

主論文

(85)
2-1タイワンコブラ (*Naja naja atra*) 毒の
トキシイド化に関する実験的研究

福 山 民 夫

東京大学医科学研究所

1
タイワンコブラ (*Naja naja atra*) 毒のト
キソイド化に関する実験的研究

福 山 民 夫

東京大学医科学研究所
熱帯疫学特別研究室

目 次

緒 論

第一章 実験材料及び方法

第二章 タイワンコブラ毒による致死及び
局所壊死に関する実験成績第三章 タイワンコブラ毒の無毒化に関する
実験成績第四章 コブラ毒ホルマリントキソイドの
免疫原性に関する実験成績

総 括

結 論

文 献

緒 論

世界に棲息する蛇の種類は、おおよそ 2,800 種とされ、このうち約 400 種が毒蛇であるが、実際に人畜に大きな被害を与えるのは 150 種あまりであると言われている。これらの毒蛇はいづれも動物学上における分類によると爬虫綱、有鱗目、蛇亜目の Elapidae (コブラ科) あるいは Viperidae (クサリヘビ科) に属している。東南アジアに分布している陸棲毒蛇の科及び属について述べると、コブラ科では、*Bungarus*, *Calliophis*, *Masticola*, *Naja*, *Ophiophagus*, の 5 属 24 種が、クサリヘビ科では *Agkistrodon*, *Azemions*, *Trimeresurus* 及び *Vipera* の 4 属 41 種が生棲している。

また台湾においては、20 種の毒蛇が知られているが、このうち陸棲蛇は 11 種で、9 種は海蛇である。このうち人畜に被害の多い陸棲蛇について表 1 にその種類を記載した。

タイワンコブラ (*Naja naja atra*) は Elapinae (コブラ亜科) の *Naja* 属 (コブラ属) における一亜

種であり、台湾、中国東南部、海南島及び北ベトナムに分布している。その大きさはおおよそ 1000 mm であるが、1654 mm に達する例も報告されている。この種も他のコブラと同様、威嚇するときは頸部を横にひろげ明瞭な "hood" をつくる (Fig. 6)。

ついでコブラ咬症について述べると、受傷後の比較的早期に、ねむけ、言語障害、嚥下困難、流涎、意識障害、呼吸困難等の神経麻痺性の全身症状が主徴としてあらわれ、吐気、嘔吐、腹痛などを伴うこともある。激烈な症例では受傷後1時間以内に死亡することもある。また咬傷局所には限局性の壊死がみられる。以上のごとくコブラ咬症における症状は、神経麻痺症状と局所壊死である。

タイワンコブラ毒の毒性因子としては、主要な致死因子として Cobrotoxin が Yang (1965)²³⁾ により分離精製された。この毒素は神経毒性であり、組織の神経筋接合部に作用することが知られている。壊死因子については

Lee (1968)²⁷⁾ により心臓毒性因子として分離された Cardiotoxin が、組織細胞に障害作用を持つと言われているが、まだ不明の点が多い。

次に毒蛇咬症の治療及び予防に関する歴史的背景についてまず述べると、1890年 Behring 及び北里によつて発見された破傷風及びジフテリヤ毒素に対する抗毒素によつて、免疫の原理あるいは血清療法への道が、はじめて開かれたことは周知の事実である。蛇毒の領域に血清療法をとり入れたのは、5年後の1895年で Phisalix 及び Calmette によつて行なわれた。これらの研究でコブラ毒に対する馬の抗毒素血清が、実際のコブラ咬症の治療に有効であることが確かめられると、世界各国でそれぞれの地域で問題となる毒蛇咬症に有効な治療血清の開発が行なわれるようになった。

一方ワクチンによる疾病の予防は、Jenner, Pasteur にさかのぼらねばならないが、いわゆ

る細菌毒素による疾患であるジフテリアの予防に、ジフテリア毒素にホルマリンを加えて無毒化したホルマリントキソイドが、Glenny (1921) 及び Ramon (1923) によつてとり入れられた。しかし蛇咬症に対する治療血清がジフテリア抗毒素の発見後5年目に早くも創成されたのに比べると、蛇毒トキソイドによつて毒蛇咬症を予防しようとする試みはなお長期間を必要とした。

その理由は蛇咬症の領域では、抗毒素によつて問題は解決されたものと一般に信じられていたこと、あるいは馬を免疫してより高い力価の抗毒素を得るために必要な蛇毒の減毒が失敗に終つたことである。そのうえこれまで毒蛇に何回も咬まれた人の中で免疫ができたと言う例もあまり聞かないので、蛇毒に対する免疫は成立ちにくいのではないかという悲観的な見方も手伝つていたと思われる。

しかし熱地あるいは僻地で實際の蛇咬症に悩まされている住民、あるいは毒蛇の飼育や

採毒に従事している人々の間には、蛇毒に対する予防が必要であることが痛感されていたことは言うまでもない。しかしやがて治療血清の成分である馬の血清蛋白に対して特に強い過敏性反応を示すために、万一受傷した場合に血清注射が危険であるような人々の要請にもとずいて、人々に対する予防接種を試みようとする研究が報告されるようになった。

すなわち Wiener (1960)¹⁸⁾ はスネークパークの一職員にオーストラリア産のタイガー・スネーク (*Notechis scutatus*) の神経毒を微量から注射を続けた結果、13ヵ月後に40mgの毒の注射にも耐えるようになったことを報告している。また Flower (1963, 1965)²¹⁾ はインドコブラ毒を Na-alginate で減毒したものを、自分自身に注射して17回目の注射後、5ヵ月で血中にコブラ毒に対する致死防御抗体の上昇を認め、予防接種の可能性を示唆した。

沢井等 (1969)²⁴⁾ は抗毒血清によるハ

ブ咬症の治療には一定の限界のあることを疫学調査の結果知り、ジヒドロキオクト酸で不活化したハブ毒トキソイドを奄美大島及び沖縄の住民の志願者に接種したが、その間に起ったハブ咬症患者の調査の結果、トキソイドは受傷局所に起る壊死を防ぐのに有効であることを報告した。

コブラ咬症に関してもこれまで沢井等(1973)⁶⁾の調査により、東南アジア諸国における蛇咬症のうち最も高い致命率を示すコブラ咬症では、治療血清の注射を受ける以前に死亡する患者の多いことから、ここでも予防接種の必要性が強調されている。

さてコブラ毒トキソイドに関するこれまでの研究では、矢追及び川島ら(1928)¹⁾の報告によれば、0.25%の毒を含む生理食塩水にホルマリンを0.5%に加えて、37℃で無毒化したトキソイドをウサギに注射した結果免疫効果を認めたと報告しているが、一部の動物は免疫の途中で死亡し、生き残ったウ

サギの体重も全て減少していることなどから毒素が完全に無毒化されていたかどうかは疑わしい。また血中の中和抗体の産生を認めるためには、接種総量が100mgでは不十分で165mgを必要としたことから、その免疫原性はかなり弱いものであった。また Grass-et 及び Zoutendyk (1933)⁴⁾ らは、ケーブコブラ (Naja flava) の毒を生理食塩水に溶解し、これにホルマリンを加えてトキシイド化を試みたところ、無毒化されなかったが、Martin's broth に溶解したところほぼ2週間でその毒性が失われ、高い抗原性を有するトキシイドを得たと述べている。しかし田中(1941)¹³⁾

はタイワンコブラ毒を用いてこの方法に準じてトキシイド化を試みたところ、無毒化するまでには2ヶ月を要した。またこれを馬に免疫したが血中の抗毒素を全く証明し得なかったと報告している。赤塚(1936)⁶⁾ によれば Naja naja naja の毒を生理食塩水で1%濃度とし、これに0.4%にホルマリンを添加し

で40℃に放置した場合には、6週間で無毒化した。37℃ではさらに7週間を要したと言う。またこの変性毒素の抗原性を調べるために、マウス及び家兎を用いて長期に亘り大量の毒を投与したにもかかわらず、その免疫効果はマウスでは全くなく、ウサギにおいてもその血中に抗毒素の存在を確実に証明できなかった。桑島(1938)^{7, 8, 9)}はホルマリンによるコブラ毒の無毒化は容易でないことを知り、0.1~1.0%のタイフンコブラ毒溶液に3%のホルマリンを加え、さらにこれを100℃あるいは75℃で加熱したところ、75℃の加熱では1時間で毒性が失われた。このようにして無毒化したトキシイドを家兎に免疫したが、氏は「コブラ毒のトキシイド化は著者の方法にては良好な抗原たりえず」と述べている。Salafranca (1970)³⁸⁾の報告もまたフィリッピンコブラ毒をホルマリン処理して馬を免疫しているが、投与量を多くすると麻痺があらわれ、中には斃死したも

11

のもあることから、まだかなりの毒性が残されているものと思われる。

このように従来の研究においては、タイワンコブラのみならず他のコブラ毒もホルマリンによる無毒化は非常に困難を極め、その免疫原性も低いことなどから、トキソイドと称するものを作り出すには至らなかった。また Kocholaty (1968)³²⁾ はインドコブラ及びその他の蛇毒を用いて、少量のメチレン青の存在で photooxidation によって不活化を試みた。また沢井ら (1969)³³⁾ はタイワンコブラ毒は、ジヒドロクオクト酸を用いても不活化されることを示唆した。最近では Lauhatirananda ら (1970)³⁶⁾ 及び Mittelstaedt ら (1973)⁵³⁾ はコバルト60によるコブラ毒の不活化を試みた。

このように先人達によってこれまでに行なわれた蛇毒トキソイド化の主たる目的は、できるだけ高いカ価の治療用抗毒素血清を製造するために馬を免疫するためのものであり、

たとえ無毒化が不十分で若干の毒性が残されていても、あるいは免疫原性が低下していても、基礎免疫時に生の毒を接種するよりはかなり多量の毒を注射することが可能であることから、それなりの意義はあるものと思われる。しかし人に能動免疫を与えるためのトキソイドは、良好な免疫原性を有することは勿論であるが、無毒化は特に完全であることが要求される。従来の特キソイドはこのような条件を満足させるものではなかった。

先にコブラ毒には致死因子の他に壊死因子が存在し、咬症患者の多数に壊死が認められ、無視できぬ毒性の一つであることを述べた。今までのコブラ毒トキソイドに関する研究では、致死因子についてのみ検討され壊死について全く触れられていなかった。しかし今後はこの壊死についても検討する必要があるが、残念なことにこれまでこの局所病変に注目した実験報告が少なく、それも筋肉内注射によるもので、実際のコブラ咬症患者に見

られるものとは全く異なつたものであつた。
このような理由から、局所壊死について検討
を加えるためには、まず適当な実験方法を開
発する必要がある。著者はこのような観点か
ら、咬症患者にみられるものと同様な病変を
ウサギやモルモットに再現すべく研究を試み
たところ、後に述べるようにその方法を見出
すことができた。

そこで今回は実験動物に再現した局所壊死
の性状について詳しく検討を加え、かつ人体
接種が可能なタイフンコブラ毒トキソイドを
試作するために、ホルマリンによる無毒化の
条件及びその致死あるいは局所の壊死に対す
る抗原性について検討した結果、確実に無毒
化されしかも優れた免疫原性を有するなど、
人体に応用することが期待できるトキソイド
を作ること成功し、且つこの研究にかかわ
る一連の実験から2, 3の新知見を得たので
ここに報告する次第である。

第一章 実験材料及び方法

1) コブラ毒 凍結乾燥されたタイワンコブラ粗毒及び精製コブトロキシン (Cobrotoxin) を用いた。前者は日本蛇族学術研究所より、また後者は台湾高雄医学院の楊教授より分与されたものである。これらの毒をチメロサル 0.01% を含む $1/30$ M リン酸緩衝食塩水 (PBS) で、粗毒は 1% ($10 \text{ mg} / \text{ml}$)、コブトロキシンは 0.1% ($1 \text{ mg} / \text{ml}$) 溶液とし、遠心により不溶物を除去したものを用了。

2) 実験動物

イ) マウス 致死活性の測定には体重 14 ~ 17 g の DDY 系マウスを用いた。

ロ) ウサギ 免疫を行なう目的には体重 2,500 ~ 3,000 g のものが用いられ、壊死に関する実験には 3,000 ~ 4,500 g の大きい白色ウサギを用いた。

ハ) モルモット 免疫には 300 ~ 350 g, 壊死をつくる目的の場合は 450 ~ 550 g

0.8 の白色モルモットを用いた。

3) 毒性試験 マウスに対する致死活性は毒溶液を2倍間隔に希釈して、その0.2 ml を体重14~17gのマウス4匹ずつの腹腔内に注射し、24時間後に生死を判定し、最小致死量 (MLD) または50%致死量 (LD_{50}) を計算した。 LD_{50} の計算は Reed-Muench 法 (1938)¹⁰⁾ によった。

また壊死については脱毛したウサギまたはモルモットの背部皮膚に3cm間隔の広さにマジックインクで線を描き、その中心部に毒素溶液の0.2 ml を皮内注射して、形成された病変部の縦及び横の径を計り、その平均値で大きさを表わした。必要ある場合は動物を麻酔死させ、皮膚をハサミで切断して剥ぎ取り、ガラス面に元の大きさになるように張り付けて測定した。

4) ホルマリンによる無毒化試験 無毒化に要するホルマリンの濃度あるいはpH等を検討する場合には、透析によりホルマリンを除

去した後の試料を 0.2 ml ずつ、動物に免疫するためのトキソイドの無毒化を調べる場合には 0.5 ml ずつを 5 匹のマウスの腹腔内に注射し、24 時間後にすべてのマウスに異常を認めないときに無毒化が完了したものとした。またトキソイドの 0.2 ml をウサギの背部皮内に注射して、壊死がでないことを確認した。

5) 毒素の精製方法 岩瀬 (1932, 1933)^{2,3)} 及び Yang (1965)²³⁾ などの方法に準じ、硫酸塩析法によつて精製した。粗毒を pH 6.5 の PBS で 10 mg / ml に溶解し、この溶液に固型硫酸 (特級) を加えて 60% 飽和とする。数時間放置後、冷却遠心して沈澱を除去した上清に、さらに硫酸を添加して 90% 飽和とし、再び遠心した沈澱を蒸留水で溶解し、セルロースチューブに詰め、透析によつて脱塩を行った後に凍結乾燥して保存した。

6) 毒素の蛋白質量の測定

Micro-Kjeldahl 法に

よった。

7) 沈降トキソイドの製法 2容量のトキソイド溶液に1容量の0.148M塩化アルミニウム ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を加えてよく攪拌し、次に同じく1容の燐酸ナトリウム ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) を加え、pHを6.5に修正し、最後に防腐剤としてチメロサルを0.01%に加えた。この沈降トキソイド1mlには蛋白量にしてスmg相当のコブラ毒とアルミニウム1mgが含まれている。

8) トキソイドの抗原性試験

1) 免疫方法 体重300gないし350gのモルモットに初回は0.5ml (0.5mg相当の粗毒を含む) を等量のフロイント・アジュバントとともに皮下注射し、以後は3週間隔でアジュバントを含まないトキソイドを0.5mlずつ2回、1mlずつ1回追加注射した。採血は最終注射から14日目に心臓穿刺によって行ない、5匹のモルモットの血清を混合したものの抗毒素価を測定した。

ウサギを用いる場合には体重 2.5 ないし 3 kg のウサギを前と同様な方法で、トキシイド 1 ml とずつを 3 週間隔で 4 回皮下注射し、耳静脈から採血して血清を分離し、抗致死価及び抗壊死価の測定を行なった。

ロ) 血中抗毒素の測定 抗致死価は血清 1 ml に一定の毒量を含む粗毒液 0.25 ml を加え、室温に 1 時間放置後、その 0.5 ml (血清 0.4 ml が含まれる) をマウスの腹腔内に注射し、24 時間後の生死を観察した。この場合毒量量の希釈間隔は 1.4 倍とした。対照のマウスには血清のかわりに PBS を用いた。抗致死価は血清 0.4 ml の中和した毒量を最小致死量あるいは LD₅₀ の倍数であらわした。

抗壊死価の測定は白色のウサギを硫化バリウムで脱毛し、血清と一定量の毒素を含む粗毒液を等量に混合し、室温に 1 時間おいた後にその 0.2 ml を 1 匹のウサギの背部皮内に注射し、24 時間後に皮膚に作られた壊死部

の縦及び横の径を測り、その平均値を求め、
匹のウサギの平均値を壊死の大きさとした。
対照のウサギには血清の代りに P B S を用い
た。

ハ) 免疫動物のコブラ毒に対する防御能 脱
毛した免疫モルモットの背部皮内の1ヶ所に
一定量の粗毒を注射し、その生死を経時的に
観察すると同時に注射局所に作られた壊死の
大きさについても測定した。

免疫ウサギの場合には背部皮膚の2ヶ所に
一定量の粗毒を皮内注射して、できた壊死の
大きさの平均値を求めると同時に、他の免疫
ウサギには一定量の毒液を筋肉内に注射して
、その致死防御能を観察した。沈降トキソイ
ドで免疫したウサギについては、筋肉内に粗
毒攻撃を行ない致死防御効果のみを観察した
。

9) 病理組織学的検索 コブラ毒を注射し
た局所の病理組織学的所見を調べるための標
本は、実験材料を10% (V/V) ホルマリン

に浸けて保存し、病理切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

第二章 タイフンコブラ毒による致死及び 局所壊死に関する実験成績

一般に蛇毒の毒作用としては、神経毒作用、出血作用、壊死作用、溶血作用、血液循環障害作用、血液凝固阻止あるいは血液凝固促進作用などが存在することが知られている。

しかしながらこれらの毒作用を発揮する毒成分については、明らかにされているものは少なく、かつ毒蛇の種類によってそれぞれの毒に含まれているこれらの成分の割合は、かなり異っているため、これらの作用のうちのどれが致死という現象に最も大きな影響を与えるかについて明らかにすることは、一般的にかなり困難である。しかしタイフンコブラでは咬症患者があらわす臨床所見あるいは動物実験などの結果から、主な致死因子であるコブロトキシンが単離され、また一方ではコブロトキシンとは関係なく局所に壊死を起す因子のあることが明らかにされている。

I コブラ毒の致死作用

本実験はコブラ毒の致死作用を時間的な面からとらえ、且つ毒の注入経路の相違による差異等を明らかにすることと目的とした。

コブラ粗毒をリン酸緩衝食塩水 (pH 7.0) で溶解し、0.2 ml 中に 7 mcg (50% 致死量) 又は 10 mcg (最小致死量) を含有する濃度の異なる2種の粗毒溶液をつくる。その粗毒溶液の 0.2 ml をそれぞれ静脈内、腹腔内、筋肉内の経路で一群4匹のマウスに注射した。毒を注射後これらのマウスの生死を経時的に観察した成績について述べる。

1 ml の毒量を筋肉内に注射したマウスでは、注射後2時間以内に3匹が死亡し、残りの1匹も4時間以内に死亡した。また50%致死量の毒を注射したものは、2時間以内に半数の2匹が、4時間以内にはさらに1匹が死亡したが、残りの1匹は以後元気を回復して24時間目の観察時にも何らの異常を示さず生存していた。次に1 ml の毒量を腹腔内に注射した群のマウスは2時間以内に全

て死亡した。50%致死量では注射後2時間目の観察時には半数の2匹が死亡していたが、残りの2匹は以後無事に耐過した。また静脈内注射した場合も同様で、1mldの毒量を注射した群のマウスは2時間以内に全てが死亡した。50%致死量の毒を注射した群では2時間以内に4匹中3匹が死亡したが、残りの1匹は以後の観察に於ても死亡しなかった。

この成績から注射毒量や注射経路の如何を問わず、死亡するマウスは全て注射後4時間以内という短い時間で死亡し、ここで発症はしていても生残った動物は以後すみやかに回復して生存するという興味ある現象が明らかにされた。

II コブラ毒の壊死作用

この実験はトキソイドによる致死防御のみならず、壊死防御についても検討を加えるため、咬症患者にみられる壊死と同様な壊死を実験動物に再現し、その性状を明らかにする

ことを目的として行なった。

1) 注射経路及び局所壊死の経時的変化

0.5mgあるいは1.0mgの毒を筋肉内や皮内に注射して、注射経路による局所壊死の差異について検討を行なった。筋肉内注射を行なった場合、外部からの観察では、皮膚表面の変化は全く見られなかったが、注射部位を切開すると、筋層部分に極めて限局した色調の変化が認められるにすぎなかった。皮内注射では皮膚表面に注射部位を中心として、円形に近い健康部との境界が明瞭な壊死が認められた。この病変は臨床報告例や沢井らによる調査研究において観察された咬症患者にみられる壊死と酷似していた。よって以後の研究には主に皮内注射が用いられた。

1mgの粗毒をウサギの背部皮内に注射して、肉眼的変化を経時的に観察したところ、次のような変化が認められた。

注射から数分経過すると、局所は腫脹しはじめ皮膚の表面は淡紫色を呈する。これは時

間の経過とともに次第に拡大する。注射後1時間ではその中心部は帯黄乳白色に変化して、直径が14mm程度で境界が不明瞭な円形に近い病変が形づくられている。

注射後5時間では色調は1時間後の状態とほぼ同じであるが、腫脹は増大している。

注射後24時間になると病変部全体が帯黄乳白色となり、中心部は褐色に変化している。腫脹は腹側部にそって帯状に下垂していく。

注射後48時間では壊死部の周辺は細い赤色のリングに囲まれて正常部と明瞭に区分される。壊死部はほぼ全体が茶褐色に変化しているのが観察された (Fig. 7)。

注射後5日目には壊死部全体が茶褐色になって、周囲の健康部分よりやや陥没している。腫脹は減退して軽度となる。

10日目では壊死部は健康部位よりかなり陥没し、色調は5日目と変わらないが、腫脹は全く回復している。

14日目には局所は黒褐色を呈し、痂皮状で周囲より脱落しつつあるのが認められた。

このようにしてウサギの皮膚につくられた局所壊死の経時的変化は、モルモットを用いてもほぼ同様な結果をえた。

2) 壊死の病理組織学的検索

コブラ毒の粗毒 300mcg をウサギの背部皮内に注射して24時間後に動物を麻酔死させ、局所病変を病理組織学的に観察したところ、表皮は萎縮して、表皮下に好中球の限局的滲出がみられた。皮下は一般に水腫性で皮下筋層の融解壊死が認められた (Fig. 8)。

次に 500mcg を筋肉内に注射した例では骨格筋層の筋線維の融解壊死と線維間に好中球の滲出がみられた (Fig. 9)。

この他 200mcg をモルモットの皮内に注射してから2時間後の比較的早期の組織変化を調べたところ、皮下組織に近い筋線維の表側では、筋束が乱れて疎となっていて、間質は水腫性であった。個々の筋線維には、硝子様変性 (凝

固壊死) 又処によつては筋融解像が認められた。これらの標本のいづれにも出血は全く認められなかつた。

3) 毒素量と壊死との関係

1000 mcg, 300 mcg, 100 mcg, 30 mcg の各毒素量をウサギの背部皮内に2カ所(1000 mcg は別のウサギを用いて1ヶ所のみ注射した)ずつ注射して、壊死形成に必要な最小毒量を求めたところ、表2に示したように100~300 mcgの粗毒を必要とすることが明らかにされた。

次にウサギを用いて経時的に壊死の大きさの変化を測定した。その結果は表3に示されたように注射後1時間で形成された壊死は、時間が経過してもその大きさはあまり変らなかつた。このことからタイフンコブラによる壊死は毒の注入後早期に形成されることが判明した。このような実験をモルモットについても試みたが、表4に示されたように、ほぼ同じ成績がえられた。

4) ウサギとモルモットの皮膚の毒に対する感受性の比較

モルモットを1群4匹とし、毒素を1匹に1ヶ所ずつ皮内注射した。各毒量における壊死の大きさは、4匹の平均値であらわした。ウサギでは各毒素量を1匹につき2ヶ所ずつ注射して、4匹の平均値で示した。実験成績は表5に示されているが、これによるとウサギでは、直径10 mm前後の壊死をつくるためには200 mcgの毒量を必要としたが、これに対してモルモットでは50 mcgでほぼ同じ大きさの壊死が形成された。このことからモルモットの皮膚はウサギのそれに比較して、コブラ毒に対して鋭敏であると思われる。

5) コブロトキシンの壊死形成能

粗毒を対照として、コブロトキシンの壊死形成能を検討した。モルモットは1群4匹を用いて、粗毒及びコブロトキシンの各毒素量を別々のモルモットに注射した。モルモット

では粗毒のLD₅₀は200mcgであったが、壊死はその1/4量で明確に認められた。しかしながらコブロトキシンを注射したモルモットにはLD₅₀に近い12.5mcgを注射した例でも、生存した動物のいずれにも何ら変化が見られなかった(表6)。次にウサギに对照として300mcgの粗毒を、他の部位に一定の毒量のコブロトキシンを1ヶ所注射し、1群2匹ずつを用いて検討した(表7)。100mcg以上のコブロトキシンを注射したウサギは全て死亡したが、生存する3匹についてみると、粗毒を注射した部位には平均13mmの壊死がみられたが、コブロトキシンを注射した箇所には全く異常を認めなかった。

次にコブロトキシン12.5mcgをモルモット及びウサギの皮内に注射し、24時間後に病理組織学的検索を行なった結果、いずれも患部の皮下組織は筋層近くに水腫が認められた外は異常がなかった。

またウサギの下腿筋肉内に致死量に近いコブトキシン50mcgを注射した例でも、筋線維の間に水腫が認められただけで筋線維には変化が認められなかった。

考 察

まずタイワンコブラ毒の致死作用について考察を加えると、最小致死量あるいは50%致死量の毒量を注射されたマウスは、毒量や注射経路の相違にはあまりかかわりなく、注射後短時間内に死亡し、ここでは発症はしていても死をまぬがれた動物は、以後漸次症状が消退して元気に生き続ける現象が明瞭に認められたことから、致死因子は毒の注入後その毒作用を極めて短い時間内に発揮し、長時間に及ぶ持続作用は持っていないことを示す証拠であろう。このような毒作用は著者の経験ではタイワンコブラ毒のみならず、インドコブラ (*Naja naja naja*)、タイコブラ (*Naja naja kaouthia*)、フィリッピンコブラ (*Naja naja philippinensis*) においても同様であった。このことは実際の

コブラ咬症患者のうち、不幸にも死亡したものの多くは受傷後短い時間内に死亡しているのも、この様な毒作用によるものと思われる。

次にウサギ及びモルモットを用いて皮内注射によってつくられた壊死部の皮膚を剝離して観察すると、その変化は皮膚のみに限られており、壊死部と接する骨格筋層には及んでいない。筋肉内注射した場合にも壊死は注射部位のごく限られた筋肉層にのみ認められ、皮膚には全く及んでいなかった。これは病理組織学的所見によっても確認された。この事実からコブラ咬症による局所の壊死は皮膚壊死であると考えられる。筋肉内注射による壊死はごく限られた部分にしかおきないことは、筋壊死が広範囲に及ぶ出血性蛇毒によるものとは、かなり性質を異にしている。またハブ毒などの出血毒による壊死には、必ず強度の出血を伴っているが、コブラ毒の壊死巣には出血が認められないのが特徴であった。

このことからコブラ毒には出血を伴わない壊死因子が存在することが示唆される。Homma 及び Tu (1971)⁴⁰⁾ はタイコブラ (*Naja naja kaouthia*) 及びキングコブラ (*Ophiophagus hannah*) の毒をマウスの筋肉内に注射し、同様な結果をえていることから、コブラ科に属する蛇毒に共通な現象であろう。楊教授によって分離されたタイワンコブラ毒の主要な致死因子であるコブロトキシン (Cobrotoxin) には壊死作用がほとんど認められないことから、コブラ毒によって起る壊死作用は、コブロトキシンとは別の因子であることが推測される。コブラ毒牙の長さはハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) が 6 ~ 80 mm⁵⁾, ガラガラヘビでは 5 ~ 14 mm¹¹⁾ もあるのに対してタイワンコブラのそれは 3 ~ 6 mm⁵⁵⁾ と非常に短い。このため実際の咬傷時に毒が体内に深く注入される可能性は少なく、皮下組織など表在性の部分に作用するものと思われる。実際のコブラ咬症患者にみられる壊死も限局性で、表在性である理由もここ

にあると考えられる。広範囲に亘る壊死を起した患者の例では、大量の毒が注入されたため、腫脹に伴って毒が拡散され、広範囲に皮膚壊死を起したものであろう。これはウサギによる実験でも、比較的少量の1mgという毒量を注射したものの中には、腫脹が腹側部に拡大するに伴って、壊死部も腹側部に拡がるものがあることから想像できる。

小 括

タイフンコブラ毒の致死作用についてマウスを用いた実験成績を要約すると、7mcg (LD₅₀) あるいは10mcg (MLD) の毒量と注射した場合には、注射毒量には関係なく静脈内または腹腔内に粗毒を注射した動物のうち死亡したものは、全て2時間以内であった。また筋肉内注射によるものでは、大部分は2時間以内に死亡したが、4時間程度生き延びたものも若干認められた。ここで発症はしていても生き残った動物は、以後漸次

回復して生き続けた。すなわちこの実験において毒の注入を受けた動物の生死は、毒量や注射経路の相違にはあまり拘らずに、その後非常に短時間内に決定されることが明らかにされた。

またコブラ咬症患者にみられる局所壊死と酷似した壊死をコブラ毒の皮内注射によって、容易に実験動物につくることができた。この実験によって始めてコブラ毒による局所壊死について検討を加えることが可能となった。

この壊死は限局性且つ表在性で、皮膚あるいは皮下組織の壊死が主で筋肉層への影響は少なかった。また壊死は毒の注入後1~2時間の早い時期に進展し、出血を伴わないことが特徴であることが、病理組織学的に明らかにされた。

神経毒画分として精製されたコブラトキシンは壊死作用を持っていなかった。

直径10 mm程度の病変をつくるのに必要

な粗毒量を最小壊死量としたとき、ウサギではおよそ200mg, モルモットでは50mgであった。

第三章 タイワンコブラ毒の無毒化に関する実験成績

世界における毒蛇咬症患者の正確な数字を把握することは極めて難しいが、WHOの統計によると年間の死亡者数は、30,000～40,000人にのぼるものと推定されている。この大部分(25,000～35,000人)は東南アジアにおけるものであり、なかでもインド・パキスタン・ビルマ地方に多い(Swaroop, et al. 1954)¹⁵⁾。

このような多数の毒蛇咬症患者に対する治療用抗血清をつくるため、大動物の免疫が行なわれているが、蛇毒の持つ強い毒性のため、免疫の途中で動物が死亡するなど、多くの困難が伴うことはよく知られている。ことにコブラ毒で免疫する場合にはこの感が深い。そこでこれまでに種々なる蛇毒のトキシイド化の研究が行なわれてきたが、最近開発されたハプトキシイド以外はいづれも満足すべき成果は得られなかった。特にタイワンコブラ

毒はホルマリンによって無毒化され難く、毒溶液に3%にホルマリンを加え、 100°C で加熱する方法などが試みられたほどであった。そこで著者はホルマリンによる無毒化の条件について詳細に調べた成績について述べる。

1) 粗毒溶液のpHと無毒化に要するホルマリンの濃度

pHを7.0に修正した1%の粗毒溶液に局方ホルマリンをそれぞれ0.4, 0.2, 0.1, 0.05%に加え、 37°C に保ちながら無毒化の状態を調べた。実験成績は図1に示されているが、ホルマリンを0.4%に添加した毒溶液の毒性は、ホルマリン添加前には LD_{50} が7.8 mcg で、溶液1 ml に1280 LD_{50} の毒量が含まれていたものが、ホルマリン添加後2日で32 LD_{50} 、すなわち当初の毒性の $\frac{1}{40}$ に、また4日後には5 LD_{50} 、すなわち $\frac{1}{260}$ に減少し、7日後には完全に無毒化された。次に0.2%のホルマリン濃度では無

毒化がやや遅れ、ホルマリン添加7日後でも10 L D₅₀の毒性が残り、14日後にようやく無毒化することができた。これに対してホルマリン濃度が0.1あるいは0.05%ではホルマリンを添加しない対照と同様に6週後でも無毒化されなかった。

次に0.2%にホルマリンを含む1%粗毒溶液を1 N NaOH及び1 N HClを用いて、pHがそれぞれ5.0, 6.0, 7.0, 8.0の4種類の毒溶液をつくり、37°Cに保ち、前と同じ方法で経時的に毒性の変化を観察した。実験成績は図2にまとめられているが、pH 8.0の毒溶液の毒性はホルマリン添加後2日で10 L D₅₀すなわち1/130に減少し、5日後には無毒となった。pH 7.0では無毒化がやや遅れ7日後には10 L D₅₀に減少したが14日後でもなお完全には無毒化されなかった。これに対してpH 6.0ないし5.0の毒溶液ではホルマリン添加の当初はやや毒性の低下が認められたが、3週以後は毒性の減少は認められず、5

週後でも無毒化がみられなかった。

しかしそのような場合でもホルマリン濃度を高くすれば無毒化を促進させることができた。すなわち pH を 6.0 に保った毒溶液に 0.2, 0.4, 0.8 % にホルマリンを添加すると、0.2 あるいは 0.4 % の濃度では無毒化が困難であったが、ホルマリンの濃度を 0.8 % にあげると 5 週後には無毒化することができた（図 3）。このようにコブラ粗毒をホルマリンで処理する場合には、粗毒液の pH あるいはホルマリンの濃度が高いほど無毒化の時間が短くなることが明らかにされた。しかしいずれの場合でも粗毒を用いた限りでは、無毒化の途中でその溶液中に多量の白色の沈澱物があらわれることが特徴的であった。

またこのようにして無毒化により致死毒性を失った毒液 0.2 ml を脱毛したウサギの背部皮内に注射して、24 時間後に注射局所の皮膚の病変を観察したが、肉眼的にも病理組織学的にもコブラ毒によると思われるような

何等の病変をも認めなかった。これに反してホルマリンを添加しない毒溶液の場合には径15 mmの典型的な壊死の発生がみとめられた。これらの結果からホルマリンによるコブラ毒の無毒化によって、致死作用だけでなく注射局所にみられる壊死作用をもおさえることができた。

2) コブロトキシンのホルマリンによる無毒化

次にコブロトキシンの0.1%溶液にホルマリンを0.5%に加え、pH 7.0に修正し、37℃に保ちながら減毒の状態を観察した。対照として同じ毒力を示す粗毒の1%溶液を用いた。実験成績は図4に示されているが、両毒素液ともにほぼ同じ経過で7日ないし10日で無毒化が完了した。しかし対照の粗毒溶液はホルマリン添加2日後に多量の沈澱が生じたにもかかわらず、コブロトキシン溶液には沈澱はまったくみられなかった。

3) アミノ酸添加粗毒のホルマリンによる

無毒化

前述の実験結果から粗毒にホルマリンを添加した場合に生ずる沈澱物は、タイワンコブラ毒の致死因子であるコブトキシンとは関係のない別の物質であると考えられる。しかしコブラ毒には致死以外の毒性因子があるので、毒素の一部に変性をもたらすような無毒化の方法は、その免疫原性をできるだけ損わないためにも避けた方がよい。そこで次に蛋白保護剤として各種のアミノ酸すなわちグリシン、グルタミン酸、アラニン、アルギニン、リジン、シスチン及びシステインなどを添加して沈澱の有無を観察した。そこでこれらのアミノ酸を 0.05 M に混合した 1% の粗毒溶液にホルマリンを 0.2% ずつ 4~5 日間隔で 4 回添加し、37℃で pH を 6.5 に保ちながら無毒化し、毒性が全く失われるのを確かめた。実験成績は表 8 に示されているが、20 日を要した無毒化の完了まで L-Lysine 塩酸塩、または L-アルギニンを含む溶液には沈降

物が生じなかったが、その他のアミノ酸類を添加したものでは全て無添加の対照と同様に多量の沈澱物が生ずるのが認められた。

4) ホルマリンによる壊死因子の無毒化

今まではタイワンコブラ毒の最も重要な致死活性の無毒化について主に検討したが、ここでは壊死活性について調べた。

リジン塩酸塩を 0.05 M に含有する 1% 粗毒溶液 ($\text{pH } 6.5$) に最初ホルマリンを 0.2% に加え、以後5日間隔で3回添加し、 $\text{pH } 6.5$ を保ちながら 37°C において無毒化した。時々試料をとり透析によってホルマリンを除去してから、毒溶液に含まれている致死活性及び壊死活性を測定した。壊死活性は毒溶液の 0.2 ml を脱毛したウサギの皮内に注射して、壊死の有無を観察した。

致死活性は無毒化5日目にはその毒力はホルマリン添加前の毒力に比べて $1/4$ に低下し、10日目には $1/87$ 、15日目にはさらに、 $1/370$ に減少して、20日目に無毒化は完了

した。これに対して壊死は、ホルマリンを加える前の粗毒では250 mgで直径約10 mmの大きさの壊死が形成されたが、無毒化開始から2日目にはその毒性はかなり弱くなり1,000 mgに相当する毒量で10.5 mmの壊死がみられた。5日目においては毒原液の0.2 ml (2,000 mgの粗毒に相当する) で7 mm, 7日目ではさらにその大きさは小さくなって5.5 mmの病変が認められたにすぎなかった。13日目の観察では肉眼的には壊死と思われるような変化は全く存在していなかった。

このような緩和な無毒化の条件のもとでも無毒化剤としてのホルマリンは、致死因子のみならず壊死因子も容易に無毒化することができた。無毒化に要した日数は致死活性においては20日であったが、壊死は13日でやや短い日数で無毒化することができた。

考 察

人体に応用するためのトキソイドの条件と

して、トキシイドが良好な免疫原性を保持する必要があることはもちろんであるが、それ以上に重要なことは、安全性を保証するための毒の無毒化が完全に行なわれなければならないことである。先人達が試みた色々なコブラ毒のトキシイド化の研究においては、その毒性を完全に失わせることは非常に困難であったことはすでに度々述べた。そこで著者はホルマリンによる無毒化の条件について詳細に検討したところ、タイフンコブラ毒の無毒化には、毒溶液のホルマリン濃度及びpHが重要な役割を演じていることが明らかになった。

すなわちホルマリンの濃度が高い程、またpHが中性ないしアルカリ側に傾くほど、すみやかにその毒性を失わせることができたが、酸性側（6.0以下）に傾くと著しく遅れることが明らかになった。このことは以前にいろいろな研究者によって行なわれていた実験では、蒸留水や生理食塩水などのように緩衝作

用のない溶液が用いられていたために、溶液が酸性に傾き、そのために無毒化が困難であったことも一因と思われる。しかしこのような条件の差異が、トキソイドの抗原性にどのような影響を与えるかについては、将来の研究に待たねばならない。

次に粗毒ではホルマリンによる無毒化が完了するまでに、溶液中に多量の沈降物が生じた。しかし楊教授(1965)²³⁾によって分離された、タイワンコブラ毒の主要な致死因子であるコブロトキシンでは沈澱を生じないことから、粗毒によって生ずる沈澱物は、致死因子とは無関係なものと思われる。

また一方ではコブラ毒の毒作用は、致死以外に壊死を起す因子も含まれていることから、できるだけ免疫原性を損うことなく無毒化するためにも、沈澱ができないような方法が望ましい。その結果リジンまたはアルギニンを添加すると沈澱が防げることが明らかにされた。これらはいずれも塩基性アミノ酸に属

していることが注目される。

また蛇毒は一般にホルマリンによって抗原性が損われやすいと言われていることから、粗毒溶液にリジンを加えてpHを6.5とし、ホルマリンを徐々に加えるなど、できるだけ緩和な条件で無毒化した場合も、致死因子のみならず壊死因子も確実に無毒化することができた。

小 括

タイフンコブラ毒のホルマリンによる無毒化の条件について種々検討した結果、ホルマリンの濃度が高いほど、あるいは毒溶液のpHが中性またはアルカリ側に傾くほど、すみやかにその毒性を失う傾向が認められた。

粗毒を用いた場合には多量の沈降物が生じたが、これはあらかじめ毒溶液中にリジンまたはアルギニンを0.05Mの濃度に加えて置くことにより防止することができた。このような事実が明らかにされると、毒素溶液のpHやホルマリンの添加方法をかえるなど、コブ

ラ毒の無毒化を種々な条件のもとで行なうことが可能となった。そこで粗毒溶液中に0.05 Mにリジンを加え、毒溶液のpHを6.5としホルマリンを4~5日間隔で0.2%ずつ徐々に添加するなど比較的緩和な条件のもとで無毒化した場合でも、致死因子、壊死因子の両者ともに再現性よく確実に無毒化させることができた。

第四章 コブラ毒ホルマリントキソイドの 免疫原性に関する実験成績

前章ではホルマリンによる無毒化の条件について種々検討したが、本章ではその成績にもとずき、ホルマリンで無毒化した粗毒トキソイドの上清及び沈澱部分の免疫原性やアミノ酸を添加して沈澱物の形成を阻止した粗毒トキソイド及び精製毒トキソイドの免疫原性などについて報告する。

1) 粗毒トキソイドの免疫原性

1%の粗毒溶液をpH 6.5, 37°Cに保ちながらホルマリンを4~6日間隔で0.2%ずつ4回添加し、20日間放置し、その0.5 mlをホルマリンを除去した後5匹のマウスに腹腔内注射を行ない無毒化されたことを確かめた。次にこの粗毒トキソイドを5,000 rpm, 10分遠心して上清と沈澱に分けた。上清は生理食塩水中で透析してホルマリンを除き、沈澱は蒸留水で3回洗滌した後生理食塩水を加えて上清と同じ量にもどした。こ

れらの上清と沈澱の再浮遊液の蛋白量はそれぞれ $1.05 \text{ mg} / \text{ml}$ 及び $4.2 \text{ mg} / \text{ml}$ であった。そこで両者の免疫量を一定にしてモルモットを免疫した。すなわち初回接種量を蛋白量にして、 500 mcg とし上清は 0.5 ml 、沈澱は4倍希釈したもの、 0.5 ml をフロインド・アジュバントと共に20匹ずつのモルモットの皮下に注射した。追加免疫は3回行ない3週間隔でアジュバントを含まないトキシイド溶液 0.5 ml ずつ2回、 1 ml ずつ1回注射した。最終注射後2週目に5匹ずつの免疫モルモットから採血したものをプールし、それぞれの血清について血中抗体価の測定を行ない、残りのモルモットには直接毒素を注射して防御効果を検討した。実験成績は表9に示されているが、粗毒の上清部分で免疫されたモルモットの血清 0.4 ml では 5.2 mcg から最高 14.2 mcg の毒の致死防御が認められたが、沈澱部分で免疫された動物の血清ではこのような毒の中和効果は認

められなかった。

次に1群4匹ずつの免疫モルモットの脱毛した背部皮内に180, 250, 350, 500 mcgの毒溶液0.2 mlを注射し、対照には同数の無処置モルモットを用いてコブラ毒に対する防御能を調べた。実験成績は表1に示されているが、対照のモルモットでは500 mcgまたは350 mcgの毒を注射した群では、前者で2時間後に4匹が、後者では4時間後に3匹、24時間以内に1匹が死亡した。また250 mcgの注射群では4, 24, 48時間以内にそれぞれ1匹ずつが死亡した。180 mcg注射群では4匹共生き残った。これに対して免疫モルモット群では致死防御と同時に延命効果がみとめられたが、その効果は特に上清部分で免疫されたモルモットが沈澱部分より著明であった。すなわち上清部分で免疫した群では500 mcg注射群で24時間以内に4匹中1匹、350 mcg注射群では48時間以内に4匹中1匹

が死亡したのみで、その他はすべて生残った。また沈澱部分での免疫群では500 mcg注射群では24時間以内に4匹中2匹が、また48時間以内では4匹中1匹が死亡し、350 mcg注射群では24時間以内に4匹中2匹が死亡した。次に注射後24時間目に生残ったモルモットについて注射局所における壊死の大きさを測定した結果も表10にまとめられているが、対照のモルモットにみられた壊死の大きさに比べて免疫モルモットの壊死の大きさが特に縮小するというような結果は得られなかった。

2) アミノ酸添加粗毒及び精製毒トキソイドの免疫原性

本実験ではホルマリンによる沈澱を防ぐためにアミノ酸を添加したトキソイドの免疫原性を検討した。

表11に示されたように硫酸アンモンの60%から90%飽和によって得られたコブラ毒の分画の毒性の比活性を、蛋白あたりのLD

50 で比べると、粗毒が $1/4.7 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$ であったものが精製毒では $535.7 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$ と4.6倍に上昇した。そこで粗毒の1%及び精製毒の0.5%溶液を作り、それぞれの溶液に 0.05 M に L-Lysine 塩酸塩を加え、さらにホルマリンを0.2%ずつ4~6日間隔で5回添加して無毒化し、沈澱のない透明なトキソイド液を得た。次に両トキソイドの蛋白量を $1/40 \text{ M}$ 酢酸緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) で $2 \text{ mg}/\text{ml}$ に調整し、その 1 ml を1回量として3週間隔で4回免疫した。初回接種時はフロイント・アジュバントと共にウサギの皮下に注射したが、追加免疫にはアジュバントを用いずにトキソイドのみを接種した。実験成績は表12に示したが、粗毒トキソイドで免疫した9匹のうち、最も高い抗毒素価を示した2匹のウサギは 0.4 ml の血清が 35 mcg (5 ml d) のコブラ毒を中和し、4匹が 25 mcg (3.5 ml d)、2匹が 18 mcg (2.5 ml d)、残りの1匹はまったく中和能が

なかつた。一方精製毒トキソイドで免疫した群では6匹のうち3匹がコブラ毒の50 m.c.g (7 m.l.d) を、残りの3匹は35 m.c.g (5 m.l.d) の毒を中和して、粗毒トキソイドに比べて高い抗致死価を示した。

次に粗毒及び精製毒トキソイドで免疫されたウサギの中で比較的高い血中抗体価を示したウサギ2匹ずつの血清について壊死防御能を調べた。実験成績は表14にまとめられているが、ウサギに対する最小壊死量とみられる50 m.c.g の毒によって作られた壊死の大きさ、対照の正常のウサギがそれぞれ7 m.m ないし9 m.m であったのに比べて、精製毒トキソイドで免疫されたウサギ (No 13, 14) あるいは粗毒トキソイドで免疫されたウサギ (No 8, 26) が前の実験で50 ないし25 m.c.g の毒に対して致死防御能を示した血清を用いた場合でも、その壊死の大きさは6 m.m ないし9 m.m で対照と同様壊死の発生を防ぐことができなかった。

次にこれらのトキソイドで免疫されたウサギ8匹に14mgないし1.8mgの毒1.0mlずつを筋肉内注射して致死防御能について観察した。その結果は表13に示されているが、すべてのウサギが生残った。すなわち前の実験で免疫血清の0.4mlがコブラ毒の50mcgないし35mcgを中和するようなウサギが14mgの毒の攻撃に耐え、また血清の毒に対する中和量が35mcgないし25mcgであったウサギが7mgないし3.5mgの毒の攻撃に耐え、血清の中和量が18mcgであったウサギは1.8mgの毒の攻撃に耐えたことを示している。これに対して正常なウサギでは1.8mgないし1.3mgの毒の攻撃に対して全てが死亡した。これらの結果から少なくとも免疫ウサギの中で血清の毒に対する中和能の高いものは、直接の毒の攻撃に対してよく致死を防御したと言える。

しかしながらこのような致死防御を示すウサギでも毒の直接皮内への攻撃に対しては壊

死の発生を防ぐことができなかった。実験成績は表 14 にまとめられているが、50 ~ 200 mcg の毒を注射された免疫ウサギに発生した壊死の大きさは、50 mcg の毒では 9 mm ~ 11.8 mm, 100 mcg の毒に対しては 11 mm ~ 19.3 mm, 200 mcg の毒の攻撃に対しては 16.5 mm ~ 21 mm で対照と同様に壊死の発生をおさえることができなかった。

3) 沈降トキソイドの免疫原性

コブラ粗毒の 10 mg / ml と溶液 (0.05 M L-Lysine 塩酸塩を含む) に局方ホルマリンを 5 日間隔で 0.2% ずつ 5 回添加し、溶液の pH を 6.5 に保ちながら、37°C のフランク管内においた。次にトキソイドの一部を透析によってホルマリンを除去した後、その 0.5 ml を 5 匹のマウスの腹腔内に注射し、すべてのマウスが生残することを確かめた。無毒化が確かめられたトキソイドはチメロサル 0.01% を含む 0.025 M 酢酸緩衝食塩水 (

PH 6.0) に透析して遊離ホルマリンを除去した。さらに本トキソイドを酢酸緩衝食塩水で蛋白量が $4 \text{ mg} / \text{ml}$ になるよう希釈した。つづいて本溶液の半量の塩化アルミニウム及び磷酸ナトリウムを加え、PH を 6.5 に修正した後、防腐剤としてチメロサルを 0.01% に加えて、溶液 1 ml 中 2 mg (蛋白量) のコブラ毒と、 1 mg のアルミニウムを含む沈降トキソイドをつくった。

このようにして作られた沈降トキソイドの免疫原性を調べるために、1 群 7 羽のウサギを用い、トキソイドの 2 mg , 1 mg , 及び 0.5 mg をそれぞれの群のウサギに皮下注射した。注射は 3 週間隔で 4 回行ない、3 回及び 4 回目の注射からそれぞれ 10 日後に耳静脈から採血し、血中抗毒素の測定を行なった。また 2 回目の採血から 14 日後に、粗毒を直接免疫ウサギの下腿筋肉内に注射して致死防御を経時的に観察した。

第 1 回目の採血時における各免疫群の血中

抗毒素価は、トキソイド 2 mg 免疫群では、血清 0.4 ml が最高 50 mcg (5 mld) の粗毒を完全に中和し、35 mcg (3.5 mld), 25 mcg (2.5 mld), 18 mcg (1.8 mld) を中和したものがそれぞれ1羽ずつ認められた。1 mg 免疫群では最高が 35 mcg (3.5 mld) で、25 mcg (2.5 mld) の毒を中和したものが2羽、また3羽のウサギが 13 mcg (1.3 mld) を完全に中和した。0.5 mg 免疫群では 25 mcg (2.5 mld) の毒を中和したものが最高で、4羽が 13 mcg (1.3 mld) を中和していた。2回目の採血による血中抗体価は、2 mg のトキソイドを接種した群では、第1回の採血時と同じく 0.4 ml の血清が 50 mcg (5 mld) の毒と中和したものが最高で、35 mcg (3.5 mld) の粗毒を中和したものは2羽であった。1 mg 免疫群では最高が 50 mcg (5 mld), 3羽のウサギが 25 mcg (2.5 mld) を

中和した。0.5 mg 接種群においては、最も高い抗体価を示したものは、18 mcg (1.8 ml/d) の毒を中和したが、10 mcg (1 ml/d) の粗毒しか中和しなかったものが2羽も認められた。

次にトキソイドの接種をうけた免疫ウサギを、1群4羽として4群に分け、種々な毒量を下腿筋肉内に攻撃した結果、2 mg の毒の攻撃を受けたものは全例生存したが、対照の4羽のウサギはすべて24時間以内に死亡した。4 mg の毒の攻撃群では3時間目の観察時に4羽中1羽が死亡していたが、残りの3羽は48時間目の観察時にも、何らの異常も認めなかった。これに反して対照の3羽は6時間以内にすべて死亡した。8 mg の毒の攻撃群では免疫群で24時間目に4羽中1羽死亡したただけであった。大量16 mg の粗毒で攻撃された免疫群では3時間目に5羽中2羽が、24時間目に1羽が、さらに48時間目で1羽が死亡し、生存したのはわずか1羽の

みであった。このようにして免疫ウサギ"には著明な致死防御と延命効果が認められた。

各免疫群における抗毒素価を、抗血清の1 mlが、どの程度の致死活性を中和するかであらわすと、表15に示したように、第1回目の測定ではトキソイド2 mg接種群では、 $1.9 \sim 3.8$ LD₅₀の毒力を中和し、1 mg免疫群では $1.3, 3 \sim 3.3$ LD₅₀, 0.5 mg接種群では $9.5 \sim 3.8$ LD₅₀であった。また2回目の測定における結果はそれぞれ $1.9 \sim 3.0$ LD₅₀, $1.9 \sim 6.8$ LD₅₀及び $6.8 \sim 4.3$ LD₅₀であった。

次にこれらの免疫ウサギ"の血中の抗致死価と、直接に毒を注射した場合の致死防御あるいは延命効果との関係をまとめると図5のようになった。それによると、免疫ウサギ"の血清1 mlが5 LD₅₀程度の毒を中和すると、そのウサギは2~4 mgの毒の攻撃に耐え、また血清が10 LD₅₀を中和した場合には、4 mlに相当する8 mgの毒の攻撃にも耐

えることがわかった。

考 察

人に直接接種するためのトキソイドが備えられるべき条件として最も重要なことは、完全な無毒化が要求されることであることはすでに述べたが、次に重要な条件としては良好な免疫原性を有することである。実際の予防接種では注射回数もかなり制限されることから、せいぜい3~4回の接種で少なくとも直接毒の攻撃から死を救うだけの抗体の産生を促す免疫原性を有すること、また注射に要する毒量ができるだけ少ないこと等が望まれる。そこで著者は無毒化に関する実験で明らかにされた成績を考慮しつつ、タイワンコブラ毒を精製し、粗毒及び精製コブラ毒トキソイドの免疫原性等について検討した。

粗毒溶液ではホルマリンによる無毒化が完了するまでに、溶液中に多量の沈降物が生じたが、タイワンコブラ毒の主要な致死因子であるコブラトキシンでは沈澱を生じないこと

から粗毒によって生ずる沈澱部分は致死因子とは関係のない物質であると思われ、主要な免疫原であるコブトキシンは上清部分に存在していると考えられた。このことは今回の実験で、ホルマリントキソイドの上清部分を免疫原としたモルモットの血中抗致死価が高かったことからもうなづける。しかし沈澱部分で免疫した動物でも血清の致死防御効果が認められなかったにもかかわらず、その免疫動物に直接コブラ毒を攻撃した結果、若干の致死防御が認められたことから、沈澱物の中にも致死防御に関係のある免疫原が移行していることが示唆された。

そこで粗毒溶液中にあらかじめ 0.05 M の濃度にリジン塩酸塩を加えて、沈澱物を防止した粗毒トキソイドと精製毒トキソイドの免疫原性について検討したところ、精製トキソイドの効果が優れ、 0.4 ml の免疫ウサギ血清が最高 50 mcg の毒を中和し、最小致死量の 10 倍量の毒の攻撃にも耐えたことは注

目に値する。

しかしこのように致死毒性に対して強い防御力を示したウサギの血清中に、壊死因子を中和する抗体が測定されなかったばかりでなく、これらの免疫ウサギは50 mcg という最小壊死量の毒ですら防ぐことができないのは意外であった。このことは一見トキソイドの抗壊死因子に関与する毒の抗原性が弱い為ではないかと想像されるが、この問題は将来壊死の発生機転が明らかにされなければ、解決されないであろう。

つづいて人に直接免疫することの可能性の有無をさらに追求するために沈降トキソイドの免疫原性について検討した。本トキソイドに用いたアルミニウムの濃度を1 mg / ml としたが、この根拠は人体に使用可能な量として考慮したものであり、トキソイド溶液中の毒素蛋白との結合に関する最適の量的比率については、今後の検討を待たねばならない。

沈降トキソイドの免疫原性をウサギの血中抗毒素価で検討したところ、トキソイドの0.5mg接種群と、その4倍量の2mgを注射した群との平均値の差は約2倍であり、免疫量を増量しても抗毒素はその割には產生されないことが示された。また1回目の採血時における抗体価と2回目のそれとはほぼ同じ値を示していることから、1回の接種量についてはさらに研究を進めなければならない。しかし免疫動物に最小致死量の2倍あるいは4倍量の粗毒を攻撃しても、大部分のウサギが死を免れたことから、その致死防御効果はかなり優れていると言えよう。個々のウサギの抗毒素価と攻撃毒量との関連をみると、免疫ウサギの血清1mlが5~10LD₅₀の毒を中和すれば、2ないし8mgの毒の攻撃に対する致死防御が可能であることが示された。

蛇毒は一般的には、ホルマリンにより免疫原性が破壊されやすいとされているが、このように優れた免疫原性を有するトキソイドが

得られた理由としては、ホルマリンによる毒素の変性をできるだけ避けるために、蛋白保護作用を持つと思われるリジン塩酸塩を加え、且つ毒素溶液のPHを6.5とし、さらに少量ずつホルマリンを添加する等、できるだけ緩和な条件により無毒化したため、毒素蛋白の変性が最小限に留められたことも一因であると考えられるが、一方ではこのような条件のもとで、ホルマリンの持つ作用として分子の重合が起り、そのため分子量が大きくなって免疫原性を増強したのではないかとも思われる。

このようにして優れた免疫原性を有するトキシソイドが作られたことは、治療用抗毒素血清を得るための大動物の免疫において、最も重要視される基礎免疫時に、大量のコブラ毒を接種することが可能となり、今まで非常に困難であった免疫が、免疫期間の短縮と言うことも含めて、かなり容易になることが充分期待される。また動物実験において局所の壊

死を防御する効果はほとんど得られなかったが、致死防御効果が優れていることから、実際のコブラ咬症において最も恐れられている致死が、このトキシイドによって防がれることは、すでに実用化が進められているハブトキシイドに次いで人体への応用が期待される。一方ではトキシイドの接種によって致死だけでなく局所の壊死も充分に防御することが望まれることから、この問題に関してはさらに研究を進めなければならない。

小 括

タイワンコブラ (*Naja naja atra*) 毒のトキシイドの試作を目標として、無毒化剤としてのホルマリンの濃度と毒溶液のpHについて検討した結果、ホルマリン濃度の高い程、あるいはpHが中性ないしアルカリ側に傾くにつれて無毒化の速度が早くなった。その際無毒化の過程で濃厚な沈澱が起ったが、コブラ毒の致死因子であるコブラトキシンでは起らなかった。またこのような沈澱は予め粗毒をリジンあ

るいはアルギニンで処理しておくとならなかった。このような成績からホルマリン濃度を0.8%とし、pH 6.5, 37°Cで20日間放置して無毒化されたトキソイドを上清と沈澱に分け、これを抗原としてモルモットを免疫し、血中抗体価を調べ且つ直接毒を免疫動物に攻撃してその防御能を調べた結果、粗毒トキソイドの大部分の致死防御抗原は上清部分に移行していることが明らかにされた。

次に0.05Mの濃度にリジン塩酸塩を含む1%粗毒溶液に、1%ホルマリンを加えて無毒化し、ホルマリン添加による沈澱を防いだトキソイドでは、硫酸アンモンで精製されたトキソイドが、粗毒トキソイドより優れた致死防御能を示した。すなわち0.4mlの免疫血清が50mcgの毒を中和し、免疫動物は致死量の10倍もの毒の攻撃に耐えた。しかしこのようによく免疫された動物でも毒の壊死作用を阻止することができなかった。

次に同様な方法で作られたトキソイドに塩

化アルミニウム及びリン酸ナトリウムを加えて
「沉降トキソイド」とし、その免疫原性について
検討した。1回の接種量をそれぞれ、2mg,
1mg, 0.5mgと定め、3週間隔で4
回皮下に接種した。3回及び4回目の接種か
らおのおの10日後に採血を行なって、血中
抗体価を測定した。第1回目の採血における
抗致死価は、2mg免疫群では血清1mlが
平均10.4LD₅₀の毒力を中和し、1mg免
疫群では7.5LD₅₀, 0.5mg免疫群では5.
4LD₅₀の毒力を中和した。2回目の測定で
はそれぞれ10.8, 10.4, 5.2LD₅₀であ
った。免疫動物の致死防御効果は、2mgの
粗毒を攻撃した群では死亡したものがなく、
4mg及び8mgの攻撃群でも優れた防御効
果を示した。血中抗体価と攻撃毒量との関係
から、免疫動物の血清1mlが5~10LD₅₀
の毒性を中和すれば、2mgないし8mg
の毒に対する致死防御が可能であることを示
した。このように本トキソイドを注射した動

物の抗体産性もよく、コブラ毒の持つ強い致死作用を防御することができた。

総 括

既に緒言で詳しく述べたように、これまでもホルマリンによるコブラ毒のトキシイド化について、いろいろな研究が行なわれてきたが、これらの実験では、いずれもコブラ毒の強い毒性を失わせることが非常に困難であったばかりでなく、ホルマリンで処理した毒の免疫原性も弱いこと等から、ホルマリンによるトキシイド化は不可能であると思われていた。またこれらの研究では、トキシイドの無毒化試験や免疫原性については、致死毒性についてのみ調べられ、壊死に関しては全く検討されていなかった。しかしコブラ毒に含まれる壊死活性も、見逃がすことができない重要な因子であるので、トキシイド化の研究で最も重要な無毒化においては、致死のみならず壊死因子も充分に無毒化されなければならない。またトキシイド接種による免疫効果については、コブラ毒の強い致死作用を防御することが、最も重要なことであるが、同時

に壊死も防御されることが望ましい。著者はこの点を踏まえ、ホルマリンによるタイフンコブラ毒のトキシイド化の研究を行なった。

本論文の大きな特徴の一つは、この研究において咬症患者に見られる局所壊死と酷似する実験的壊死を、ウサギやモルモットに再現させることに成功し、局所壊死に対する実験方法を開発することができたため、初めて壊死因子についても検討が進められるようになったことである。また免疫した動物の血中抗体価を測定すると共に、直接コブラ毒を攻撃して動物がどの程度の毒量に耐えるかを観察し、血中抗毒素価とそれを防御する攻撃毒量との相互関係を明らかにすべく検討を加えたことも、従来の報告では見られなかった新しい試みである。

このように進められた実験から得られた成績について次のように総括することが出来る。

- 1) コブラ毒の致死作用は極めて激烈であ

り、その毒性の発現が早く、10あるいは7 mg の毒を注入後、4時間以内にマウスを死に至らしめたが、発症はしていてもこれに耐えた動物は、以後すみやかにその症状が回復して長く生き続けた。この結果から毒を注射された動物の運命は、短い時間内で決まることが特徴であるのが明らかにされた。

2) タイワンコブラ咬症患者にみられる壊死と酷似した壊死を、ウサギでは200, モルモットでは50 mg 程度の毒を皮内に注射することによって、容易に作ることができ、その大きさの測定も可能となった。この壊死は限局性且つ表在性であり、筋層への影響はほとんどみられなかった。また出血を伴っていないことが特徴であり、毒の注射後1~2時間の早い時期に形成されること等が明らかにされた。この実験方法の開発によって、免疫動物の血中抗壊死価の測定や、壊死防御能あるいは局所壊死の性状等も観察することができるようになった。

3) タイフンコブラ毒の無毒化には、毒溶液の pH が大きな影響を与えること、即ち酸性側 (5.0, 6.0) では減毒が困難であったが、中性あるいはアルカリ側 (8.0) では、すみやかにその毒性が失われることが明らかにされた。しかし粗毒を用いる場合には、無毒化の途中でその溶液中に多量の沈降物があったが、これはあらかじめ毒溶液中にリジンあるいはアルギニンと添加して置くことにより防止することができた。この成績により今までコブラ毒のホルマリンによる完全な無毒化は、非常に困難であるとされていたが、毒溶液の適当な pH を選ぶことにより、容易に再現性よく無毒化することが可能となった。

4) 毒溶液中に 0.05 M の濃度にリジン塩酸塩を加え、ホルマリンを 0.2% ずつ 4~6 日間隔で徐々に添加し、溶液の pH を 6.5 に保ちながら 37℃ で無毒化することにより、ほぼ 20 日間で完全にその毒性を失わせることができた。このようにして無毒化した精製皮

び粗毒トキソイドの免疫原性の検討では、免疫したウサギの血清 0.4 ml が中和する毒量の平均値はそれぞれ 42.5 (6.1 ml α), 23.3 (3.3 ml α) mcg で、かなり高い致死中和抗体が測定されたが、壊死中和抗体は検出されなかった。これらの動物に粗毒攻撃を行なったところ、致死は充分な防御成績が得られたが、壊死は全く防御されなかった。

5) 粗毒沈降トキソイドの免疫原性もかなり優れ、著明な致死防御と延命効果がみられた。

6) 免疫動物の血中抗体価と攻撃毒量との関係から、ウサギの抗血清の 1 ml が 5 ~ 10 LD₅₀ の毒力を中和すれば 2 ~ 8 mg の攻撃にも充分耐えることが明らかにされた。

以上述べたように本研究において、特に無毒化の条件につき詳しく実験を重ね、その免疫原性についても検討を加えた。タイフンコブラの粗毒あるいは硫酸アンモンで部分精製

した毒にリジン塩酸塩を加え、pHを6.5に保ちつつ37℃に放置しホルマリンを0.2%ずつ4~6日間隔で徐々に増量する方法でトキシソイド化を行なったところ、致死のみならず壊死因子も完全に無毒化された。またその免疫原性も、従来の報告に比べてはるかに優れた致死防御能を有し、人体接種が可能と思われるトキシソイドがはじめて得られた。

このようにして、タイワンコブラ毒のホルモルトキシソイドを得るための、トキシソイド化の一つの方法を示すことができた。しかし本トキシソイドによって局所の壊死を防御することができなかったが、この問題に関しては壊死因子に対する免疫原性のよいトキシソイドを得るため、さらに実験を進めなければならぬ。一方では本研究で、局所壊死に関する実験方法が開発され、従来ほとんど知られていなかったコブラ毒による局所病変の性状について明らかにされた事など、今後大いにこの問題の解決に役立つことが期待される。

結 論

コブラ咬症による死亡や局所壊死を最小限に留めるための予防を目的として、タイワンコブラ毒トキシソイドを開発すべく実験を行なった結果、本研究によりはじめて人体接種が可能なたキシソイドを得ることができた。

またこの研究を進める過程で明らかにされた主な新知見を説明すれば次のように要約することができる。

1) タイワンコブラ毒のホルマリンによる無毒化では、毒素溶液のpHやホルマリンの濃度が、重要な役割を演じていることを明らかにすることができた。

2) 粗毒をホルマリンで無毒化する場合に、その毒性が完全に失われるまでに、その溶液中に多量の沈降物を生ずるのが常であったが、タイワンコブラ毒の致死因子であるコブラトキシン溶液には現れないこと、またこのような沈降物はリジンあるいはアルギニンを添加することにより、防止することができ

ることを明らかにした。

3) 粗毒溶液中にリジン塩酸塩を加え、37℃で、pHを6.5に保ちつつ、ホルマリンを0.2%ずつ4~6日間隔で添加し、徐々に増量するなど比較的緩和な条件の下でトキシイド化を行なっても、致死、壊死の両因子とも確実に無毒化できることを実証し、その免疫原性も高いことから、タイフンコブラ毒ホルモルトキシイドを得るための、トキシイド化の一つの方法を提示することができた。

4) 直接毒の攻撃に対して、致死防御に必要な免疫動物の血中抗毒素価を知ることができた。

5) タイフンコブラ毒の致死作用の特徴を明らかにした。

6) コブラ咬症患者にみられる壊死と酷似した壊死をウサギやモルモット等の実験動物に容易に作る方法を見出し、今までほとんど知られていなかった局所壊死の特徴を明らかにすることができた。

特に局所壊死に関する実験方法を開発したことにより、この面での研究が大いに進展することが期待される。一方では優れた致死防御能を保持するトキソイドが作られたことにより、高単位の治療血清を得るための馬の免疫が容易に行なわれるばかりでなく、将来トキソイドの人体接種が有望である。これらのことから、本研究はタイワンコブラのみならず、他のコブラ咬症の治療や予防の前進に大きく貢献するものと信じる。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始懇篤なるご指導を賜わり、かつ論文のご校閲をいただいた元東京大学教授、現日本蛇族学術研究所所長、沢井芳男博士ならびに本研究に御協力御援助を賜わった三共株式会社中央研究所の小此木丘博士、服部善八郎博士および東京大学医科学研究所熱帯疫学特別研究室の川村善治博士、細田マツエ技官に衷心より感謝いたします。また貴重なるコフロトキシンを分与して頂いた高雄医学院教授楊振忠博士および本論文作成に種々御援助を賜わった東京大学教授松橋直博士ならびに同大学講師海老沢功博士に深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 矢追秀武、川島四郎 (1 9 2 8) : アナトキシン免疫の効果について、日本伝染病学会誌, 2, 1 1 4 1 - 1 1 5 1
- 2) 岩瀬祐一 (1 9 3 2) : タイワンコブラ (*Naja naja atra*) 毒素の分離について、台湾医学会誌, 3 1 (2), 2 1 7 - 2 2 5
- 3) 岩瀬祐一 (1 9 3 3) : タイワンコブラ (*Naja naja atra*) 毒素の分離について (続報), 台湾医学会雑誌, 3 2 (4), 5 5 0 - 5 5 9
- 4) Grasset, E. and Zoutendyk, A. (1 9 3 3) : Detoxication of snake venoms and application of the resulting antigens to rapid method of antivenomous vaccination and serum production. J. Exp. Path., XIV, 308 - 317
- 5) 恵 平治 (1 9 3 3) : ハブに関する研究、毒牙および毒腺に就て、口腔科学会雑誌, 5, 1 5 1 - 1 5 4
- 6) 赤塚京治 (1 9 3 6) : 蛇毒の免疫学的研究、実験医学雑誌, 2 0 (4), 6 0 6 -

6 1 6

- 7) 桑島謙夫 (1 9 3 8) : 蛇毒免疫について
(第 2 報)、実験医学雑誌, 22 (8),
1 4 8 0 - 1 4 9 8
- 8) 桑島謙夫 (1 9 3 8) : 蛇毒免疫について
(第 3 報)、実験医学雑誌, 22 (9),
1 6 6 9 - 1 6 9 2
- 9) 桑島謙夫 (1 9 3 8) : 蛇毒免疫について
、実験医学雑誌, 22 (7), 1 1 7 0 -
1 1 9 0
- 10) Reed, L. J. and Muench, H. (1 9 3 8) : A simple method of estimating fifty per cent endpoint. The Am. J. of Hyg., 27, 493 - 497
- 11) Klauber, L. M. (1 9 3 9) : A statistical study of the rattlesnakes. Occasional papers, San Diego Society of Natural History, No. 5, 20 - 43
- 12) Fidler, H. K., Glasgow, R. D. and Carmichael, E. B. (1 9 4 0) :
Pathological changes produced by the subcutaneous injection of rattlesnake (Crotalus) venom in to Macaca mulatta monkeys. The Am. J. of Pathology, 16, 355 - 364
- 13) 田中哲之助 (1 9 4 1) : 蛇毒をもつてせ

る大動物免疫に関する研究、実験医学雑誌、
25 (2), 159 - 177

14) 桑島謙夫 (1942) : 蛇毒とその免疫、
医学の進歩, 1, 1 - 45

15) Swaroop, S., Grab, B. (1954) : Snakebite mortality in the
world. Bull. World Health Org., 10, 35 - 76

16) Haast, W. E., Winer, M. L. (1954) : Complete and spontaneous
recovery from the bite of a Blue krait snake (*Bungarus caeruleus*)
. Am. J. Trop. Med. Hyg., 4, 1135 - 1137

17) 沢井芳男、新里幸徳 (1959) : 沖縄に
おけるハブ蛇被害対策、沖縄におけるハブ
咬症の臨床症状について、東京医学新誌、
76, 86 - 92

18) Wiener, S. (1960) : Active immunization of man against the venom
of the Australian tiger snake (*Notechis scutatus*). Am. J. Trop.
Med. Hyg., 9, 284 - 292

19) 小比木 丘、星 昭二、本間 学、他 (1
961) : ハブ毒、サキシマハブ蛇毒およ
びヒメハブ蛇毒のマウス筋肉内注射による
局所病変の比較について、日本細菌学雑誌

, 16, 909 - 913

20) 星 昭二、本間 学、他 (1961) : ハブ毒腹腔内および筋肉内注射によるマウス致死の比較について、北関東医学, 11, 25 - 29

21) Flowers, H. H. (1963) : Active immunization of a human being against cobra (*Naja naja*) venom. *Nature*, 200, 1017 - 1018

22) Reid, H. A. (1964) : Cobra - bites. *Brit. Med. J.*, 2, 540 - 545

23) Yang, C. - C. (1965) : Crystallization and properties of cobrotoxin from Formosan cobra venom. *J. Biol. Chem.*, 240 (4), 1616 - 1618

24) 沢井芳男、川村善治、牧野正顕、福山民夫、他 (1966) : ハブ蛇毒トキソイドの基礎的研究. 1) トキソイドの免疫原性について、日本細菌学雑誌, 21 (1), 32 - 41

25) Lee, C. Y. and Chang, C. C. (1966) : Mode of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission.

Mem. Inst. Butantan Simp. Internac., 33 (2), 555 - 572

26) Chang, C. C. and Lee, C. Y. (1966) : Electrophysiological study of neuromuscular blocking action of cobra neurotoxin. Br. J.

Pharmac. Chemother., 28, No 2, 172 - 181

27) Lee, C. Y., Chang, C. C., Chiu, T. H., et al. (1968) :

Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from Formosan

cobra venom. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path.,

259, 360 - 374

28) Leviton, A. E. (1968) : The venomous terrestrial snakes of

East Asia, India, Malaya and Indonesia. In Blicherl, Buckley and

Deuloful : Venomous animal and their venoms. vol 1, 529 - 576

29) 小此木 丘、服部善八郎 (1968) : 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、第一報、アルコール

処理ハブ毒の毒性およびマウスにおける免

疫実験、日本細菌学雑誌, 23, 137 -

144

30) 沢井芳男、川村善治、福山民夫、他 (19

68) : 1965年より1967年にわた

る奄美大島および沖縄におけるハブ咬症の

現況について、熱帯、No. 1, 56 - 70

31) 小菅隆夫 (1968) : マムシ蛇 (*Agkistrodon halys blomhoffii*) 毒の毒性に関する研究 — とくに生物学的毒性ならびに毒による形態学的変化 —. 北関東医学, 18, 353 - 379

32) Kochlaty, W. F., Ledford, E. B., et al. (1968) : Immunization study with *Naja naja* venom detoxified by photooxidation. *Toxicon*, 5, 159 - 163

33) Sawai, Y., Kawamura, Y. (1969) : Studies on the toxoid against the venoms of certain asian snakes. *Toxicon*, 7, 19 - 24

34) Sawai, Y., Kawamura, Y., Fukuyama, T., Okonogi, T. and Ebisawa, I. (1969) : Studies on the improvement of treatment of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Bites. 8. A field trial of the prophylactic inoculation of the habu venom toxoid. *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 197 - 203

35) Sawai, Y., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and Okonogi, T. (1969) : Studies on the improvement of treatment of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) bites. 7. Experimental studies on habu venom toxoid by dihydrothioctic acid. *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 109 - 117

- 36) Lauhatirananda, P., Gantharon, S. and Hayodom, V. (1 9 7 0) :
Radiation effects on cobra venom. Radiation sensitivity of toxins
and animal poisons. International Atomic Energy Agency, Vienna,
107 - 112
- 37) 沢井芳男、曾 長生、他 (1 9 7 0) : 台
湾高雄県における毒蛇咬症、 Snake, 2 (1
) , 1 3 - 1 7
- 38) Salafranca, E. S. (1 9 7 0) : Detoxification of Cobra Venom
and Bacterial Toxins for Biological Production. Radiation Sensi-
tivity of Toxins and Animal Poisons, International Atomic Energy
Agency, Vienna, 87 - 94
- 39) 沢井芳男、川村善治、福山民夫、鎮西 弘
、他 (1 9 7 1) : 1 9 6 9 年における奄
美大島および沖縄のハブ咬症の現況につい
て、 Snake, 3 , 1 - 8
- 40) Homma, M., and Tu, A. T. (1 9 7 1) : Morphology of local tissue
damage in experimental snake envenomation. Br. J. exp. Path.
52, 538
- 41) Stringer, J. M., Kainer, R. A. and Tu, A. T. (1 9 7 1) :
Ultrastructural studies of myonecrosis induced by cobra venom in

mice. Toxicology and Applied Pharmacology, 18, 442 - 450

42) 貞弘 省二 (1 9 7 1) : ハブトキソイドに関する研究. I. ホルマリンによるトキソイド化. 日本細菌学雑誌, 26 (5, 6) , 214 - 221

43) 貞弘 省二 (1 9 7 1) : ハブトキソイドに関する研究. II. 精製トキソイドの免疫原性. 日本細菌学雑誌, 26 (7) , 319 - 324

44) 沢井 芳男, 他 (1 9 7 1) : 1971年における東南アジアとくにマレーシア, タイ, フィリピンおよび台湾の毒蛇咬症の調査について. Snake, 3 (2) , 97 - 128

45) 沢井 芳男 (1 9 7 1) : 琉球におけるハブ咬症の治療に関する研究報告書 (X II) .

46) Sawai, Y., Chinzei, H., Kawamura, Y., Fukuyama, T. and Okonogi, T.

(1 9 7 2) : Studies on the improvement of treatment of habu (Trimeresurus flavoviridis) bites. 9. Studies on the immunogenicity of the purified habu venom toxoid by alcohol precipitation.

Japan. J. Exp. Med., 42, 155 - 164

- 47) 外間 善次 (1 9 7 2) : サキシマハブ (*Trimeresurus elegans*) 毒トキソイドに関する研究,
Snake, 4, 23 - 33
- 48) 林 貽恵 (1 9 7 2) : タイワンハブトキ
ソイドの基礎的研究, Snake, 4, 34 - 43
- 49) Kuo, T-P. and Wu, C-S (1 9 7 2) : Clinicopathological studies
on snake bites in Taiwan. Snake, 4, 1 - 22
- 50) 沢井 芳男 (1 9 7 3) : 毒蛇咬症の諸問題
Snake, 5, 15 - 27
- 51) 沢井 芳男 (1 9 7 3) : アジアにおける毒
蛇咬症の現状, Snake, 5, 29 - 75
- 52) 木場 一夫 (1 9 7 3) : 東南アジアの毒蛇
類, Snake, 5, 77 - 115
- 53) Mittelstaedt, J. S., Shau, S. M. and Tiffany, L. W. (1 9 7 3) :
The detoxifying effect of cobalt-60 radiation on the venom of the
hooded cobra, *Naja naja*. Toxins of Animal and Plant Origin, vol.
3, 867 - 896, Gordon and Breach, Science Publishers Inc. New York,
U. S.A.
- 54) 沢井 芳男. 他 (1 9 7 4) : インドおよび

インドネシアにおける毒蛇咬症について、
文部省科学研究費海外学術調査研究報告書

55) Snakes of Taiwan, U. S. Naval Medical Research Unit No. 2, 56 -
57

56) Poisonous snakes of the world. Department of the navy bureau of
medicine and surgery, U. S. Government Office, Washinton, D. C.