

沖縄ハブ抗毒素の有効性の検討

(ハブ抗毒素の抗腫脹作用の定量的研究 第二報)

山川雅延・野崎真敏・外間善次

ま え が き

ハブ咬症に見られる出血、腫脹、壊死のうち、腫脹現象は最も早期に認められる炎症のひとつである。従って、咬傷局所の示す腫脹の強弱を早期に観察すれば受傷者の症状をある程度予測するための手がかりを得るといわれる。即ち、咬傷局所に全く腫脹を認めない場合はハブ咬傷ではないか、もしくは殆ど毒が注入されなかったといえる。真栄城(文献23)は腫脹が高度になると脱水状態を反映して血液濃縮を来し、hypovolemiaを起し、咬傷局所の静脈環流障害が筋壊死の大きな原因になるとして“減圧筋膜切開”を提唱した。即ち、ハブ咬症による高度の腫脹は筋壊死及びショックに関与する危険な症状であり、後に動静脈シャントによる末梢循環不全を引起して配下の組織に重大な影響を与える場合がある。従って、最も有効な治療薬とされるハブ抗毒素の抗腫脹作用について研究することは重要な意義がある。しかし、蛇毒に対する腫脹作用の研究報告は少ない。

我々は既に「昭和48年度・沖縄ハブ抗毒素開発研究報告書」の中でハブ毒の腫脹活性の定量的研究結果について報告した。更に、この定量法を応用して「昭和49年度・沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書(II)」によってハブ抗毒素の抗腫脹作用の定量的研究結果を部分的ながら第一報として報告した。今回はその後得たデータを含めて抗腫脹作用の定量的取扱法をできるだけ述式化する様に努めた。

実験方法及び材料

試験用ハブ毒素

ハブ粗毒：沖縄産ハブ(*T. Flavoviridis*)より採取した毒液を遠心分離して不溶性白色沈殿物を除去した後、凍結乾燥して褐色瓶に入れデシケーター中に保存した。

分画毒素：沖縄産ハブ粗毒をセファデックスG100で分画(大森-佐藤の方法)し、そのHR-I画分を凍結乾燥してデシケーター中に低温保存した。又HR-II及びH₂₋₀画分はアンバーライトCG50(高橋等の方法)で更に精製した後、凍結乾燥してデシケーター中に低温保存した。

ハブ抗毒素製品

ハブ粗毒又は分画毒で馬を免疫して得られた馬血清をペプシン消化した後、硫酸分画法又はDEAEセルローズ法で精製-凍結乾燥した抗毒素製品で、Lot12は“化学及血清療法研究所”にて治療用として製造されたものである。各抗毒素製品の免疫原、精製法、抗毒素価などは表1に示した。これらの凍結乾燥された毒素及び抗毒素製品は用時もとの溶量まで蒸留水で復元した後、更にM/30 PBS PH7.0, 0.9% NaCl, 一万倍マーゾニン)で適宜希釈した。

表1 各抗毒素製品の免疫抗原, 精製法, 抗毒素価 (μ/ml)

抗毒素製品	免疫抗原	精製法	蛋白濃度 $\mu g/ml$	抗毒素価			備考
				抗致死	抗出血I	抗出血II	
Lot 12	奄美ハブ粗毒	ペプシン消化- 硫酸分画	64	366	354	586	化血研製
" 14	沖縄ハブ粗毒	" "	67	396	400	350	
" 19	HR-I	ペプシン消化- DEAEセルロース	46	2,590	1,800	16	カラム法
" 20	HR-II	" "	38		20	2,000	"
" 22	HR-I+HR-II	" "	54	240	325	923	パッチ法
" 23	HR-II	" "	140		40	4,252	"

抗毒素価は生物学的製剤基準による

試験用毒素のMEDの測定

ハブ毒の腫脹活性は先に著者らが発表した方法によって測定した。即ち、マウスの右後足趾に10 μ lの毒液を注射し、4時間後に左右両足趾を後肢距骨関節より切断して直ちに両足趾の重量を測定した。左健足趾の重量を100%として右腫脹足の重量%を腫脹率とした。腫脹率 y と毒量の対数値 x との間には適当な範囲内で直線関係が成立し、この直線関係は次式によって示される。 $x = \bar{x} - (\bar{y} - y) / b$ 但し、 \bar{x} は直線関係が認められる範囲内における各毒注射量の対数値の平均、 \bar{y} は同範囲内での腫脹率 y の全測定値の平均、 b は傾斜で実験値より27.1と算出された。ここで、 $y = 130$ のときの $\text{anti log } x$ の値をIMED(最少腫脹量)と定義した。即ち、IMEDは130%の腫脹率を示す毒の最少量である。この方法により測定された各試験毒素のIMEDは

粗毒(CV)=0.6 mcg, HR-I=0.3 mcg, HR-II=0.6 mcg, H₂₋₀ = 3.88 mcgであった。

実 験 結 果

I 粗毒又はHR-I毒に対する中和曲線

1 試験毒素量(1TDと記す)は5, 10, 20, 40, 80MEDの5種類とし、各試験毒素は250TD/ μ lとなるように希釈した。1管当り100TD/ μ l宛を加え、全量を2.0 μ lとして、その1TDが注射量20 μ l中に含まれるようにした。又、抗毒素の希釈は1.6倍間隔とした。実際には表2に示すごとく、5本の小試験管に抗毒素液を各々0.25, 0.4, 0.63, 1.0, 1.6 μ l宛分注し、これに試験毒素を各0.4 μ l加えた後、全量をPBSで2.0 μ lとした。

表2 毒素・抗毒素混合液の作り方 (ml)

Tube No	①	②	③	④	⑤
抗毒素液	0.25	0.4	0.63	1.0	1.6
試験毒素 (100 TD)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
PBS	1.35	1.2	0.97	0.6	0
全量	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

この毒素・抗毒素液は室温に1時間放置後、その2.0 mlを一群10匹のマウス右足蹠に注射した。注射4時間後にマウスの両足蹠を切断して個別に重量を測定し腫脹率を求めた。この場合、足蹠重量の測定作業に時間的ズレが生じることを考慮して、あらかじめ注射時間も5~10分間隔ですらしておき、判定時間をできるだけ一定(4時間)にするようにした。

図1 ハブ粗毒と抗毒素製品Lot14の中和反応

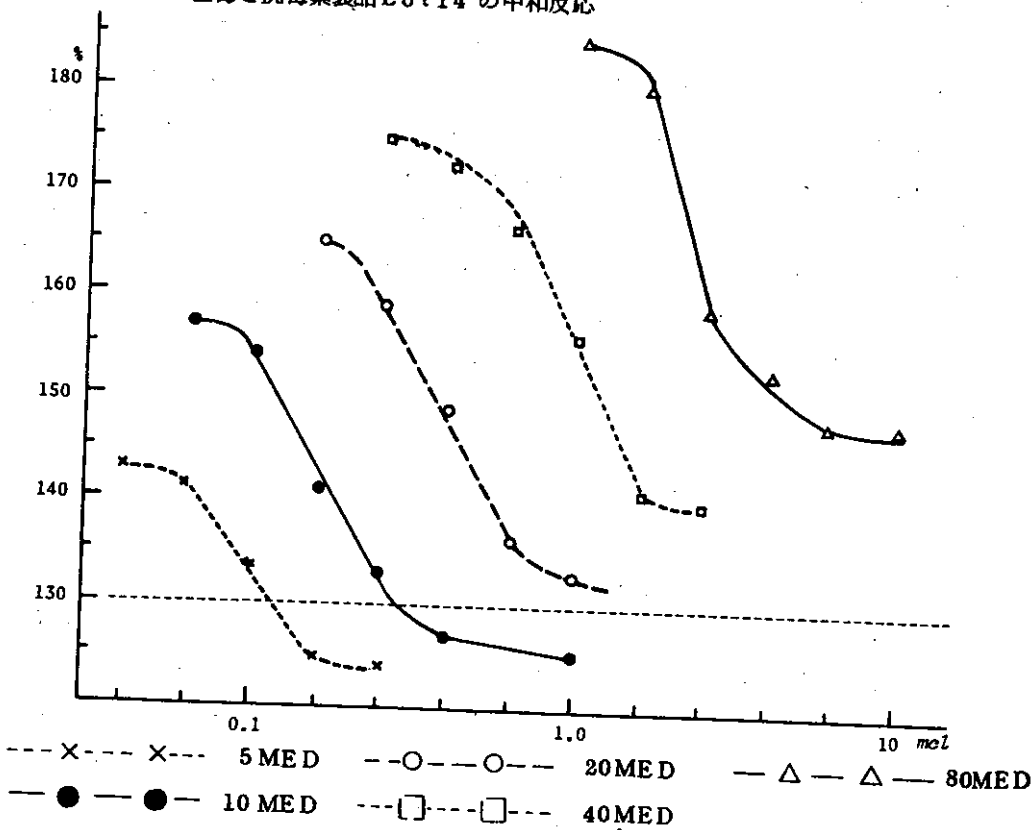
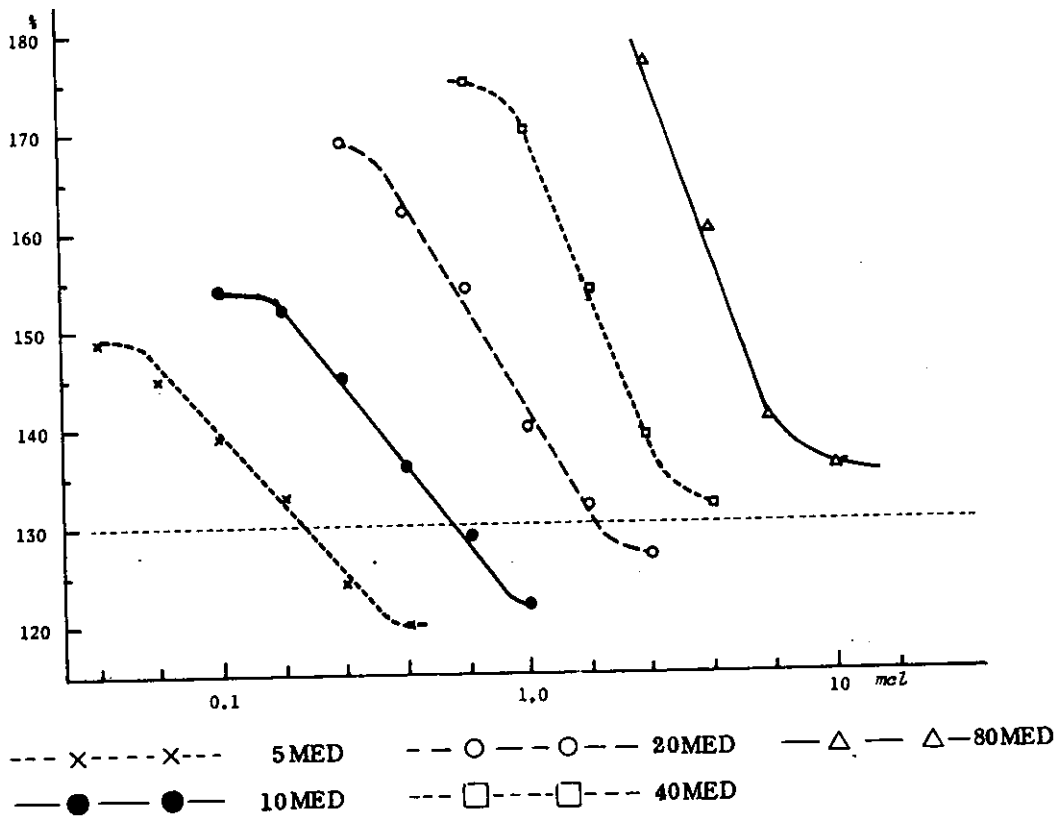


図1は粗毒を試験毒素とした場合の抗毒素製品Lot14による中和反応の結果である。又、図2はHR-Iを試験毒素とした場合のLot14との中和反応である。両図とも典型的な逆シグモイド曲線を示しているが、試験毒素の毒力レベルが高くなるに従って、中和されない部分が多く残っている。

図2 HR-I と抗毒素製品Lot14 の中和反応



粗毒を試験毒素とした場合、20MEDレベル以上の毒量に対しては、いくら抗毒素量を増やしても130%までおさえることはできない。又、HR-Iを試験毒素とした場合、20MEDレベルでも抗毒素量を増やせば130%の腫脹率に達することができる。しかし、40MED以上では、やはり130%まで中和することは困難であった。

次に両者ともある範囲内では腫脹率と抗毒素量の対数値との間に直線関係が認められるが、各直線部分の平行性は否定された。即ち、試験毒素量が増すに従って各直線のスロープも大きくなる傾向を示した。例えば、図2に示したHR-IとLot14の中和曲線のうち、直線部分だけの比較より求められたスロープbは、5MEDの場合32、10MEDの場合42、20MEDの場合56、40MEDの場合82、80MEDの場合90であった。

※ 稀釈抗毒素の原液に換算した注射量とmuster dilutionとの関係を示す表3を作っておけば便利である。

表3 稀釈抗毒素の原液に換算した注射量とmuster dilution との関係

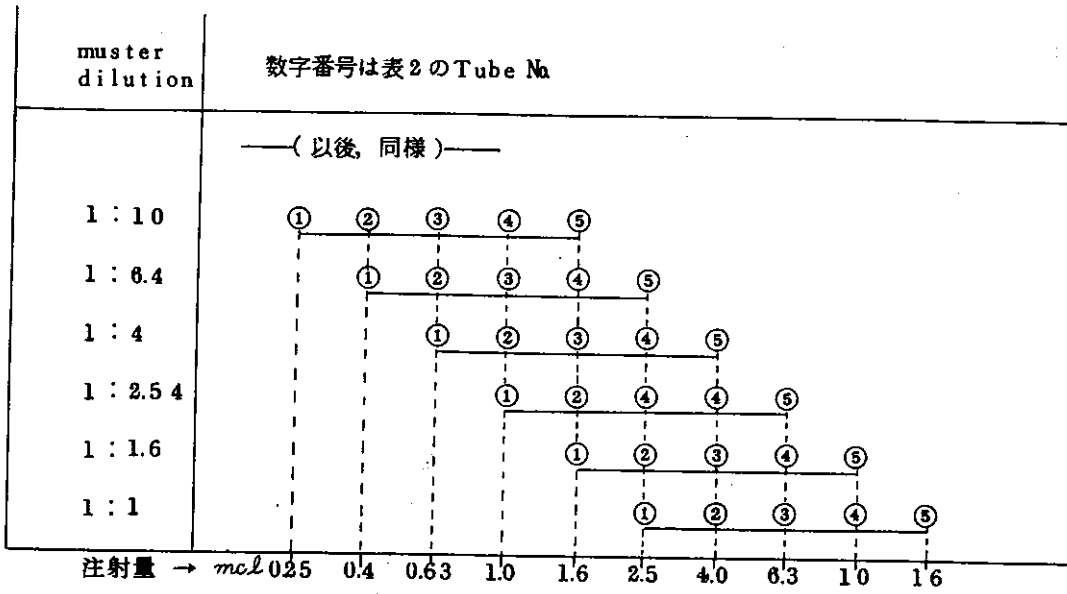
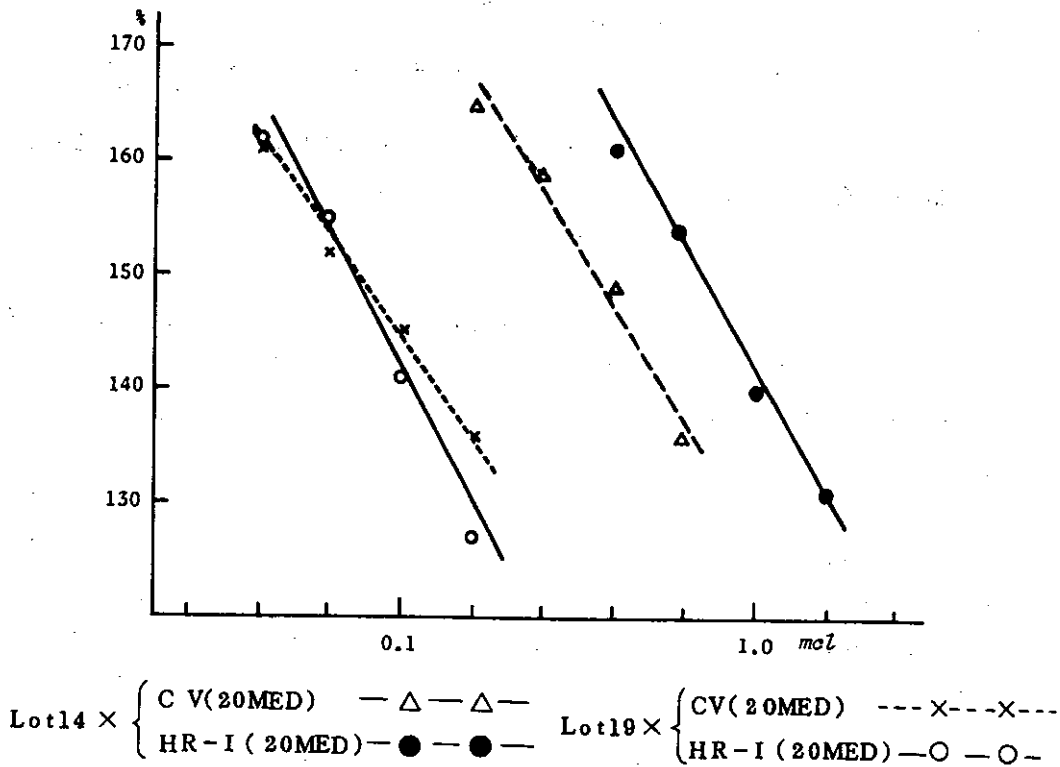


図3 Lot14及びLot19の粗毒又はHR-Iに対する中和反応



次に図1と図2を比較すると、粗毒を試験毒素とした場合はHR-Iを使用した場合より、同量の毒力を中和に必要な抗毒素量が少ないことがわかる。このことは図3に示したとおり、Lot14による粗毒20MEDとHR-I 20MEDに対する両中和直線が相互に大ききずれていることからわかる。この場合、抗HR-I血清であるLot19は粗毒とHR-Iの両者に対する中和直線が殆ど重なっていることと比較すれば、粗毒免疫血清Lot14はHR-I(20MED)に対するより粗毒(20MED)に対する中和力の方が大きいことがわかる。

II 抗(HR-I)腫脹単位

4種の抗毒素製品(Lot12, Lot14, Lot19, Lot22)についてHR-I 20MEDレベルにおける抗毒素量と腫脹率との関係を調べた。その結果図4に示した様に一定の範囲内で各用量・反応線は直線性が認められ且、平行関係が成立した。

図4 各抗毒素製品の用量反応直線(HR-I 20MED)

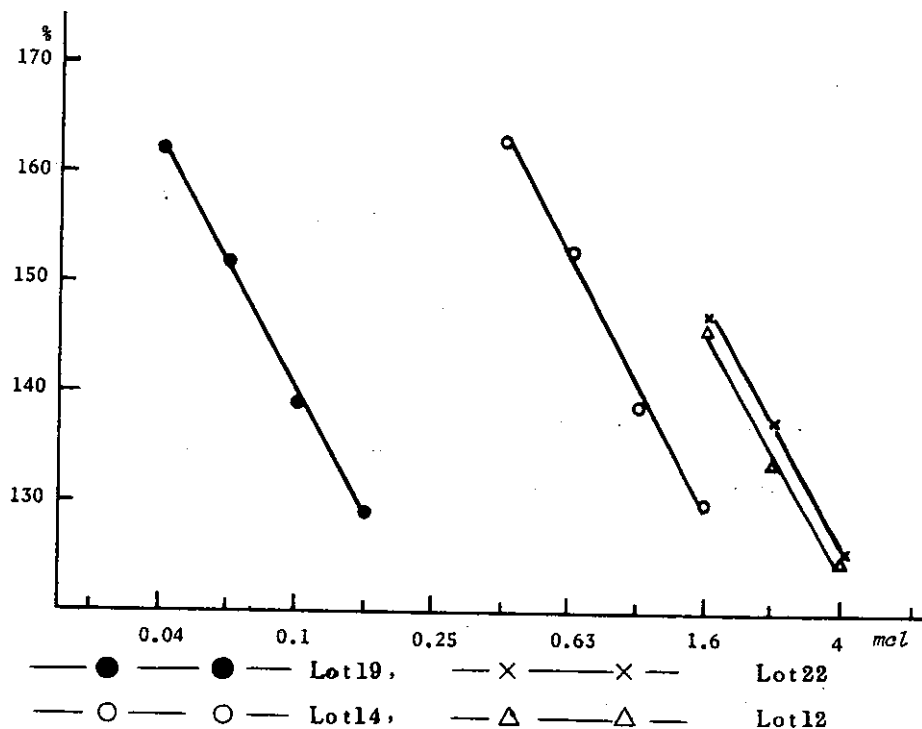


表4はこれらの用量・反応線の分散分析を行った結果である。このときの variance S^2 は34.362 共通の傾斜 b は-54.65であった。このように同一毒量(20MED)に対する各用量・反応直線は相互に平行であることが認められたのでLot14を仮の標準抗毒素として相対力価を求め表5に示した。

表4 用量反応線の分散分析

Nature of variation	S S	df	M S
Preparation	3314.02	3	1104.67
Regression	17094.35	1	17094.35
Parallelism	15.61	3	5.2033
Linearity	91.307	6	15.2178
Between doses	20515.29	13	1578.099
Error (within doses)	4329.6	126	34.3619
Total	24844.886	139	

表5 各抗毒素製品の相対力価及び抗腫脹単位

相対力価及び信頼限界		単位/ml
Lot14	1	605
Lot19	10.29 (9.19~11.5)	6596
Lot12	0.5 (0.44~0.58)	323
Lot22	0.46 (0.41~0.53)	297

試験用毒素：HR-I 20MED 危険率5%

さて、マウスに注射された抗毒素量の対数値Xと腫脹率Yとの関係を直線性が認められる範囲に限って一般に次式で現わすことができる。

$$X = \bar{X} - (\bar{Y} - Y) / b$$

但し、 \bar{X} は直線関係が認められる範囲内における抗毒素注射量の対数値の平均、 \bar{Y} は同範囲内での腫脹率Yの全測定値の平均、bは傾斜である。ここで1TD(この場合はHR-I 20MED)の試験毒素を中和して腫脹率が130%(中和終末点)になるような抗毒素の最少量を1単位とする。即ち、中和終末価はY=130のときのanti log Xの値(ml)である。よって上記の式は

$$X = \bar{X} - (\bar{Y} - 130) / b \quad \text{但し } b = -54.65$$

となる。又、抗毒素1.0ml中に含まれる抗腫脹単位は

$$\text{抗腫脹単位/ml} = \frac{1}{\text{anti log } X \times 10^{-3}}$$

で現わすことができる。このような方法で各抗毒素製品の抗腫脹単位を求め表5に示した。即ち、Lot19はLot14の約10倍の力価を示して抗(HR-I)腫脹力価は著しく高いが、Lot12及びLot22は逆にLot14の約 $\frac{1}{2}$ の力価を有しているに過ぎないことがわかる。

Ⅲ HR-II及びH₂-0に対する抗腫脹作用

HR-II及びH₂-0の1試験毒素量を5MEDとして各抗毒素製品(Lot12, Lot14, Lot19, Lot20, Lot23)との中和試験を行った。表2に示した方法で毒素・抗毒素混合液を作り室温に一時間放置した後、その20mclを1群10匹のマウス右足蹠に注射した。注射4時間後に各群ごと健足重量と腫脹足重量を測定して腫脹率を求めた。

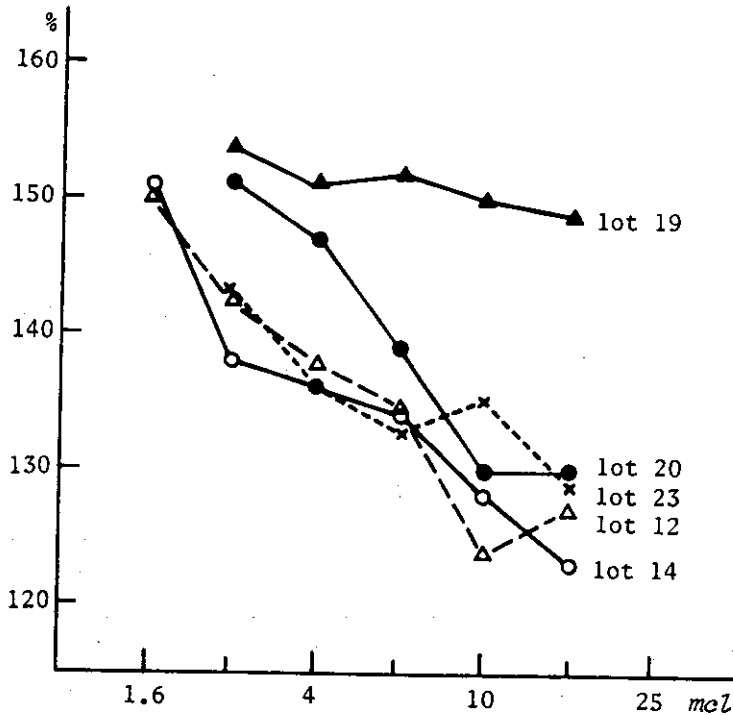
表6 HR-II 5MED に対する抗腫脹作用 (%)

Lot No \ 注射量 mcl	16	10	6.3	4.0	2.5	1.6
Lot 12	127	124	134	138	143	150
Lot 14	123	128	134	136	138	151
Lot 19	149	150	152	151	154	
Lot 20	130	130	139	147	151	151
Lot 23	129	135	133	136	143	153
対照	(153)					

表7 H₂-0 5MED に対する抗腫脹作用 (%)

Lot No \ 注射量 mcl	16	6.3	2.5
Lot 12	155	153	153
Lot 14	137	143	145
Lot 20	149	145	143
Lot 23	156	158	155
対照	(151)		

図5 HR-II 5MED × Lot14, Lot20, Lot23, Lot12, Lot19



結果は表6, 表7, 図5にまとめられたが, HR-I免疫血清であるLot19は全く抗(HR-II)腫脹作用を示さなかった。Lot19以外の各抗毒素製品は対照に較べて明らかに抗(HR-II)腫脹作用を示しているが, その作用は粗毒, 又はHR-I毒素に対する中和実験の場合より著しく弱かった。即ち, 試験毒素量を最低レベルの5MEDにし, 且, 抗毒素液は原液のまま使用してようやく抗腫脹作用を認めることができた。

しかし, これらの測定値を分析した結果, 腫脹率と抗毒素量の対数值間には直線関係及び平行関係を認めることは困難であった。

又, 表1, 表6.7, 及び図5を比較すればわかるようにウサギ背皮法で測定した場合, Lot20及びLot23の抗出血(II)価は著しく高いにもかかわらず, 抗(HR-II)腫脹作用はLot12又はLot14と殆ど差が認められなかった。

即ち, 粗毒で免疫して得たLot12及びLot14は, HR-II毒のみで免疫して得たLot20及びLot23と較べて抗(HR-II)腫脹作用が殆ど同程度であった。

次に, H₂-0毒素に対してはLot14に僅かに抗(H₂-0)腫脹作用を認めたが他の抗毒素製品については殆ど認められなかった。

このようにHR-II及びH₂-0毒素に対する抗腫脹作用は著しく弱く, 従って, これらに対する抗体を定性的に検出することはできたが定量的な取扱いをすることは困難であった。

蛇毒抗毒素の力価を表示する最も一般的な方法は、マウスによる抗致死作用の表示である。我国ではこれに加えて抗局所作用の一つである抗出血作用による方法をハブ抗毒素、及びマムシ抗毒素の力価表示に採用している。

しかし、他の重要な抗局所作用の一つである抗腫脹作用に関する表示はなく、又これに関する研究報告も殆どない。著者らは既に、ハブ毒の腫脹活性を定量的に扱う方法を報告した。又、ハブ毒、サキシマハブ毒の分画実験より致死、出血、腫脹の各作用は、必ずしも相関しないことを指摘した。

本論文では、ハブ毒の腫脹作用の定量法を応用してハブ抗毒素の抗腫脹作用の定量化を試みた。

一定量のハブ粗毒又はHR-I毒素に対してハブ抗毒素量を増やしていくと、その毒のもつ腫脹作用は、抗毒素量に対応して中和される。

しかし、ある限界に達するとそれ以上抗毒素を増やしても中和されないで残る部分がある。しかも、この残存非中和部分は、毒レベルが高い程（即ち、毒量が多い程）多く残り、又、粗毒の方が精製毒（HR-I）より強い傾向を示す。

これは、通常の中和機構のほか、免疫の過程で、ある毒成分に対しては抗体がよく産生されるが、他のある成分に対しては、殆ど抗体ができないことによるものであろう。

HR-I毒素のように部分精製されると粗毒の場合程、この傾向は顕著でなくなる。

次に、粗毒及びHR-Iを試験毒とした場合一定の範囲内で、腫脹率と抗毒素量の対数値間には直線関係を認めることができる。この場合、130%付近まで直線範囲と認められるのは、粗毒を試験毒としたとき10MED以下、HR-Iを試験毒としたとき20MED以下であった。

しかし、試験毒量をいろいろ変えてみると、これらの直線は毒レベルが高くなるに従ってスロープも大きくなる傾向を示した。

即ち、これらの直線間の平行性は、否定されたが相互に隣接している直線（例えば、5MEDと10MED、10MEDと20MED、又は40MEDと80MED）は、bの値が接近するので有意な差としては認め難い。よって、隣接した直線間は平行とみなし得る場合もあるが、5MEDと80MED間のように離れた直線間における平行性は完全に否定される。

HR-I 20MEDを1TDとした場合、腫脹率が130%の範囲まで直線と認められ、且、同レベルの毒量に対しては各抗毒素製品の中和直線が相互に平行であった。

この関係を利用して各抗毒素製品間の抗腫脹作用を相対力価で比較した。表5はHR-I 20MEDを130%の腫脹率まで中和するのに必要な抗毒素量が1.0ml中に含まれる数で、 $\frac{U}{ml}$ を表現した。例えば、Lot14がHR-I 20MEDを中和して130%の腫脹率を示すに必要な最小抗毒素量（中和終末価）は0.001652mlであり、従って1.0ml中には605倍含まれているので605 $\frac{U}{ml}$ と示した。

しかし、実際にはある特定の抗毒素を標準物質と定め、それに対する相対力価で単位を表わす方が合理的である。仮にLot14を標準抗毒素としてその単位を600 $\frac{U}{ml}$ と定めるとLot19は6541

$\frac{1}{ml}$ と決めることができる。

即ち、標準抗毒素に対して、あらかじめ任意の単位を与えることができるのであるが、上述のように、一定の毒素を中和する数とほぼ同じにした単位を与えておくといろいろ便利である。他の抗毒素製品に対しても同様な方法で単位を決めればよい。

次に、HR-I 免疫血清である Lot 19 は HR-I 毒素に対しては勿論、粗毒に対しても著しい抗腫作用を示した。

但し、図 3 が示した様に、粗毒免疫血清 (Lot 14) は HR-I 毒素より粗毒をよく中和するが、Lot 19 は HR-I と粗毒の間に中和力の差が殆どない。

本実験では HR-II 及び H_2-O に対する抗毒素価を定量することはできなかつた。これは 1 TD を最低 5 MED にしても原液でやると定性的に検出できる程度の抗毒作用しか認められなかつたことによる。特に、ウサギ背皮法で抗 (HR-II) 出血価が著しく高い Lot 20 及び Lot 23 が、弱い抗 (HR-II) 腫脹作用を示したに過ぎない。

即ち、粗毒で免疫して得た抗毒素も、HR-II 毒単味で免疫して得た抗毒素も、抗 (HR-II) 腫脹作用に殆ど差が認められなかつたのである。 H_2-O 毒に対しては定性的な検出さえ困難であつた。

この問題はいずれ再検討を要すると思ふが、特に抗原である HR-II 及び H_2-O の精製法に留意して、変性、失活などが起因したか否かを調べる必要があると思ふ。

しかし、現在治療に供されているハブ抗毒素 (粗毒免疫血清) は、ハブ粗毒中の HR-II 及び H_2-O の腫脹作用に対して必ずしも有効ではないかも知れない。このことはハブ受傷者が直ちに治療血清の投与を受けても腫脹だけ長時間持続するか、もしくは 2~3 日間腫脹が進展するという臨床症状と併せて考えると興味深い。(文献 25)

ま と め

ハブ抗毒素の抗腫脹作用の定量化を試みた。

- 1) HR-I 20MED を 1 試験毒素量としていろいろな抗毒素製品の抗腫脹価を定めることができた。
- 2) ハブ粗毒 10MED 以下を 1 試験毒素として抗腫脹価を定めることも可能であるが、この場合は粗毒中の HR-I 成分が重要な支配要因となる。
- 3) HR-II 及び H_2-O 毒素に対する抗腫脹価を定めることはできなかつた。

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) 服部善八郎：腸炎ビブリオの実験的感染法に関する研究（第Ⅲ・第Ⅳ報），東京獣医学畜産学雑誌，19，1970
- (2) 外間善次：サキシマハブ（*Trimeresurus elegans*）毒トキシノイドに関する基礎的研究，*The Snake*，4，23-33，1972
- (3) 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.
- (4) 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
- (5) L. J. Reed and H. Muench: A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Amer. J. Hyg*, 27, 493-497, 1938.
- (6) Tamotsu Omori-Satoh, 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.
- (7) 小此木 丘，服部善八郎：ハブ蛇毒のアルコール処理による弱毒化とその免疫原性について *日本細菌学雑誌*，23(2)，1968
- (8) 沢井秀男，川村善治，福山民夫，清水敏夫，小此木 丘，服部善八郎，五十嵐勇：ハブ蛇毒トキシノイドの基礎的研究，2，マウス足蹠法によるトキシノイドの副作用に関する実験的研究，*日本細菌学雑誌*
- (9) 沢井秀男他：琉球におけるハブ咬症の治療に関する研究報告書（N-XI），1965-1971
- (10) Yoshio Sawai, Hiroshi Chinzei, Yoshiharu Kawamura, Tamio Fukuyama and Takashi Okonogi : Studies on the improvement of treatment of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) bites. 9. Studies on the immunogenicity of the purified habu venom toxiod by alcohol precipitation. *Japan. J. exp. Med.*, 42, 155-164, 1972.
- (11) Takahashi T. and Ohsaka A.: Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principle from proteolytic activity: *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65-75 1970.

- (12) Tamotsu Omori, Sadaaki Iwanaga and Tomoji Suzuki.: The relationship between the hemorrhagic and lethal activities of Japanese mamushi venom *Toxicon*, 2, 1-4, 1964.
- (13) 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.
- (14) Omori-Sato T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65, 1970.
- (15) 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
- (16) 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 venom ejected by a single bite of *Trimeresurus* species; *Japan J. Med. Sci. Biol.* 25 123-131, 1972.
- (17) 沖縄県公害衛生研究所報, 第5号~第9号
- (18) 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年
- (19) 牧野正顕: 抗ハブ毒血清の力価測定および2, 3の薬剤の抗ハブ毒作用について, *日新医学*, 47(2), 120~129, 1960
- (20) Yoshio Sawai, Hiroshi Chinzei, Yoshiharu Kawamura, Tamio Fukuyama and Takashi Okonogi.: Studies on the improvement of treatment of Habu Snake bite. Studies on the improvement of Habu Snake antivenine. *J. Exp. Med.*, 31. 137-150, 1961.
- (21) 沢井芳男: 人と大島とハブと, *日本医事新報*, 1793号, 57~60, 1958
- (22) 沢井芳男: ハブ毒と死, *東京医事新誌*, 77(9), 501~505, 1960
- (23) 真栄城優夫: ハブ咬症の臨床, *日本熱帯医学会雑誌*・第3巻第1号, 昭和50年
- (24) 沢井芳男: アジアにおける毒蛇咬症の現状, *The Snake*, Vol.5, PP.29-75, 1973
- (25) 沢井芳男: 毒蛇咬症の治療, 1. 日本及び韓国, *The Snake* Vol.7, PP.49-67, 1975
- (26) Tamotsu Omori-Sato and Akira Ohsaka: Purification and some properties of hemorrhagic principle I in the venom of *trimeresurus flavoviridis*: *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65, 1970.
- (27) Tomoko Takahashi and Akira Ohsaka: Purification and characterization of a proteinase in the venom of *trimeresurus flavovi-*

ridis; Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity: Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 293-307.

- (28) W. Bücherl, E. Buckley and V. Deulofeu; Venomous Animals and their Venoms, Vol. 1, Academic, 1968.
- (29) Minton, S.A.: Snake Venoms and envenomation. 1970.
- (30) 沖縄ハブ抗毒素開発研究報告書, 昭和48年度
- (31) 沖縄ハブ抗毒素製造研究報告書, 昭和49年度