

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
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
六反田 藤 吉
野 中 実 男

はじめに

ハブ咬傷の治療に際しては通常20ml (6,000単位)、特に重傷と思われる場合には40ml (12,000単位)の抗毒素が投与されている。

しかし、昭和49年度の報告書でも述べたように、一回の咬傷で注入される毒量は一様でなく、外間の咬牙実験(6)を一つのモデルと考えれば、予想をはるかに上まわる量の毒が注入されるケースもありうるため、それだけの抗毒素量で充分中和できるかどうか疑問である。このような場合には抗毒素の量を増やしていけばよいわけであるが、抗毒素は、所詮馬の血清から造られたものであり、血清病やアレルギー等の副作用を考えた場合おのずと投与量に限界がある。

したがって、今年度も昨年に引きつづき低い蛋白量で高い抗体価を有する抗毒素の大量製造の方法を確立するため研究を進めた。

現在使用している治療用ハブ抗毒素は、ペプシン消化→硫酸塩析法により精製されているが、この方法は血清中のグロブリン群をまとめて採取するものであり、抗体とは直接関係のない不活性蛋白もかなり含まれているため抗体価は期待した程上昇しなかった。これまでの経験では、粗血清の2～3倍が限度であった。

我々は、昨年報告書の中でペプシン消化→硫酸塩析法に加え、DEAE-セルロースによるイオン交換処理を行えば、免疫グロブリンが他の不活性蛋白から効率よく分離され、抗体価も粗血清の6～8倍まで上昇させ得ることを報告した。

しかし、この方法を実際の製造工程に加えるまでには、未だいくつかの操作上の問題点が残されている。

- ① 脱塩及び緩衝化：硫安分画後の脱塩処理にはSephadex G-25 (10×85 cmカラム)を用いたが、1回の処理量が限られており、大量の場合には数回に分けて行なわなければならなかった。したがって、大量をもっとスピーディに処理できる方法を考案する必要がある。
- ② 濃縮：DEAE-セルロースカラムより溶出される抗毒素液は、非常に濃度が低いため硫安で再沈殿させて濃縮したが、この場合、もう一度脱塩処理を行なわなければならなかった。したがって、もっと効率のよい濃縮法を考案する必要がある。
- ③ 無菌操作：カラムを用いると操作が繁雑になり、雑菌及びパイロゲンの混入が最も心配される。操作中はもちろん、用いる試薬、器具類を如何にしてパイロゲンフリーにするか等である。

したがって、今年度はこれらの操作、特に脱塩・緩衝化及び濃縮の方法を簡素化すると共に、昨年良好な成績を得た、硫安分画→DEAE-セルロース法の再現性を検討して、高単位ハブ抗毒素の大量製造の方法を確立することを目的に研究を行なった。

実験材料及び実験方法

- (1) ハブ粗毒の採集：メートルグラス(200 ml)の口にビニール製の膜(厚さ0.3 mm)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2,000 rpm, 8 min 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等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) ハブ粗毒の精製：佐藤・高橋等の方法(15)によりHR-I, HR-II及びH₂₋₀画分を精製した。

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及びH₂₋₀を得た。H₂₋₀とは、その際吸着されずに素通りする、マウスでは出血、腫脹及び致死作用を示すが、ウサギ背皮では殆ど出血作用を示さない画分のことである。

これらの精製毒は凍結乾燥保存し、試験用毒素及び馬の免疫用抗原として使用した。

- (3) 蛋白質量の測定：ハブ毒及び馬血清の蛋白質量はOD₂₈₀を測定し、ハブ粗毒 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 1.54 \text{ OD}_{280}$ 、馬血清 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 1.24 \text{ OD}_{280}$ として計算した。
- (4) 毒力試験：出血作用は近藤等(1)のウサギ背皮法、腫脹作用は山川等(7)のマウス足蹠重量法により測定した。致死作用はマウスの尾静脈注射法により測定し、LD₅₀はLeed & Muench法(3)で計算した。
- (5) 免疫用トキシイドの調製：貞弘等の方法(12)により調製した。粗毒及びH₂₋₀液では、ホルマリン0.2%量を1日おきに3回総量0.6%を添加し、HR-II液では、ホルマリン0.2%量を1回添

加した。不活化は37°Cの孵卵器中で行った。各液は $\frac{M}{30}$, PH=7.0 , P.B.S に透析してホルマリンを除去した後、ミリポアGSフィルターで除菌した。最終製品の蛋白量は、粗毒素キソイド=1.0 $\frac{mg}{ml}$, H₂-0 トキソイド=1.0 $\frac{mg}{ml}$, HR-II トキソイド=4.4 $\frac{mg}{ml}$ であった。

H₂-0 トキソイドは0.2 ml をマウス大腿部筋肉内に注射すると多少の出血を認めたが、マウスの尾静脈注射では5匹全部が生残った。HR-II トキソイドは、ウサギ皮内における出血斑ではほぼ10分_の1に減毒されていた。

各毒素キソイドは、寒天ゲル内沈降反応を行ない、沈降線が大きく乱れていないことを確かめた。

- (6) 馬の免疫及び全採血：各馬の免疫方法は表1~4に示してあるが、主として、基礎免疫はフロイントのアジュバントと(5)で調製した毒素キソイドを混合して注射し、50~55日後から7~10日間隔で同毒素キソイドまたは減毒前の毒素で追加免疫を行った。

No 23, 1.182, 1.183の全採血は1 l 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日後に血清を分離した。No 22は、血液にクエン酸ソーダを最終濃度が0.5%になるように加え、2日後に血漿を分離した。

- (7) 抗毒素の精製：No 22, 23の血清は、昨年精製実験で最も成績のよかった方法(硫酸分画→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。(17)

しかし、この方法は脱塩・緩衝化及び濃縮にかなりの時間を要するため、No 1.182の精製には、脱塩・緩衝化に人工腎臓、濃縮にPANホローファイバー(限外濾過装置)を用いた。(このことに関しては後で詳しく述べる。)また、DEAE-セルロースの洗浄及び緩衝化にはサラネット籠を使用した。これを用いると大量のセルロースを一度に処理することができる。

それと並行して、血清中の各 fraction の抗体分布を検討するため、Sober 及び Peterson の方法(16)により、小規模に血清の分画を行った。(このことについても後で詳しく述べる。)

- (8) 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なった。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、検体が多かったため、試験用毒素は(2)で製造した自家製のものを使用した。標準抗毒素は、抗出血価の測定には予研製のものを使用し、抗致死価の測定には、自家製の Lot 14 を対照として使用した。

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

抗腫脹価(HR-I)測定用：20MED

- (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

いて電気泳動を行なった。ペロナルバッファー（PH=8.6 イオン強度0.06）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、ポンソー3Rで染色しデンシトメトリーを行なった。

実 験 成 績

I 馬の免疫及び全採血

各馬の免疫表及び採血量等については表1～4に示した。

表-1

馬No.22 免疫表（HR-I+HR-II免疫）

免疫 日数	接種量 mg	試血 (μ/ml)		備 考
		抗HR-I	抗HR-II	
1日	92			アジバント+HR-IIトキシイド
66	2.4			HR-IIトキシイド
73	4.7			"
81	140		20	"
92	0.4		35	HR-II毒
98	1.7		130	"
107	3.3		170	"
115	5.0		250	"
135	5.0		300	"
146	10.0		350	"
153	13.0		500	"
161	19.0		750	"
172	一 部 採 血 (3,000ml)			
205	73.0			アジバント+HR-Iトキシイド
252	3.7			HR-Iトキシイド
261	7.5			"
267	22.5			"
273	37.5	420	90	"
282	1.4	440	90	HR-I毒
290	2.8			"
296	6.9	300		"
304	13.8	280		"
310		250		"
364		80		HR-I毒: 3.5mg, HR-II毒: 1.1mg
371		100		" 3.5 , " 1.1
379		120		" 6.9 , " 2.2
387		120	300	" 13.8 , " 4.4
394		140	350	" 20.7 , " 13.2
402		200	550	" 40.6 ,
409		180	500	" 46.4 ,
416		230	500	" 29.0 , HR-II毒1.0mg
426	全 採 血 (血液量25,000ml, 血清量12,500ml)			

表-2

馬No.23 免疫表 (HR-II 免疫)

免疫 日数	接種量 mg	試血 (μ/ml)		備 考
		HR-I	HR-II	
1日	4.4			アジバント+HR-II トキソイド
8	8.8			"
63	8.8			HR-II トキソイド
77	8.8			"
84	8.8			"
92	8.8		1000	"
98	13.2			"
105	8.8		1425	HR-II 毒
112	22.0		1600	"
119	23.9		1635	"
126	26.6		1550	"
139	全採血 (血液量 2,000 ml 血清量 1,000 ml)			

表-3

馬No.24 免疫表 (H₂-0 免疫)

免疫 日数	接種量 mg	試血 (μ/ml) 抗 H ₂ -0	備 考
8	20		"
63	20		H ₂ -0 トキソイド
71	40		"
77	50		"
84	5		H ₂ -0 毒
92	10		"
98	20		"
105	40		"
112	60		"
119	100		"
126	100		"
133	95		"
			抗体価が測定レベルに達しなかったため免疫中止

№22の馬は、最初HR-IIで免疫を行なったが、期待していた程抗体価が上昇しなかったため、血液3,000mlを採血した後約2ヶ月間休養させ、改めてHR-Iによる免疫を行った。(昭和49年度の報告書で報告済)

基礎免疫にはHR-Iトキソイドを用い、約50日後、同トキソイドで4回、更に不活化前のHR-I毒で5回追加免疫を行なった。追加免疫4回で抗HR-I価は440単位まで上昇したが、それをピークに抗体価はむしろ低下し、9回目には250単位まで低下した。

これまでの経験から、一度下がらだした抗体価は、そのまま免疫を続けても上昇させることができないため、しばらく休養させることにした。

約55日間休養後、今度はHR-IとHR-IIの混合毒素で追加免疫を行なった。その結果、80単位まで低下した抗HR-I価は230単位まで上昇し、HR-I免疫に変えた時に90単位まで低下した抗HR-II価も500単位まで上昇した。

しかし、単独の免疫では抗HR-I価440単位、抗HR-II価750単位まで上昇した馬であり、本意ではあったが、最後の3回の試血結果がほぼ横バイであったため、これがピークと判断し全採血を行なった。

全採血は、5%クエン酸ソーダ液を血液量の $\frac{1}{10}$ に加え、頸静脈から採血して2日間静置後血漿を分離した。血液量25,000mlより血漿12,500mlを得た。

№23の馬は、HR-IIトキソイドで2回基礎免疫を行ない、55日後同トキソイドで5回、不活化前のHR-II毒で4回追加免疫を行なった。精製HR-IIは、凍結乾燥処理により溶解性が悪くなったり、トキソイド化するためにホルマリン量を増やしていくと沈殿を生じたりで不安定なため、今回はホルマリン0.2%を加え、5日間インキュベイトして約10分の1に減毒したものを用了。毒活性がかなり残っているため、基礎免疫量は№22に比べ少なくし2回に分けて行なった。抗体価はブースター3回で1,000単位、6回で1,600単位に達した。

全採血は頸動脈から1,000mlのメスシリンダーに採血し、2日後血清を分離した。血液量は22,000ml、血清量は10,000mlであった。

№24の馬は、H₂-0トキソイドで2回基礎免疫を行ない、55日後、同トキソイドで3回、更に不活化前のH₂-0毒で8回追加免疫を行なった。

ハブ粗毒の中には、HR-I、HR-II以外にマウスに対して致死作用・出血作用及び腫脹作用を示す成分がかなりの割合で含まれており、我々は、その成分をH₂-0とよんでいるが、この成分もHR-I、HR-IIと同様、治療効果を検討してゆく場合重要であると考え免疫を試みた。

しかし、免疫表でも明らかなように抗体価は測定レベルにも達しなかったため、ブースター11回で免疫を中止した。

図1

馬No.24 正常血清

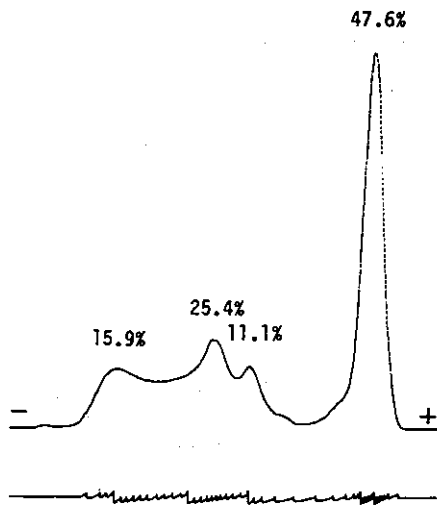


図2

馬No.24 最終試血血清

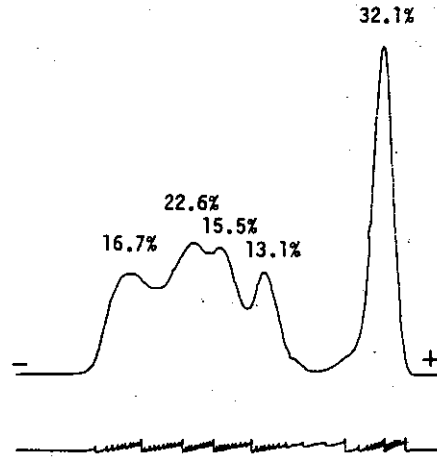


図1・2は馬No.24の正常血清と最終試血血清の電気泳動像を比較したものであるが、アルブミンが減少しβ-グロブリンが増加しているため、測定レベルには達しないが、H₂-0に対する抗体が多少はできているようである。

表-4 馬No.1182, No.1183の免疫表(粗毒免疫)

免疫 日数	No. 1182		No. 1183		抗 原
	接種量 mg	抗HR-II	接種量 mg	抗HR-II	
1	25		25		アジバント+粗毒トキソイド
7	50		50		"
14	100		100		"
21	200		200		"
77	1	16.6u	1	31.3u	粗 毒
84	2	< 88	2	99	"
91	5	< 160	5	124	"
98	10	125	10	148	"
105	20	184	20	106	"
112	30	223	30	< 170	"
119	50	230	50	165	"
126	80	288	80	242	"
133	100	346	100	233	"
141	120	396	120	297	"
148	150	398			"
154			全採血(血清量19,000ml)		
155	150	318			粗 毒
162	150	404			"
169	全採血(血清量13,300ml)				

Na1182, Na1183の馬は、化学及血清療法研究所(熊本在)で沖縄ハブ粗毒を用いて免疫を行なった。ハブ粗毒トキソイドを用いて4回基礎免疫を行ない、おおよそ2ヶ月後、不活化前の粗毒でNa1182は13回, Na1183は10回追加免疫を行なった。抗体価は抗HR-II価のみを測定したが、Na1182ではブースター10回以降、400 μml ではほぼプラトーに達したため全採血を行なった。Na1183の抗体価は除々に上昇していたが、ブースター10回目で馬が痙痛を起したため緊急採血した。痙痛のため抗体価は急激に低下し、全採血の時点では197 μml だった。

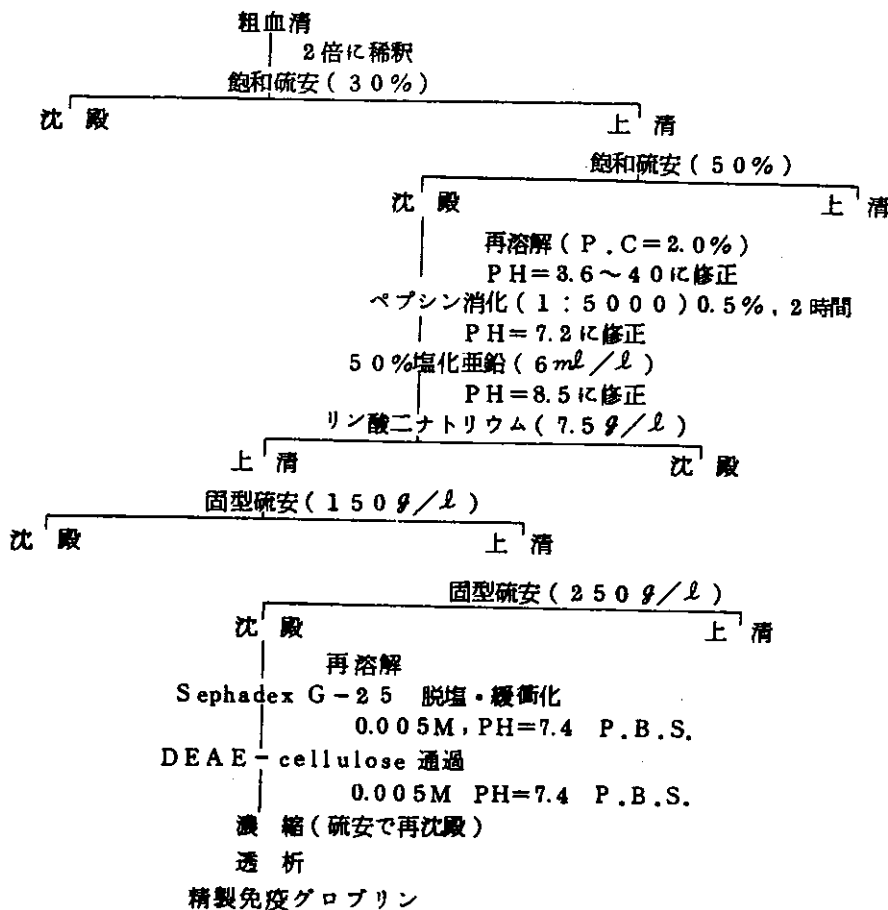
全採血は頸静脈よりメスシリンダーに採血し、2日後に血清を分離した。Na1182では13,300 ml, Na1183では19,000 ml の血清を得た。

II 抗毒素の精製

(1) Lot 22, Lot 23の精製

馬No22 (HR-I + HR-II免疫) 及び馬No23 (HR-II免疫) の血清の精製は、図-3に示された方法で行なった。これは、昨年精製実験で最も効率のよかった方法である。

図-3 Lot 22, 23 血清の精製経過



粗血清を30~50%飽和硫安で予備的に分画した後、ペプシン消化を行ない、未消化のグロブリンは塩化亜鉛で沈殿させ除去した。また、消化グロブリンは、固型硫安で再分画した後、DEAE-セルロースを通過させて更に精製した。

ペプシン添加量を検討するために、Lot 22では、硫安分画血清を4つに分けて、それぞれにペプシン0.1、0.2、0.5、1.0%を加えて回収量を比較したが、ペプシンの量が多い程結果は良好であった。しかし、0.5%と1.0%にはあまり差がなかったためLot 23の精製には0.5%を加えた。

イオン交換処理を行なう場合には、処理能力以上の検体を加えないことと、緩衝化を充分に行なうことが大切である。

今回の精製にはDEAE-セルロース(Brown) 0.90 mg/g を用いたが、Capacityを測定した結果、血清蛋白 1 g あたり湿状態(カラムにつまった状態)のセルロースが $80 \sim 90 \text{ ml}$ 必要であった。この計算でゆくと、馬1頭分の血清を一度に処理するためには、硫安分画等の前処理で蛋白量を減らすことができたとしても、 $15 \sim 20 \text{ l}$ のセルロースが必要であり、かなり大型の装置が必要となってくる。

したがって、Na 22では市販のテトロン布で作った袋を用いてバッチ法で精製を行ない、Na 23は大型カラム($24.5 \times 45 \text{ cm}$)を用いて精製を行なった。

バッチ法の場合には、 0.005 M 、 $\text{PH}=7.4$ 、PBSで緩衝化された血清液に適量のDEAE-セルロースを加えて十分に攪拌した後、テトロン布で濾過し、セルロースは更に2回同緩衝化で洗浄した。その際、DEAE-セルロースの微粒子がテトロン布を通過して濾液中に混入したため、Na 2濾紙で濾過し除去した。

この方法により、硫安分画で得られたNa 22血清 $53.6 \text{ g} / 4,000 \text{ ml}$ より $21.2 \text{ g} / 7,000 \text{ ml}$ を得た。この血清液は濃度が非常に薄かったため、硫安で濃縮した。

Na 23は大型カラム(特注品)に適量のDEAE-セルロース($24.5 \times 25 \text{ cm}$)を充填し、 0.005 M 、 $\text{PH}=7.4$ PBSを用いて毎時 $4,800 \text{ ml}$ の速度で溶出、素通りする画分を採取した。硫安分画で得られたNa 23血清 $173 \text{ g} / 4,800 \text{ ml}$ より $78 \text{ g} / 16,000 \text{ ml}$ を得た。

表-5 ハブ抗毒素の力価及び製造量

LotNo	粗血清				精製抗毒素				抗原		
	血清量 ml	蛋白 mg/ml	力価 $\mu\text{ml} (\frac{\mu}{\text{mg}})$		血清量 ml	蛋白 mg/ml	力価 $\mu\text{ml} (\frac{\mu}{\text{mg}})$				
			抗出血I	抗出血II			抗出血I	抗出血II		抗致死	抗腫脹
Lot22	8,000	75	230 (3.0)	500 (6.7)	210	54	325 (6.0)	923 (17.1)	143 (2.7)	297 (5.5)	HR-I+ HR-II
Lot23	10,000	79		1,550 (19.6)	640	140	40 (0.29)	4,252 (30.4)		53 (0.38)	HR-II
No 1182	13,000	100	500 (5.0)	380 (3.8)	2,000	92	535 (5.8)	340 (3.7)	300 (3.3)	455 (4.9)	粗毒
No118-A	8,000	93	400 (4.3)	200 (2.2)	80	156	1,500 (9.6)	359 (2.3)			"
" B	"	"	"	"	65	164	1,875 (11.4)	412 (2.5)			"
" C	"	"	"	"	130	180	2,400 (13.3)	443 (2.5)			"

表-5はそれぞれの抗毒素の抗体価をまとめたものである。Lot22では、粗血清の抗体価は抗HR-I価230 μml 、抗HR-II価500 μml 、精製後の抗体価はそれぞれ325 μml 、923 μml で比活性は2.0~2.5に上昇した。

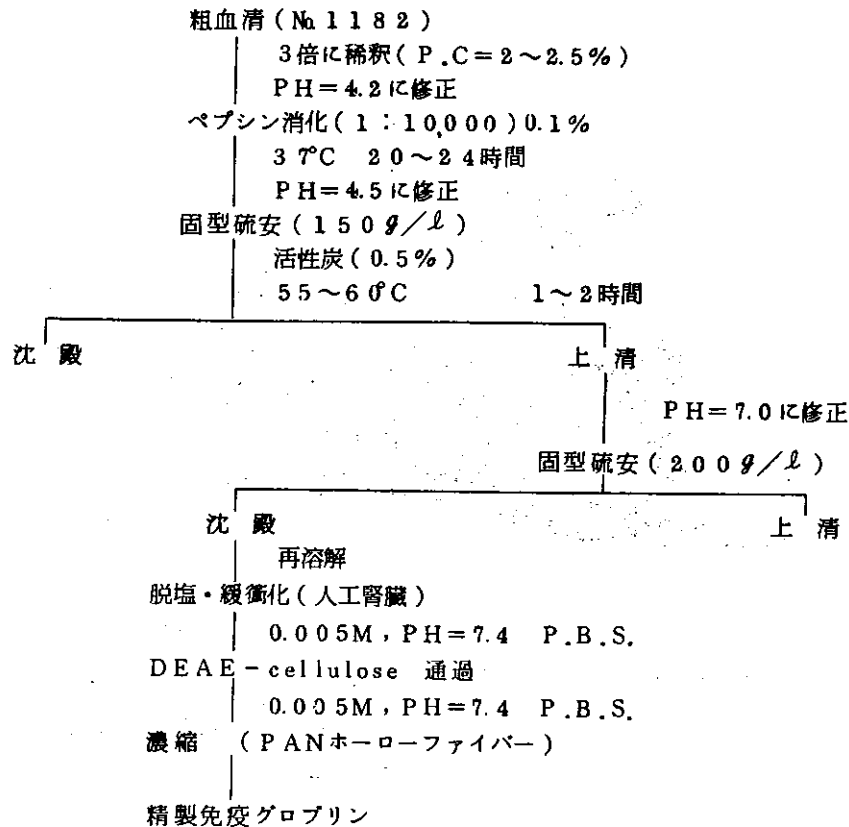
Lot23は精製HR-II毒免疫であるため抗HR-I価及び抗致死価は測定できず、抗HR-II価のみを測定した。粗血清の抗HR-II1,550 μml に対し、精製血清では4,252 μml に上昇したためかなり精製されているように思えたが、蛋白濃度が14%と高く比活性は1.6と殆ど上昇していなかった。

結局、Lot22,23いずれにおいても抗体価は期待した程上昇せず、回収率も著しく悪かった。

(2) No 1182血清の精製

馬No1182血清の精製は図-4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、現在治療用ハブ抗毒素の精製に使われている方法である。

№1182 血清の精製経過



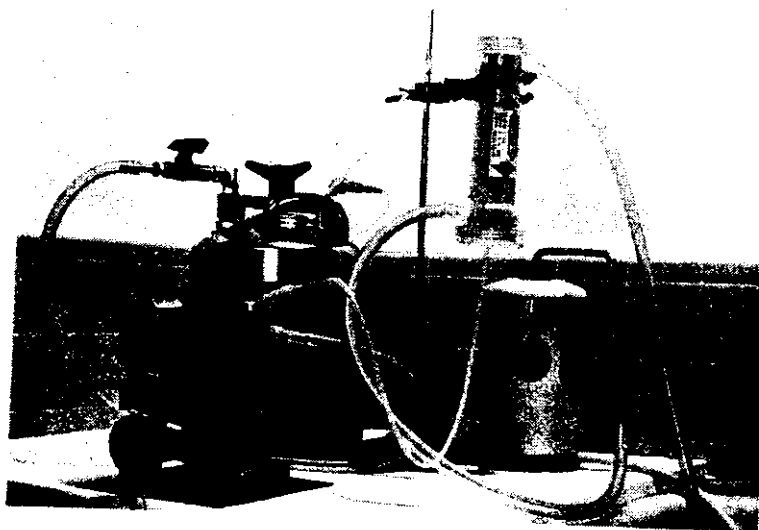
すなわち、№22, 23 血清では、ペプシン消化をする前に予備的に硫安分画を行なったが、今回は粗血清をすぐにペプシン消化した。硫安分画により精製された血清は、前回同様、DEAE-セルロースを用いて更に精製したが、硫安分画後の脱塩・緩衝化及びDEAE-セルロース処理後の濃縮操作には、人工腎臓、PANホーローファイバーをそれぞれ用いて操作の簡素化を試みた。

人工腎臓による脱塩・緩衝化：人工腎臓とは、透析膜で作られた毛細管を束にしたものに外管を取りつけたもので、外液との接触面積を広くし、透析の効率をよくするように工夫したものである。

装置の組み方は写真-1に示したが、操作方法は下記のとおりである。

- ① 外管に軟水器を通過させた水道水を流す。
- ② 中央のステンレスタンクに硫安分画した血清液を入れる。
- ③ ポンプを運転して人工腎臓の毛細管に血清液を循環させる。
- ④ 一定の時間おきに血清液中の硫安濃度をチェックする。

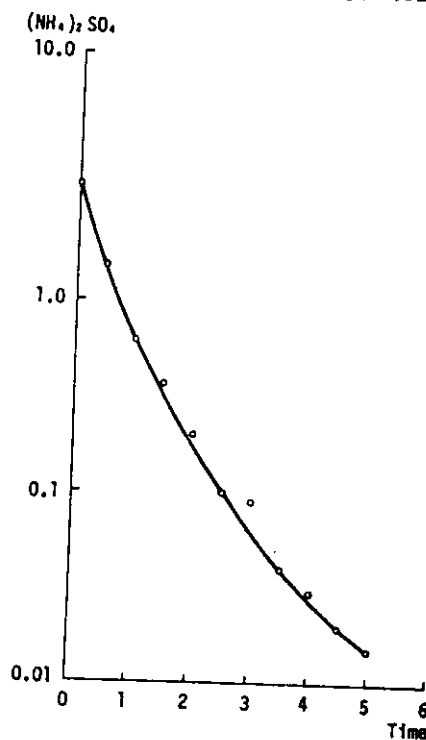
写真1. 人工腎臓による血清の脱塩・緩衝化



- ⑤ 硫安が検出されなくなったら水道水を止め，外管に緩衝液を循環させる。
- ⑥ 適当な時間おきに緩衝液をかえ，血清液を十分に緩衝化する。

図-5 人工腎臓による硫安の脱塩

血清液 5,000 ml の脱塩・緩衝化をこの方法で行なったが，図-5 に示したように硫安濃度は対数的に減少し，5 時間後には殆んど検出できない程であった。しかし，念のため，更に 2 時間水道水を流した後，0.005M, PH=7.4, P.B.S に外液をかえた。0.005 M, PH=7.4, P.B.S は 10 l のビーカーに入れて血清液同様ポンプで外管を循環させ，1 時間おきに 4 回取りかえた。緩衝化の終了は PH でチェックした。脱塩・緩衝化には合計 11 時間を要し，最終ボリュームは 4,800 ml であった。



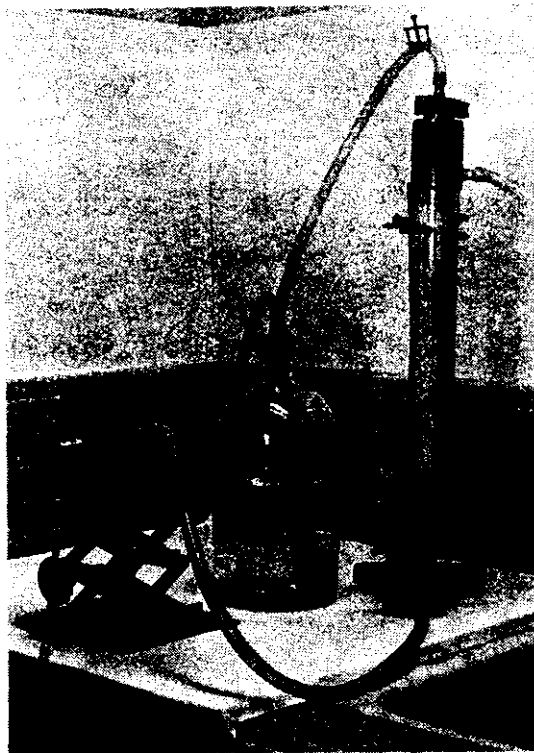
Sephadex G-25で、血清液5,000mlを脱塩すると最低3日は必要であり、ボリュームも4~5倍に増えるため、人工腎臓の方がはるかにスピーディーに処理することができた。また密閉した装置が組めるため、雑菌の混入も防ぐことができる。

人工腎臓で脱塩を行なうと、透析が進むにつれて血清液量が著しく増えて来るが、今回は血清液を入れた容器を密閉して加圧することによりこれを防いだ。

なお、今回は有効濾過面積1.6㎡の人工腎臓(旭化成)1個を使用した。

PANホーローファイバーによる濃縮： PANホーローファイバーとは、限外濾過膜で作られた毛細管(ファイバー)を束にしたものにポリカーボネート製の外管を取り着けたもので、濾過面積を広くし、限外濾過が効率よく行なわれるように考案されたものである。ペプシン消化グロブリンの分子量が90,000~100,000であるため、今回は分子量18,000以下を通過させるようなポアサイズのものを使用した。

写真2. PANホーローファイバーによる血清の濃縮



装置の組み方は写真2に示した。操作方法は、まず、人工腎臓と同様毛細管に血清液を循環させ、ホーローファイバーの出口の方のチューブをピンチコックで絞り限外濾過膜に圧力が加わるようにする。すると、分子量が小さいもの(ここではbuffer)は、外管の方へ押し出され、血清液は循環

しながら濃縮されて行く。この場合、ファイバー内の血清はたえず流れているため、濃度分極が起りにくく、蛋白濃度がかなり高くなっても滲過速度はあまり低下しない。今回使用したPANホーローファイバー（旭化成）の場合は、 $2\text{Kg}/\text{cm}^2$ まで加圧することができるが、ポンプの出力が小さいため $0.4\text{Kg}/\text{cm}^2$ をかけた。しかし、この場合でも、1時間 10L の割合で濃縮することができた。なお、今回使用したPANホーローファイバーの有効滲過面積は 1.75m^2 である。

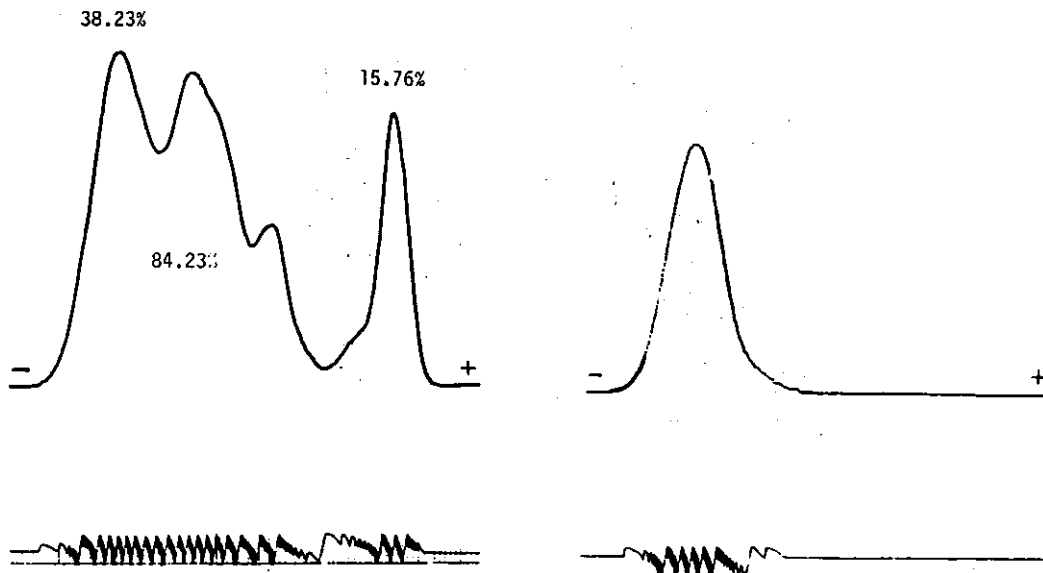
今回の精製では、DEAE-セルロースより溶出した血清液 $50,000\text{ml}$ （ $\text{P.C}=0.035\%$ ）をおおよそ6時間で $2,000\text{ml}$ まで濃縮することができた。昨年は、硫安 50% 飽和で沈殿させ濃縮したが、この場合、再度脱塩の必要があり、PANホーローファイバーを使用した方がはるかに効率よく濃縮することができる。また、人工腎臓同様密閉した装置が組めるため、雑菌の混入も防ぐことができる。

馬No1182血清の精製は、このように人工腎臓、PANホーローファイバーを用いて操作の簡素化を計りながら、ペプシン消化→硫安塩析→DEAE-セルロース処理の順で行なったが、表-5に示したように、比活性は殆ど上昇しなかった。

図-6.7は、馬No1182の粗血清と精製血清の電気泳動像を比較したものであるが、消化免疫グロブリンと思われる単一のピークが観察されるだけであり、これから判断すれば、目標としていた画分は精製されていることになる。

図-6 馬No1182血清精製前

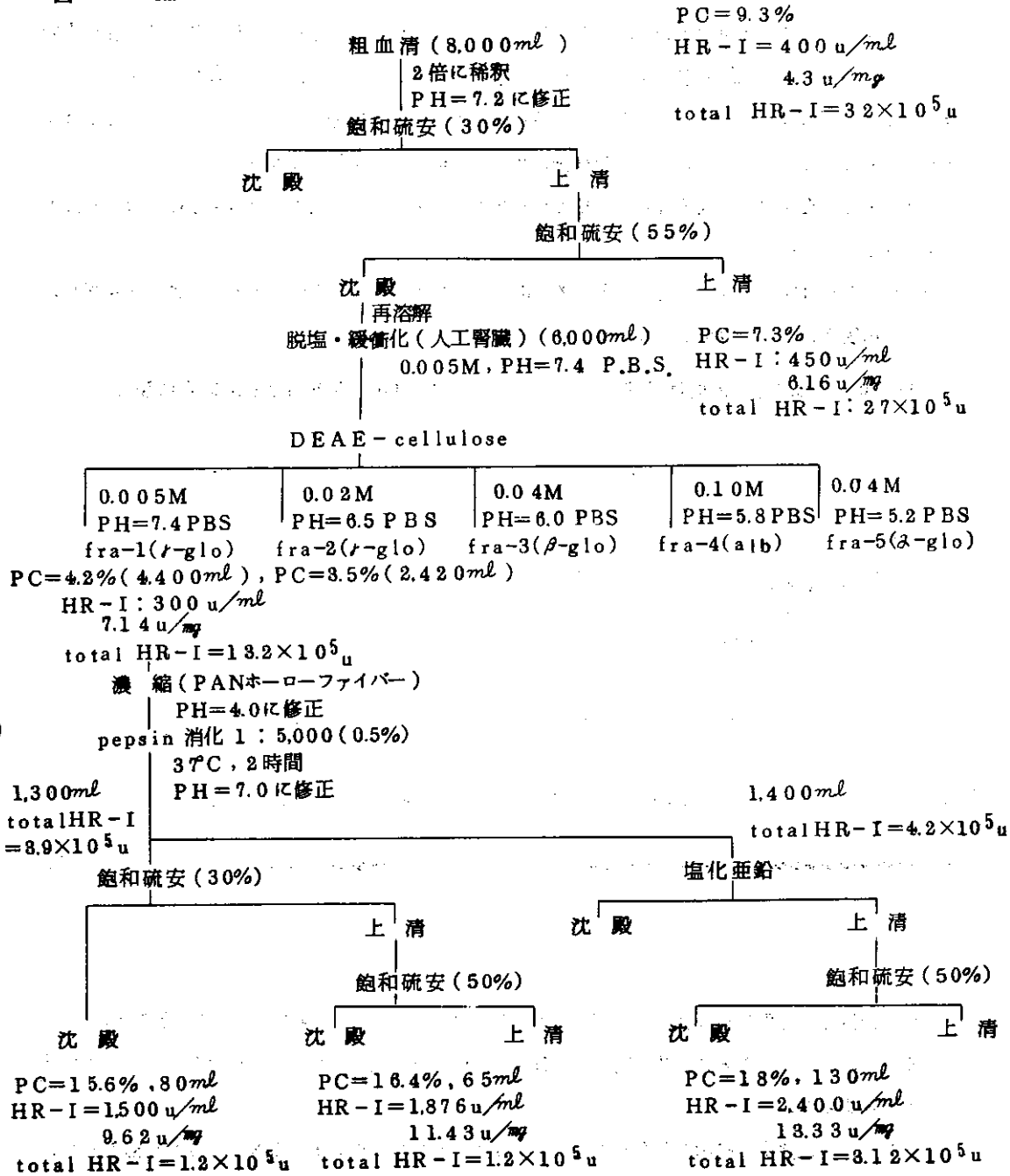
図-7 馬No1182血清精製後



(3) No 1183 血清の精製

今回精製した Lot 22, Lot 23 及び 1182 血清では、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、抗体価が期待した程上昇しなかったため、これらの原因を明らかにするために、No 1183 血清では、図-8 に示されているように、硫酸分画と DEAE-セルロースで免疫グロブリンを精製した後にペプシン消化を行った。

図-8 No 1183 血清の精製経過



DEAE-セルロースによる分画は、図-8に示されているように5段階に分けて stepwise elution を行ない fra-1~5を得た。fra-1, fra-2 は主に γ -グロブリン, fra-3 は β -グロブリン, fra-4 はアルブミン, fra-5 は α -グロブリンである。

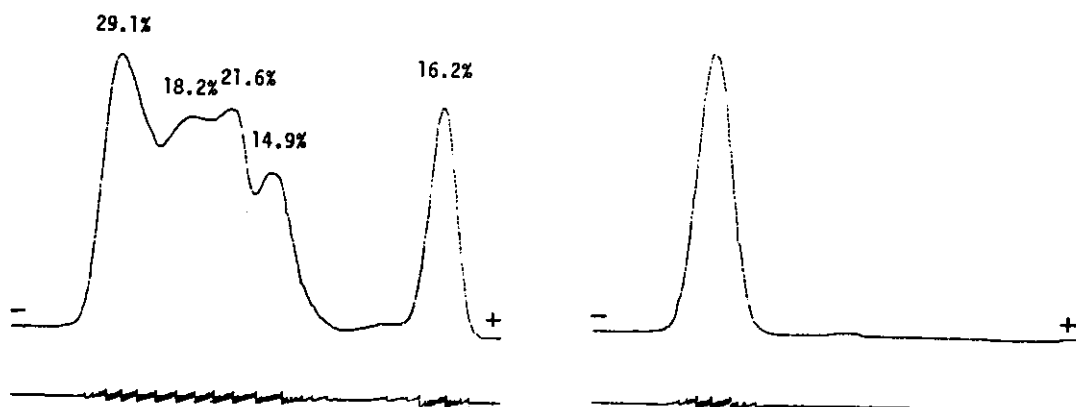
抗体価は抗HR-I価のみを測定したが、大部分の抗体はfra-1, fra-2 の γ -グロブリンにあり、他の fraction には殆ど認められなかった。fra-1, 2を比較した場合、fra-1の方に多く含まれていたため、fra-1ではペプシン消化を行ない、消化グロブリンは飽和硫安(30%)、飽和硫安(50%)及び塩化亜鉛+飽和硫安(50%)の3つの方法で分離し、それぞれの抗体価を比較した。その結果、塩化亜鉛で未消化グロブリンを除去した後硫安分画を行なったのが最もよく、SP=8.11に上昇し、飽和硫安(30%)及び飽和硫安(50%)処理では、それぞれSP=2.24, SP=2.66だった。いずれにしても抗体価は2.5~3倍にしか上昇しなかった。

今回も脱塩・緩衝化には人工腎臓、DEAE-セルロース処理には大型カラム、濃縮にはPANホーローファイバーを使用した。

図-9, 10はNo1183血清の精製前後の電気泳動像を比較したものであるが、 γ -グロブリンが高度に精製されているのがよくわかる。

図-9 馬No1183血清精製前

図-10 馬No1183血清精製後



馬に蛋白抗原を免疫した場合、通常抗体はT-グロブリン(β_2 -グロブリン)にできるといわれている。しかし、No1183血清の場合、抗HR-I価だけを測定したが、抗体はむしろ γ -グロブリンの方にあった。

したがって、血清中の抗体の分布を更に詳しく検討するため、No21, 22, 23及びNo1183

血清の4検体についてDEAE-セルロースで小規模に分画を行ない、抗体の行方を検討した。

(4) 馬Na2 2血清のDEAE-セルロースによる精製(小規模)

馬の血漿成分を系統的に分離するために、下記のようなbuffer systemでstepwise elutionを行なった。

馬Na2 2の粗血漿2.5mlを0.005M, pH=7.4 phosphate bufferに一昼夜透析し、同bufferで充分平衡化されたDEAE-セルロース(2.5×40cmカラム)に注入した。溶出速度は毎時100mlとし、1試験管あたり10mlを採取した。溶出液はUVモニターに接続してOD₂₈₀を測定し、大部分の蛋白が溶出された後次のbufferに変えた。

buffer systemは次のとおりである。

Step 1 : 0.005 M	pH=7.4	phosphate buffer
Step 2 : 0.0175 M	pH=6.5	"
Step 3 : 0.04 M	pH=5.9	"
Step 4 : 0.10 M	pH=5.8	"
Step 5 : 0.40 M	pH=5.2	"
Step 6 : 0.40 M	pH=5.2	"

+2.0 M NaCl

図-11 DEAE-セルロースによるNa2 2血漿の精製

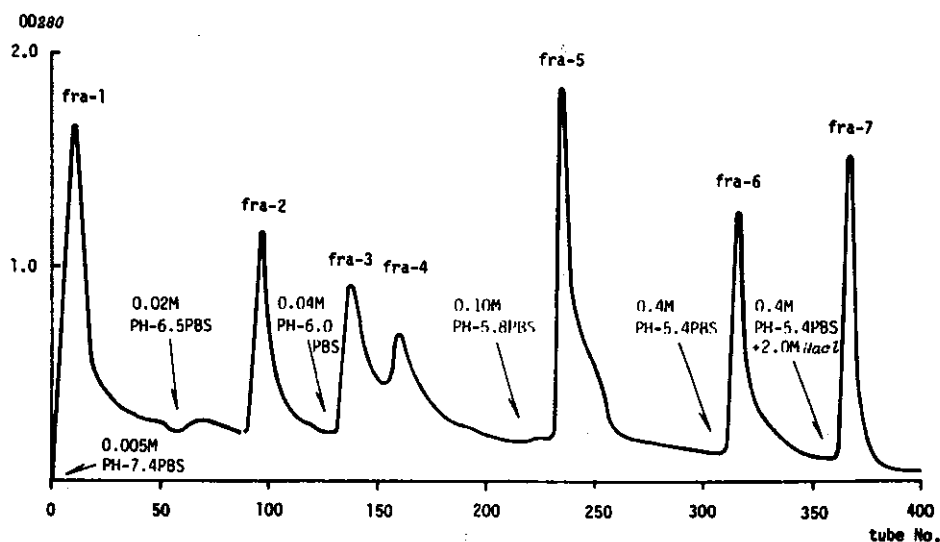


図-12 馬No 2 血清精製前

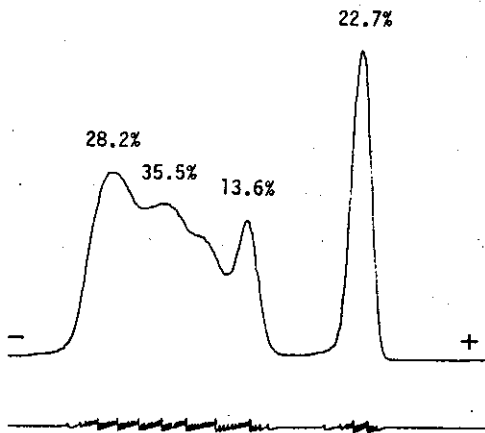
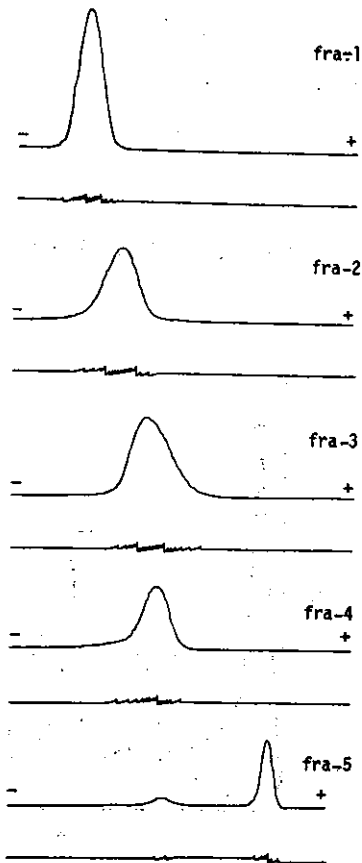


図-13 馬No 2 血清の各 fraction の泳動像



その結果図-11を得た。溶出する順に fraction 1~7 とすると、図-12, 13の電気泳動像から fra-1, 2は γ -グロブリン, fra-3, 4は β -グロブリンであることがわかった。また fra-5はアルブミン, fra-6は α -グロブリンに β -グロブリンがコンタミしたものであった。表6は、それぞれの fraction の抗体価をまとめたものである。

表-6 No 2 2 血漿の各 fraction の抗体価

	total uoi	total pro	H R - II				H R - I			
			total units	u/ml	mg/u	sp.Acti	total units	u/ml	mg/u	sp.Acti
plasma	25	2,000	12,500	500	0.16	1.00	5,750	230	0.348	1
fra-1	210	357	275	1.3	1.30	0.12	2,480	11.8	0.144	2.42
" 2	170	167	1,376	8.1	0.12	1.33	918	5.4	0.182	1.91
" 3	130	120	1,923	14.8	0.062	2.58	645	5.0	0.186	1.87
" 4	240	175	4,849	20.2	0.036	4.44	211	0.9	0.83	0.42
" 5	180	288	920	4.0	0.40	0.40				
" 6	160	175								
" 7	110	146								
total		1,428	9,143				4,254			
回収率(%)		71.40	73.14				73.98			

抗HR-II価の大部分は、fra-3及び4のβ-グロブリンにあり、両fractionを加えると全回収量のおおよそ74.07%を占めていた。特にfra-4に多く含まれ、比活性も4.44に上昇した。

fra-3ではSP=2.58だった。fra-2のγ-グロブリンにも抗体はあったが、fra-3,4に比べれば少なく比活性も1.33とさほど上昇しなかった。

しかし、抗HR-I価の大部分はむしろfra-1,2のγ-グロブリンにあり、両fractionを加えると全回収量のおおよそ79.88%に達した。特にfra-1に多く含まれ、比較性は2.42に上昇した。fra-3のβ-グロブリンにも抗体はあったが、fra-1,2に比べて少なく、全回収量の15.16%にしかすぎなかった。

結局、精製HR-I+HR-II毒で免疫したNo 2 2 血清では、HR-Iに対する抗体は主にγ-グロブリンに、HR-IIに対する抗体は主にβ-グロブリンに造られていることになる。

活性の回収率は、HR-Iで73.14%、HR-IIで73.98%だった

写真3.4は、No.22血清の各fractionとHR-I及びHR-II毒との寒天ゲル内沈降反応を示したものである。

写真-3 No.22血清のゲル内沈降反応(HR-I)

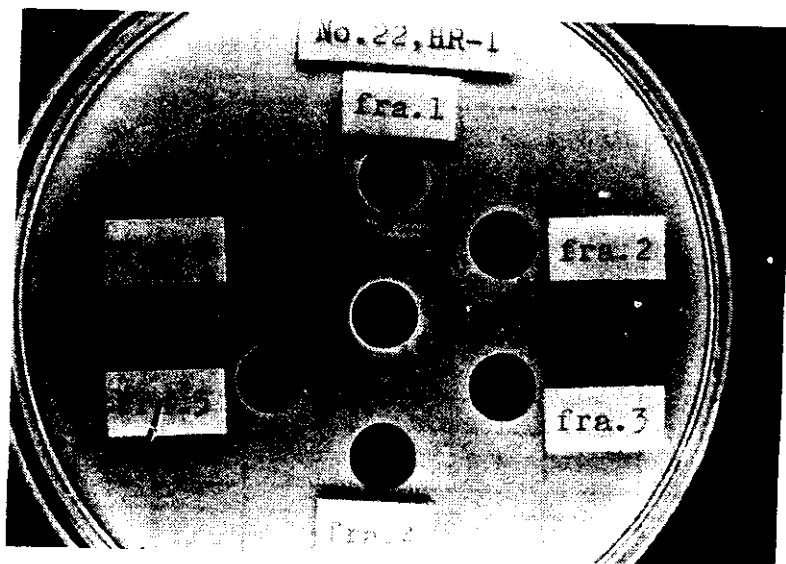
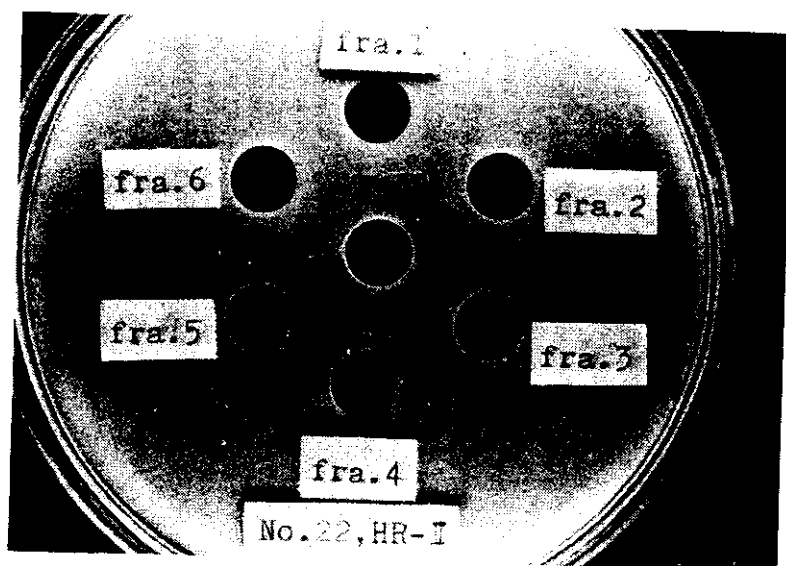


写真-4 No.22血清のゲル内沈降反応(HR-II)



HR-Iはfra-1のみに鮮かな沈降線を認めたが、HR-IIではfra-4にもはっきりとした沈降線が観察された。したがって、fra-4にはHR-Iに対する抗体は殆どなく、HR-IIに対する抗体はかなり含まれていることになり、ウサギ背皮における抗出血価の結果と一致した。

(5) 馬No 21血清のDEAE-セルロースによる精製(小規模)

馬No 22血清では抗HR-Iの大部分は γ -グロブリンに、抗HR-IIの大部分は β -グロブリンに含まれていることがわかったため、昨年精製HR-I毒で免疫した馬No 21血清についてもNo 22と同様小規模に精製を行なってみた。

No 21血清7mlをstarting bufferである0.005M, PH=7.4, P.B.S.に透析した後、DEAE-セルロース(5.0×19cmカラム)を用いて毎時600mlの流速でstepwise elutionを行なった。buffer systemはNo 22血清の時と同じである。

表-7 馬No 21血清の各fractionの抗体価

	vol	mg/ml	total mg	total u	u/ml	%	
fra-1	160	0.33	52.8	2.253	14.08	16.93	γ -glob
" 2	160	0.34	54.4	7.771	48.57	58.41	"
" 3	1050	0.05	52.5	3.281	3.12	24.66	β -glob
" 4	250	0.32	80.0				alb
" 5	170	0.40	68.0				λ -glob
total			307.7	13305		100	

各fractionの抗体価は表-7にまとめたが、抗体分布の主力と思われていたfra-3(β -グロブリン, T-グロブリン)には全回収量の24.66%が分布しているにすぎず、大部分の抗HR-I価はfra-2にあり、fra-1とfra-2のいわゆる γ -グロブリンを加えると全回収量の75.34%を占めていた。この血清は、精製HR-I毒で免疫したものであり、抗HR-II価は測定できなかった。

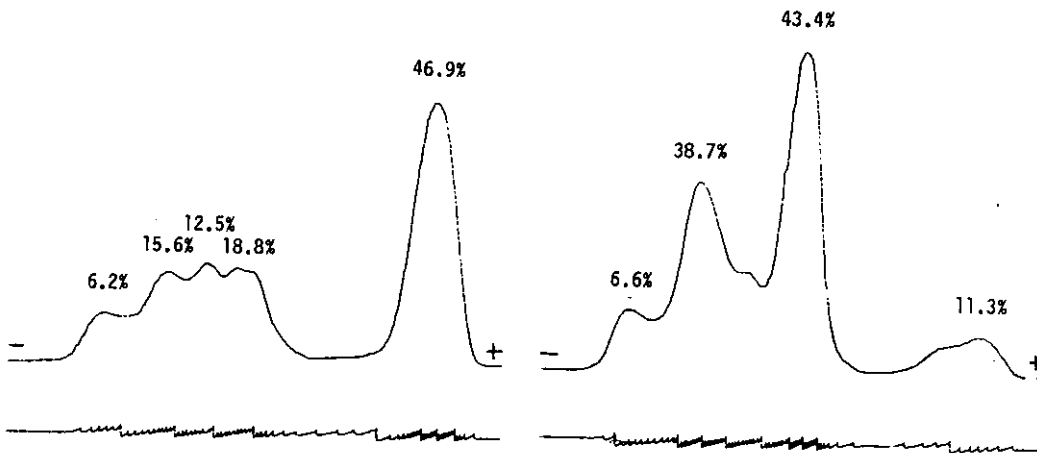
精製HR-I毒で免疫した馬No 21血清においても、No 22同様HR-Iに対する抗体の大部分は γ -グロブリンにあった。

昨年の報告書の馬No 21血清の電気泳動像の中で、“免疫がすすみ抗体価が上昇するにつれてアルブミンが減少し、T-グロブリンが増加した”と報告したが、今回行なったDEAE-セルロース分離後の電気泳動では、その山は γ -グロブリンであり、このfractionには抗HR-I価は殆ど含

まれてなかった。(図-14,15)

図-14 馬No.21 正常血清

図-15 馬No.21 最終試血血清



(6) 馬No.23 血清のDEAE-セルロースによる精製(小規模)

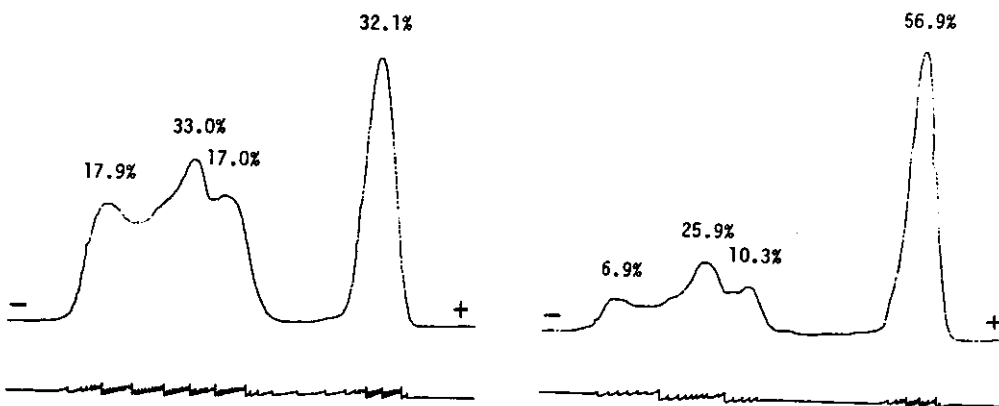
馬No.22 血清では、HR-II に対する抗体の大部分がβ-グロブリンにあったため、精製HR-II 毒で免疫した馬No.23 血清についても、No.22 同様DEAE-セルロースで精製を行ない、抗HR-II 価の行方を検討した。

No.23 の血清1.2 ml を諸条件はNo.21 の時と同じにして分画を行なった結果、No.22 の時と同様に、大部分の抗HR-II 価はβ-グロブリンに分布していた。

図16, 17 は馬No.23 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が、抗体価の上昇と共にアルブミンが減少し、グロブリンが全体的に増加していた。

図-16 馬No.23 正常血清

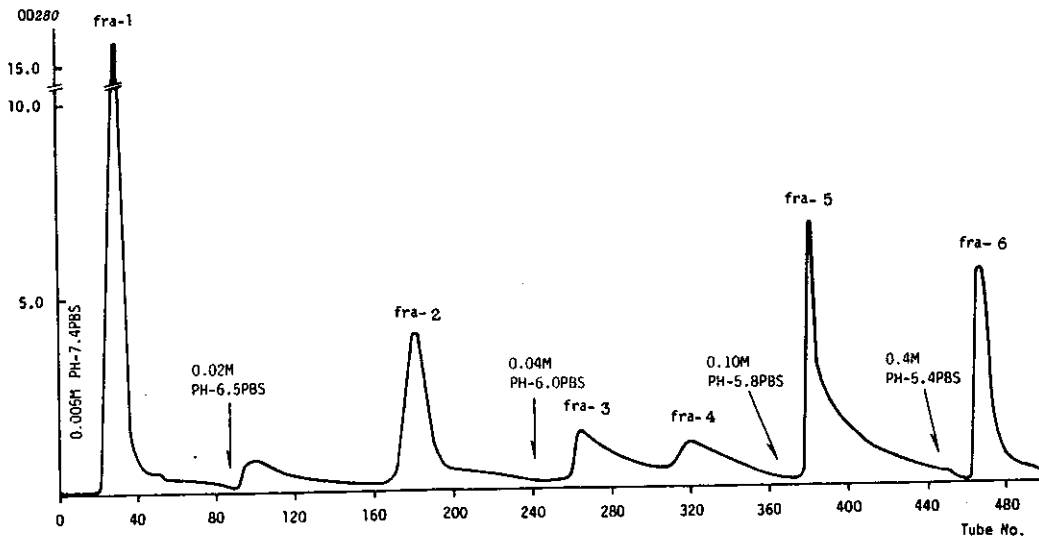
図-17 馬No.23 最終試血血清



(7) 馬No 1183 血清のDEAE-セルロースによる精製(小規模)

馬No 1183 血清の抗HR-I 価の大部分は γ -グロブリンに含まれていることが、DEAE-セルロースの大型カラムを用いた精製実験でわかったが、各fractionの抗体の分布を更に詳しく検討するために、ここではNo 1183 血清100mlをDEAE-セルロース(5.0×45cmカラム)を用いて小規模に分画を行なった。流出速度は600ml/hourとし、1試験管あたり15mlを採取した。buffer systemはNo 22の時と同じである。(図-18)

図-18 DEAE-セルロースによるNo 1183 血清の精製



各fractionの抗体価は表-8に示したが、先にも述べたとおり抗HR-I 価の大部分はfra-1,2のいわゆる γ -グロブリンにあり、fra-3,4の β -グロブリンには殆ど認められなかった。特に、fra-1に多く含まれ、全回収量の71.19%を占めていたが、蛋白量が多いため比活性は2.90で、fra-2の3.22より低かった。

表-8 馬No 1183 血清の各fractionの抗体価

	total vol(ml)	total pro(mg)	pro mg/ml	anti HR-I			anti HR-II			
				u/ml	total u	SP	u/ml	total u	SP	
粗血清	100	9,300	93	400	4,000	1	200	20000	1	
fra-1	365	1,935	5.3	66	24,090	2.90	13	4,745	1.14	γ -glo
" 2	390	702	1.8	25	9,750	3.22	10	3,900	2.58	"
" 3	365	332	0.91				7	2,555	3.57	β -glo
" 4	385	304	0.79				7	2,695	4.12	"
" 5	515	1,133	2.2							alb
" 6	275	523	1.9							α -glo
total					33,840			13,895		
回収率(%)					84.60			69.48		

抗HR-II価はfra-1~4の4つのfractionに分散されていたが、蛋白量の多いfra-1,2のγ-グロブリンに多く含まれ、両fractionを加えると全回収量の62.22%に達した。しかし、比活性はfra-8.4のβ-グロブリンの方が高かった。

硫安分画によりどのfractionが除去されたかを検討するために、(3)の硫安30%飽和及び硫安55%飽和处理より得られた血清200mlを、DEAE-セルロース(5×45cmカラム)を用いて粗血清の時と同一の条件で分画を行なった。

表-9 馬No1183硫安分画血清のDEAE-セルロースによる精製

	total vol	total OD ₂₈₀	total pro	$\mu\text{g}/\text{ml}$	pro(%)	
fra-1	490	4,900	8,950	8.06	49.99	γ-glo
" 2	610	1,891	1,520	2.49	19.29	γ - "
" 3	440	638	510	1.16	6.51	β - "
" 4	520	588	470	0.90	6.00	β - "
" 5	390	975	780	2.00	9.95	alb
" 6	300	810	645	2.15	8.26	λ-glo
total			7,875		100.00	

表-9は、各fractionの蛋白の分布を示したものであるが、これを粗血清を分画した表-8と比較すると、アルブミンが除去されているだけで他のfractionでは殆ど影響はなかった。

一般に、血清では、硫安30%飽和でγ-グロブリンが沈殿し、50%飽和で他のグロブリンが沈殿するといわれているが、今回の硫安30%飽和处理ではγ-グロブリンは除去されていなかった。

総括及び考察

昨年、良好な成績を得た硫安分画→ペプシン消化→DEAE-セルロース法の再現性の検討を行なうと共に、抗毒素の大量製造のための装置及び操作の改良を行なった。

まず、馬5頭に4種類の抗原、HR-I+HR-II、HR-II、H₂-0及び粗毒を免疫した。

No22の馬は、最初HR-IIで免疫を行なったが、期待していた程抗体価が上昇しなかったため、しばらく休養させた後改めてHR-Iで免疫を行なった。その結果、抗HR-I価は順調に上昇し、追加免疫4回で440 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで上昇したが、それをピークに抗体価はむしろ低下し、追加免疫8回目には250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで低下したため、再び休養させ、今度はHR-IとHR-IIの混合毒素で免疫した。しかし、一度低下した抗体価を元のレベルまで上昇させることはできなかった。免疫を行なう場合、全採血のタイミングは非常に難かしいが、2~3回の試血結果がほぼ横バイであれば速かに全採血を行な

った方がよいように思う。

No 2 3 の馬はHR - II で免疫を行なった。基礎免疫には、ホルマリン 0.2% を加え 10 分の 1 に減毒したものを使用した。No 2 2 の時の約 2 倍にあたる $1550 \mu/ml$ まで上昇し、結果は良好であった。馬の個体差もあり単純に比較はできないが、精製HR - II 毒は、トキソイド化するためにホルマリンを加えると沈殿を生じたり、寒天ゲル内沈降反応の沈降線が乱れたりすることがあるため、馬免疫用のHR - II トキソイドは、むしろ今回のように減毒程度に留めた方がよいように思う。

No 2 4 の馬は H_2-O で免疫を行なったが、抗腫脹価、抗致死価共に測定レベルにも達しなかったため追加免疫 1 1 回で中止した。 H_2-O の免疫は初めての試みであり、馬の個体差によるものか、 H_2-O の抗原性が弱いのか明らかでないが、いずれにしても、ハブ毒の致死作用を検討するには H_2-O の存在は重要であり、来年もう一度試みるつもりである。電気泳動によれば、最終試血血清は、正常血清に比べ β -グロブリンの割合が増加しており、 H_2-O に対する抗体が多少は産生されているようであった。

No 1 1 8 2, No 1 1 8 3 の馬は、化学及血清療法研究所でハブ粗毒を用いて免疫を行なった。No 1 1 8 2 では抗体価は順調に上昇したが、No 1 1 8 3 では免疫の後半に疝痛を起こし、抗体価は急激に低下した。疝痛は寒い季節によく起こるといわれている。免疫は阿蘇で行なっているが、冬期にはかなり気温が下がるため、今後は、この時期を避け春から秋にかけて免疫を行なうつもりである。

それぞれの血清は、昨年同様DEAE-セルロース法で精製を行なった。

硫酸分画後の脱塩・緩衝化は、Lot 2 2, Lot 2 3 では昨年同様Sephadex G - 2 5 を用い、No 1 1 8 2, No 1 1 8 3 では人工腎臓を用いて比較したが、大量の血清の処理には人工腎臓による透析法の方が適していた。その理由は、

- (1) 操作が簡単で装置も安価である。
- (2) 大量の血清が一度に処理でき、脱塩の速度が速い。
- (3) 密閉回路にすれば、血清量を増やさずに脱塩ができる。
- (4) 密閉した装置が組めるため、雑菌の混入を防ぐことができる等である。

また、DEAE-セルロース処理後の血清液の濃縮についても、硫酸分画法とPANホーローファイバーによる限外濾過法を行ない両者を比較したが、塩濃度を変えずに速かに濃縮できるPANホーローファイバーの方がはるかに優れていた。

今回は、ポンプの出力が弱かったため、人工腎臓、PANホーローファイバー共に 1 個ずつを用いたが、適当なポンプを使用すれば数個を連結することも可能であり、更に効率を上げることができると思う。また、人工腎臓とPANホーローファイバーを接続すれば、脱塩と濃縮を同時に行なうことも可能である。

No 1 1 8 2, No 1 1 8 3 の精製は、脱塩・緩衝化には人工腎臓（有効濾過面積 $1.6 m^2$ ）、DEAE-セルロース処理には大型カラム（ $24.5 \times 45 cm$ ）、濃縮にはPANホーローファイバー（有効濾過面積 $1.75 m^2$ ）を用いて精製を行なったが、イオン交換処理に伴う諸操作は、昨年に比べはるかにスピ

ーディに行なうことができた。

しかし、このように操作及び装置の改良を試みながら精製した抗毒素は、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、抗体価は殆ど上昇せず回収率も非常に悪かった。

DEAE-セルロースによる精製法の基本的な考え方は

- ① 硫安30%飽和で γ -グロブリンを除去し、50%飽和でアルブミンを除去する。
- ② ペプシンでT-グロブリン(免疫グロブリン)を消化し、物理化学的な性質を γ -グロブリンに近づける。
- ③ DEAE-セルロースにより、消化T-グロブリンを γ -グロブリンと同じ条件で分離採取する。この場合、未消化T-グロブリンは吸着除去される。

であるが、今回の精製では、ペプシン消化が充分に行なわれず、抗体の大部分は未消化グロブリンとして除去されたものと思われる。

また、電気泳動では単一のピークになっているにもかかわらず抗体価が上昇しないのは、消化T-グロブリンの中に硫安分画で除去されなかった γ -グロブリンがコンタミしているためであろう。コンタミしていたとしても、消化T-グロブリンは γ -グロブリンと同じ位置に泳動するため、精製された血清の泳動像からは両者を見分けることができない。No 1183の血清では、硫安分画前後の電気泳動像を比較したが、 γ -グロブリンは殆ど除去されていなかった。

硫安分画だけで精製する場合には、未消化T-グロブリンも消化グロブリンと一緒に採取されるためさほど回収率に影響はなかったが、今回のようにDEAE-セルロース法で精製する場合には、それぞれの操作が直接回収率に影響するため、硫安分画、ペプシン消化が充分行なわれたかどうかを確かめた後に次の操作に移るべきである。

確める方法については未だ充分検討してないが、DEAE-セルロースの小型カラムを用いて、0.005M, PH=7.4, P.B.S.で溶出し素通りする画分の量を測定すれば、反応が充分行なわれたかどうかを確めることは可能だと思う。

今回生じたいくつかの問題点を明らかにするため、No 21 (HR-I免疫), No 22 (HR-I+HR-II免疫), No 23 (HR-II免疫), No 1183 (粗毒免疫)の4種の血清を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を検討した。その結果、HR-Iに対する抗体は主に γ -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。

一般に、高度に免疫されたウマの血清では、抗体の大部分はTグロブリン(β_2 グロブリン)にあるといわれ(8), 治療を目的とした血清でも、この部分を採取するような操作、すなわち硫安30%及び50%飽和处理を行ってきたが、今回精製した4頭分の血清から判断すれば、抗HR-I価はむしろ γ -グロブリンに多く含まれており、硫安30%飽和处理は省き、すぐに50%飽和にした方がよいと思う。No 1183の血清では、硫安30%飽和にしても γ -グロブリンは殆ど沈殿しなかったが、一般に、血清では、硫安 $\frac{1}{3}$ 飽和にすれば大部分の γ -グロブリンが沈殿するといわれているからで

ある。(16)

今回得られた結果を整理すれば、血清の精製は、下記のような方法で行なった方がよいと思う。

粗血清→硫安50%飽和→脱塩・緩衝化(人工腎臓)→DEAE-セルロース→濃縮(PANホーローファイバー)→ペプシン消化→硫安50%飽和→脱塩・緩衝化→濃縮→精製免疫グロブリン
No.1183の血清の一部をこのような方法で精製し、比較的良好な成績を得た。

ま と め

高単位ハブ抗毒素の大量製造法の確立を目的に、昨年良好な成績を得た硫安分画→ペプシン消化→DEAE-セルロース法の再現性を検討した。また、大量製造のための装置及び操作の改良を行なった。

- (1) 馬5頭に4種類の抗原、HR-I+HR-II, HR-II, H₂-0及び粗毒を免疫した。
- (2) HR-II免疫では、抗体価は昨年約2倍に上昇し結果は良好であったが、H₂-0免疫では抗体価が測定レベルにも達しなかったため途中で中止した。
- (3) 硫安分画後の脱塩・緩衝化は、Sephadex G-25によるゲル濾過法と人工腎臓による透析法を行ない比較したが、後者の方が大量処理には適していた。
- (4) DEAE-セルロース通過後の濃縮には、硫安塩析法とPANホーローファイバーによる限外濾過法を行ない比較したが、後者の方がはるかに優れていた。
- (5) 今回精製した抗毒素は、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、抗体価は殆ど上昇せず回収率も非常に悪かった。
- (6) 主にγ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。しかし、粗毒で免疫した馬No.1183の血清では、抗HR-I, 抗HR-IIともにγグロブリンの方に多く分布していた。
- (7) 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、DEAE-セルロースを用いて治療用の血清を精製する場合には、あらかじめ小規模に分画して抗体の存在を確かめたのち大量精製は行うべきである。

本研究に要した研究費は、昭和50年度国庫補助より支出された。紙上より深謝申し上げます。

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*, 9(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, 181~196, 1973
- (10) 逢坂 昭: 出血のメカニズムへの1つのアプローチ, 蛇毒出血因子の研究, *生体の科学*, 24(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) 首根忠雄：ジフテリア抗毒素の免疫化学的研究，生物物理化学，2(3)，193~198，1955
- (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