Meningopneumonitis virus の浮遊L細胞内

増殖に関する生化学的研究

多 村 憲*・岩 永 光 比 子*・東

昇*

AKIRA TAMURA, MIHIKO IWANAGA, NOBORU HIGASHI: BIOCHEMICAL STUDIES OF MENINGOPNEUMONITIS VIRUS MULTIPLICATION IN L CELL SUSPENSION CULTURE

(受稿 4月18日 1961)

序

Meningopneumonitis virus (以下 MPV) の属するオウム病群ウイルスの、感染細胞内 RNA 及び DNA 合成に関する生化学的研究としては、Starr 等^{1),2)} がオウム病ウイルス-McCoy 細胞系において、組織化学的方法により、まず細胞質内に RNA 染色性の封入体の形成、及びそれに続く DNA 粒子の出現という過程を明らかにしている。また田波等³⁾ は同じくオウム病ウイルス-McCoy 細胞系において DNA 合成阻害剤の 5-Fluorodeoxyuridine 及び蛋白合成阻害剤の Fluorophenylalanine を用いた実験からウイルス核酸とウイルス蛋白質合成の時間的推移を追究し、ウイルス感染細胞内の子孫ウイルス粒子出現に先行して即ち潜伏期間においてウイルス DNA はウイルス蛋白より数時間先行して合成されることを見出し、このことからオウム病ウイルス (TTF 株) の増殖は二分裂ではなく「真のウイルス」同様 subunits の形で増殖し成熟すると報告している。

著者等は数年来 MPV の L 細胞内増殖機構に関して、生物学的、電子顕微鏡学的研究を行ってきたが^{4)~7)}、更にその機構のより精密な解析のためには、生化学的研究が必要である。しかし一般に動物ウイルスの増殖に関する生化学的研究は、ファージのそれに比べてその実験系が複雑なためになかなか困難である。それ故に動物ウイルスの実験技術をファージの実験系に近づけるべき努力がなされた。この意味で Dulbecco 等(1954)⁸⁾ によるブラック法の発見、及び最近の細胞の浮遊培養技術の進歩は重要である。

著者等も MPV 増殖の生化学的研究を始めるに当り、まず MPV のブラック法による感染価測定法の確立、及び浮遊培養法による MPV 増殖系の確立の必要性を感じた。幸いにして、このうちブラック法に関してすでに成功して報告した (1959)⁹⁾、(1960)¹⁰⁾。

著者等はこれらの実験技術的基礎の上に立つて、MPV 増殖機構の生化学的研究に入つた。即ち MPV-浮遊培養 L 細胞系を用いて一段増殖実験を行い、MPV 感染細胞内核酸及び蛋白の生成の様子を純化学的方法を用いて調べた。

実験材料及び実験方法

1. ウイルス

使用ウイルス及びウイルス継代方法は前報¹⁰⁾と同じである。実験に使用したウイルス浮遊液は次の方法により調製した。即ちウイルス継代感染細胞の fluid を pool し 3,000 rpm 10分と 6,000 rpm 60分に分画遠心を 2 回行つてウイルスを部分的に精製し、得られた部分精製ウイルスを培養液中に適当な濃度に分散させて実験に使用した。

2. 細胞及び細胞培養方法

実験にはすべて浮遊培養 L 細胞を使用した。この浮遊培養細胞は当研究室で単層培養法により継代した L 細胞より作成されたもので、過去約 2 年間浮遊培養系で継代培養したものである。細胞は 2~3 日間隔で新しい培養液で 4×10^5 /ml の細胞濃度に希釈して継代培養した。細胞の増殖率は 3 日目で 4 乃至 5 倍となる。この細胞を実験に使用するに当り、特に稀釈継代 2 日目の細胞浮遊液を新しい培養液で 2 倍に稀釈し、

* 京都大学ウイルス研究所物理部 (主任 東 昇教授)

更に一昼夜 37° に培養して使用した。これは代謝及び生合成活性の活発な細胞を使用するためである。それは以下に述べるような生化学的実験には、2, 3 の研究者により指摘されているように^{11)~13)} “young” な培養細胞と “old” な培養細胞とではウイルスの感染に伴う細胞の生化学的 response の様子が異なる場合があるからである。

ウイルスの継代、及びブラック法に使用する L 細胞の単層培養は上記浮遊 L 細胞を 5×10^5 /ml 程度に新しい培養液で稀釈し、培養瓶に移植して 37° に静置培養して作成した。

培養液の組成は Earle 氏液にラクトアルブミン水解物 0.5%, 酵母エキス 0.1%, 牛血清 10%, ストレプトマイシン 200 μ g/ml を含む液で、濾過滅菌したものである。ウイルス感染に使用する維持培養液は、上記培養液のうち、牛血清を 2% に減じたものである。

3. 一段増殖実験

1) 吸 着

まず浮遊培養 L 細胞を 1,000 rpm, 5 分遠沈して旧液をすて、PBS 液で 2 回、維持培養液で 1 回洗滌する。之に適當濃度のウイルス浮遊液(浮遊液は維持培養液)を加える。その際細胞濃度を $0.5-1.0 \times 10^7$ /ml になるように調製する。ついで 37° で一時間振盪培養してウイルス細胞に吸着せしめる。吸着時間終了後、直ちに PBS 液で数倍に稀釈し、遠沈して接種液を除き、未吸着ウイルス除去の目的を以つて冷却 PBS 液で細胞洗滌を 4 回行つた。次に細胞を新しい維持培養液中に浮遊せしめ、pipping して十分に均質な細胞浮遊液を作り、最後に更に培養液を加えて細胞濃度を $0.5-1.0 \times 10^6$ /ml 程度まで稀釈し、37° で振盪培養した。感染時間はウイルス吸着開始より始まる。細胞の洗滌に要した時間を含まない。

感染ウイルスと細胞との比、いいかえれば感染の multiplicity は増殖曲線実験の場合には、その目的に応じて 0.06 と 50 の間であつた。但し生化学的実験には感染系における全細胞の同時感染を確実にするため 50 以上とした。

2) ウイルス採取

感染後経時的に感染細胞浮遊液より 10ml を採取し、2,000 rpm, 10 分遠沈して感染細胞上清と感染細胞にわけた。感染細胞は、附着ウイルスを除去するために 10ml の PBS 液で 3 回洗滌後、1 ml の維持培養液中に分散させて Potter のホモジナイザーに移し、500 rpm, 5 分氷冷下にホモジナイズする。ホモジネー

トは 5 ml の培養液中に浮遊し、2,000 rpm, 5 分遠沈して上清を細胞内ウイルスとして感染価測定に供した。

3) 感染価測定法

前報¹⁰⁾に従い L 細胞によるブラック法を使用した。また感染細胞数の測定にもブラック法を応用した。即ち、洗滌により感染細胞浮遊液中の遊離ウイルスを除き、細胞を適當濃度に稀釈してその 0.1ml をブラック用小瓶に作つた L 細胞の sheet の上にのせ、揺り動かしてよく分散させる。30 分室温に静置して感染細胞を細胞 sheet 上に附着させてから静かに寒天培養液を overlay し、以下ブラック法に準じてブラックの出現を調べた。

4. 生化学実験

1) 細胞数の測定法

Bürker-Turk 血球計算盤を使用し、総計約 700 の細胞を計数して平均値を求めた。誤差は $\pm 10\%$ 以内である。死細胞数は中性赤染色法により生細胞数を計数して全細胞数から差引く方法、またはトリパンブルー染色法により死細胞数のみを染色して計数する方法によつた。中性赤及びトリパンブルー染色法は Girardi 等 (1956)¹⁴⁾の方法に従つた。

2) 窒素量の測定

Kabat and Mayer (1957)¹⁵⁾のマイクロキルダール法によつた。即ち細胞を PBS 液で洗滌後、キルダール分解フラスコ中で硫酸銅及び硫酸カリを触媒として濃硫酸で分解し、キルダール蒸留装置によつて生じたアンモニアを蒸留、これをメチルレッド、メチレンブルー混合指示薬を含んだ飽和硼酸溶液中に吸収させ、N/70 塩酸で滴定した。

3) 蛋白質の定量

細胞を PBS 液で洗滌後 1 N 苛性ソーダに溶解し、Lowry (1951) の銅-Folin 法¹⁶⁾により、銅イオンを含んだ炭酸ソーダ溶液中で Folin 試薬により呈色させ、500 m μ または 750 m μ の吸光度を分光光度計で測定した。standard として結晶牛血清アルブミンを使用した。

4) RNA 及び DNA の定量

MPV 感染細胞浮遊液より経時的に 10ml を採取し、遠沈して細胞を集める。これを PBS 液で 2 回洗滌後、冷 10% 三塩化酢酸 5 ml 中に浮遊させる。10 分後遠沈して上清の酸可溶性分画部を除き、更に 2 回沈査を 10% 三塩化酢酸 5 ml で洗う。次に沈澱を 1 ml の蒸留水中に分散させ、95% アルコール 4 ml を加えてよく

攪拌し、10分後に遠沈する。更に沈澱を純アルコール 5 ml で 1 回、アルコール：エーテル 3：1 混液 5 ml で 3 回洗滌してリビッド分画を除く。得られた残渣から可及的にアルコール：エーテル混液を除き、1 N 苛性カリ 1 ml を加え、37° で 16～18 時間加温し、RNA を分解する。次いで冷却下に 6 N 塩酸 0.2 ml を加えて液の pH を中和し、1.0 N 過塩素酸 1 ml を加え、少時放置後遠沈して上清をとり、更に 0.5 N 過塩素酸 2 ml で沈澱を洗って先の上清と合し、これを RNA 分画とする。沈澱に 0.5 N 過塩素酸 2 ml を加え、攪拌下に 70°、20 分加温して DNA を分解し、氷冷して沈澱を完全に析出させてから遠沈して上清をとり、残渣を更に 0.5 N 過塩素酸 2 ml で洗い上清を合して DNA 分画とする。

上述の方法により得られた RNA 分画を Mejbaum (1939) の方法¹⁷⁾でオルシノールを用いて RNA を 660 m μ で比色定量し、また DNA 分画は Burton (1956) の方法¹⁸⁾によりジフェニールアミンを用いて 595 m μ で定量した。この比色定量には島津分光光度計 QR-50 型を使用した。RNA 定量の standard として酵母 RNA を使用し、DNA 定量のそれには犢胸腺 DNA を使用した。

実験成績

ここに述べるようなウイルス感染細胞内の生化学的变化を、純化学的方法により経時的に追跡する場合には、厳密に一段増殖系を使用しなければならないことはもちろんであるが、更に感染系と非感染系とを細胞集団として比較する必要上、使用する感染系としては存在する全細胞の感染の成立が必要であり、非感染細胞の混入のないことを確かめねばならない。従つてまずこの点につき検討した成績から述べる。

1. 感染細胞の形成に関する検討

存在する全細胞の感染の成立条件を求める方法としては、ウイルスの細胞への吸着速度を測定して、吸着ウイルス量と吸着時間の関係を求め、ポアソン分布の式に従つて存在する全細胞に少なくとも 1 感染価以上のウイルスが吸着するための条件を求める方法がある。従つてまず MPV の L 細胞への吸着曲線を求めた。

第 1 図は細胞濃度 8.0×10^6 /ml, multiplicity 4.8 PFU で 37° で培養した時の培養液中よりのウイルス消失速度を示す。第 1 図には同時に 37° におけるウイルスの不活化速度も示してある。この成績で MPV の浮遊細胞への吸着速度はかなり緩慢で、一方ウイルス不活

Fig. 1 Heat inactivation curve of MPV in maintenance medium at 37° and adsorption curve of MPV to L cells.

化速度はかなり速い。従つて MPV の細胞への吸着量を正確に求めることは難かしいと推定される。

また第 1 表は細胞濃度 7.2×10^6 /ml, multiplicity 13.7 PFU で 37°、1 時間吸着後、吸着上清、細胞洗滌液、感染細胞内の各ウイルス感染価及び同時に 37° でのウイルス不活化量を求めて、最初に接種したウイルス量から差引き計算によつて真に細胞に吸着したウイルス量を求めるべく試みた成績を示す。表中消失ウイルス量は接種ウイルス量から不活化ウイルス、吸着上清及び各洗液中のウイルス、及び細胞内ウイルス量を差引いて求めたものである。従つて細胞に真に吸着したウイルス量はこの消失ウイルス量に細胞内ウイルス量を加えたものであるがその量は意外に少なく接種ウイルス量の 10% 以下で測定誤差内となる。したがつてファージ及び数種の動物ウイルスで行われているような差引計算法によつて吸着ウイルス量を求める方法は MPV の場合には使用出来ない。このことから MPV の場合には吸着ウイルス量から感染細胞数を推定するという方法は不可能であることが分る。

そこで次に感染細胞数を直接ブラック法で測定する方法により、接種ウイルス量と感染細胞数の関係を求めた。第 2 表は細胞濃度 8.25×10^6 /ml に種々の multiplicity で 37°、1 時間ウイルスを吸着させた後、感染細胞数を測定し、全細胞数当りのパーセントを求めたものである。この成績より multiplicity が 13 PFU の場合には 80% 以上の細胞が感染し、65 PFU では 90% 以上の細胞が感染した。したがつて、以下の生化学的実験では 50 PFU 以上の high multiplicity を使用して、存在する大部分の細胞が同時感染を受けるべ

Table. 1 Distribution of Residual Plaque Forming Virus in L Cell Suspension after Infection with MPV*

	Total ml.	PFU per ml.	Total PFU	Recovery %
Inoculum	10	9.9×10^7	9.9×10^8	100
Inactivated		2.0×10^7	2.0×10^8	22.0
Supernatant after adsorption	40	1.7×10^7	6.6×10^8	66.6
Washing fluid	1	3.8×10^5	3.8×10^7	3.84
	2	9.2×10^4	9.2×10^6	0.93
	3	3.3×10^4	3.3×10^6	0.33
	4	1.8×10^4	1.8×10^6	0.18
	5	2.4×10^4	2.4×10^6	0.24
Cell associated			6.6×10^5	0.07
Deficit			6.8×10^7	6.88
Infected cells			6.5×10^7	

* Input multiplicity in this experiment is 13.7 PFU per cell.

Table. 2 Proportion of Infected Cells after Exposure at Various Multiplicity for 1 Hour at 37°.*

Input multiplicity	Infected cell no./Total cell no.
65	93.1
13	80.9
2.6	50.2
0.51	8.1
0.10	1.7
0.021	0.18

* Cell concentration in this case is 8.2×10^6 cells/ml.

く留意した。

2. 増殖曲線

第2図は multiplicity 44 の場合の MPV の浮遊L細胞内一段増殖曲線を示す。細胞内ウイルス感染価は10~16時間に感染細胞数の 10^{-3} という低値を示し、1細胞当りのウイルス感染価は 7.7×10^{-4} PFU/cell であった。これはウイルスが細胞に侵入後、何等かの変化をうけて感染性を消失するためと考える。また1~10時間に見られる感染価の減少は細胞内に侵入したウイルスが感染価を消失していく様子を示しているものとする。但しこの場合熱不活化を考慮する必要があるかも知れない。細胞内及び細胞外ウイルス感染価の上昇開始時間は multiplicity が高いためにこの成績では明確でない。30時間における細胞当りのウイルス収量は 450 PFU/cell に達する。

細胞内及び細胞外ウイルス感染価の上昇開始時間を

Fig. 2 Growth of MPV in L cell suspension culture at input multiplicity 44.

精密に求めるためにおこなった low multiplicity の実験成績は第3図に示すように、細胞内及び細胞外感染価は18時間まで全く認められず、細胞内感染価は19時間、細胞外感染価は21時間にはじめて認められ、以後それぞれ急速に上昇する。この2本のカーブをそれぞれ外挿して横軸と交差する点(図上点線で示す)を求めると、細胞内ウイルスは18.5時間、細胞外ウイルスは20時間であつて、これがそれぞれ細胞内及び細胞外ウイルス感染価の上昇開始時間を示していると考えられる。

3. 感染及び非感染細胞の増殖

第4図は感染及び非感染細胞の増殖の様子を示す。図上点線は死細胞数を示す。ここで非感染細胞とは MPV 接種液のかわりに単に維持培養液のみを接種したもので、吸着、洗滌等の操作はすべて感染細胞と同

Fig. 3 Growth of MPV in L⁺ cell suspension culture at input multiplicity 0.068.

Fig. 4 Cell division of uninfected and MPV-infected L cells.

様に処理されたものである。またこの実験及び以下の実験で非感染細胞として熱不活化ウイルスを接種した場合も試みたが結果は全く同じであつた。第4図の成績で非感染細胞は若干のシグモイドカーブの形を示して増殖する。しかるに感染細胞の増殖は完全に抑制される。また感染細胞の場合には20時間以後に死細胞の増加がみられ、35時間で全細胞が死滅する。この場合ボックス群ウイルス他数種のウイルスにみられる多核細胞の形成は MPV-L 細胞系ではみとめられなかつた。

4. 感染細胞内の全窒素、蛋白、RNA 及び DNA の増減

第5～8図はそれぞれ感染及び非感染細胞内の窒

Fig. 5 Nitrogen content in uninfected and infected cells. The vertical lines represent twice the average error in duplicate experiments.

Fig. 6 Protein content in uninfected and infected cells.

素、蛋白、RNA 及び DNA の単位細胞当りの経時的変化を示す。窒素量は25時間までは感染及び非感染細胞の間に差をみとめず、30時間以後に感染細胞内窒素量の減少がみられる。

また蛋白量は20時間以前は変化なく、25時間以後に感染非感染いずれにおいても減少がみられた。しかし窒素量及び蛋白量いずれも感染細胞内の変化は顕著なものでなく、しかもその変化がウイルス増殖のほとん

Fig. 7 RNA content in uninfected and infected cells.

Fig. 8 DNA content in uninfected and infected cells.

ど終了した頃にみられることから考えて、その変化がウイルスの増殖と本質的な意味をもつものとは考えられない。

これに対し感染細胞内 RNA 及び DNA 含量はウイルス増殖のかなり初期から非感染細胞に比して著明な増加を示す。即ち、RNA は感染10時間以後に増加が認められ、20時間で最高値に達し、以後急速に減少する。感染20時間における増加率は非感染細胞に対して

33% ($11\mu\text{g}/10^6$ cells) の増加であった。20時間以後の急激な減少は、丁度この頃から死細胞が増加するを考慮すれば、細胞の構成要素の部分的代謝機能の低下に起因するものと考えてよいであろう。

一方 DNA は15時間以後に増加が認められ、25時間ではほぼ最高値に達し、以後一定値にとどまる。感染30時間において、感染細胞の DNA 含量の増加率は非感染細胞のそれに対して 35% ($9.5\mu\text{g}/10^6$ cells) であった。

考 察

MPV-L 細胞浮遊培養系において、接種時のウイルス量及び細胞濃度を適当に選ぶことによって、ほとんど100% 近く細胞を短時間に同時感染させることができる。したがって、この系でウイルスの一段増殖実験を行つて、感染細胞内ウイルス感染価の変動と、それに平行して核酸及び蛋白の変動を同時に純化学的に測定し、両者を対比して考察することが可能となつた。

増殖曲線の成績で、細胞内に新ウイルス粒子の出現は感染後18.5時間以後であり、これは Officer 等 (1960)¹⁹⁾ のオウム病ウイルス (Borg 株)-Chang 細胞系での実験や田波等²⁰⁾ のオウム病ウイルス (TTF株)-McCoy 細胞系の実験成績と略々一致している。ヘルペスウイルスで認められるような multiplicity の高低の差による新ウイルス形成開始時間の変動は MPV-L 細胞系の場合には認められない。

MPV 感染細胞内の全窒素及び蛋白量の増減に関しては、ウイルス増殖に本質的な意味をもつものと思われる変化を得られなかつたが、RNA 及び DNA 量はそれぞれ感染後10時間及び15時間以後に著明な増加を示した。この核酸の増加に対する成績と先の増殖曲線の成績を対比して考察すると、RNA は細胞内新ウイルス粒子出現に少なくとも8.5時間先行して増加しはじめ、また DNA は3.5時間先行した。

田波等²⁰⁾ はオウム病ウイルス (TTF 株)-McCoy 細胞系を用いた実験で、新ウイルス粒子の細胞内出現は感染後17時間に始まるのに対し、DNA 合成はそれに10時間先行し、蛋白合成は2時間先行することを 5-Fluorodeoxyurine 及び Fluorophenylalanine を用いた阻害実験により示している。また Starr^{11,2)} 等は同じウイルス-細胞系を用いて、螢光色素による RNA 及び DNA の分別染色法により、DNA 染色性ウイルス基本小体が細胞に侵入後、まず細胞質に RNA 染色性の封入体を形成し、その後 DNA 染色性の基本小体が

出現することを報告している。

これらの報告と著者等の実験成績と直ちに結びつけて、増加した核酸の意義について考察することは早計であろうが、ただMPV-L細胞系においても、ウイルスの感染に伴ってDNA合成のみでなくRNA合成も活発に行われていること、及びそれらの高分子の合成が細胞内新ウイルス粒子の出現にかなり先行してはじめられているということを伺い知ることができる。

MPV感染浮遊L細胞内増殖に関する電子顕微鏡的形態学的研究成績については之を別に報告⁷⁾するが要約すると、基本小体は宿主細胞内に侵入して後崩壊してその形態を消失すること、成熟基本小体出現前にinitial bodyが出現すること、更にinitial bodyより基本小体への成熟過程を明らかにし得る。第9図は増

Fig. 9 Summary of findings in L cells infected with MPV.

殖曲線から得た感染価の消失と出現、形態的研究より得た基本小体及びinitial bodyの消失と出現、及び生化学的研究より得たRNA及びDNA合成の成績の時間的關係をまとめたものである。しかしこの時間的關係から直ちに増加したRNA及びDNAの役割や細胞内の存在部位を論ずることはできず、今後の研究にまたねばならない。

動物ウイルス感染細胞内での核酸及び蛋白含量の増加についてはこれまでに数種の報告がある。Ackermann等(1959)²⁰⁾はpolio virus-HeLa細胞系でウイルスの感染に伴って細胞質内にRNA及び蛋白の増加を報告した。またNewton and Stocker (1958)²¹⁾はヘルペスウイルス感染HeLa細胞に於て顕著なDNAの生成を認めた。Ginsberg and Dixon (1959)²²⁾はアデノウイルスIV型感染HeLa細胞内のDNA及び蛋白の増加を報告し、Green and Daesch (1961)¹³⁾はアデノウイルスII型-KB細胞系でDNA、RNA及び蛋白の増加を報告している。しかしいずれの報告において

もこれらの増加した核酸及び蛋白質量は、細胞当りのウイルス収量から考えて大過剰であり、その核酸及び蛋白のウイルス増殖に対する意義は不明のまま残されている。

著者等の実験成績で、RNA及びDNA含量の最も増加した時の増加量はそれぞれ 10^6 細胞数当り $11\mu\text{g}$ 及び $9.5\mu\text{g}$ であつて、非感染細胞に対する増加率はそれぞれ33%及び35%であつた。MPV-L細胞系で増殖曲線の成績から1細胞当りの最高ウイルス収量は約450~500 PFU程度である。またMPV基本小体は平均直径 $300\text{m}\mu$ の大きさを有する。ここでMPVの比重を1.3と仮定し、1細胞当り500ウイルス粒子を生ずると仮定すると、 10^6 細胞当りのウイルス重量は $9.3\mu\text{g}$ である。ウイルス粒子中の核酸含量が不明のため、生成ウイルス粒子数と増加した核酸量とを比較考察することは不可能であるけれども、1PFUに対応するウイルス粒子数は1より大きい値であるはずであり、事実形態学的な検索では1細胞当りのウイルス収量は500粒子をはるかに上まわると思われるので、このような核酸の増加量は考えられないほどの値ではないように思われる。

総括

meningopneumonitis ウイルス感染浮遊L細胞内での窒素量、蛋白量及び核酸の増減を純化学的方法により測定し、それらの成績を増殖曲線と対比して考察した。即ち、細胞内感染価の上昇は感染後18.5時間よりはじまり30時間で最高値となる。一方窒素及び蛋白量はウイルス増殖に有意と思われる変化を示さなかつたが、RNAは感染5時間以後より増加しはじめ20時間に極大値を示し以後減少する。DNAは10時間以後に増加しはじめ25時間まで上昇して以後ほぼ一定値に止まる。以上の成績を既報の成績と対比して増加したRNA及びDNAの意義について考察した。

文献

- 1) Starr, T.J., Pollard, M., Tanami, Y., and Moor, R.W. (1960). Cytochemical studies with Psittacosis virus by fluorescence microscopy. Texas reports on Biology and Medicine, 18, No. 3, 501-514.
- 2) Pollard, M., Starr, T.J., Moore, R.W. (1960). Cytochemical changes in human amnion cells infected with psittacosis virus. Nature, 188, 770.
- 3) Tanami, Y., Pollard, M., and Starr, T.J. (1961). Replication pattern of psittacosis virus in a tissue culture system. Abstract at the annual meeting of the Society of

- Am. Bact. at Chicago, 1961. 4) Higashi, N. (1959). Some fundamental differences of the mechanism multiplication between psittacosis group viruses and pox-viruses. Ann. Rept. Inst. Virus Research Kyoto Univ. **2**, 1-21. 5) Higashi, N., Notake, K., and Fukada, T. (1959). Growth characteristics of the meningopneumonitis virus in strain L cells. Ann. Rept. Inst. Virus Research Kyoto Univ. **2**, 23-56. 6) 野竹邦弘 (1959) Meningopneumonitis virus の培養に関する研究. ウイルス **9**, 507-525. 7) Higashi, N., Tamura, A., and Iwanaga, M. (1961). Developmental cycle and reproductive mechanism of the meningopneumonitis virus in strain L cells. Ann. Rept. New York Acad. Sci. in press. 8) Dulbecco, R., and Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure line with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. **99**, 167-182. 9) Tamura, A., and Higashi, N. (1959). Plaque formation in monolayers of strain L cells infected with the meningopneumonitis virus. Ann. Rept. Inst. Virus Research Kyoto Univ. **2**, 57-64. 10) Higashi, N., and Tamura, A. (1960). A plaque assay for meningopneumonitis virus in monolayers of L cell strain. Virology, **12**, 578-588. 11) Kaplan, A.S., and Ben-Porat, T. (1960). The incorporation of C¹⁴-labeled nucleosides into rabbit kidney cells infected with pseudorabies virus. Virology, **11**, 12-27. 12) Saltzman, N. P. (1959). Systematic fluctuations in the cellular protein, RNA, and DNA during growth of mammalian cells. Bact. Revs., **23**, 224-231. 13) Green, M., and Daesch, G. E. (1961). Biochemical studies on adenovirus multiplication. II Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. Virology, **13**, 169-176. 14) Girardi, A. J., McMichael, H., and Henle, W. (1956). The use of HeLa cells in suspension for the quantitative study of virus propagation. Virology, **2**, 532-544. 15) Kabat, E.A., and Mayer, M.M. (1957). Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas Publishes. 16) Lowry, C. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-296. 17) Mejbaum, W., (1939). Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z. Physiol. Chem., **258**, 117. 18) Burton, K. (1956). A study of the condition and mechanism of the diphenyl amine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J., **62**, 315-323. 19) Officer, J.E., and Brown, A. (1960). Growth of psittacosis virus in tissue culture. J. Inf. Dis. **107**, 283-299. 20) Ackermann, W. W., Loh, P.C., and Payne, F.E. (1959). Studies of the biosynthesis of protein and ribonucleic acid in HeLa cells infected with polio virus. Virology, **7**, 170-183. 21) Newton, A., and Stoker, M.G.P. (1958). Changes in nucleic acid content of HeLa cells infected with herpes virus. Virology, **5**, 549-560. 22) Ginsberg, H.S., and Dixon, M.K. (1959). Deoxyribonucleic acid and protein alterations in HeLa cells infected with type 4 adenovirus. J. Exp. Med. **109**, 407-422.