L 細胞シートへのオウム病 agent

吸着現象の動力学*

田 波 洋 山 田 喜 紹 田 崎 忠 勝

KINETICS OF ADSORPTION OF PSITTACOSIS AGENT BY L CELL MONOLAYERS

Yoh TANAMI, Yoshitsugu YAMADA, and Tadakatu TAZAKI
Department of Bacteriology, Faculty of Medicine
Shinshu University (Matsumoto City)

〔受付：3月10日，1969年〕

総 括

L細胞シートに対するオウム病 agent, (Goat Pneumonitis agent, 長野株) の基本小体の吸着条件について次の結論がえられた。

(1) 吸着に関する培地の至適 pH は 5.5～6.5 の範囲で，その両側の pH では吸着率は激減する。基本小体粒子の感染力価も同じく培地の pH 5.5～6.5 の範囲で最も安定であった。

(2) L細胞への GP 粒子の吸着成立には medium 中に無機塩類の存在が必要で，とくに Ca^{2+} が強い吸着促進効果を示した。一般に2価陽イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) の方が1価陽イオン (Na^+ , K^+ , NH_4^+) に比べて強い吸着促進効果を示した。例えば， Na^+ は， Ca^{2+} と同程度の吸着効果をあげるためには Ca^{2+} に比べ約20倍以上の高濃度を必要とした。

(3) L細胞シートへの GP 粒子の吸着は，コロイド拡散理論に基づく Allison & Valentine (1960) の式に従っておくことが認められた。オウム病 agent の基本小体を半径 0.175μ の球状体に換算してあてはめると，t 秒間内の吸着率(Y)は下のように t のみの函数として与えられる。

$$\text{Adsorption rate: } Y = 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t} \quad (7)$$

従つて，t 秒間内の吸着粒子数(IFU)が実測されればそれをYで割ることによつて，inoculum 中の，吸着可能な粒子総数が求められることになる。

序 文

ウイルス粒子 (virion) は運動装置をもっていない。だから，液層中に浮んでいるウイルス粒子と宿主細胞との最初の“出会い”，つまり衝突は，すべてブラウン運動による他動的な“偶然性”に基づいていることになる。

このような発想にもとづいて，単層細胞シートに対する動物ウイルス粒子の吸着現象をコロイド拡散理論を用いて解明したのは Allison & Valentine (1960 a, 1960 b), Valentine & Allison (1959) が最初だと思われる。

彼らの研究は，ウイルス粒子と細胞表面との間の“はじめの交渉”である衝突と吸着を数量的にあつかう途を開くとともに，実際にえられた plaque count 値から，inoculum 中の総粒子数 (総 PFU 数) を求めることを可能にした。

私たちは，(Tanami, 1962) 前に浮游動物細胞に対するオウム病 agent の吸着速度を求める実験を行い，コロイド拡散理論に基づいて吸着効率を求めたが，本論文では，単層細胞シートに対するオウム病 agent 基本小体 (以下粒子とよぶ) の吸着現象を Allison & Valentine (1960a, 1960b) の考え方に従つて分析し，理論と実験値の適合性を論じたい。

このほか，オウム病 agent 粒子の感染力価の安定性と培地 pH との関係や，maximum な吸着速度をうるための培地条件 (pH や各種塩類の濃度) について行つた予備実験成績ものべたい。

理 論

Allison & Valentine (1960a, 1960b) は，液層中にうかぶウイルス粒子と，液層に密着する monolayer と

* 本研究の要旨は昭和43年10月，第16回日本ウイルス学会総会(九州大)で報告した。
信州大学医学部細菌学教室

の間で、 t 秒間に、単位面積 (1 cm^2) あたりおこる衝突回数 N_t は近似的に次式であらわされることを導いた。

The number, N_t , of particles suspended in fluid reaching a unit area of flat surface in contact with the fluid is given, for less than 40% of the particles adsorbed, by

$$N_t = 11.3 C_0 \sqrt{D \cdot t} \quad (1)$$

where C_0 is the initial concentration of particles in the fluid (number/unit volume),

D is the diffusion coefficient of the virus particles, and

t is the adsorption time in seconds.

The diffusion coefficient of the virus, D , can be calculated from the Stokes-Einstein equation:

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta a} \quad (2)$$

where k is Boltzmann's constant (1.38×10^{-16}),

T is the absolute temperature,

η the viscosity of the suspending fluid, and

a the radius of the particles.

Since the radius of the elementary bodies of the psittacosis agent is equivalent to 0.175μ , $a = 1.75 \times 10^{-5} \text{ cm}$.

The viscosity (η) of the Eagle's medium at 37°C is 0.0072 Poise. Accordingly, the diffusion coefficient of the psittacosis particles (elementary bodies) is given as follows:

$$D = 1.80 \times 10^{-8} \text{ ml. sec}^{-1} \quad (3)$$

From formulas (1) and (3), theoretical collision number between suspending psittacosis particles and monolayer cells at 37°C will be given as follows:

$$N_t = 1.51. C_0. 10^{-3} \sqrt{t} \quad (4)$$

しかし、monolayer に対する粒子の衝突が、100% の効率で不可逆的吸着につながるわけではなく、何回かの無駄なバウンドをしたのち、一定の確率で粒子は不可逆的吸着をするものと考えられる。

ちなみに、Allison & Valentine (1960b) の報告では陽性にチャージしているアルミニウム板の表面に対しては、Vaccinia virus (表面荷電は全体としては負にチャージしている) は理論的予測値に等しい 100% の効率で吸着したが、ニワトリ胎児細胞 monolayer に対しては約 50% の効率でしか吸着しなかったという。

従つて、1 回の collision あたり不可逆的吸着の成立

する確率 (Adsorption efficiency, E) を考え次のように定義しよう。

$$E = \frac{\text{No. adsorbed particles in } t \text{ seconds}}{\text{No. collisions in } t \text{ seconds}} \quad (5)$$

From the formulas (4) and (5), the number of actually adsorbed particles in t seconds will be given as

$$N_t = 1.51. C_0. E \sqrt{D \cdot t} \quad (6)$$

$$\text{or } N_t = 1.51. C'_0. \sqrt{D \cdot t}, C_0. E = C'_0 \quad (6)'$$

吸着実験のさい、1 個の粒子が平均 2 回衝突するような条件下 (実際にはありえない程長い吸着時間が許された場合) では、吸着確率は衝突数 $\times 2 E$ になるが、本論文では吸着率が高々 20% の場合を扱うので、ある粒子が 2 回以上衝突するチャンスは無視しうる程小さいと考えてよい。

そこで (6)' 式の C'_0 は、(粒子あたり 1 回しか衝突がおこらないような実験条件下での) 吸着可能な総粒子数、 $N_{\text{max. spin}}$ に相当する (後出)。

従つて、 t 秒間に monolayer に吸着する粒子の比率は理論的には次の (7) 式で、実験的には (8) 式で、夫々与えられることになる。

Theoretical adsorption rate:

$$\frac{N_t}{C'_0} = 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t} \quad (7)$$

Obtained adsorption rate:

$$\frac{N_t}{N_{\text{max. spin}}} \quad (8)$$

理論値と実験値の間の適合性は、これらの (7), (8) 式によつてえられた値を比較することによつて検討することができる。

材料と方法

(1) オウム病 agent: L細胞で継代 (40代) した山羊肺炎 agent, 長野株 (大森他, 1953) を用いた。Inoculum としては、新鮮材料を次の手順で部分精製した基本小体粒子を用いた。

(i) 比較的大量 (m.o.i. = 3 位) のオウム病 agent を接種した L細胞を 48~72 時間後 (すでに完全な CPE がおこっている) 2 回凍結融解する。

(iii) 3,000rpm, 15分遠心した上清を、9,000rpm で 30分間遠心し、沈渣を $1/5$ 量の PBS にかべる。

(iv) これを 30% (w/v) ショ糖液にのせ、9,000rpm で 30分遠心すると、細胞小破片が除かれ、比較的サラリとした粒子標本が沈渣としてえられる。

これを原量の PBS にかべ、更に、3,000rpm 15分間

遠心した上清を inoculum とした。粒子の不活化をできる丈さけるため、粒子のトリプシン消化は省いた。

(2) 細胞培養: L細胞をタンザク瓶内の cover-slip 上にうえ, monolayer を形成させて用いた。培養液は Eagle medium に calf-serum (5%), Dihydrostreptomycin 100 μ g/ml を加えて用いた。pH7.0。

(3) 吸着実験のすすめ方:

(i) 完成した monolayer を PBS で2回洗ったのち, 約 10^6 IFU/ml に希釈した部分精製材料 (inoculum とよぶ) を加え, 37°C で水平に静置して吸着をおこさせる。

希釈液の組成, pHは実験の種類によつてちがう(後出)。Inoculum size はタンザク瓶あたり 0.6ml で, 瓶の平坦部の面積が6 cm² だから, 液層の深さは1 mm になる。

吸着は原則として37°C のゆぶね中で行うが, 30分以上の長時間に亘るときはフラン器内で行う。

(ii) Inclusion Forming Units (IFU) の計算: 種々の吸着時間 t (時間の単位は秒とする。時間の範囲は10秒ないし10時間) の後, 感染細胞を PBS で2度洗い未吸着の粒子を除く。Eagle medium を加え, 37°C で27時間培養したのち cover-slip をとり出し, 細胞にギムザ染色を施して封入体形成細胞数 (Inclusion Forming Units, IFU) を顕微鏡下で算える (Weiss & Huang, 1954)。私たちが用いた Nikon, SUR-Ke 型での1000倍の1視野あたりの IFU を x とすると, inoculum のうち t 秒間に吸着する IFU, (N_t), は次式で与えられる。

$$N_t = \frac{6(\text{cm}^2)}{2.5 \times 10^{-4}(\text{cm}^2)} \times x = 2.4 \times 10^4 x \quad (9)$$

where, x is Inclusion Forming Units per one microscopic field. N_t indicates the apparent IFU of the inoculum when the adsorption was allowed to take place for t secnds.

(iii) 遠心法による, 感染可能な総 IFU 数, $N_{\text{max. spin}}$ の求め方: 底の平らな遠心管底に cover-slip 上に培養した細胞シートを置き, inoculum (0.5ml) をのせて水平ローターで 9,000rpm, 30分間遠心する。この条件下ではすべての GP 粒子は強制的に L 細胞シートに“衝突”する(押しつけられる)。ここですべての粒子が細胞内に penetrate できるかどうか不明だが, 少なくとも, すべての粒子が唯1回だけ衝突した場合侵入した吸着粒子数を IFU 値によつて知ることができる。(Weiss & Dressler, 1960)。

遠心後 cover-slip をとり出し, タンザク瓶に入れて27時間培養し, ギムザ染色を施して IFU を算え (9) 式と

同様の係数をかけて inoculum 中の総 IFU を計算する。この値は遠心法によつてえられた総 IFU という意味で $N_{\text{max. spin}}$ という記号であらわすことにする。そうすればすでに (8) 式で表わしてあるように, 静置吸着においてえられた N_t 値を, この $N_{\text{max. spin}}$ で割った値は, t 秒以内に, 静置吸着実験で単層細胞シートに吸着した粒子の吸着比率の実験値を示しているわけである。

実験成績

(1) GP 粒子の吸着におよぼす培地 pH の影響

吸着実験の至適条件を求めるために, 培地 pH と, 無機塩類の影響についてしらべた結果次のような成績がえられた。

(i) 各 pH における GP 粒子の感染力価の安定性

実験方法: 部分精製した GP 粒子を, pH 4.7~8.5 の範囲の PBS(M/40 PB+M/15 NaCl) で希釈し, 37°C で数時間放置後, L細胞 monolayer に接種して, survived IFU を求める。培地 pH は, いずれも37°C における値を示めす (以下同じ)。

Fig. 1 Inactivation curves of the psittacosis elementary bodies in 0.025 Mol. phosphate buffered saline at various pH ranging between 4.7 and 8.5 at 37°C. The infectivity of the elementary bodies is maintained most stably at pH 6.1. *Data indicated by the symbol + are the results of the experiment performed in the Eagle's medium supplemented with 10% calf serum. Which indicates that calf serum has no protective effect on the infectivity of the psittacosis agent.

実験成績の一部を夫々図1, 2に示めす。ここにみられるように (a) GP 粒子の不活化は原則的に first or-

Fig. 2 Effects of medium pH on stability of the psittacosis elementary bodies, at 37°C. The infectivity of the organism has been found to be most stable in the medium of pH 6.1.

Fig. 3 Effect of pH of the medium on adsorption of psittacosis elementary bodies by Earle's L cell monolayers. Relative proportions of adsorbed particles are arbitrarily expressed comparing with the maximum value. In this experiment, adsorption was allowed to take place at 37°C for 30 minutes in 0.025 Mol. phosphate buffered saline.

der kinetics に従っておくる。(b) 粒子は pH 5.5~ 6.5 で最も安定で、その両側の pH では急激に不活化される。

(ii) 吸着率におよぼす培地 pH の影響

M/40 PBS (pH 4.7~ 8.5) に、約 10^6 IFU/ml の GP

粒子をうかべ、37°CにおけるL細胞シートへの吸着率と pH との関係求めた。

成績の一部を図3に示すが、ここにみられるように、(前項でのべた不活化実験の成績と同様に) 吸着率も pH 5.5~ 6.5の範囲で最大値を示し、その両側の pH では吸着率がいちじるしく低下している。

なお、この成績では吸着時間内での GP 粒子の不活化率は補正済みである。

Allison & Valentine (1960 b)によれば、ニワトリ胎児細胞への Fowl plague virus の吸着率も pH 6.0 前後で最高値を示している。おそらく pH 6.0前後ではウイルス粒子も、細胞表面も、表面の carboxyl-group のイオン化が抑制され、両表面の負電荷総量が減少し、そのため粒子の吸着が促進されるものと考えられる。

(2) GP 粒子吸着におよぼす無機塩類の影響

一般に、細胞表面へのウイルス粒子の吸着には原則として陽イオンの存在が必要であることはひろく認められている。その理由としては、medium pH が中性附近の場合、粒子も細胞表面もともに、全体として負にチャージしているため、両表面のイオン二重層が互いに結合するためには、適当濃度の陽イオンが必要だと、考えられている。この点について、GP 粒子とL細胞の系でも、同じことが見出された。実験のすすめ方は次のとおりである。

Inoculum: 精製 GP 粒子を、塩類 free の 9% ショ糖液 (w/v) にうかべて接種材料とした。37°Cでのショ糖液の pH は 6.0 前後で、吸着条件としては至適である。

L細胞シートを9%ショ糖液で数回いいねいに洗ったのち、上にのべた手順にならって、 10^6 IFU/ml の GP 粒子を吸着させ、吸着率を測定した。このとき、medium に種々の無機塩類を種々の濃度 (10^{-4} ~ 10^{-1} M) 加え、各塩類の吸着促進効果をしらべた。実験成績を夫々図4, 5に示す。ここにみられるように Hanks 液中での吸着率が最高なので、これに対する百分比で各塩類の各濃度における吸着率をこれらの図に示してある。なお、37°Cにおける9%ショ糖液の粘度は、実測の結果、0.0089 Poise で、Hanks 液のそれは0.0072であった。従って、厳密なことをいえば、Hanks 液内での吸着率は、9%ショ糖液内での吸着率に比べ(他の条件が同一とすれば) $\sqrt{1.23} \approx 1.11$ 倍大きい筈である((1), (2)式をみよ)。

図4, 5ではこの点についての補正は施していない。

(しかし、次の結論に関しては影響はない)。

これらの成績から次の結論がえられた。

(i) L細胞への GP 粒子の吸着成立には陽イオン

Fig. 4 Effect of cations on adsorption of psittacosis particles by Earle's L cell monolayers. Adsorption rate is expressed as a percentage of the maximum value.

Fig. 5 Effect of cations on adsorption of psittacosis particles by Earle's L cell monolayers. Adsorption rate is expressed as a percentage of maximum value.

の存在が必要である。

(ii) 1価陽イオンに比べ2価陽イオンの方がはるかに強い吸着促進効果を示している。とくに Ca^{2+} が最も促進効果が強く、 10^{-2} Mふきんでは、単独で Hanks 液に匹敵する吸着率を示している (図4, 5)。

(iii) 一般の傾向として、吸着に関する optimum な

Fig. 6 Adsorption curves of the psittacosis elementary bodies by L cell monolayers. The number of adsorbed particles (as indicated by IFU per area) is plotted as a function of adsorption time. The rate of increase in number of adsorbed psittacosis particles declines gradually as the adsorption time goes by.

Fig. 7 Adsorption of the psittacosis elementary bodies by the Earle's L cell monolayers. The number of IFU per unit area increases linearly as a function of the square root of the time of adsorption. The tangent of each regression line is approximately proportional to the inoculum concentration. It is noted that the adsorption curve rises after a short lag period of time of about 10 to 20 seconds.

塩濃度は 10^{-2} M前後で、それ以上の高濃度では、吸着率が却つて低下する場合がある。

これらの事実から、L細胞表面へのオウム病 agent 粒子の吸着は (バクテリオファージ (Garen & Puck, 1951; Puck *et al.* 1951; 田波, 1953) や動物ウイルス (Alli-

son & Valentine, 1960a; 1960b) の場合と同様に) 静電氣的結合力による結合が、少くとも吸着初期のきつかけになっているように思われる。

(3) 吸着速度の Kinetics—コロイド 拡散理論の適合性について

実験方法は“材料と方法”の項でのべてあるので、ただちに成績の説明に移ろう。

図6, 7に示した実験成績は、L細胞シート群に、濃度の異なる GP 粒子標本(濃度比1:1/2:1/4)を接種した場合の吸着率の時間的経過を示したものである。

図6にみられるように、時間軸(横軸)に普通のスケールで時間を目盛つた場合は、吸着粒子数(2.5×10^{-4} cm² あたりの IFU で示してある)は、はじめは時間に比例してふえてゆくが、次第に曲線の傾きが水平に近づいてゆく傾向が認められる。

ところが、同じ成績を、図7に示したように、時間軸を $\sqrt{t}$ 秒で目盛つてみると、実験値は原点($t=0$)ちかくをとおる直線群に沿って分布し、かつ、各回帰直線の傾斜(tangent)は各 inoculum の粒子濃度に比例していることが見出される。

このことは(1)、(4)式から予想されたことで、L細胞への GP 粒子の吸着が原則的に(1)式に従って進行することを裏書きしている。

ここで図7の成績を注意深くみてみると、各回帰直線は原点($t=0$)を通らず、約10~20秒の lag のちに立上っていることがわかる。このような成績はこの場合のみでなく、他の実験例でもくりかえし得られている。

この理由については、いまのところ推量の域を出ないが、静電氣的結合力による粒子と細胞の“一時的な結合”が何かの生物学的プロセスをへて“不可逆的結合”になるために必要な反応時間を示しているのではないかと考えている。

次に Allison & Valentine の式((1)式)から予想される理論的吸着率($N_t/C_0' = 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t}$)と、実験的吸着率($N_t/N_{\max} \cdot \text{spin}$)との間の適合性について述べよう。

前後3回行つた実験成績を図8にまとめて示す。ここにみられるように各実験値(値を中央にした各棒の長さは標準偏差を示す)は実験誤差の範囲で、理論曲線とよく一致しており、Allison & Valentine の式がこの吸着系によくあてはまることを示している。

ただ、図8の成績をよく見てみると、吸着時間が60分以下のときは実験値が理論値をやや下廻り、逆に、120分以上の場合には実験値が理論値をやや上廻る傾向が認められる。このことの理由は明らかではないが、上にふ

Fig. 8 Comparison between theoretical and obtained adsorption rates. Theoretical line based on Brownian theory is expressed as Y (adsorption rate) $= 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t}$ sec. Experimental results are shown by each point with a bar which indicates the standard deviation. Different symbols indicate different experiments.

れた衝突から不可逆吸着成立までの間に10~20秒の lag period があることと、吸着時間が長くなれば(その相対量は僅かとしても)一部の粒子が2回以上細胞に衝突するチャンスがふえてくるわけで、そのため、実際の吸着効果が予想より大きくなるため、によるのではないかと考えられる。

考 察

L細胞へのオウム病 agent (GP) 粒子の至適吸着条件は、結局 Hanks 液、pH 6.0前後ということが見出された。また、粒子の吸着には無機塩類(とくに Ca^{2+} イオン)の存在が要求されることが認められたが、これらの pH や塩類要求の条件は、他の動物ウイルスやファージ系での条件とほぼ等しく、オウム病 agent がとりわけ異なっている点は見出せなかった。

L細胞シートへの GP 粒子の吸着 Kinetics は原則的にコロイド 拡散理論式に従っておくことが認められた。Allison & Valentine (1960a, 1960b) の式によれば、接種材料中の吸着可能粒子数のうち、 t 秒間に吸着できる粒子の割合(つまり吸着率)は $Y = 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t}$ で与えられ、これは吸着時間(t 秒)のみによつて

きまる函数である。この予測値が、実験値とよく一致すること(図8)はオウム病 agent 粒子の吸着現象においても、ブラウン運動に基づく粒子と細胞の衝突が、吸着・感染のきっかけとなっていることを物語っている。

このことを別の面から眺めてみると、ある与えられた吸着時間内の、細胞シートの単位面積あたりの吸着粒子数(IFU)の測定値(N_t)がわかれば、次の(9)式によつて、inoculum 中の吸着可能粒子総数 C_0' が求められることになる。

$$C_0' = \frac{N_t}{1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t}} \quad (9)$$

たとえば吸着時間を60分とすれば、理論上の吸着率は約9%だから、得られた IFU (N_t)を11.1倍すれば、その inoculum 中の吸着可能(感染可能)な粒子総数が得られることになる。

ただしここで、

$$\text{吸着効率} \left(E = \frac{\text{単位面積あたりの吸着粒子数}}{\text{単位面積あたりの総衝突数}} \right)$$

の値は依然として不明のまま残ることが問題となろう。この効率を求めるために、アイソトープでラベルした粒子による実験を計画中である。

Summary

The rate of adsorption of a psittacosis agent (Goat Pneumonitis agent, strain Nagano) by monolayers of Earle's L cell have been investigated. It has been shown experimentally that the rate at which psittacosis agent elementary bodies (0.35μ diameter) arrive at a surface of the cell monolayers can be accurately predicted from the theory of Brownian motion. Proportion of particles adsorbed by the monolayers during an adsorption time of t seconds, Y_t , is given as

$$Y_t = 1.51 \times 10^{-3} \sqrt{t}$$

There are good agreement between theoretical adsorption rate calculated from the above formula and experimentally obtained values within the experimental error. Therefore, we can estimate the number of total infective particles in the inoculum from the number of "infected particles" as shown by counting "inclusion from-ing cells" microscopically.

Adsorption of the psittacosis agent by L cell monolayers requires adequate concentration of cations. Optimum salt concentration for adsorption is approximately 10^{-2} M. Divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) accelerate adsorption more

effectively than univalent cations such as Na^+ , K^+ , NH_4^+ etc. Optimum pH of the medium for psittacosis adsorption has been found to be 6.1; between 5.5 and 6.5 there is a slight decline in the efficiency of adsorption. At either sides of these pH values adsorption rate declines markedly.

文 献

- 1) Allison, A. C., and Valentine R. C. (1960a). Virus particle adsorption II. Adsorption of vaccinia and fowl plague viruses to cells in suspension. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 393-399.
- 2) Allison, A. C., and Valentine R. C. (1960b). Virus particle adsorption. III. Adsorption of viruses by cell monolayers and effects of some variables on adsorption. *ibid.* 40, 400-410.
- 3) Garen, A., and Puck, T. T. (1951). The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses II. *J. Exp. Med.* 94, 177-189.
- 4) Omori, T., Ishii, S., Harada, K., Ichikawa, O., Murase, N., Katada, M., and Araumi, W. (1953). Study on infectious pneumonia of goat caused by a virus. I. Isolation of the causative agent and its characteristics. *Exper. Rep. of Gov. Exper. Sta. for Anim. Hyg. Tokyo*, 27, 109-120.
- 5) Puck, T. T., Garen, A., and Cline, J. (1951). The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction. *J. Exp. Med.* 93, 65-88.
- 6) 田波 洋 (1953): 細菌ウイルスの吸着におよぼす温度の影響. *Virus* 3, 16-23.
- 7) Tanami, Y. (1962). Kinetics of psittacosis virus adsorption to suspended cells. *Virus* 12, 20-23.
- 8) 田波 洋, 山田喜紹 (1964): 山羊肺炎 agent の増殖環. *Virus* 14, 103-109.
- 9) Valentine, R. C., and Allison, A. C. (1959). Virus particle adsorption. I. Theory of adsorption and experiments on the attachment of particles to non-biological surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 10-23.
- 10) Weiss, E., and Huang, J. S. (1954). The infected cell count method of titration of feline pneumonitis virus. *J. Inf. Diseases* 94, 107-125.
- 11) Weiss, E., and Dressler, H. R. (1960). Centrifugation of Rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 103, 691-695.