日本産魚類のウイルス病に関する研究-VIII.

IHNV 感染により RTG-2 細胞が産生する インターフェロン

佐野徳夫*·長倉義智** (昭和57年6月29日受理)

Studies on Viral Diseases of Japanese Fishes-VIII.

Interferon Induced by RTG-2 Cell Infected with IHN Virus

Tokuo Sano* and Yoshitomo Nagakura**

*Laboratory of Fish Pathology; Tokyo Univ. Fish., 5-7, Konan 4 Chome, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

**Akkeshi Station, Japan Sea Farming Association, 2–1, Chikushigoi, Akkeshi-Cho, Akkeshi-Gun, Hokkaido 088–12, Japan

(Received June 29, 1982)

Inhibitory factor was induced by RTG-2 cell infected with IHN virus. This factor fulfilled the following biological and physicochemical properties.

1) thermostability to heating at 56° C for 30 min. 2) acid stability to pH 2 at 4° C for 24 hr. 3) nonsedimentation at $100,000 \times g$ at 4° C for 2 hr. 4) nondialysis. 5) inactivation by trypsin treatment. 6) cell specific specificity in antiviral effect. 7) wide antiviral spectrum. 8) indirect viral inactivation.

Three assays of interferon units were compared. The result indicated that dye uptake method was most sensitive assay, which was 2.1 times as sensitive as plaque reduction method and 2.6 times as sensitive as CPE method. Consequently, it was demonstrated that the factor was interferon.

ウイルス感染において、インターフェロン (IF) は抗体よりはるか早期に出現する。一方、ワクチン接種による体液性免疫効果は IF による抗ウイルス作用の持続時間より長い。そこで、魚類ウイルス性疾病の予防対策を考える時、IF による抗ウイルス作用とワクチン接種による免疫効果の併用は、現在、理論的域にとどまるが、極めて興味深いことと考える。しかし、魚類ウイルス性疾病の予防をこの見地から指向した研究は著者らの知る限りでは見当らず、特に魚類の IF に関する研究は Dorson et De Kinkelin、1974、De Sena and Rio、1975、OIE and Loh、1971 などその基礎的研究の集積さえ非常に少ない状態である。

著者らは、RTG-2 細胞において IHN ウイルスがウイルス抑制因子を誘発し、その生物学的および物理化学的性状によりその因子は IF であることを確認した。また、IF の力価測定法について 比較検討を 行ったのでここに報告する。

材料および方法

ウイルス抑制因子の誘発 ウイルス抑制因子の誘発は 以下により行った。培養開始時の細胞密度が 1.2~1.6× 10⁵. 細胞/ml の RTG-2 細胞浮遊液 15 ml を 20°C に 6 日間培養し、この細胞に IHN ウイルスを M.O.I. で 0.3 I.U./細胞になるように接種した。接種後、20°C で 1 時間静置してから Hanks' BSS で細胞単層を 2 回洗 い、EAGLE の MEM にウシ胎児血清を 10% 含む培地 (MEM-10) を加えた。20°C で 72 時間培養後、培地を

^{*} 東京都港区港南 4-5-7, 〒108 東京水産大学

^{**} 北海道厚岸郡厚岸町筑紫恋 2-1. 〒088-12 日本栽培漁業協会厚岸事業所

回収し、 $5,000 \times g$ で 20 分間遠心し、上清に適量の塩酸を加えて pH 2 に調整した。その後、 4° C で 24 時間静置し IHN ウイルスを不活化してから、適量の水酸化ナトリウム飽和水溶液を加え、pH 7.4 に再調整した。 4° C で $100,000 \times g$ 2 時間遠心し、その上清の上 2/3 をウイルス抑制因子液とした。対照は IHN ウイルスのかわりに Hanks' BSS を用いて上記と同様に行って用意した。

ウイルス抑制因子の力価測定 ウイルス抑制因子の力 価測定は FINTER (1969) の dye uptake 法を改良して 行った。力価測定には、培地 1 ml を含む 16×125 mm 培養管に単層を形成した RTG-2 細胞を用いた。ウイル ス抑制因子液は MEM-5 をもって 10º.2 倍階段 (FINTER, 1969) に希釈し、1 希釈当たり3本の培養管を用意し、 ウイルス抑制因子希釈液をもって培地と置換した。その 量は1本の培養管当たり1 ml とした。これを20 $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ 24 時間培養後、HANKS' BSS で細胞単層を2回洗って から,約 1,000 TCID50/mlの IPN ウイルス (VR-299 株) を各培養管に 1 ml ずつ接種した。20°C で約 42 時 間培養後,CPE が細胞単層全域におよんだことを確認 して、中性赤溶液(塩化ナトリウムと中性赤をそれぞれ 0.85%, 0.02% を含む溶液)を各培養管に $0.4\,\mathrm{m}l$ ずつ 加えた。20°C で1時間作用後, 0.85% 生理食塩水で細 胞単層を2回洗った後, 0.1 M NaH₂PO₄ (pH 4.3) とエ チルアルコールの等量混合液を各培養管に 3 ml ずつ加 え、細胞に取り込まれた中性赤を抽出しこの抽出液の吸 光度を分光光度計を用いて波長 540 nm で測定した。ウ イルス非感染細胞の対照 (細胞対照) は、ウイルス抑制 因子希釈液のかわりに MEM-5 と置換した培養管に, IPN ウイルスを接種するかわりに MEM-10 を用いて, 上記ウイルス抑制因子の力価測定と同様に行った。ウイ ルス感染細胞の対照 (ウイルス対照) は, ウイルス抑制 因子希釈液のかわりに MEM-5 を用いて、上記ウイル ス抑制因子の力価測定と同様に行った。

ウイルス抑制因子の生物学的および物理化学的性状試験は以下により、また因子の力価測定は dye uptake 法によって行った。

56°C, 30 分間加熱処理 ウイルス抑制困子液 3 ml を 16×125 mm 培養管に入れ、あらかじめ 56°C に調節した恒温槽中で、最初の 10 分は随時、残りの 20 分は 5 分ごとに攪拌して加熱処理した。30 分間加熱処理後、直ちに氷冷してウイルス抑制因子の力価測定に供した。対照として、この間 4°C に保存したウイルス抑制因子液を用いた。

4°C, 24 時間, pH 2 処理 ウイルス抑制因子液 3ml

を 16×125 mm 培養管にとり、12 N 塩酸で pH 2 に調節し、4 °C に静置した。24 時間後、水酸化ナトリウム飽和水溶液で pH 7.5 に再調整し、ウイルス抑制因子の力価測定に供した。対照として、この間 4 °C に保存したウイルス抑制因子液を用いた。

 4° C, $100,000 \times g$, 2 時間遠心処理 ウイルス抑制因子 液を 4° C で $100,000 \times g$, 2 時間遠心し,上清の上 2/3 を分離し,ウイルス抑制因子の力価測定に供した。対照には,遠心処理前のウイルス抑制因子液を用いた。

透析処理 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 18°C) で 4°C, 24 時間, 透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, 型: 27/32 Visking Company USA) を用いて無菌的に透析したウイルス抑制因子液をウイルス抑制因子の力価測定に供した。対照には、透析前のウイルス抑制因子液を用いた。

トリプシンによる消化 血清によるトリプシン不活化をより少なくするため、ウイルス抑制因子液を HANKS' BSS で 2 倍に希釈し、トリプシン (Type I. Approx. 10,000 BAEE units per mg protein, Sigma Chemical Company USA) 液を、トリプシンが最終濃度で 0.4 mg/mlとなるように加え、37°C で1時間ごとによく攪拌しつつ4時間消化した。消化後、トリプシンインヒビター(Lyophilized from Soy bean, Type I-S. Sigma Chemical Company USA)を最終濃度で 0.4 mg/mlとなるように加え、トリプシンの消化を止め、ウイルス抑制因子の力価測定に供した。対照はトリプシン液のかわりに、その溶媒である二回蒸留水を用いてトリプシン消化操作と同様にして準備された。

細胞種特異性 ウイルス抑制因子が、その抗ウイルス作用の発現において細胞種特異性を示すか、どうかを調べるため、IPN ウイルスに対して感受性を示し、 CPE を発現する RTG-2、STE-137、BF-2、CHSE-214 の 4 種魚類株化細胞を用いて、ウイルス抑制因子の力価測定を行った。

 杭ウイルス・スペクトル ウイルス抑制因子の抗ウイルス・スペクトルを調べるため,RTG-2 細胞に対して CPE を発現する以下の ウイルスを攻撃ウイルスとして 用い,ウイルス抑制因子の力価測定を行った。IPN ウイルス(10^8 TCID $_{50}$ /ml),IHN ウイルス (10^8 TCID $_{50}$ /ml),EVE (10^3 TCID $_{50}$ /ml)

ウイルス抑制因子液とウィルス液の混合 ウイルス抑制因子がウイルスを直接不活化するか、どうかを調べるため、ウイルス抑制因子液 $1\,\mathrm{m}l$ にウイルス液 $0.1\,\mathrm{m}l$ を加え、 $4^{\circ}\mathrm{C}$ に 48 時間静置した後、ウイルス力価を測定

した。静置時に 12 時間ごと十分に攪拌した。なお、ウイルス液には IPN ウイルス, IHN ウイルスおよび EVE が用いられた。対照はウイルス抑制因子液のかわりに、MEM-10 を用いて、上記と同様に行った。ウイルスの定量には、マイクロタイター法を用い、BEHRENS-KÄR-BER 法で TCID: 0 値が算出された。

インターフェロンの力価測定法の比較吟味は以下にしたがって行われた。

インターフェロン (IF) 液 ウイルス抑制因子の誘発 と同様の方法により得た。

Dye uptake 法 前述した ウイルス抑制因子の力価 測定法に従った。

プラック減少法 直径 50 mm の細胞培養用プラスチ ックシャーレに RTG-2 細胞の単層形成を待ち, IF 液の 2 倍階段希釈をもって1希釈当たり3枚のシャーレの培 地と置換した。置換する IF 希釈液はシャーレ1枚当た り 1 ml とした。20℃ で 24 時間の培養後, IF 希釈液 を吸い取り、HANKS' BSS で約 100 pfu/0.2 ml に調整 した IPN ウイルスを各シャーレに $0.2\,\mathrm{m}l$ ずつ接種し た。20°C で 1 時間培養後、ウイルス液を吸い取り、シ ャーレ1枚当たり 5 ml の寒天重層液 (1.0% 寒天含有) を重層した。寒天重層液が固化後、MEM-5をシャーレ 1 枚当たり 3 ml 重層し, 20°C で 48 時間培養した。プ ラック算定は、培養単層を0.5% クリスタルバイオレッ ト液で染色して行った。プラック抑制の基準として IF 希釈液のかわりに MEM-5 を用いて, 前述と同様に行 い培地対照とした。培地対照に対する各 IF 希釈ごとの 平均値の % プラック数を求め、対数確率紙の横軸に IF 希釈倍数を、縦軸に % プラック数をとってプロットし 50% プラック減少点を示す IF 液の希釈倍数を IF 力 価すなわち 50% plaque reduction dose (PRD to) とし た。

 行い、培養管の半数に CPE を抑制することのできる IF 希釈を Reed-Muench 法で算出し、その IF 希釈の逆数を IF 力価すなわち 50% tissue culture inhibition dose (If D_{50}) とした。

マイクロプレートを用いた CPE 阻止法 培養管を用いた CPE 阻止法と同様に行った。すなわち、IF 液の 1 希釈当たりマイクロプレートの 8 穴を用いた。置換する IF 希釈液は 1 穴当たり $0.1\,\mathrm{ml}$ とした。攻撃に用いた IPN ウイルスは $10\sim100\,\mathrm{TCID_{50}}/0.05\,\mathrm{ml}$ に調整後、 $1\,\mathrm{穴当たり}\,0.05\,\mathrm{ml}$ を接種した。IPN ウイルス液を除いた後、MEM- $10\,\mathrm{vec}$ を各穴に $0.1\,\mathrm{ml}$ ずつ加えた。

結 果

RGT-2 細胞における IHN ウイルスのウイルス抑制 因子誘発能 実験は 3 回行われたが、いずれの 場合も RTG-2 細胞に IHN ウイルスを接種して得られたウイルス抑制因子液の希釈倍数が低い培養管においては明らかに CPE の阻止がみられ、希釈倍数が高くなるにつれて CPE の阻止力が低くなることを確認できた。吸光度とウイルス抑制因子液希釈倍数の対数のグラフは Fig. 1 に示すように シグモイド 曲線となり、中性 赤摂取量が 25% から 75% の範囲での回帰直線の式はそれぞれ

$$Y = -0.113X + 0.400$$

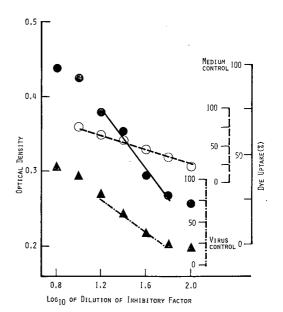


Fig. 1. Relationship between inhibition activity (Dye uptake) and dilution of viral inhibitory factor induced by RTG-2 cell infected with IHN virus.

Y = -0.210X + 0.645Y = -0.045X + 0.406

(X=希釈倍数の対数, Y=吸光度)

となった。また、回帰直線の有意検定を行った結果、いずれの場合も有意水準 0.01 でその回帰直線は有意と認められた。そして、誘発されたウイルス抑制因子の力価は、それぞれ $30DU_{50}$ (50% dye uptake units)/ml, $32DU_{50}$ /ml および $34DU_{50}$ /ml であった。一方、対照では、いずれの場合も CPE の阻止がみられなかった。本実験から IHN ウイルスは、RTG-2 細胞においてウイルス抑制因子誘発能を有することがわかった。

ウイルス抑制因子の生物学的および物理化学的性状 RTG-2 細胞において IHN ウイルスにより誘発された ウイルス抑制因子は Table 1 に示す諸性状を有する。す なわち、1) 56° C、30 分間加熱処理に対してほぼ安定である。2) 4° C、24 時間、pH 2 処理に対して安定である。3) $100,000 \times g$ 、2 時間に対して不沈降性であり、抗ウイルス性としてウイルス粒子は関与していない。4) 非透析性である。5) トリプシン消化により不活化し、その活性は蛋白質そのものか、活性本体が蛋白質に付随している。6) 抗ウイルス作用において細胞種特異性をもっている。

抗ウイルス・スペクトルについて調べた結果, IPN ウイルスを用いた場合, $26DU_{t0}/ml$ を示したウイルス抑制 因子が EVE を用いた場合には, $8DU_{50}/ml$ であり, IPN

Table 1. Biological and physicochemical properties of viral inhibitory factor induced by RTG-2 cell infected with IHN virus

Treatment	Inhibition activity of viral inhibitory factor (DU units/ml)						
_	Post- treatment	Pre- treatment					
Heating, 56°C, 30 min	18	24					
pH 2 treatment 4°C, 24 h	r 12	11					
$100,000 \times g$ centrifugation,							
4°C, 2 hr	22	24					
Dialysis	21	21					
Trypsinization	<2.5	9					
Inhibition activity							
of viral inhibitory	RTG-2	12					
factor induced by	STE-137	10<					
fish cell lines	CHSE-214	< 2.5					
induced with IHN virus (DU units/ml)	BF-2	4					

ウイルスを用いた場合には $24\mathrm{DU}_{50}/\mathrm{m}l$ を示したウイル ス抑制因子が IHN ウイルスの場合には、 $10DU_{50}/ml$ で あった。この結果から、ウイルス抑制因子は RTG-2 細 胞に対して、程度の差はあれ、IPN ウイルスだけでな く, EVE, IHN ウイルスに対する阻止力も付与した。ま た、ウイルス抑制因子液とウイルス液との混合の結果、 IPN ウイルスについては対照が $10^{3.8}$ TCID₅₀/ml, ウイ ルス抑制因子との混合後, その力価は 108.8 TCID₅₀/ml で あり、IHN ウイルスについては対照が $10^{2.9}TCID_{50}/ml$, ウイルス抑制因子との混合後, その力価は 10^{2.8}TCID₅₀/ ml, また, EVE については対照が 10^{2.6}TCID₅₀/ml に 対してウイルス抑制因子との混合後、 その力価は 102.8 $TCID_{50}/ml$ であった。 すなわち、 ウイルス 抑制因子は IPN ウイルス, IHN ウイルスおよび EVE を直接不活 化することはなかった。以上の諸結果から,ウイルス抑 制因子はインターフェロン (IF) であることの条件を充 足していることが明らかになった。上記と同一の IF 液 を用いて、それぞれ異なる IF 力価測定法によって得ら れた IF 力価は以下のように示される。

Dye uptake 法による IF 力価は $34DU_{50}/ml$ であった。プラック減少法による場合 Table 2 に示したようになり、Fig. 2 より IF 力価は $16PRD_{50}/ml$ となった。培養管を用いた CPE 阻止法による場合、IPN ウイルス接種 43 時間後に対照培養の 100% に CPE の発現がみられ、IF 力価は 13 $1fD_{50}/ml$ 、また、マイクロプレート法による場合、8 $IfD_{50}/0.1$ ml であった。

Table 2. Plaque number per dish, average and percent plaque number expressed as plaque number in diluted IF/plaque number in medium control ×100 in the relationship between IF dilution and interferon activity of IF induced by RTG-2 cell infected with IHN virus

	Plaque number				
IF dilution	Dis 1	sh no 2		erage	Percent plaque number
2^0	1	0	0	0	0
2^{1}	0	0	1	0	0
2^2	14	11	18	14	12
2^3	32	31	29	31	27
2^4	49	44	51	48	42
25	75	85	87	82	71
2^6	95	106	110	104	90
Medium control	110	117	117	115	100

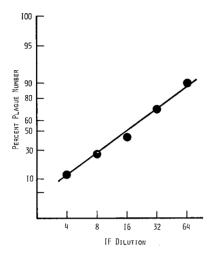


Fig. 2. Relationship between IF dilution and percent plaque number expressed as plaque number in diluted IF/plaque number in medium control×100 in interferon activity of IF induced by RTG-2 cell infected with IHN virus.

考 察

ウイルス抑制因子の産生において、回収したウイルス抑制因子液中には誘発ウイルス (IHN ウイルス) が感染性ウイルスとして残存しており、適当な方法によりそれを不活化あるいは除去する必要があった。一般に、ウイルスによって誘発される IF では、pH 2 による処理で失活はみられない。ニューキャッスル病ウイルスの完全な不活化を行うためには、pH 2 で数日間の処理を行う必要のあること(北村、1976)および IPN ウイルスは、著者らの研究結果では 48 時間の pH 2 処理でも完全な不活化は不可能であったことと比較すると IHN ウイルスは pH 2 の処理により、非常に容易に不活化されることがわかる。著者らは 4 C、pH 2 の 24 時間処理で IHN ウイルスを不活化した後、 $^{100,000} \times g$ の遠心で夾雑物質を除去する方法をとった。

RTG-2 細胞において IHN ウイルスにより誘発されたウイルス抑制因子の力価は $30,32,34 \mathrm{DU}_{50}/\mathrm{m}l$ で,ウイルス抑制因子の誘発および力価測定は安定したものであった。

OIE and Loh (1971) は FHM 細胞においてレオウイルス・タイプ 2 で $40\sim50$ units/ml の IF を誘発させた。また、DE SENA and RIO (1975) は RTG-2 細胞において、IPN ウイルスによる IF を誘発し、それを精製し

て 103~104 units/ml の力価の IF を得た。Dorson et DE KINKELIN (1974) はニジマスを用いて Egtved 病 (ウ イルス性出血性敗血症) ウイルスを接種し, 血清中に最 高 3,000 units/ml 以上の力価の IF を誘発させている。 哺乳動物の中でもマウスや他の齧歯類は IF を良く産生 する。YOUNGER et al. (1966) は高力価 IF 産生細胞と してよく知られているマウス L 細胞およびマウスにお いて、ニューキャッスル病ウイルスによりそれぞれ4,000 および 104 units の IF を収獲している。以上のように, これら得られた IF 力価の数値から判断すると本実験で 得られたの力価は低いように見受けられがちである。し かし、異なる動物種から得られる IF を測定する系の感 度を相互に比較することは困難であるので、一つの動物 種から得た IF の力価が他の種から得た IF と同じ、ま たは等価であると想定することには危険がある。また、 同じ動物種から得られる IF の測定においても、研究者 によりそれぞれ異なった方法を工夫、考案して用いてお り、感度が異なるのが実情であり著しい場合には、数百 倍も異なるものを同じ1単位として表現されたことから ヒト, マウス, ニワトリ, ウサギなどでは国際標準 IF が調整, 利用されるに至った (飯塚・鈴木, 1974). し かし、魚類の場合にはそこまでに至っていない。

抗ウイルス性因子が IF であるとするにはいくつかの生物学的ならびに物理化学的性質を満足しなければならない。RYTEL et al. (1966), OIE and LOH (1971) の報文ならびに松山 (1972), などは IF の判定に触れているが,これらを検討した結果,著者らはウイルス抑制因子が以下の性状を示すとき, IF と判定できると判断した。

- 1. 56°C, 30 分間加熱処理に対して安定である。
- 2. 4°C, 24 時間, pH 2 処理に対して安定である。
- 3. 4° C, $100,000 \times g$, 2 時間遠心処理に対して沈降しない。
 - 4. 非透析性である。
 - 5. トリプシ処理により不活化する。
 - 6. 抗ウイルス作用において細胞種特異性をもつ。
 - 7. 幅広い抗ウイルス・スペクトルをもつ。
 - 8. ウイルスを直接不活化しない。

ただし、エンドトキシン誘発 IF はウイルス誘発 IF より 56° C および pH 2 に対して不安定であり、上記の判定基準はウイルス誘発抗ウイルス因子についてのみ適用される。本実験において得られたウイルス抑制因子は上記の判定基準を満足しているため、IF であると断定できた。

細胞種特異性について, 系統的に離れたトリのウイル

スとヒトの細胞、またその逆あるいはトリのウイルスとマウスの細胞またはその逆などの関係では、明らかに種特異性が認められるが、近縁種の場合には交差性のみられる例が Moehring and Stinebring (1970) によって報告されている。したがって、厳密な種特異性が成り立たなければ IF ではないということはないと考えられる。本実験においても、IF の性状である抗ウイルス作用における細胞種特異性は満たされたと判断できる。

力価測定法の比較において、CPE 阻止法の場合、IPN ウイルス接種後の時間の経過にしたがい IF 力価は低くなっていくことがわかる。したがって、ウイルス接種後、CPE の観察をいつ行うかが 重要な問題となる。また、CPE 阻止法には、CPE の観察を主観にたよるという欠点があるものの、マイクロプレートを用いると、細胞、試料および希釈用液などが少量でよいこと、一度に多くの試料を処理できることなどの利点がある。

プラック法では、プラック数を計数するという比較的客観性の高い判定ができ、再現性においてもすぐれているという(飯塚・鈴木 1974).この点では、dye uptake 法も分光光度計で色素量を測定するという客観性の高い方法であるといえる。Dye uptake 法、プラック減少法、培養管を用いた CPE 阻止法の感度を比較すると、dye uptake 法はプラック減少法の 2.1 倍、CPE 阻止法の 2.6 倍の感度をもち、dye uptake 法が最も感度がよく、プラック減少法と CPE 阻止法は同程度の感度を示すことがわかった。ただし、CPE 阻止法の値は IPN ウイルス接種 43 時間後の測定結果である。FINTER (1969) によれば、マウスの IF を用いた場合、dye uptake 法は、プラック減少法の 25 倍、CPE 阻止法の 1.6 倍の感度であったという。

マイクロプレートを用いた CPE 阻止法では、IPN ゥイルス接種 48 時間後、 $8IFD_{50}/0.1\,\mathrm{ml}$ であったが、これを $80IFD_{50}/\mathrm{ml}$ と換算することには問題がある。IF の作用については、飯塚・鈴木(1974)によれば、濃度依存という説と絶対量(濃度×液量)に依存するという説があり、この種の換算には注意する必要がある。

本実験で比較した3方法の他にもIF 力価の測定があるが、いずれの方法でもIF の力価はIFがもつ生物活性を指標として測定する一種の間接的定量法によって測定されており、今後、IF を直接定量する方法の開発が望まれる。

要 約

RTG-2 細胞において、IHN ウイルスは魚類ウイルス 抑制因子を誘発した。この因子は以下の生物学的および 物理化学的性状を示し、インターフェロンであることが わかった。

1) 56° C, 30 分間加熱処理に対して安定である。2) 4° C, 24 時間,pH 2 処理に対して安定である。3) 4° C, $100,000 \times g$, 2 時間遠心処理で沈降しない。4) 非透析性である。5) トリプシンにより不活化する。6) 抗ウイルス作用において細胞種特異性をもつ。7) 幅広い抗ウイルス・スペクトルをもつ。8) ウイルスを直接不活化しない。

ここで得られたインターフェロンを用いてインターフェロン力価の測定法を検討した結果、dye uptake 法はプラック減少法の 2.1 倍、培養管を用いた CPE 阻止法の 2.6 倍の感度を示し、これらの方法の中では、dye uptake 法が最も高いインターフェロン力価測定感度を示した。

文 献

飯塚雅彦·鈴木慈郎 (1974): 最新医学, 29(4), 660-664.

DE SENA, J. and G. J. R10 (1975): Partial purification and characterization of RTG-2 fish cell interferon, *Infect. and Immun.*, 11 (4), 815–822.

Dorson, M. et P. De Kinkelin (1974): Mortalité et production d'interféron circulant chez la truite arc-en-ciel après infection expérimentale avec la virus d'Eqtved: Inflecence de la température. Ann. Rech. Vétér., 5 (3), 365-372.

FINTER, N. B. (1969): Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J. Gen. Viral.*, 5, 419-427.

LAMPSON, G. P., A. A. TYTELL, M. M. NEMES and M. R. Hilleman (1963): Purification and characterization of chick embryo interferon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 468–478.

松山雅子 (1972): 新ウィルス学 II. 朝倉書店, 東京, 276-285.

MOEHRING, J. M. and W. R. STINEBRING (1970): Examination of "species specificity" of avian interferons. *Nature*, 226, 360–361.

OIE, H. K. and P. C. LOH (1971): Reovirus type 2: Induction of viral resistance and interferon production in Fathead Minnow Cells. *Proc.* Soc. Exp. Biol. Med., 136, 369–373.

RYTEL, M. W., R. E. SHOPE and E. D. KILBOURNE

(1966): An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*: V. Induction of interferon by helenine. *J. Exp. Med.*, 123, 577-583.

YOUNGNER, J. S., A. W. SCOTT, J. V. HALLUM and W. R. STINEBRING (1966): Interferon production by inactivated newcastle disease virus in cell cultures and in mice. *J. Bacteriol.*, 92 (4), 862–868.