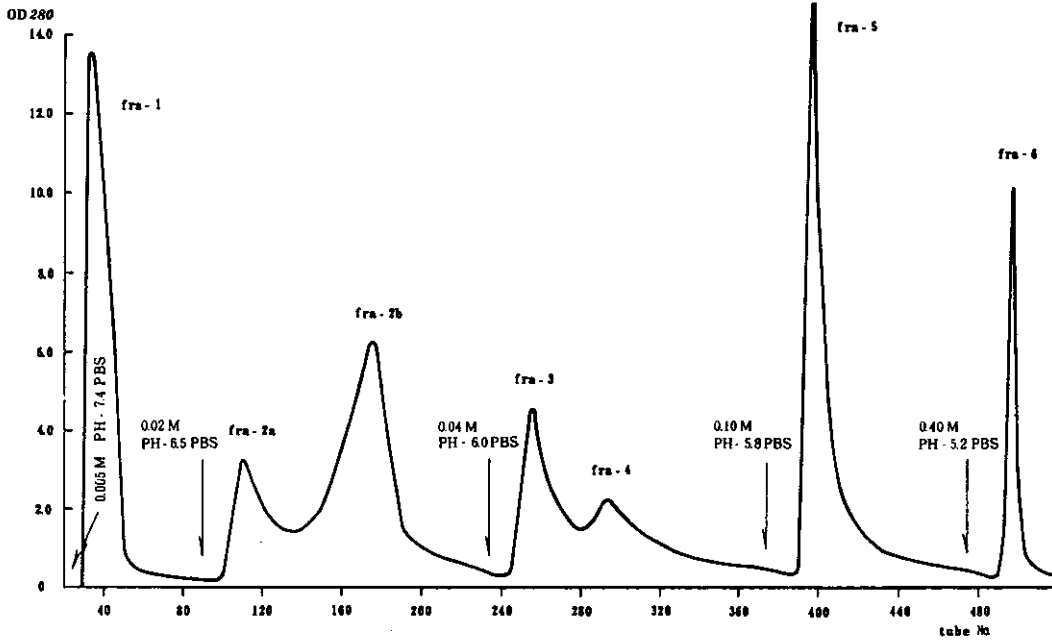


表-4 血清1201の各画分の抗体価

	protein			抗 HR-I			抗 HR-II		
	vol	mg	%	total units	u/mg	%	total units	u/mg	%
fra-1	885	2,695	24.0	29,645	11.0	46.6	3,234	1.2	7.9
fra-2a	430	930	8.3						
fra-2b	860	2,580	23.0	25,800	10.0	40.6	23,220	9.0	56.3
fra-3	460	1,104	9.8	4,526	4.1	7.1	10,709	9.7	26.0
fra-4	630	882	7.8	3,616	4.1	5.7	4,057	4.6	9.8
fra-5	460	2,185	19.4						
fra-6	210	861	7.7						
total		11,237		63,587			41,220		100

その結果、HR-Iに対する抗体は主に fra-1の γ -グロブリンと fra-2-bの T-グロブリンに分布し、HR-IIに対する抗体は主に fra-2-bの T-グロブリンと fra-3の β -グロブリンに分布していた。

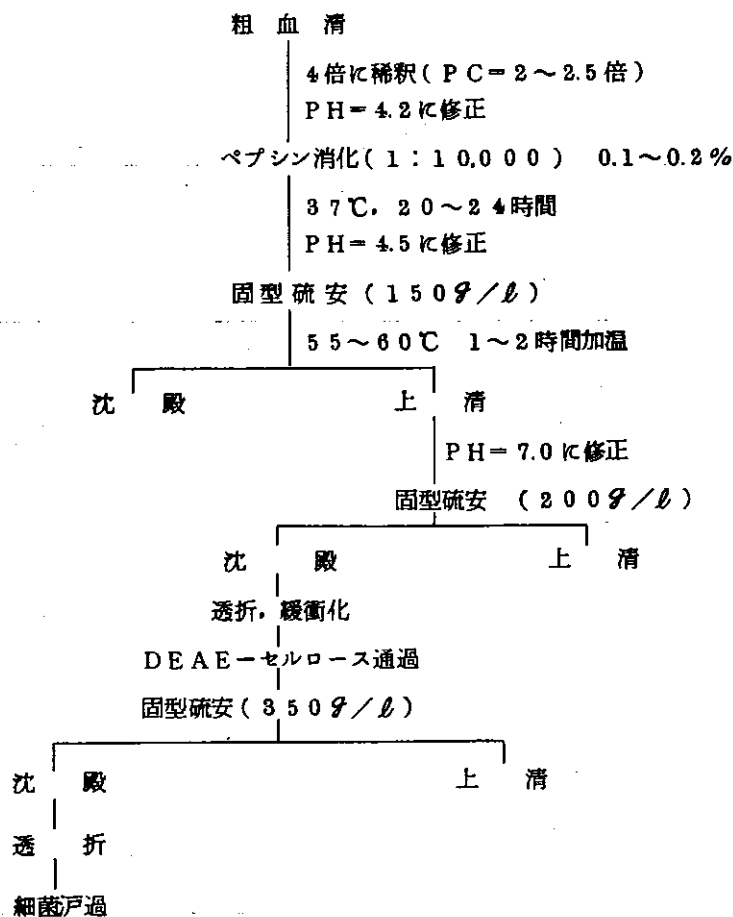
昨年、精製毒で免疫した血清ではHR-Iに対する抗体は主に γ 及びT-グロブリンに、HR-IIに対する抗体は主に β -グロブリンに分布していたが、今年、粗毒を用いて免疫した3頭の血清では、HR-Iに対する抗体は、T-グロブリンを含めて γ -グロブリン側に、HR-IIに対する抗体は、T-グロブリンを含めて β -グロブリン側に分布する傾向を示した。

II 抗毒素の精製

(1) ペプシン消化→硫酸分画→DEAE-セルロース法による精製

馬 $\#1199$ 、 $\#1200$ 、 $\#1201$ の3頭の血清の精製は図-10に示した方法で行なった。ペプシン消化から硫酸分画に至る過程は、現在の治療用ハブ抗毒素の精製に使われている方法である。

図-10 硫酸分画、DEAE-セルロースによる血清の精製



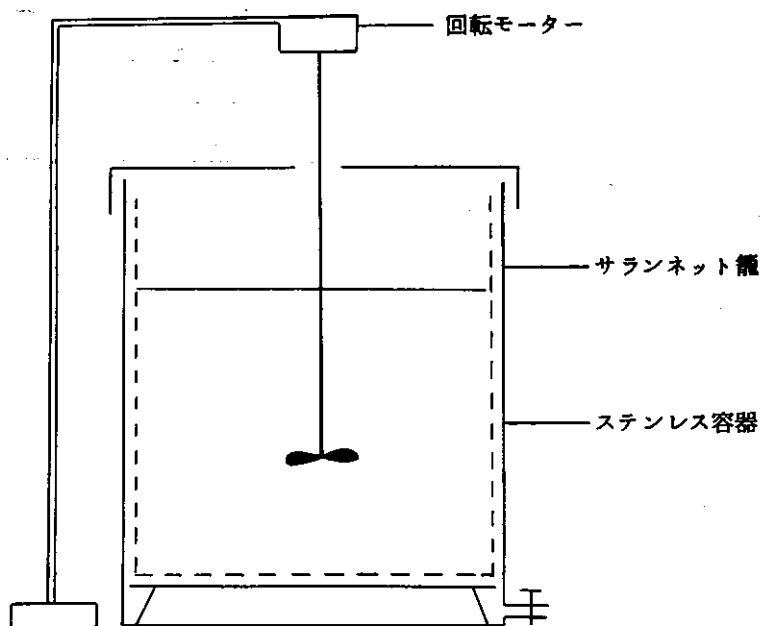
- ① 粗血清を純水で3~4倍に希釈し蛋白濃度を2.0~2.5%になるように調整する。
- ② 6 N, HCl で PH=4.2 に修正した後、ペプシン(1:10000)を0.1~0.2%量加え、37℃, 24時間 incubate する。
- ③ 6 N, NaOHを用いてPH=4.5に修正した後、固型硫安を20%飽和量(150g/l)添加し、57~60℃, 1時間加熱して不活性蛋白を沈殿除去する。
- ④ 滲液は6 N, NaOHでPH=7.0に修正した後、固型硫安を50%飽和になるまで追加し、(200g/l), 免疫グロブリンを沈殿採取する。
- ⑤ 沈殿は十分に吸湿した後、セルロースチューブに包み、透析脱塩する。

以上で細菌滲過を行えば治療用の抗毒素として使用できるが、今日は更に精製度を高めるため、もう one step 処理することにした。

- ⑥ DEAE-セルロースを通過させ、不活性蛋白を更に除去する。
- ⑦ 溶出した血清液は稀薄なため、硫安を50%飽和量(350g/l)加えて沈殿濃縮する。
- ⑧ ⑥と同様に透析脱塩し、高度精製抗毒素液とする。

ペプシン消化→硫安分画→DEAE-セルロースによるイオン交換処理と精製の基本的な考え方は昨年と同じであるが、小規模分画の結果、3頭の血清の抗体は γ , T, β -グロブリンの各 fraction に分散していたため、今回は、それぞれの血清に適した条件で溶出を行うことにした。

図-11 DEAE-セルロースの活性化装置

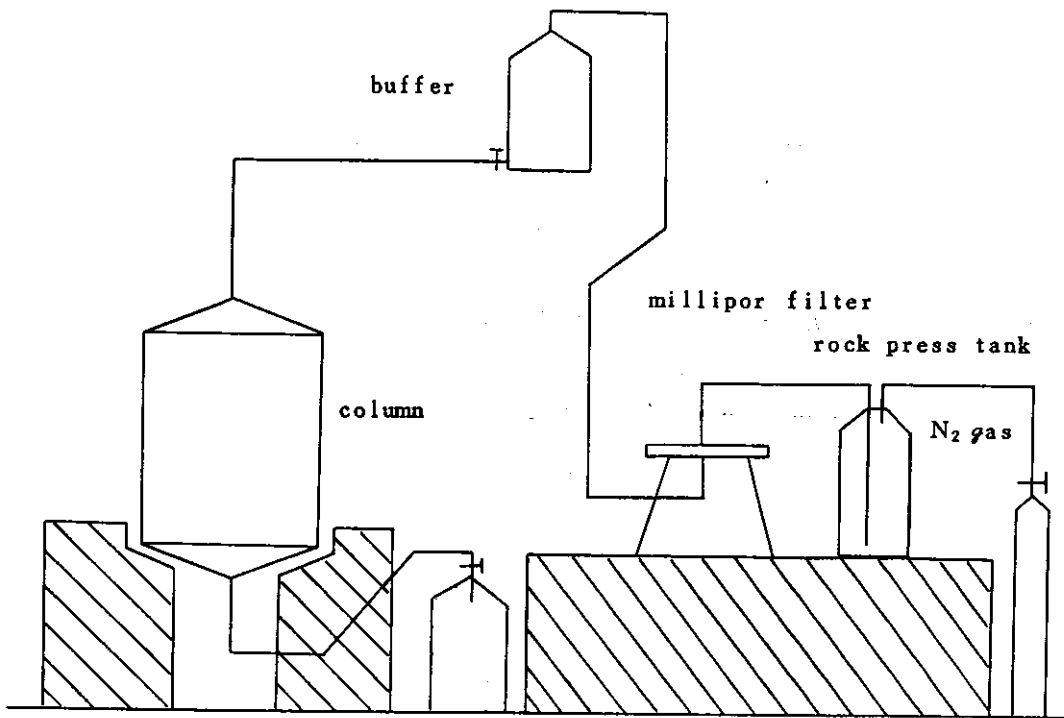


DEAE-セルロースを用いて大量の血清をイオン交換処理する場合には、大量のセルロースの速かな conditioning とカラム操作の際の雑菌の混入防止が重要である。

したがって、セルロースの conditioning は、サランネット籠を用いた図-11 方法で行った。この方法は、ガラスフィルターを用いた場合より濾過面積が広く、大量のセルロースを速かに処理するのに適していた。また、bufferize されたセルロースは、0.01%チメロサルを加えた磷酸緩衝液に懸濁させ、高圧滅菌を行った後、雑菌ができるだけ混入しないように注意しながら大型カラムに充填した。

滅菌前後のセルロースのイオン交換能については、小さなカラムを用いて血清を分画し、両者を比較したが殆んど差はなかった。

図-12 DEAE-セルロースによる血清精製装置



大量の血清のDEAE-セルロース処理は、図-12の装置を用いて行った。カラム以外の器具類は、パイロゲンフリーにするために1%苛性ソーダ液に数日浸した後オートクレーブ処理したが、カラムはオートクレーブに耐えないため、苛性ソーダ処理後、滅菌蒸留水で濯いで使用した。

また、溶出液は、0.01%チメロサルを加えた磷酸緩衝液($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)をミリポア-GSフィルター(ポアサイズ 0.02μ)で除菌して使用した。

表-5 精製抗毒素の抗体価

	粗血清					硫酸精製血清					DEAE-セルロース精製血清				
	mg/ml	vol	抗HR-I	抗HR-II	発熱	mg/ml	vol	抗HR-I	抗HR-II	発熱	mg/ml	vol	抗HR-I	抗HR-II	発熱
馬1199	142	14,000	395 (2.9)	730 (5.1)	-	135	6,000	438 (3.2)	855 (6.8)	-	134	3,600	525 (3.9)	683 (4.9)	+
馬1200	108	14,800	525 (4.9)	436 (4.0)	-	120	8,000	553 (4.8)	462 (3.9)	-					
馬1201	184	16,000	840 (6.3)	864 (6.4)	-	114	10,900	646 (5.7)	832 (7.8)	-					

それぞれの血清の抗体価は表-5にまとめた。

馬1199の血清は、純水で4倍に稀釈し、ペプシンを0.2%量加え一昼夜消化させた後、常法に従って硫酸分画、DEAE-セルロース処理を行った。小分画の結果、抗体がfra-1~4の4つのfractionに分散されていたため、DEAE-セルロースによるイオン交換処理では、その4つのfractionをまとめて採取する条件(0.04M, PH=6.0, PBS)で溶出した。

ゲルベッドは25×40cmとし、溶出速度は4,000 ml/hourとした。

また、ペプシンの添加量と精製度との関係を検討するため、馬1200、1201の血清ではペプシンをそれぞれの0.1%、0.15%量加え、一昼夜消化させた後硫酸分画を行った。

しかし、いずれの血清も、硫酸分画、DEAE-セルロース処理を通じ抗体価は全く上昇せず、馬1199の血清では、DEAE-セルロース処理により、抗HR-II価がむしろ低下したため、他の2頭の馬の血清については硫酸分画で留め、不活性蛋白は塩化亜鉛処理により除去することにした。

それぞれの馬の粗血清、及び精製血清は、生物学的製剤基準に基き発熱試験を行った。結果は表-5に示したが、馬1199の血清では精製の過程でパイロゲンが混入していた。

(2) ペプシン消化、硫酸精製血清のDEAE-セルロースによる分画

前項でも述べたように、いずれの馬の血清もペプシン消化、硫酸分画では抗体価が全く上昇しなかったため、硫酸精製血清についても粗血清の時と同様DEAE-セルロースの小型カラムを用いて系統的に分画を行い、ペプシン消化、硫酸分画処理後の抗体の分布を検討してみた。

図-13 ペプシン消化→硫酸精製血清のDEAE-セルロースによる分画(馬血1200)

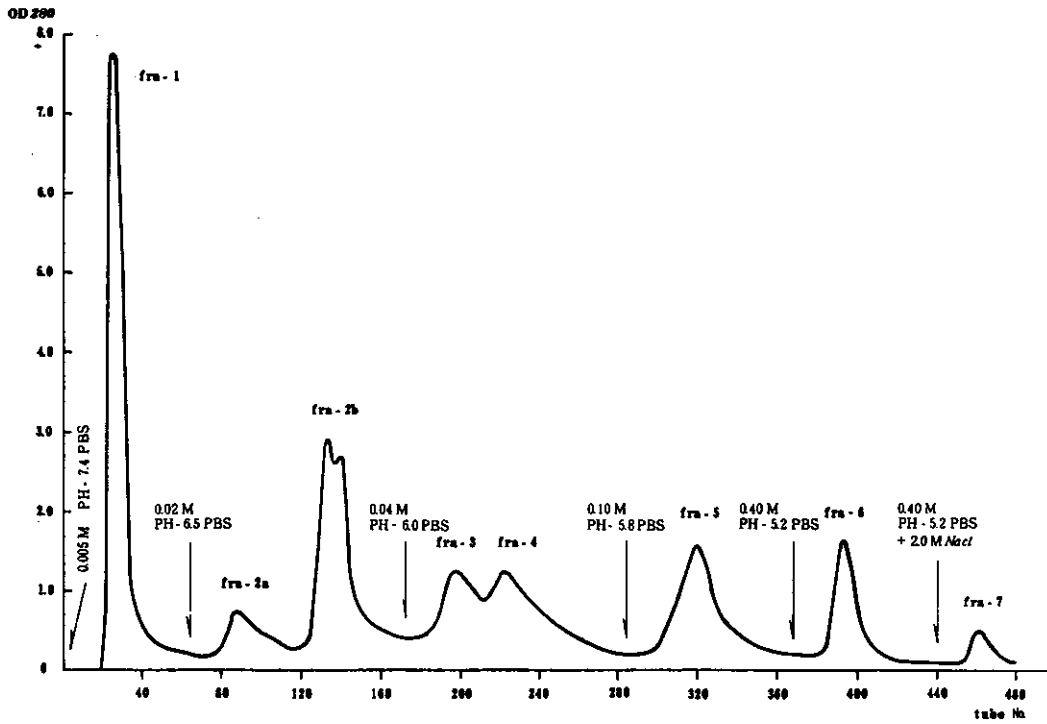
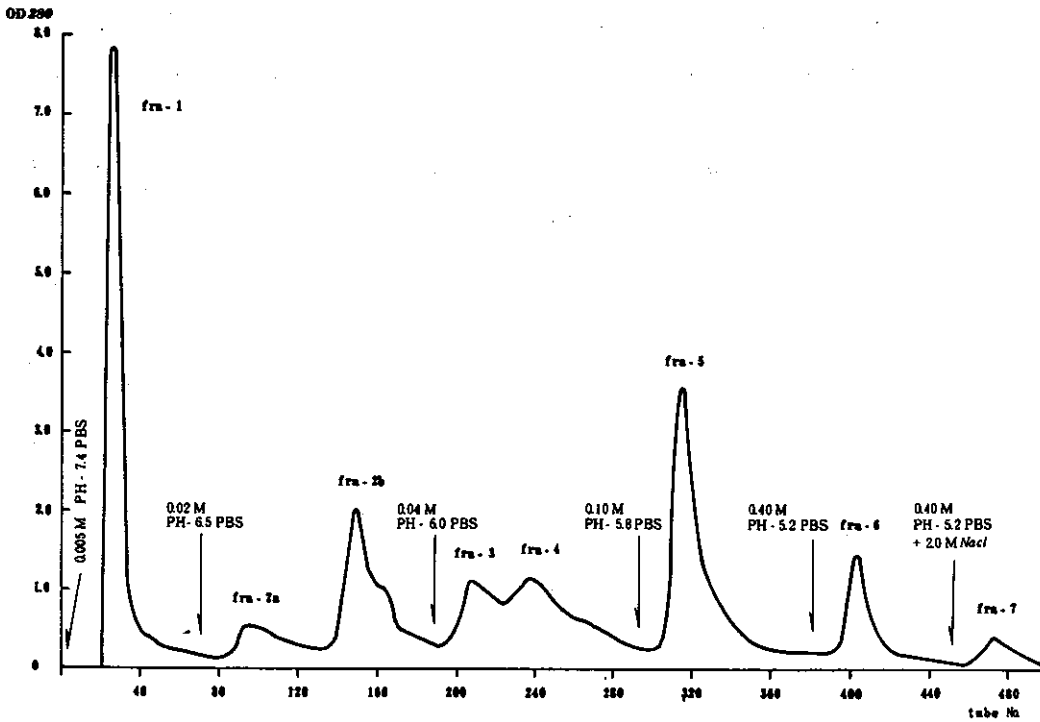


図-14 ペプシン消化→硫酸精製血清のDEAE-セルロースによる分画(馬血1201)



硫酸精製血清 50 ml を starting butter である 0.005 M, PH=7.4, PBS に一昼夜透析した後, DEAE-セルロース (5.0×30 cm カラム) を用いて毎時 225 ml の流速で step wise elution を行った。

図-13, 14 は馬 1200, 1201 血清のクロマトグラムであるが, 粗血清に比べ, fra-2b の T-グロブリンと fra-5 のアルブミンが減少し, fra-1 の r-グロブリンの割合が増加していた。

表-6 硫酸精製血清の DEAE-セルロースによる分画 (馬 1200)

	vol	total pro	mg/ml	Anti HR-I			Anti HR-II		
				total units	u/ml	u/mg	total units	u/ml	u/mg
fra-1	240	1116	4.65	12,000	50	10.7	3,600	15	3.2
fra-2b	440	638	1.45	3,080	7	4.8	4,400	10	6.9
fra-3	360	310	0.86	360	1	1.2	3,600	10	11.6
fra-4	440	374	0.85	2,200	5	5.9	2,640	6	7.0
fra-5	500	420	0.84						
fra-6	345	257	0.745						
total		3115		17,640			14,240		

表-7 硫酸精製血清の DEAE-セルロースによる分画 (馬 1201)

	vol	total pro	mg/ml	Anti HR-I			Anti HR-II		
				total units	u/ml	u/mg	total units	u/ml	u/mg
fra-1	260	884	3.4	14,820	57	16.8	5,200	20	5.9
fra-2b	520	499	0.96	6,240	12	12.5	4,680	9	9.4
fra-3	420	328	0.76	2,940	7	9.0	3,360	8	10.3
fra-4	590	469	0.80	3,540	6	7.5	4,130	7	8.8
fra-5	500	750	1.50						
fra-6	330	261	0.79						
total		3,191		27,540			17,370		

各 fraction の抗体価は表-6, 7 に示した。

馬血 1200, 1201 の粗血清では HR-I に対する抗体は主に fra-1, 2b の両 fraction に含まれていたが、ペプシン消化、硫酸精製血清では回収量のおおよそ 60% が fra-1 の γ -グロブリンに含まれていた。

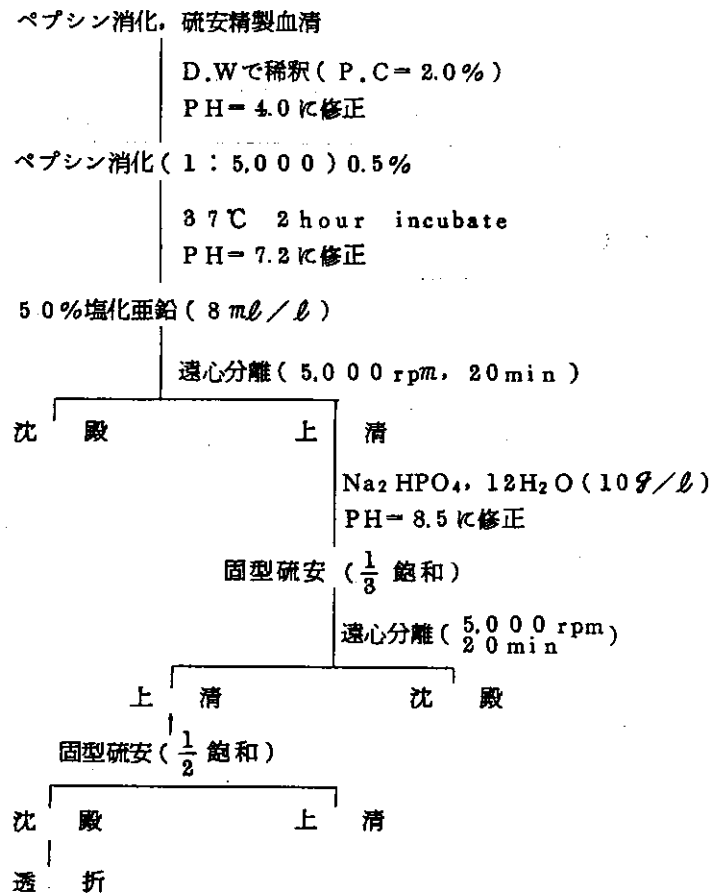
また、HR-II に対する抗体価は粗血清では主に fra-2b の γ -グロブリンに含まれていたが硫酸精製血清では fra-1~4 の 4 つの fraction にほぼ同じ割合に分布していた。

このように、粗血清に比べ精製血清では γ -グロブリンの占める割合が増加し、 γ -グロブリンの一部が α -グロブリンに移行する傾向を示したが、未だ他の fraction にも抗体価がかなり残っているため、その性質を抗毒素の精製に利用することができなかった。

3. 塩化亜鉛による抗毒素の精製

ペプシン消化→硫酸分画→DEAE-セルロースによるイオン交換法では活性が全く上昇せず、また、DEAE-セルロース処理ではパイロゲンも混入したため、本項では、蛋白変性剤である塩化亜鉛を用いて血清の精製を試みた。

図-15 塩化亜鉛による抗毒素の精製



詳しい精製の方法は図-15 に示したが、塩化亜鉛法の基本的な考え方は

- ① ペプシンを用いて血清を部分消化する。
- ② 塩化亜鉛で未消化グロブリン及び酸変性グロブリンを除去する。
- ③ 過剰の亜鉛を磷酸ニナトリウムで除去する。
- ④ 硫安で抗体を濃縮する。

であり、回収率をよくするためにはペプシン消化を充分に行うことが大切である。

したがって、ここでは出発材料であるペプシン消化、硫安精製血清をすぐに塩化亜鉛処理した場合と、ペプシンで再消化した後塩化亜鉛処理した場合とを行い両者の比活性及び回収率を比較した。

結果は表-8 にまとめたが、表中のAはすぐに塩化亜鉛処理した場合、B、Cはペプシン消化後塩化亜鉛処理した場合である。

AとB、Cの結果を比較すると、回収率は30~40%から50~70%へとかなり上昇したが、単位蛋白あたりの抗体価には殆んど差がなかった。

活性は、塩化亜鉛精製前に比べ、 $\#1199$ では1.3~1.6倍、 $\#1200$ では1.8~2.4倍、 $\#1201$ で約2倍に上昇したが $\#1201-C$ の抗体価が最も高く、抗出血価I=14.8 u/μg、抗出血価II=15.4 u/μg、抗致死価=12.0 u/μgであった。それを治療用抗毒素の蛋白濃度である50 μg/mlに換算すると、抗出血価I=740 u/ml、抗出血価II=770 u/ml、抗致死価=600 u/mlとなり、現行抗毒素の約2倍に抗体価は上昇していた。

なお、抗体価の測定には自家製の試験用毒素と使用した。

表-8 塩化亜鉛精製抗毒素の抗体価

	塩化亜鉛精製前					塩化亜鉛精製後				
	血清量	蛋白量	力価 u/ml (u/μg)			血清量	蛋白量	力価 u/ml (u/μg)		
	(ml)	(μg/ml)	抗HR-I	抗HR-II	抗致死	(ml)	(μg/ml)	抗HR-I	抗HR-II	抗致死
$\#1199-A$	50	184.0	500 (3.7)	800 (6.0)	500 (3.7)	60	30.0	139 (4.6)	300 (10.0)	
" B	80	"	"	"	"	85	23.0	100 (4.3)	300 (8.7)	118 (4.9)
" C	150	"	"	"	"	190	35.5	180 (5.1)	390 (11.0)	
$\#1200-A$	50	120.0	600 (5.0)	400 (2.8)	450 (3.8)	50	19.0	200 (10.5)	162 (8.5)	
" B	30	"	"	"	"	75	21.0	188 (8.7)	175 (8.3)	84 (4.0)
$\#1201-A$	50	114.0	800 (7.0)	800 (7.0)	594 (5.2)	60	16.0	200 (12.5)	162 (10.1)	
" B	30	"	"	"	"	70	20.0	250 (12.5)	255 (12.8)	160 (8.0)
" C	100	"	"	"	"	85	27.0	400 (14.8)	415 (15.4)	325 (12.0)

A: (ペプシン消化、硫安精製血清)→塩化亜鉛処理→硫安 $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ 飽和処理

B: (ペプシン消化)→ペプシン再消化→塩化亜鉛処理 → " "

C: 硫安精製血清

表-9は塩化亜鉛精製血清の粗毒に対する抗体価を示したものである。抗体価は、いずれの血清でも精製前のおおよそ2倍に上昇していたが、馬1201-Cの抗体価が最も高く、抗出血価=6.8 u/mg、抗致死価=4.3 u/mgであった。これを現行ハブ抗毒素(Lot 12)と比較すると、抗出血価はおおよそ4倍に上昇したが抗致死価には殆んど差がなかった。

なお、試験用毒素には1MHD=0.67mcg, 1LD₅₀=4.167mcgの乾燥粗毒を使用し、1試験毒素量は抗出血価測定用:100MHD、抗致死価測定用:3LD₅₀とした。

表-9 塩化亜鉛精製血清の粗毒に対する抗体価

	塩化亜鉛精製前				塩化亜鉛精製後			
	血清量	蛋白量	力価 u/ml (u/mg)		血清量	蛋白量	力価 u/ml (u/mg)	
	ml	mg/ml	抗出血価	抗致死価	ml	mg/ml	抗出血価	抗致死価
馬 1199-B	30	134	245 (1.8)	386 (2.9)	85	23.0	85 (3.7)	110 (4.8)
馬 1200-B	30	120	194 (1.6)	285 (2.4)	75	21.0	69 (3.3)	95 (4.5)
馬 1201-B	30	114	268 (2.4)	215 (1.9)	70	20.0	93 (4.7)	nd
" C	85	114	268 (2.4)	215 (1.9)	85	27.0	170 (6.8)	115 (4.8)
Lot 12		63	100 (1.6)	213 (3.9)				

抗出血価測定用の試験毒素:1試験毒素量=100MHD

抗致死価測定用の試験毒素:1試験毒素量=3LD₅₀

図-16~21は馬馬1200~1201の全採血血清、硫酸精製血清、塩化亜鉛精製血清の電気泳動像を示したものである。

ペプシン消化、硫酸分画血清では粗血清からアルブミンが除かれただけであったが、ペプシン再消化、塩化亜鉛処理血清では更に未消化及び酸変性グロブリンが除かれ、 γ -グロブリンを中心に他のグロブリンを一部含んだ型となっていた。

馬馬1200のペプシン再消化、塩化亜鉛精製血清では殆んどが γ -グロブリンであったが、馬馬1201の血清ではT及 β -グロブリンの割合が多く、 $\gamma:(T+\beta)=7:3$ であった。

图-16 馬61200血清(精製前)

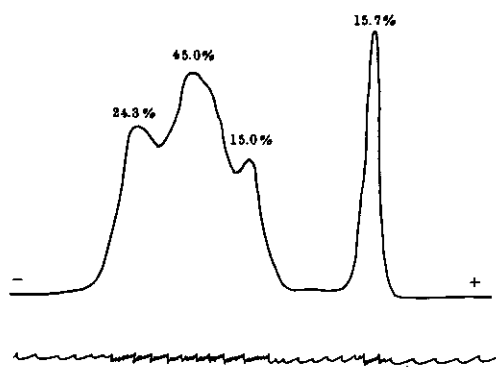


图-17 馬61200血清(硫安精製)

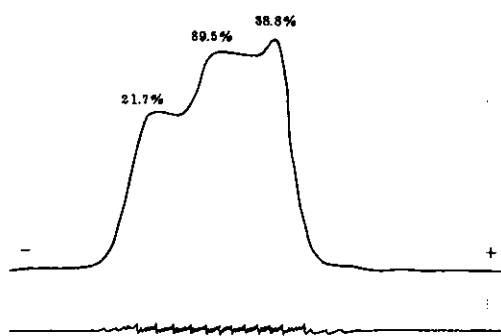


图-18 馬61200氯化亞鉛精製血清

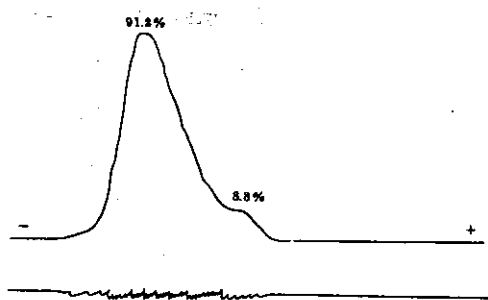


图-19 馬61201血清(精製前)

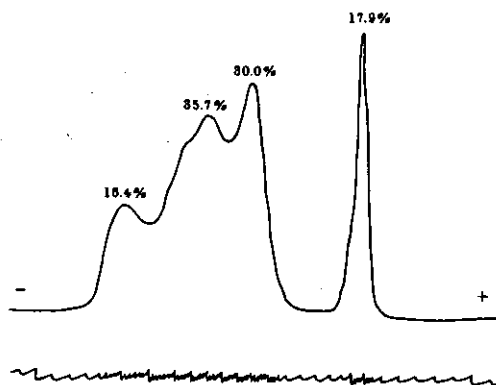


図-20 馬№1201血清(硫安精製)

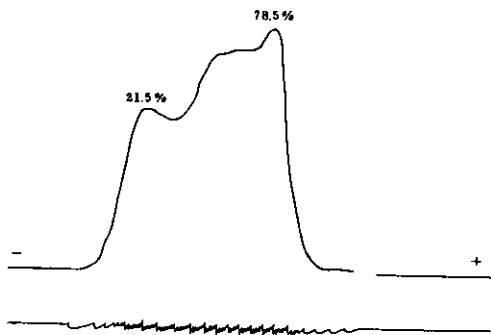
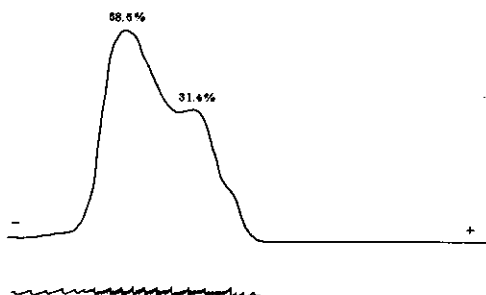


図-21 馬№1201塩化亜鉛精製血清



総括及び考察

臨床試験及び動物を用いた治療実験の材料を得るため、ペプシン消化、硫安分画、DEAE-セルロース法又は塩化亜鉛法で抗毒素の精製を行った。

まず、沖縄ハブ粗毒を用いて馬3頭(№1199, 1200, 1201)を免疫した。昨年は、貞弘等(11, 12)の方法でトキシイド化したホルモルトキシイドで基礎免疫を行ったが、今回は、基礎免疫、追加免疫共に粗毒そのままを使用した。最終的な抗体価は今回免疫した方が高かったが、馬の状態や抗体価の上がり方等には殆んど差がなくどちらの方法で免疫してもさしつかえないように思う。

試血清の抗体価は抗HR-II価のみを測定した。これまでの経験では、抗HR-I価に比べ、抗HR-II価は常に同じか低かったからである。しかし、今回免疫した№1199の血清では、抗HR-I = 395 u/ml, 抗HR-II = 730 u/ml と抗HR-II価の方がはるかに高かった。したがって、今後は両者を同時にチェックすべきであろう。

ハブ毒で免疫した血清では馬の個体ごとに抗体の分布状況が異なるため、あらかじめDEAE-セルロースの小型カラムを用いて小規模に分画し血清中の抗体の行方を確かめた後、大量の精製を行った。

№1199の血清では抗HR-I価、抗HR-II価共に大部分はγ及びT-グロブリンに含まれて

いたが、両 fraction は蛋白量も多いため比活性はさほど上昇しなかった。馬 1200, 1201 血清でも抗体の中心は T-グロブリンであったが、抗 HR-I 価は T-グロブリンを含めて α -グロブリン側へ、抗 HR-II 価は T-グロブリンを含めて β -グロブリン側へ多く分布する傾向を示している。

昨年部分精製毒で免疫した血清では、HR-I に対する抗体価は主に T 及び α -グロブリンに、HR-II に対する抗体価は主に β -グロブリンに分布していたと報告したが、今回粗毒で免疫した血清でもほぼ同じ傾向であった。

この両者の抗体分布の違いは興味のある現象ではあるが、DEAE-セルロースを用いて大量の血清を精製する場合には、目標が絞れずたいへんな障害となった。

大量の血清の精製は昨年同様ペプシン消化→硫酸分画→DEAE-セルロースによるイオン交換法で行った。

馬 1199 の血清は、DEAE-セルロースによる小分画の結果、抗体の大部分は fra-1, 2 の 2 つの fraction に含まれていたが、蛋白量が多く比活性はむしろ fra-3, 4 の方が高かったため、DEAE-セルロースによるイオン交換処理では、その 4 つの fraction をまとめて採取する条件 (0.04M PH=6.0, PBS) で溶出した。

しかし、硫酸分画、DEAE-セルロース処理を通じ抗体価は全く上昇せず、むしろパイロゲンが混入したため、他の 2 頭の馬の血清は硫酸分画で留め、その一部を抜き取り蛋白変性剤である塩化亜鉛を用いて試験的に精製を試みた。

塩化亜鉛法とは、未消化グロブリン及び酸変性グロブリンを特異的に変性除去させる方法であり、効率よく回収するためには、ペプシン消化を充分に行うことが大切である。

したがって、出発材料であるペプシン消化、硫酸精製血清をすぐに塩化亜鉛処理した場合とペプシンで再消化した後塩化亜鉛処理した場合とを行い両者の比活性及び回収率を比較した。その結果、単位蛋白あたりの抗体価には殆んど差がなかったが、回収率は後者の方がはるかに高かった。

活性は塩化亜鉛精製前に比べ 1.5~2 倍に上昇したが、馬 1201 の抗体価が最も高く、現行抗毒素の蛋白濃度である 50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ に換算すると、抗 HR-I 価 = 740 $\text{u}/\text{m}\ell$ 、抗出血価 II = 770 $\text{u}/\text{m}\ell$ 、抗致死価 = 600 $\text{u}/\text{m}\ell$ となり、抗体価は現行抗毒素の約 2 倍に上昇した。

塩化亜鉛精製血清は、粗毒に対する抗体価も同時に測定した。その結果、抗体価の最も高い馬 1201 血清は現行ハブ抗毒素 (Lot 12) に比べ、粗毒に対する抗出血価はおおよそ 4 倍に上昇しているが、抗致死価には殆んど差がなかった。

DEAE-セルロース法では抗体価の上昇は殆んど期待できず、また、パイロゲン混入の危険性もあるため、次年度は硫酸分画で留めた馬 1200, 1201 の血清を塩化亜鉛法で精製し、現行抗毒素の約 2 倍の抗体価を有する改良抗毒素を造り、臨床試験及び動物による治療実験のための材料にする予定である。

硫酸精製血清についても粗血清の時と同様DEAE-セルロースの小型カラムを用いて小規模に分画し、ペプシン消化、硫酸分画処理後の抗体の変化を検討してみた。その結果、粗血清に比べ精製血清では α -グロブリンの占める割合が増加し、 T -グロブリンの一部が α -グロブリンに移行しているようであった。しかし、未だ他の fraction にも抗体がかなり残っているため、それを抗毒素の精製に利用することはできなかった。

これらの結果から判断すれば、更に充分にペプシン消化を行えば、大部分の T -グロブリンは α -グロブリンに移行できるものと思われるが、 β -グロブリンに含まれている抗体も同様に移行させ、すべての抗体を一つの fraction に集めることができるかがDEAE-セルロース法の今後の課題であろう。次年度は血清から β -グロブリンを単離し、ペプシン消化による変化の様子を観察してみたい。

過去3年間のハブ抗毒素高度精製法の研究経過を振り返ってみると、

昭和49年度(17)

- ① より高い抗体価の抗毒素を得るために、ハブ毒よりその主要な毒成分である出血因子-I(HR-I)、出血因子-II(HR-II)を取り出し、それぞれの毒素で馬2頭を別々に免疫した。
- ② これまでの治療用抗毒素の精製法であるペプシン消化→硫酸塩析法と塩化亜鉛→DEAE-セルロースによるイオン交換法を組み合わせた方法で精製し、粗血清の6~7倍の抗体価を有する抗毒素を得た。
- ③ しかし、精製HR-I及び精製HR-II免疫で造った抗毒素を混ぜ合わせた混合抗毒素は、高単位の抗HR-I価、抗HR-II価及び抗致死価を有しているにもかかわらず、粗毒の致死作用に対する抗体価は、粗毒免疫で造った抗毒素よりはるかに劣っていた。
- ④ したがって、出血因子-I、出血因子-IIは沖繩ハブ毒のすべてを代表するものではないことが明かとなった。

昭和50年度(20)

- ① 臨床試験の材料とするために、粗毒で免疫した血清を昨年同様DEAE-セルロース法で精製し、DEAE-セルロース法の再現性の検討とイオン交換処理に伴う装置及び操作の改良を行った。
- ② その結果、操作及び装置の改良には一定の前進があったが抗体価は全く上昇せず、回収率も著しく悪かった。
- ③ 抗体価が上昇しない原因を明らかにするために、血清を系統的に分画し血清中の抗体の行方を検討した結果、馬の個体ごとに抗体の分布状況が異なることが明らかとなった。

昭和51年度

- ① 臨床試験の材料にするために、昨年同様ペプシン消化→硫酸塩析→DEAE-セルロースによるイオン交換法で精製を行ったが抗体価は全く上昇しなかった。

② DEAE-セルロース法では抗体価を上昇させることができなかったため、抗毒素の一部を抜き取り塩化亜鉛法で試験的に精製を行なった。その結果、抗体価は粗血清の1.7～2倍に上昇した。

次年度は硫安分画で留めてある抗毒素をこの塩化亜鉛法で精製し、現行抗毒素の約2倍に上昇した改良抗毒素を用いて臨床試験を行う予定である。

当初我々は、現行ハブ抗毒素の3～4倍の抗体価を有する抗毒素を目標にしていたが、血清を細かく分離し検討した結果、昭和49年度に6～7倍に上昇した血清は特殊な例であり、常にそのレベルまで上昇させることは難しく、今後は現行抗毒素の2倍を目標にしたい。

ま と め

臨床試験及び動物を用いた治療実験の材料を得るために、ハブ抗毒素の高度精製法の研究を行った。

- ① ハブ粗毒を用いて馬3頭(馬1199, 1200, 1201)を免疫した。
- ② DEAE-セルロースの小型カラムを用いて小規模に分画し、抗体の分布状況を検討した結果、馬1199の血清では抗HR-I価、抗HR-II価共に大部分は γ とT-グロブリンに含まれていた。
- ③ 馬1200, 1201血清では、HR-Iに対する抗体は主に γ とT-グロブリンに、HR-IIに対する抗体は主に β とT-グロブリンに含まれていた。
- ④ 馬1199の血清は小分画の結果を参考にしながら、DEAE-セルロース法により精製を行ったが、比活性は全く上昇せず、むしろ精製の過程でパイロゲンが混入した。
- ⑤ したがって、他の2頭の馬の血清は硫安分画で留め、その一部を抜き取り塩化亜鉛を用いて試験的に精製した結果、活性は塩化亜鉛精製前に比べ1.5～2倍に上昇した。
- ⑥ 次年度は、硫安分画で留めてある抗毒素を塩化亜鉛法で精製し、現行抗毒素の約2倍の改良抗毒素を造り臨床試験に使用する予定である。

本研究に協力して下さった松尾、清原技手をはじめ化学及血清療法研究所、第1製造部、第1課の方々に紙上より深く感謝します。

参 考 文 献

- (1) Kondo, H, Kondo, S, Ikezawa, H, Murata, R. & Ohsaka, A : Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of HABU snake venom. Japan J. Med. Sci. Biol. 13, 43-51. 1960.
- (2) 近藤 了, 近藤 久, 山本昭夫, 山内清澄, 村田良介, 中野健司, 山本碩三, 藤本政晴, 今泉清: ハブ毒のLD₅₀の測定に関する2~3の問題, 実験動物, 2(2), 1960
- (3) L. J. Reed and H. Muench: A simple method of estimating 50 per cent end-points. Amer. J. Hyg, 27, 493-497, 1938.
- (4) Tamotsu Omori-Sato, Akira Ohsaka, Satoru Kondo and Hisashi Kondo.: A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Toxicon, 5, 17-24, 1967.
- (5) Hisashi Kondo, Satoru Kondo, Seiji Sadahiro, Kiyosumi Yamauchi, Akira Ohsaka, Ryosuke Murata, Zenji Hokama and Masanobu Yamakawa.: Estimation by a new method of the amount of venom ejected by a single bite of *Trimeresurus* species; Japan J. Med. Sci. Biol. 25, 123-131, 1972.
- (6) 外間善次: ハブ(*T. flavoviridis*)の咬牙実験, 沖縄ハブ抗毒素開発研究報告書, 昭和47
- (7) Masanobu Yamakawa, Masatoshi Nozaki and Zenji Hokama.: Studies on the quantitative method for determination of edema forming activity of Habu and Sakishima Habu venoms. The snake: 5, 168-173, 1973.
- (8) 中村 弘: 抗体の構造に関する実験法, T-グロブリン, 免疫の生化学, 159~167, 1973
- (9) 中村 弘, 尾上 薫: 抗体の構造に関する実験法, 抗体の精製, 免疫の生化学, 185~196, 1973
- (10) 逢坂 昭: 出血メカニズムへの1つのアプローチ, 蛇毒出血因子の研究, 生体の科学, 26(6), 1~29, 1973
- (11) 貞弘省二, 山内清澄, 近藤 了, 近藤 久, 村田良介: 蛇毒の免疫学的研究, 日本細菌学雑誌, 20(1), 21~25, 1965
- (12) 貞弘省二: ハプトキシドに関する研究, 1. ホルマリンによるトキシド化, 日本細菌学雑誌, 26(5,6), 214~220, 1971

- (13) 曾根忠雄：ジフテリア抗毒素の免疫化学的研究, 生物物理化学, 2(8), 198~198, 1955
- (14) Omori-Sato T.: Purification and some properties of hemorrhagic principle I in the venom of *trimeresurus flavoviridis*:
Biochim. Biophys. Acta, 207, 65, 1970.
- (15) Tomoko-Takahashi and Akira Ohsaka.: Purification and characterization of a proteinase in the venom of *trimeresurus flavoviridis*;
Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity:
Biochim, Biophys. Acta, 198, 293-307, 1970.
- (16) 松岡雄治：免疫グロブリンの精製, 免疫学, アレルギー学実験法：148~165, 1971
- (17) 野崎真敏, 山川雅延, 外間善次, 吉田朝啓, 福村圭介, 六反田藤吉, 野中実男：沖縄ハブ抗毒素の製造に関する研究(I); 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書〔I〕：昭和49年
- (18) 山川雅延, 野崎真敏, 外間善次：ハブ(*T. flavoviridis*)毒の腫脹作用; 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書〔II〕：昭和49年
- (19) 山川雅延, 野崎真敏, 外間善次：沖縄ハブ抗毒素の有効性の検討(II), (ハブ抗毒素の投与量に関する基礎的考察)：沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書(II), 昭和50年
- (20) 野崎真敏, 山川雅延, 外間善次, 福村圭介, 吉田朝啓, 木原伯, 今村直彦, 山田昭, 六反田藤吉, 野中実男：沖縄ハブ抗毒素の製造に関する研究(I)：沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書(I), 昭和50年

本研究に要した研究費は昭和51年度、国庫補助より支出されました。紙上より感謝申し上げます。
本稿は昭和51年度沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書に掲載されたものです。