綜 説

ウイルス抑制因子の化学的および血清学的性状

長 野 泰 一*

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET SÉROLOGIQUES DU FACTEUR INHIBITEUR DU VIRUS

Y. NAGANO

(Institut des Maladies Infectieuses, Université de Tokyo)

ウイルス抑制因子 (inhibitory factor, 略して IF) (長野, 小島, 1954) またはインターフェロン (Isaacs and Lindenmann, 1957) と呼ばれているものの化学的本性については数年来いくつかの報告があるが, どの報告も IF は蛋白質である, あるいはウイルス抑制活性は蛋白質と不可分の関係にあるといっている (Burke, 1961; Žemla and Vilček, 1961; Lampson et al., 1963; 1965; Rotem and Charlwood, 1963; Davies, 1964; Merigan, 1964; Jungwirth und Bodo, 1964; Phillips and Wood, 1964; Kreuz and Levy, 1965).

しかし, その蛋白質の性状に関する記載はまちまちである. 酸性蛋白質であるともいい, 塩基性蛋白質であるともいう. また分子量については, 大は 114,000 から小は 13,000 まで, さまざまな数値があげられており, 同じ著者の実験でも IF の由来が異なるにしたがつて分子量も異っている. われわれは IF 活性を担うものは非蛋白性のものであつて, それが何らかの蛋白質と複合しているのではないかと考えた (羽石等, 1964).

その後われわれは精製法を少しく改良し, 得られた活性分画の化学的性状を検討した (長野等, 1965). ここにその成績と解釈を述べようと思う.

一方, IF の血清学的性状に関する殆どすべての論文は IF はその抗血清によつては不活化されないと報じているが, われわれは IF の粗試料または硫酸アンモニウム塩析試料が抗血清によつて不活化されることを報告した (長野, 小島, 1960, 1961). しかし, その後このような陽性成績はほかからは報告されず, 僅かに Paucker and Cantell (1962) が Newcastle 病ウイルスで L 細胞を処理するこ

とによつて得た IF が抗血清によつて不完全ながら中和されると報じただけである. またわれわれの陽性成績といえども決して著明なものではない. われわれはこの問題はもつと立ち入つて検討する余地があると考え, 既報の陽性成績を追試するとともに, 種々の程度に精製された IF について抗血清による不活化を試みた. そのさい, 抗血清を作用させた IF の活性は, それを測る方法の異なるにしたがつて異なるかどうかということも検討した (長野等, 1964). それらの成績をここに述べることにする.

このようにして一方では化学的性状, 他方では血清学的性状について若干の知見が得られたのでそれにもとづいて IF がどのような構成のものであるかを考えてみたい.

実験の材料と手技

1) IF 粗試料の調製 (長野, 小島, 1954, 1958)

ウサギの背部を脱毛剤で脱毛し, ワクシニアウイルス材料を塗布する. ウイルス株は伝研 1 号株をウサギ皮膚に継代保存しているもので, ID_{50} は 10^{-8} である. それの 10 倍希釈を塗布する. 第 5 日に瀉血致死, 皮膚のウイルス塗布部を取り, 0.004 M クエン酸緩衝液 (pH 7.2) を注ぎながら, メスで皮膚表層を掻き取る. ウサギ 1 頭につき 緩衝液 50 ml で皮膚組織乳剤を作る. 10,000 回転 30 分間の遠心沈澱を 5~10 回くり返し, その上清を採る.

2) IF 力価の測定

a) ウサギでの測定. —IF の 5 倍階段希釈, 各 0.5 ml を背部皮内に注射, その部位を色素液でマークする. 24 時間後, $10 \times ID_{50}$ に当る量のウイルス (0.1 ml) を, マークの部位に皮内注射する. 第 7 日に発症を判定す

* 東京大学伝染病研究所

る。直径5 mm以上の発赤または硬結を発痘とみなす。発痘阻止の成否が接種頭数において相半ばするIF量を1単位とする(羽石等, 1964)。

b) 培養細胞での測定(長野等, 1964)。——例えば直径45 mmのシャーレでのウサギ腎初代培養の単層培養の上に、IFの3倍階段希釈、各2 mlを注ぎ、37°に1夜置く。翌日、上液を捨て、ウイルス100 PFU/0.25 mlを注いで37°に1時間置いてから寒天重層、第3日に染色してブラックを算える。ブラックを半減、またはそれ以下に減らした場合を有効とする。

3) 抗血清によるIFの不活化(長野, 小島, 1960, 1961; 長野, 1961)

a) 抗血清およびIFの比較的濃いもの、例えば5倍希釈を等量混合し、37°に2時間、次いで氷室に1夜置く、ただし氷室1夜は略してもよい。混合液を5倍階段希釈し、それについて上述の方法でIF力価を測定する。

b) 抗血清の一定希釈、例えば10倍希釈と、IFの5倍階段希釈とを等量混合し、37°に2時間、氷室に1夜置いてから力価を測定する。

成 績

I. IFの化学的性状

1) IF活性を有する糖質分画

さきにわれわれはIFの精製について報告したが(羽石等, 1964)、その後、方法を少しく変更して、次のような過程で精製した(長野等, 1965)。

すなわち、まず粗試料に酢酸を加えて pH 4.6 とし、氷水中に15分間置いてから3,000回転15分間遠心して、随伴蛋白質の一部を除いた。硫酸アンモニウム飽和溶液を低温において60%飽和になるように加える。pHを修正しない。遠心して沈澱を除き、硫安を追加して80%飽和とする。遠心して沈澱を0.005 M, pH 7.0の磷酸緩衝液に取り、同じ緩衝液に向って透析する。内液の遠心上清をトリエチル・アミノエチル(TEAE)セルローズのカラム・クロマトグラフィーによって分画した。すなわち0.01 M, pH 5.8の磷酸緩衝液で緩衝したTEAEセルローズで高さ25 cm, 直径2.5 cmのカラムを作り、試料30 mlを注加した。溶出は0.01 Mから0.1 Mまでの、順次に濃度の高いpH 5.8の磷酸緩衝液を用いて行つた。

0.08 M および0.1 Mでの溶出液がIF活性を示し、蛋白質を含んでいた(Lowry等, 1951の法による)。第1図はそのクロマトグラムである。

0.1 M 溶出液が15 ml 得られた。これを以てセファデックスG 50ゲル濾過によるクロマトグラフィーを行つた。すなわち0.1 M, pH 7.0の磷酸緩衝液で緩衝したセファデックスで高さ25 cm, 直径1.5 cmのカラムを作り、試料5 ml ずつを濾過し、1管5 ml ずつ捕集した。第2図はその展開図である。

第2~9管は蛋白質を含み、特に第3管は2.0 mg/ml以上を含んでいたが、IF活性を示さなかつた。第11~19管の蛋白質は0.00 mg/ml(Lowry法)であり、アンスロン法(Morris, 1948)による糖の含有量は第13管で0.04 mg/mlであつた。IF活性は第13~15管において625単位/mlであつた。それで第12~16管を合併した分画は著明なIF活性を有し、糖は検出されるが、蛋白質は検出されなかつた。活性分画がセファデックスG 50に捕捉されることから、IF粒子またはその活性成分の分子量は10,000以下であると推定された。

含まれている糖の種類を検討した。すなわちオルシノールを用いるFernel and King (1953)の法で、アルドヘキソースが検出され、アルファナフトール硫酸法(Koch and Hanke, 1948)およびシステイン・硫酸法(Dische, 1949)によってアルドヘキソースと6-デソキシヘキソースの存在が認められた。ジフェニールアミン法(Thies und Kallinich, 1952)、カルバゾール・システイン・硫酸法(Dische and Borenfreund, 1951)およびBelcher等(1954)の法によるElson-Morgan反応がいずれも陰性であることから、ペントース、デソキシペントース、ケトース、ヘキソザミンは存在しないことが知られた。次に、どのような単糖類から構成されているかを検した。すなわち凍結乾燥試料を0.5 N 塩酸に、グル

Fig. 1. Chromatographie du FI sur colonne de TEAE-cellulose.
Elution discontinue.

Fig. 2. Chromatographie sur Sephadex G 50 du FI partiellement purifié.
Obtention du FI glucidique.

コースとして計算して1mg/ml になるように溶かして、100°で8時間加水分解した。塩酸を取り除いてから“Kieselguhr-G, Merck”を用いる Stahl(1961)の法にしたがつてクロマトグラフィーを行った。その結果、ガラクトース、グルコースおよびフコースが検出された。なお加水分解前の試料からは単糖類は検出されなかった。これらの成績から、活性分画に含まれる糖はアルドヘキソースおよびアルドメチルペントースがオリゴサッカリドまたはポリサッカリドを形成しているものと考えられる。

以上の成績に加えて、IF が0.02 M 過沃素酸によって失活する事実(長野, 小島, 鈴木, 1960)もあるので、IF 活性を担っているものは主として糖質であろうと推定される。ただし、上述の糖質分画が IF 活性基として完璧なものであるかどうか、少し疑わしい点がある。このことについてはすぐ次の項で述べる。

2) IF 活性を有する糖蛋白質分画

前節で IF 活性が糖質と関係が深いことを述べたが、精製された糖質分画の IF 活性が不安定であること、また同じ試料の IF 活性を同じ日に検定しても、検定に用

Fig. 3. Chromatographie du FI sur colonne de TEAE-cellulose.
Elution par tampon 0,035 M.

いるウサギの個体による力価の動揺が甚だしいこと；また粗試料は抗血清によって不活化されるのに反して，精製試料は失活しないこと（後述），あるいはまた糖質分画はウサギでは活性を示すのに反して，培養細胞では活性を示さないこと（長野等，1964）などを考えると，天然の状態では糖質分画は独立して存するのではなくて，何ものかと複合しているのではあるまいか，そして複合したままで作用を発揮するのではあるまいかという疑問が湧く．それで，精製の方式を変えたら，糖質分画とは違った形の活性分画が取れるかも知れないと考え，試みに次のような精製を行った．

0.01 M, pH 5.8 磷酸緩衝液で緩衝した TEAE セルローズをグラスフィルターに盛り，これに IF の硫酸塩析試料を注ぎ，0.035 M, pH 5.8 磷酸緩衝液で溶出する．溶出液を 0.01 M, pH 5.8 緩衝液に向かって透析する．以上の操作を 3 回くり返す．最後の溶出液を以て TEAE セルローズのカラム・クロマトグラフィーを行う（0.01 M, pH 5.8 緩衝液）．不連続溶出は行わず，0.035 M, pH 5.8 磷酸緩衝液で溶出する．第 3 図はその展開図である．

得られた活性分画を再度または三度，カラム・クロマトグラフィーにかけて，IF 活性を有する単一の蛋白質ピークを得た．

この分画を Tiselius 電気泳動および超遠心にかけて．電気泳動にかける試料は pH 7.7，イオン強度 0.1 の緩衝液に 10 mg/ml の濃度に溶かしたものを用いた．その泳動図は第 4 図のとおりで，この分画に含まれる主要粒子はほぼ均一な泳動速度を有することを示している．

超遠心に用いた試料は同じく 10 mg/ml 溶液である．

Fig. 4. Diagrammes d'électrophorèse libre.
(Frontières ascendantes)

分析用 Spinco 超遠心機で $22.8^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$ において 毎分 59,800 回転させた．第 5 図に示すように，単一の対称的なピークが得られた．S は 4.7（無補正）と計算された．

Fig. 5. Diagrammes d'ultra-centrifugation.

このようにして、この分画中の主要粒子の電気泳動速度および沈降速度は均一であることを知ったが、この蛋白質粒子と IF 活性とは関連があるかどうかをみるために、セファデックス G 50 ゲルで濾過した。濾過の条件

はさきに糖質分画を取ったときと同じ条件にした。その結果、IF 活性を有する蛋白質分画だけが濾出された。すなわち非蛋白性の活性分画がゲル内に留保されることはなかった（第 6 図参照）。

Fig. 6. Chromatographie sur Sephadex G 50 du FI partiellement purifié. Obtention du FI glucido-protéique.

さきに糖質分画について行つたのと同様な糖の検索をこの分画について行つたところ、糖質分画での成績と類同な成績が得られた。

かくて、この分画では糖蛋白は物理的に均一な粒子から成っており、その粒子は IF 活性を備えていると考えられる。天然の状態では、IF はこれに似た形で存在しているのかも知れない。IF 活性基が結合する相手の蛋白質は必ずしも特定の蛋白質とは限らないかも知れない。またその結合は強固なものではないようである。IF がトリプシンの作用を受けて失活することは広く認められていることであるが、トリプシンは IF 活性基そのものに直接働きかけるのではなく、複合している蛋白質を破壊するだけではあるまいか。IF 活性基は孤立すると、不安定になるか、あるいは細胞への接着が困難になるのではあるまいか。さきに述べたように、糖質分画はウサギで著明な IF 活性を示すにもかかわらず、培養細胞上では全く活性を示さないが、これはことによると随伴蛋白を奪われた IF が脆弱になったせいではなくて、細胞への接着力が何らかの制約を受けるようになったせいかも知れない。これは実験に訴えてみるべき問題であろう。

この分画の蛋白質のアミノ酸組成をみるために、6 N 塩酸で 120°, 24 時間加水分解を行い、残存塩酸を除いた後、Fahmy 等(1961)の法で含有アミノ酸を同定した。次の 15 のアミノ酸が検出された。

アラニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グリココル、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニールアラニン、プロリン、チロジン、バリン。

因みにセリンおよびスレオニンが検出されなかつたことは 0.02 M 過沃素酸による IF の失活が糖の分解によるという想定を支持する。

II. 抗血清による IF の不活化と助長

われわれはさきに IF の粗試料または硫酸塩析試料が抗血清によつて不活化されることをみたが(長野、小

島, 1961), これは抗原抗体反応の直接の結果であるのか、それとも他の何らかの要因が介入することによつて間接にひき起こされることであるのかを究明したいと思つて幾つかの実験を行つた。すなわち IF の粗試料および種々なる程度に精製された試料を用い、また IF と抗血清との混合液の IF 活性を測定する条件を種々に変えてみた(長野等, 1964)。

1) IF・抗血清混合液の IF 活性をウサギで測定する場合

a) IF の硫酸塩析試料に対する抗血清の作用。

既報の実験(長野、小島, 1961)と同様、今回も硫酸塩析 IF はその抗血清によつて不活化された。

b) IF 活性を有する糖蛋白質分画に対する抗血清の作用。

IF 活性基と蛋白質と結合しているものと推定される分画(I-(2)に記述)と、それに対応する抗血清または硫酸塩析 IF に対する抗血清との混合液の IF 活性をウサギで測定したところ、時には IF 活性が抑制され、時には全く抑制されなかつた。すなわち硫酸塩析試料のように毎常不活化される結果とはならなかつた(第1表参照)。

c) IF 活性を有する糖質分画に対する抗血清の作用。
• Lowry 等の法で蛋白質が検出されない糖質分画(I-(1)に記述)の IF 活性は不安定であるので、この IF 試料の場合は抗血清との混合液を 37° に置く時間を 2 時間とした。硫酸塩析 IF を抗血清で不活化するにもこの時間で十分であることを確かめた。結果は甚だ不定で、時には IF 活性が多少ともに低下していたが、逆に IF 活性が助長される場合の方が多かつた(第2表参照)。とにかく、確実な不活化ということは認められなかつた。

2) IF・抗血清混合液の IF 活性を培養細胞で測定する場合

a) 漿尿膜由来の IF に対する抗血清の作用。

発育鶏卵漿尿膜に由来する IF の粗試料を 10 倍に希釈し、対応血清またはウサギ IF に対する抗血清の 5 倍

Tableau 1. Essai d'inactivation du FI glucido-protéique par l'anti-sérum contre le FI relargué.

		Numéro d'expérience							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
FI relargué +	sérum normal	34,5	453						
	anti-sérum	<11,2	56						
FI glucido-protéique +	sérum normal	172,5	279,5	90,5	172,5	90,5	453	860	625
	anti-sérum	58	279,5	90,5	90,5	34,5	279,5	172,5	625

Les chiffres désignent le pouvoir inhibiteur en unités par ml.

Tableau 2. Essai d'inactivation du FI glucidique par l'anti-sérum contre le FI relargué.

		Numéro d'expérience		
		I	II	III
FI glucidique +	sérum normal	34,5	279,5	90,5
	anti-sérum	56	860	279,5

Les chiffres désignent le pouvoir inhibiteur en unités par ml.

希釈液と等量混合、インキュベーション後、階段希釈して、各希釈液の IF 活性を鶏胎の初代培養の上で検した。この場合には不活化も助長もみられなかった。(第3表参照)。

Tableau 3. Essai d'inactivation du FI d'origine de l'oeuf de poule par l'anti-sérum correspondant.

		Dilué à			
		1:8	1:16	1:32	1:64
Solution Hanks +	sérum normal	48,5 (-)			
	anti-sérum	22 (+)	33 (-)	41,5 (-)	
FI +	solution Hanks	0 (+)	1 (+)	0,5 (+)	28,5 (-)
	sérum normal	0 (+)	1,5 (+)	0 (+)	28,5 (-)
	anti-sérum	1,5 (+)	0 (+)	7,5 (+)	27,5 (-)

Les chiffres indiquent les nombres des plages produites. Une diminution de plages en 50 pour cent est désignée par (+).

b) ウサギ由来の IF に対する抗血清の作用。

ウサギ由来の IF の硫酸塩析試料とその抗血清とを混合し、その IF 活性をウサギ腎の初代培養の上で測定した。この場合には IF 活性が3ないし9倍に増強された(第7図参照)。塩析 IF の代りに精製された糖蛋白質分画を用いても同様の結果となった。

c) IF・抗体複合体の IF 活性。

抗血清が IF の作用を助長する場合、それは抗血清中の非特異的な何ものかの働きによるのであろうか。それとも、IF に特異抗体が結合したものの自体が単独の IF よりも強い IF 活性を持っているのであろうか。試みにウサギ由来の硫酸 IF にその対応血清を作用させたものを 10^5 g, 3 時間遠心し、上層と下層とを別々に取り、また管底部は原全量の緩衝液で洗い出した。この3つの部分の IF 活性をウサギ腎初代培養で測定した。

Fig. 7. Renforcement du FI par l'anti-sérum sur la culture primaire du rein du lapin.

第4表にみられるとおり、下層液は上層液の5ないし10倍の IF 活性を示し、また管底にも相当な IF 活性がみられた。そして、この下層液をウサギ皮膚で検すると、不活性であつた。

これらの成績から考えると、IF と抗体との複合体そのものが、ある条件の下では活性を示さず、他のある条件の下では普通以上の活性を示すものであるらしい。

ものの生物学的活性が抗血清によつて抑制されずに、かえつて助長されるという事例はこれまでにないことはない。例えば T_2 フェージの菌体への接着率が抗血清によつて高められ(長野, 務台, 1954)、また菌体への接着のためにトリプトファンが存在を必要とする T_4 フェージを特定の抗血清で処理すると、トリプトファンなしで接着して、溶菌にまで進む (Jerne, 1956)。またリボソームに吸着している β -ガラクトシダーゼ (Cowie 等, 1961) あるいは遊離のペニシリナーゼ (Richmond, 1963; Pollock, 1964) の活性がそれぞれの抗血清によつて増強される場合がある。また HVJ による細胞融合 (岡田等, 1964)、あるいは節足動物媒介ウイルスの感染力 (Hawkes, 1964) も抗血清によつて助長されるという。

抗体のこの作用はどのようにして営まれるかというこ

Tableau 4. Pouvoir inhibiteur du complexe du FI et d'anticorps évalué sur la culture du tissu et chez l'animal.

			Evaluation sur la culture primaire du rein du lapin		Evaluation chez le lapin	
			Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
FI + anti-sérum	{	avant centrifugation	500*			
		après				
	{	centrifugation				
		{couche supérieure	100	550	25 u/ml	25 u/ml
		{couche inférieure	1.000	2.800	<11,2 u/ml	<11,2 u/ml
		{résidu		>270		
FI + sérum normal	{	avant centrifugation	100		279,5 u/ml	279,5 u/ml
		après				
	{	centrifugation				
		{couche supérieure	100			
		{couche inférieure	100			
		{résidu	<10			

* Dilution la plus élevée capable de diminuer des plages en 50 %.

とは、ファージのように数種類の抗原が集合して大きな構造を成しているものではかえって調べ易くて、次のようなことが半ば実証されている。すなわち、トリプトファン要求 T_4 ファージの尾部末端の線維はメジウム中にトリプトファンがないと、菌体に接着することができないが、それは線維が尾鞘に鉤着しているからである。トリプトファンを与えると、線維は尾鞘から離れるので、菌体に接着できるようになる。希釈によつてトリプトファンの濃度を一定の限界以下とすると、線維はまた尾鞘に吸い寄せられる。トリプトファンを与えて、線維が尾鞘から離れているときに、尾鞘に対する特異抗体を与えると、それが尾鞘の表面に結合して尾鞘に何らかの変化を起こす。尾鞘全体が頭部の方に向つて収縮するのであろうと想像されている。そのためにトリプトファンを取り除いても、ファージ線維はやはり尾鞘に吸着されることなく、したがつて菌体に接着し得る状態のままである (Brenner 等, 1962)。因みにファージ中和抗体はファージ線維に対する抗体である (Brenner 等, 1959)。

ところで、酵素のような、より単純な分子では説明が困難であつて、いわゆる effet allostérique の一種ではあるまいかと考えられているだけである (Pollock, 1964)。

要 約

1) ワクシニアウイルスに感染させたウサギ皮膚組織を材料として、ウイルス抑制因子 (IF) を精製した。まず材料を酢酸酸性にして随伴蛋白質の大部分を除き、硫酸アンモニウムの 60 パーセント飽和で沈澱するものを除き、次いで 80 パーセント飽和で活性成分を沈澱させた。それを溶かしてトリエチルアミノエチル (TEAE) セルローズでのカラム・クロマトグラフィーを行い、得

られた活性分画についてセファデックス G 50 ゲル濾過によるクロマトグラフィーを行つた。

このようにして IF 活性を有する糖質分画が得られた。その糖はガラクトース、グルコース、フコースから成るオリゴサッカリドまたはポリサッカリドであつた。この分画はセファデックス G 50 ゲルによつて捕捉されたことから、この分画中の IF 活性成分の分子量は 10,000 以下であらうと推定される。

精製法を少しく変更することによつて、IF 活性を有する糖蛋白質分画が得られた。この分画に含まれる主要粒子の電気泳動速度および沈降速度は均一であつた。この分画をセファデックス G 50 ゲルで濾過すると、IF 活性を備えた糖蛋白質分画だけが得られ、IF 活性を有する糖質分画は得られなかつた。つまり、この分画では IF 活性は蛋白質を含む粒子と不可分であつた。

2) IF の粗試料または硫酸アンモニウム塩析試料は抗血清によつて不活化されたが、精製試料は不活化されなかつた。

IF の硫酸試料を抗血清で処理したものの IF 活性を動物個体で検すると活性を示さなかつたが、培養組織で検査すると、抗血清で処理しない IF よりも、かえつて高い活性を示した。この現象の詳細は今のところ不明である。

いずれにしても、抗血清が IF を不活化するのは抗体が IF 活性基そのものを直接に破壊または封鎖することによるのではないと解される。

3) われわれは IF の分子は IF 活性を有し、抗原性を有しない糖質と、抗原性を有し、IF 活性を有しない蛋白質とから成ると想定している。

文 献

- 1) Belcher, R., Nutter, A. J. and Sambrook, C. M. (1954), *Analyst*, **79**, 201.
- 2) Brenner, S., Champe, S. P., Streisinger, G. and Barnett, L. (1962), *Virology*, **17**, 30.
- 3) Brenner, S., Streisinger, G., Horne, R. W., Champe, S. P., Barnett, L., Benzer, S. and Ress, M. W. (1959), *J. mol. Biol.*, **1**, 281.
- 4) Burke, D. C. *Biochem. J.*, **78**, 566.
- 5) Cowie, D. B., Spiegelman, S., Roberts, R. B. and Duerksen, J. D. (1961), *Proc. nat. Acad. Sci.*, **47**, 114.
- 6) Davies, A. (1964), *Biochem. J.*, **90**, 29 P.
- 7) Dische, Z. (1949), *J. biol. Chem.*, **181**, 379.
- 8) Dische, Z. and Borenfreund, E. (1951), *J. biol. Chem.*, **192**, 583.
- 9) Fahmy, A. R., Niederwiesser, A., Pataki, G. and Brenner, M. (1961), *Helv. chim. Acta*, **44**, 2022.
- 10) Fernell, W. R. and King, H. K. (1953), *Analyst*, **78**, 80.
- 11) Haneishi, T., Shirasaka, M., Okazaki, H., Nagano, Y. et Kojima, Y. (1964), *C. R. Soc. Biol.*, **158**, 1433.
- 12) Hawkes, R. A. (1964), *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **42**, 465.
- 13) Jerne, N. K. (1956), *J. Immunol.*, **76**, 209.
- 14) Jungwirth, C. und Bodo, G. (1964), *Biochem. Z.*, **339**, 382.
- 15) Koch, F. C. and Hanke, M. E. (1948), *Practical Methods in Biochemistry*, 5th ed., Baltimore, p. 368.
- 16) Kreuz, L. E. and Levy, A. H. (1965), *J. Bact.*, **89**, 462.
- 17) Lampson, G. P., Tytell, A. A., Nemes, M. M. and Hilleman, M. R. (1963), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **112**, 468; (1965), **118**, 441.
- 18) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951), *J. biol. Chem.*, **193**, 265.
- 19) Merigan, T. C. (1964), *Science*, **145**, 811.
- 20) Morris, D. L. (1948), *Science*, **107**, 254.
- 21) Nagano, Y. (1961), *Ile Symp. int. Chimiothérapie, Naples, II*, p. 19.
- 22) Nagano, Y. et Kojima, Y. (1954), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **148**, 1700.
- 23) Nagano, Y. et Kojima, Y. (1958), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **152**, 372 et 1627.
- 24) Nagano, Y. et Kojima, Y. (1960), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **154**, 2172.
- 25) Nagano, Y. et Kojima, Y. (1961), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **155**, 1183.
- 26) Nagano, Y., Kojima, Y., Oda, M., Kim, T., Shirasaka, M. et Haneishi, T. (1965), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **159**, 280.
- 27) Nagano, Y., Kojima, Y., Shirasaka, M. et Haneishi, T. (1965), *Japan. J. exp. Med.*, **35**, 133.
- 28) Nagano, Y., Kojima, Y. et Suzuki, T. (1960), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **154**, 2166.
- 29) Nagano, Y. et Mutai, M. (1954), *Compt. rend. Soc. Biol.*, **148**, 766.
- 30) Okada, Y., Yamada, K. and Tadokoro, J. (1964), *Virology*, **22**, 397.
- 31) Paucker, K. and Cantell, K. (1962), *Virology*, **18**, 145.
- 32) Phillips, A. W. and Wood, R. D. (1964), *Nature*, **201**, 819.
- 33) Pollock, M. R. (1964), *Immunology*, **7**, 707.
- 34) Richmond, M. H. (1963), *Biochem. J.*, **88**, 452.
- 35) Rotem, Z. and Charlwood, P. A. (1963), *Nature*, **198**, 1066.
- 36) Stahl, E. and Kaltenbach, U. (1961), *J. Chromatography*, **5**, 351.
- 37) Thies, H. und Kallinich, G. (1952), *Berichte*, **85**, 438.
- 38) Žemla, J. and Vilček, J. (1961), *Acta virol.*, **5**, 367.