

# 新規標的毒成分 (flavoxobin, CTF 及び Phospholipase A2) 研究 及びハブ類毒迅速検出キット研究の概要

仲間幸俊・盛根信也\*<sup>1</sup>・照屋盛実・安座間安仙・寺田考紀・喜屋武向子  
玉城志博\*<sup>2</sup>・新川武\*<sup>2</sup>

## Research on Novel Target Venom Components (flavoxobin, CTF and Phospholipase A2) from Habu-snake and Research on Rapid Detection Kit of Venom from Habu-snakes; an Overview

Yukitoshi Nakama, Nobuya Morine\*<sup>1</sup>, Morimi Teruya, Yasuhito Azama, Kouki Terada,  
Hisako Kyan, Yukihiro Tamaki\*<sup>2</sup> and Takeshi Arakawa\*<sup>2</sup>

**要旨：**我々は平成 29 年度から令和 3 年度まで、新規標的毒成分 (flavoxobin, CTF 及び Phospholipase A2) として生物学的製剤基準に規定された規定毒以外に抑制すべきハブ毒成分の研究に取り組んだ。また、ハブ類毒迅速検出キットの研究を並行して実施した。この研究により Phospholipase A2 は規定毒以外の成分で中和すべき成分であると結論した。一方で規定毒と Phospholipase A2 を中和しても致死活性が残存した。また、沖縄県内に生息するハブ類 4 種 (ハブ、ヒメハブ、サキシマハブ、タイワンハブ) の毒成分を検出可能なハブ類毒迅速検出キット 4 種を試作し、その感度及び特異性を確認した。その結果、検出キット 4 種を組み合わせることでハブ類毒 4 種の判別が可能になった。

**Abstract:** From FY2009 to FY2021, we have been studying novel target venoms (flavoxobin, CTF, and phospholipase A2) that should be suppressed in addition to the prescribed venoms specified in minimum requirements for biological products. In addition, a rapid detection kit for four species of habu (*Protobothrops flavoviridis*, *Ovophis okinavensis*, *Protobothrops elegans*, and *Protobothrops mucrosquamatus*) venoms was also studied. This study concluded that Phospholipase A2 is a component that should be neutralized by components other than the prescribed venoms. On the other hand, lethal activity remained even after neutralization of the prescribed venom and phospholipase A2. In addition, four rapid detection kits for four species of habu venoms inhabiting Okinawa Prefecture were developed, and their sensitivity and specificity were confirmed. The combination of the four kits made it possible to discriminate the four species of habu venoms.

**Key words:** ハブ, *Protobothrops flavoviridis*, ヒメハブ, *Ovophis okinavensis*, サキシマハブ, *Protobothrops elegans*, タイワンハブ, *Protobothrops mucrosquamatus*, 抗毒素, antivenom, 致死活性試験, lethal activity test, batimstat, varespladib, 迅速検出キット, rapid detection kit

### I はじめに

沖縄県には猛毒を有するハブ (*Protobothrops flavoviridis*), ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*), サキシマハブ (*Protobothrops elegans*) 及びタイワンハブ (*Protobothrops mucrosquamatus*) のハブ類 4 種が生息し、年間 60 件程度の咬症が発生している。ハブ類咬症は、咬症の直接的な影響のみならず、重篤な後遺症の影響、そして、ハブ類の存在自体が県民や観光客に対し、少な

らず心理的・経済的脅威を与えている可能性が指摘されている<sup>1)</sup>。当所ではハブ対策の一環として、ハブ抗毒素の研究並びにハブ類毒の迅速検出法の研究を進めてきた。本稿では、平成 29 年度から抗ハブ毒ヒト抗毒素の実用化事業で実施した「新規標的毒成分に関する研究」及び「ハブ類毒迅速検出キットの研究」について報告する。

\*<sup>1</sup> 現所属：保健医療部中部保健所, \*<sup>2</sup> 国立大学法人琉球大学熱帯生物圏研究センター。

## 1. 新規標的毒成分に関する研究

ハブ咬症の治療には「はぶウマ抗毒素（以下、抗毒素とする）」が用いられる。抗毒素は、ウマにハブ毒を免疫して得られる血清を製剤化した医薬品であり、生物学的製剤基準<sup>2)</sup>により、その製造法や品質管理等が定められている。同基準では抗毒素の製造時に、致死・出血I毒（以下、規定毒とする）の中和効果を確認することとされている。規定毒は金属プロテアーゼの一種であり、その成分はHR1a及びHR1bの2種が存在する<sup>3)</sup>。

盛根らは規定毒成分2種を抗原としてヒト抗体を作製し、これらが1.5LD<sub>50</sub>のハブ粗毒を用いたマウス致死活性試験において、抗毒素と同等の力価を持つことを確認した<sup>4)</sup>。しかし、「ヘビ毒抗毒素の製造と品質管理に関するWHOガイドライン<sup>5)</sup>」では、3-6LD<sub>50</sub>の粗毒に対する効果の確認が求められており、3LD<sub>50</sub>の粗毒を用いた試験においては抗毒素に及ばない結果となった<sup>4)</sup>。開発したヒト抗体は規定毒の特定の成分を中和するモノクローナル抗体であり、規定毒以外の成分に対しては中和効果を有しないと考えられる。そのため高用量に毒が投与されたことで、規定毒以外の成分がマウスに対する致死量を超えたことが原因であると推測された<sup>4)</sup>。

ハブ毒は様々な酵素及びペプチド等からなる複雑な混合物である。規定毒以外にも、多様な金属プロテアーゼやセリンプロテアーゼ、Phospholipase、Cタイプレクチン様タンパク、ヒアルロニダーゼ等が様々な存在し、高度に多様化していることが知られている。また、これらの成分は各々異なる毒性を呈する<sup>6,7)</sup>。

過去に当所において野崎らはマウス致死活性やウサギ背皮の出血活性を基にハブ粗毒の分画研究を行ってきた。その中で沖縄産のハブ毒から規定毒を分離した残りの画分に、強いマウス致死活性があることを明らかにし、その画分をH2-0画分とした<sup>8,9)</sup>。後にH2-0画分からflavoxobinおよびCTFが分離されている<sup>4)</sup>。

flavoxobinは、セリンプロテアーゼの一種でありハブ毒の主要な毒構成要素である<sup>7)</sup>。CTFは強い細胞毒性がある成分として分離され、後にディスインテグリンであることが判明している<sup>7,10)</sup>。またPhospholipaseA2（以下、PLA2とする）は、ハブ毒成分の中で最も高い存在比を占めることが報告されており<sup>7)</sup>、ハブ毒の主要な構成要素である。

本研究では、flavoxobin、CTF及びPLA2を新規標的

毒成分とし、各々を中和した時のマウス致死活性への影響を確認することで、規定毒に加えて中和を考慮すべき成分を特定することを目的とし種々の検討を行った。

## 2. ハブ類毒迅速検出キットの研究

沖縄県には危険な毒ヘビであるハブ、ヒメハブ、サキシマハブ及びタイワンハブが生息している。特に沖縄島にはこの4種が混在しており、各々の種について咬症被害が発生している。しかし、ヘビ咬傷時において咬症患者自身が加害生物を見ていないことが多く、見ていたとしても咬症患者からの聞き取りのみで加害ヘビ種を特定することは困難である<sup>11)</sup>。当所では医療機関における診断や治療の改善に資するため、加害ハブ種を特定するための研究を進めてきた。

咬症患者の血液や尿からヘビ毒を検出する試みはいくつか報告されている。例えば、オーストラリアでは、その地域の主要な毒蛇であるタイガースネーク、ブラウンスネーク、ブラックスネーク及びタイパンを判別するキットが診断用として実用化されている。当該キットは牙痕のぬぐい液や尿中からサンドイッチEIA法により毒成分を検出するものである<sup>12),13)</sup>。また、近年はより簡便な操作により検出が可能なラテラルフローストリップによるイムノクロマトキットが注目されており、例えば、台湾ではクサリヘビ科ヘビとコブラ科ヘビの咬症判別用に研究開発の報告がある<sup>14)</sup>。当所では過去にELISA法を用いて咬症患者の血液や咬症部位の組織中からハブ毒を検出する方法について研究を行っており、これらの試料中からハブ毒をng(10<sup>-9</sup>g)オーダーの感度で検出可能であることを報告してきた<sup>15)-17)</sup>。さらに、サンドイッチELISA法及びイムノクロマト法を用いたハブ類毒迅速検出法について開発研究を進め、ハブ毒及びタイワンハブ毒検出キットを試作した実績がある<sup>18),19)</sup>。

本研究では、迅速かつ簡便に咬傷部位から採取可能な生体試料を用いて加害ハブ類種の判別を可能とする技術の確立を目的とした。操作及び判定が簡便なラテラルフローストリップを用いたイムノクロマトキットを試作し、ハブ類毒4種の判別を目指した。

## II 研究計画と方法

### 1. 新規標的毒成分に関する研究

新規標的毒成分3種を中和した時のマウス致死活性

に対する影響を確認するため、図1に示したスキームで研究を計画した。

まず、ハブ粗毒から新規標的毒成分3種を分離・精製し、得られた毒成分を各々ウサギに免疫した。免疫したウサギの血清を採取後、血清中の抗体を精製し、各成分に対するうさぎポリクローナル抗体を得た。精製した各抗体について試験管内試験により、対応する成分に対する中和能を確認した。一方、規定毒について抗体以外の方法で中和する方法を検討した。阻害剤として batimastat を用いた。阻害剤 batimastat と各成分に対するうさぎポリクローナル抗体を用いたマウス致死活性試験を行い、新規標的毒成分を中和する効果について検討した。また、新規標的毒成分についても、必要に応じて阻害剤の利用を検討し、PLA2 の阻害剤として varespladib を用いた試験を行った。

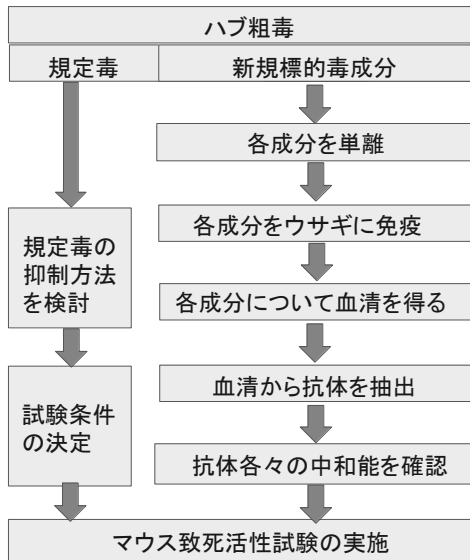


図1. 新規標的毒成分研究のスキーム。

2. ハブ類毒迅速検出キットの研究

ハブ類迅速検出キットを試作するため、図2に示したようなスキームで研究を計画した。本研究は琉球大学熱帯生物圏研究センターと共同で実施した。

まず、各ハブ粗毒から抗原の候補となる成分を分離・精製し、マウスに免疫することで脾臓細胞からハイブリドーマを作出した。その後、得られた多数のハイブリドーマ株由来の抗体について、各種ハブ毒抗原との結合力や特異性に基づき選抜した。結合力が弱い場合や特異性が低い場合は、抗原の再選択やハイブリドーマの再選抜等実施した。最後に選抜した抗体を用

いてイムノクロマトキットを試作し、その感度（検出可能な毒濃度範囲）及び特異性（他のヘビ毒との交叉反応性）を確認した。

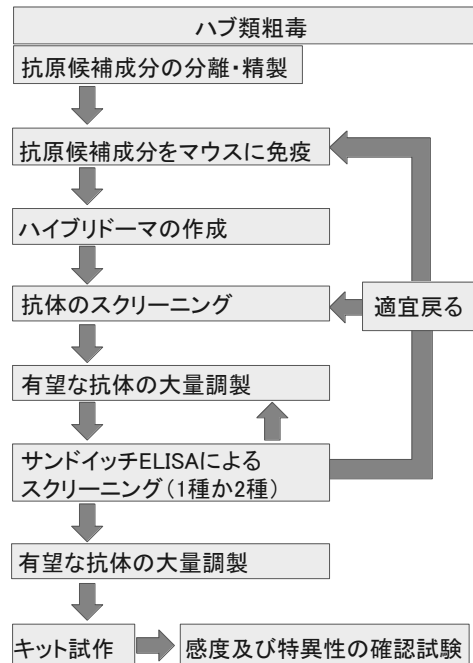


図2. ハブ類毒検出キット研究のスキーム。

III 結果

1. 新規標的毒成分に関する研究

新規標的毒成分 flavoxobin, CTF 及び PLA2 を分離精製し、ウサギに免疫することで、各成分を中和するポリクローナル抗体が得られた。さらに規定毒を抑制するための阻害剤の研究にも取り組み、マウス致死活性試験条件を確立した。確立した条件下で各種うさぎポリクローナル抗体を用いたマウス致死活性試験では、48 時間後の致死率に影響しなかった。また、PLA2 についてはそのアイソザイムの存在から、抗 PLA2 うさぎポリクローナル抗体の必要量に疑義が生じたため、幅広く PLA2 とそのアイソザイムを阻害できる阻害剤 varespladib を用いてマウス致死活性試験を行った。その結果、PLA2 を中和した群は対象群と比較して致死率が大幅に低下した。よって PLA2 は中和を考慮すべき成分と考えられる。しかし、規定毒に加え、PLA2 を阻害しても尚マウス致死活性が残存した。

各実験結果の詳細を以下に示す。

(1) ハブ毒中の新規標的毒成分の分離精製及び各成分に対するうさぎポリクローナル抗体の作成

ハブ毒中から新規標的毒成分 3 種の各成分を分離精製し、ウサギに免疫しその血清を得た。血清中の抗体をプロテイン G アフィニティーカラムを用いて精製し、試験用の各種うさぎポリクローナル抗体とした。

(2) 各種うさぎポリクローナル抗体の新規標的毒成分各種に対する中和能の検討

(1)で得られたうさぎポリクローナル抗体の各成分に対する中和能を試験管内試験により確認した。得られた抗体は、3 種ともに続く動物試験に適用できる十分な中和能を有する結果であった。

(3) 規定毒の抑制方法の検討と試験条件の確立

規定毒成分は活性中心に亜鉛イオンを有するメタロプロテアーゼと呼ばれる酵素である<sup>3)</sup>ため、メタロプロテアーゼ阻害剤<sup>20)</sup>である batimastat を用いた。試験条件決定のため、試験管内試験による予備試験を行った。ハブ毒の規定毒と、阻害剤 batimastat を混合し、プロテアーゼ活性阻害試験により中和能を確認したところ、良好に中和することを確認した。また、ハブ粗毒中の規定毒成分の中和能も確認した。さらに、新規標的毒成分 3 種に対しては、flavoxobin 活性阻害試験、PLA2 活性阻害試験及び CTF 阻害試験を行い、batimastat が阻害作用を示さないことを確認した。

次に batimastat を用いたマウス致死活性試験の試験条件の確立を行った。試験管内試験により得られた規定毒を阻害するために必要な batimastat 濃度と、マウス致死に必要なハブ粗毒量の関係をマウス致死活性試験により求めた。その結果、ハブ粗毒量を 4LD50 用い、batimastat は試験管内試験により求めた結果の 1.5 倍量である 87.5 nmol を用いることとした。

(4) 新規標的毒成分 3 成分に対するうさぎポリクローナル抗体を用いたマウス致死活性試験

抗 flavoxobin、抗 CTF、抗 PLA2 うさぎポリクローナル抗体 3 種それぞれを用いたマウス致死活性の確認試験をそれぞれ行った。粗毒のみを投与した群、粗毒・batimastat を投与した群、ハブ粗毒・batimastat・抗体各種を投与した群の 48 時間後の死亡率を比較した。それぞれの試験及び群について 4 週齢のマウス 10 匹ずつを用い、腹腔内に投与した。各群の死亡率を表 1 に示した。

いずれの抗体を用いた場合においても、ハブ粗毒・batimastat・抗体各種を投与した群は、粗毒・batimastat を投与した群と死亡率に大きな差はなかった。

以上の結果より、うさぎポリクローナル抗体を用い

たマウス致死活性試験において、新規標的毒成分を中和する効果を確認できなかった。

表 1. マウス致死活性試験における死亡率。

試験名及び投与群名	死亡率(%)
<b>flavoxobin 中和試験</b>	
粗毒群	80
粗毒・batimastat 群	60
粗毒・batimastat・抗体群	60
<b>CTF 中和試験</b>	
粗毒群	80
粗毒・batimastat 群	100
粗毒・batimastat・抗体群	80
<b>PLA2 中和試験</b>	
粗毒群	80
粗毒・batimastat 群	70
粗毒・batimastat・抗体群	70

(5) PLA2 の阻害を目的とした阻害剤の検討

ハブ毒中の PLA2 について、構造がよく似たアイソザイムが存在し、その一部はリン脂質の切断能力が低いことが報告されている<sup>9)</sup>。我々はリン脂質基質を用いた試験管内試験により投与量を見積もっていたため、基質の切断能力が低いアイソザイム量が見積もれず、抗体投与量が不足していた可能性があると考えられ、抗 PLA2 うさぎポリクローナル抗体を用いない系の構築が必要であった。そこで、PLA2 とそのアイソザイムに対し、幅広く作用することが報告されている阻害剤 varespladib<sup>21)</sup>を用いた試験条件決定のため予備試験を行った。

ハブ粗毒に対し、varespladib 存在下で、プロテアーゼ活性阻害試験、flavoxobin 活性阻害試験及び PLA2 阻害試験を行った。また、varespladib 存在下で CTF 阻害試験を行った。varespladib はハブ粗毒中の PLA2 活性を 96.5%失活したのに対し、プロテアーゼ活性及び flavoxobin 活性を阻害しなかった。また、PLA2 活性を阻害する濃度において、CTF の阻害効果も確認されなかった。

以上のことから、varespladib はマウス致死活性の確認試験に使用することができ、その濃度はハブ毒 4LD50 に対して、178 nmol と算出した。

(6) 新規標的毒成分 PLA2 に対する varespladib を用いたマウス致死活性試験

ハブ粗毒・batimastat・varespladibを投与した群，粗毒のみを投与した群の50時間後の死亡率を比較した。5週齢のマウスを各群8匹ずつ用い、腹腔内に投与した。各群の死亡率を表2に示した。ハブ粗毒・batimastat・varespladibを投与した群は，粗毒のみを投与した群と比較して死亡率の大幅な低下が見られた。以上のことから，PLA2は中和を考慮すべき成分であると結論した。しかし，規定毒及びPLA2を抑制しても尚，ハブ粗毒中にはマウス致死活性が残存した。

表2. varespladibを用いたマウス致死活性試験の結果。

群名	死亡率 (%)
粗毒群	100
粗毒・batimastat・varespladib群	37.5

2. ハブ類毒迅速検出キットの研究結果

ハブ類毒迅速検出キットの研究では，ヒメハブ及びサキシマハブ粗毒から適当な抗原を選び出し単離した。これら抗原を用いてハイブリドーマを作出し，抗体を得た。得られた抗体を用いてキット化し，ハブ，台湾ハブ，ヒメハブ及びサキシマハブキットの試作が完了した。また，それぞれのキットの感度及び特異性の確認試験を実施しさらに，用いた抗体のアイソタイプ，サブタイプ及び軽鎖を同定した。

各実験の詳細を以下に示す。

(1) 抗原候補成分の単離

サキシマハブ粗毒より抗原候補成分であるelegaxobin及びSV-PAD-2を分離・精製し，elegaxobin及びSV-PAD-2の精製に成功した。

(2) ハイブリドーマの作成と抗体スクリーニング

ヒメハブ毒PLA2，サキシマハブ毒elegaxobin及びSV-PAD-2をそれぞれマウスに免疫し，ミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを得た。ヒメハブ毒PLA2は，過去に当所で精製したものをを用いた。

ハイブリドーマが産生する抗体の結合性や特異性を判定するため，スクリーニングを行い，サキシマハブ毒検出キットに用いる抗原はSV-PAD-2に決定した。さらに，ハイブリドーマの株数としてヒメハブ毒キット用に3種，サキシマハブ毒キット用に7種選抜した。

(3) サンドイッチELISA法による抗体スクリーニング

サンドイッチELISA法を用いて，より抗原成分との結合性が強く，特異的な抗体を選抜した。

(4) マウス腹水法による抗体の大量調製

マウス腹水法により，キット試作に必要な抗体量を得た。得られた抗体はプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより分離した。

(5) キットの試作

(4)で得られた抗体を用いて，イムノクロマトキットを試作した。

(6) キットの感度及び特異性の確認試験

試作したキットの感度及び特異性の確認を行った。キットの感度は表3のとおりであった。また，特異性については，ハブ，台湾ハブ及びヒメハブ毒検出キットにおいて高く，抗原に用いた毒以外のハブ類の毒はいずれも陰性を示した。しかしながら，サキシマハブ毒検出キットについてはいずれのハブ類毒についても陽性を示し，特異性が低い結果となった。

表3. ハブ類毒迅速検出キット各種の検出感度。

キット種類	感度 (各粗毒 mg/mL)
ハブ	0.32-1000
台湾ハブ	1.6-200
ヒメハブ	1-10
サキシマハブ	300-5000

(7) キットに使用した抗体の同定

キットに使用した抗体のアイソタイプ，サブタイプ及び軽鎖を同定した。なお，サキシマハブ毒検出キットに用いた抗体については，軽鎖のみ同定が可能であった。各抗体の同定結果を表4に示した。

表4. 各抗体のアイソタイプ及び軽鎖。

ハブ類種名	抗体名	アイソタイプ	軽鎖
ハブ	HR1a-1102-16	IgG1	κ鎖
	HR1a-1102-17	IgG2a	κ鎖
台湾ハブ		IgG1	κ鎖
ヒメハブ	YHT-BHP03	IgG1	κ鎖
	YHT-BHP12	IgG1	κ鎖
サキシマハブ	No.26	-	κ鎖
	No.35	-	κ鎖

## IV 結論

新規標的毒成分として選定した flavoxobin, CTF 及び PLA2 の中で、少なくとも PLA2 は中和を考慮すべき成分であると結論した。

ハブ、タイワンハブ、ヒメハブ及びサキシマハブ毒の判別を目的としたイムノクロマトキットを試作し、キット4種を組み合わせることで、ハブ類毒4種の判別が可能になった。

## V 今後の課題及び展望

### 1. 新規標的毒成分研究の課題及び展望

新規標的毒成分の研究により、規定毒に加えて PLA2 を中和することによりマウスの死亡率が低下することを明らかにし、中和を考慮すべき成分であると結論した。高用量のハブ毒を用いたマウス致死活性試験において、死亡率を大きく低減する標的成分を示すことができた。

Koh らは長期的なヘビ咬症治療の展望について、ヒトモノクローナル抗体をベースとした抗毒素を用い、治療効果の改善や救命率の上昇が見込めるとしている<sup>22)</sup>。ヒト抗体は単一の抗原に特異的なモノクローナル抗体として製造されるため、複雑なタンパクの混合物であるヘビ毒に対しては複数製造する必要がある。本研究の成果により、ハブ毒成分中の中和を考慮すべき成分が明らかになったことで、ヒト抗体の開発がより進展していくものと考えられる。

### 2. ハブ類毒迅速検出キット研究の課題及び展望

ハブ類毒迅速検出キットを沖縄県に生息するハブ、タイワンハブ、ヒメハブ及びサキシマハブ毒について試作した。それぞれの毒を検出することに成功し、キット4種を組み合わせることで、ハブ類毒4種の判別が可能になった。

また、キット4種の検出感度については表3のとおりであり、それぞれ異なっている。キットの実用化のためには検出感度の設定が必要である。しかし、咬症患者の血中や咬症部位に残存するヘビ毒量については、咬症時の毒注入に関する不確定要素が多く<sup>23)</sup>、また、咬症発生からの時間経過により変化すると考えられている<sup>24)</sup>ため、統一的な見解がない状況にある。今後は、ハブ類咬症患者の血中毒量データを蓄積することにより必要な検出感度の設定と、その条件に合わせたキットの改良などの追加研究が必要であり、その目

的のためには各医療機関との連携が不可欠であると考えられる。

## VI 参考文献

- 1) 池原貞雄, 阿部琢哉, 宮城康一, 城間侔 (1978) ハブ生息域実態調査 沖縄特殊有害動物駆除対策基本調査報告書, 1-56.
- 2) 生物学的製剤基準. 平成16年3月30日 厚生労働省告示 第155号, 最終改正: 令和3年12月23日 厚生労働省告示 第410号.
- 3) E. Oyama and H. Takahashi (2017) Structures and functions of snake venom metalloproteinases (SVMP) from *Protobothrops venom* collected in Japan. *Molecules*. 22 1305.
- 4) 盛根信也, 大城聡子, 泉水由美子, 久高潤(2016)抗ハブ毒ヒト抗毒素研究の概要について 沖縄県衛生環境研究所報, 50:57-61
- 5) Annex 5 Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No.964.
- 6) 上田直子, 千々岩崇仁, 大野素徳(2004)ハブ毒を科学する多様な生理機能と加速進化, 化学と生物, 42(10): 687-693.
- 7) S. D. Aird, *et al.*(2013) Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genomics*. 14:790.
- 8) 山川雅延, 野崎真敏, 富原靖博(1983)ハブ毒精製画分 (HR-1, HR-2, H2-0) の相互増強作用, 昭和57年度抗毒素研究報告書 (I), 25-28.
- 9) 野崎真敏, 山川雅延, 富原靖博(1983)致死活性成分 (H2-0) の精製の試み, 昭和57年度抗毒素研究報告書 (I) 29-40.
- 10) T. Omori-Satoh, *et al.*(1986) Purification and characterization of cytotoxic factors in the venom of the Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon*. 24:1045-1053.
- 11) 福地斉志, 喜屋武向子(2020)沖縄県における令和元年(2019年)の毒蛇咬症, 令和元年抗毒素研究報告書 15-28.
- 12) J. C. Cox, *et al.* (1992) A novel format for rapid sandwich EIA and its application to the identification of snake venoms. *Journal of Immunological Methods*. 146:213-218.
- 13) S. K. Sutherland. (1992) Antivenom in Australia. *The Medical Journal of Australia*. 157:734-739.

- 14) Chien-Chun Liu, *et al.* (2018) Development of sandwich ELISA and lateral flow strip assay for diagnostic clinically significant snakebite in Taiwan. *PLOS Neglected Tropical Disease.*, 12:e0007014.
- 15) 野崎真敏, 富原靖博, 山川雅延(1986)特殊抗毒素の研究(3) ELISAによる局所筋肉中のハブ毒の定量(2)―局所における抗毒素の中和効果について―, 昭和60年度抗毒素研究報告書 20-27.
- 16) 野崎真敏, 富原靖博, 山川雅延(1990)ELISAのハブ毒研究への応用, 平成元年抗毒素研究報告書, 15-22.
- 17) 野崎真敏(1993)ELISAによる患者浸出液中の毒素量の測定, 平成4年度抗毒素研究報告書, 16-19.
- 18) 大城聡子, 泉水由美子, 盛根信也, 寺田考紀(2015)タイワンハブ毒の迅速検出の検討 沖縄県衛生環境研究所報, 49:56-60.
- 19) 大城聡子, 松田聖子, 泉水由美子, 盛根信也, 寺田考紀(2018)沖縄県産ハブ (*Protothrops flavoviridis*) 毒の毒性成分 HR1A の検出方法, 沖縄県衛生環境研究所報, 50:38-41.
- 20) Francisco Chacón, *et al.* (2015) The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon.* 93:41-50.
- 21) M. Lewin, *et al.* (2016)Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibition of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins.* 8:248.
- 22) C. Y. Koh, *et al.* (2020)Repurposed drug to the rescue of snakebite victims. *Science Translational Medicine.* 12:eabb6700.
- 23) M. B. Pucca, *et al.* (2020) Current knowledge of snake dry bite. *Toxins.* 12:668.
- 24) K. P. Maduwage, *et al.* (2020) Enzyme immunoassays for detection and quantification of venoms of Sri Lankan snakes: Application in the clinical setting. *PLOS Neglected Tropical Disease.* 14:e0008668.