ブラック抑制法によるインターフェロン力価測定系 にみられるばらつきについて

高山直秀・清水文七

VARIATION ENCOUNTERED IN THE INTERFERON ASSAY SYSTEM BASED ON THE PLAQUE INHIBITION METHOD

Naohide TAKAYAMA and Bunsiti SIMIZU

Department of Microbiology, Chiba University, School of Medicine, Chiba 280

〔受付：11月14日，1970年〕

総 括

我々は CEF-VSV を用いた，ブラック抑制法による IF 測定系にみられるばらつきにつき検討し，次の結果を得た。

1) CEF を IF 処理することによって，ブラック数に関する測定内のばらつきは大きくなる。

2) 対照系では，ブラック数に関する測定間のばらつきは測定内のばらつきよりも大きい，ブラック数の平均値に有意の差を生じる程ではない。しかし，この測定系で得た PDD_{50} 値には約2倍までの測定間のばらつきがある。

3) 測定内のばらつきの大きさは IF 濃度とびん当りの全 IF 量との影響をうける。

4) IF 濃度が一定の場合には，ウイルス抑制効果は接種液量に正比例して増大する。すなわち，びん当りの全 IF 量に正比例する。反対にびん当りの IF 量を一定にして，接種量を変化させたときには抑制効果に変化はみられない。

序

インターフェロン (IF) の力価測定法には種々あるが，現在は攻撃ウイルスのブラック形成の抑制によつて測定する方法が最も多く用いられている (Baron, 1969, Wagner, 1968)。この方法は比較的正確であるが，生物検定法の特徴に従つて，一般に測定値の真の値からのばらつきが大きい。このばらつきを小さくし，真の値に近い測定値を得る為，手技の工夫や統計的処理法の導入

(Lindenmann, 1963) がなされている。したがつて，IF 力価測定にあつてはまず，用量と反応との関係が安定して，再現性の良い (精度の高い)，そして測定値が真の値に近く，そこからのばらつきの小さい (正確度の高い) 細胞ウイルス系を樹立することが必要である。そしてさらに，その測定系でのばらつきの大きさについて，あらかじめ検討しておかなければならない。

我々はニワトリ胎児細胞 (CEF)-Vesicular Stomatitis Virus (VSV) の系での IF によるウイルス抑制効果のばらつきについて検討した。

材料と方法

細胞 CEF 初代培養細胞，マウス胎児初代培養細胞 (MEC)，および BHK-21細胞を底面積が $28 \times 60 \text{ mm}$ のびんに培養して用いた。なお，びん当りの CEF 細胞数はロットの異なる4本の平均で $1.22 (\pm 0.23) \times 10^7$ 個であつた。培養液としてはイーグル MEM にコウシ血清 (CS) を5%~10%に加えて使用した。

ウイルス 西部ウマ脳炎 (WEE) ウイルスを CEF でクローン化して得た P 株に由来する弱毒変異株 W232 株 (Simizu, 1969) を使用した。また IF の力価測定には VSV を用いた。

インターフェロンの作製 BHK-21細胞内で増殖させた W232株を CEF 単層培養上に接種して一定時間後に標本をとり，凍結融解を3回くり返したのち， 4°C で3000回転，15分間遠心沈澱し，その上清を採取した。上清の一部を 56°C で30分間加熱してウイルスを不活化し，これを IF 粗標本とした。またさらに $100,000g$ で4時間遠心沈澱処理を加えて得た上清を IF 標本として

4°C に保存して実験に供した。

インターフェロンの力価測定 IF 力価測定は CEF 単層培養上で Baron (1966) の方法に従って行なつた。5% CS 加 MEM で連続 4 倍希釈した 3 段階の IF 被検液をびん当り多くは 0.8ml の割合で接種し、3 時間 37°C に置いた。この間 20~30 分毎に、びん全体をゆり動かして、接種液が全細胞面をひたすように配慮した。つづいて細胞面を MEM で 2 回洗い、びん当り約 50 Plaque-forming Units の割合に VSV を接種し、その後栄養寒天を重層した。なお、各希釈毎に 2 本のびんを用い、対照には 6~8 本のびんを使用した。2 日間 37°C に置いたのち、中性紅で細胞を染色し、ブラック数をかぞえた。ブラック数を半減させる希釈度を以て、その原液の IF 価としたが、これは Lindenmann (1963) に従ってプロビット図解法によつて求めた。

インターフェロンの同定 W 232 株を CEF に接種し、48 時間 37°C で培養したのち、凍結融解を 3 回行ない、さらに 3000 回転×15 分間遠心沈澱して得た標本を小分けし、それぞれ別個に pH, 熱, 遠心沈澱等の処理を加え、その後それ等のもつウイルス抑制効果をしらべた。それぞれの標本について測定したウイルス抑制効果が 50% Plaque-depressing dose (PDD₅₀) 値で表 1 に示してある。56°C×30min, 56°C×180min, pH 2.0,

Table 1. Titer of Interferon of Chick Embryo Fibroblast Cells after Various Treatments

Treatment of CEF IF Sample	IF Titer in PDD ₅₀ /0.2ml
56°C×30min	36
56°C×180min	25
pH 2.0×24hr	44
100,000g×4hr	29

100,000g×4 時間等の処理を行なつた標本相互の間にウイルス抑制効果の点で有意の差が認められない。ついで 100,000g×4 時間の遠心沈澱を加えた標本をトリプシン処理し、その後のウイルス抑制効果をしらべた。(この標本中に含まれる CS の濃度は最終的には 0.2% 以下である。) トリプシン処理は 200γ/ml の割合にトリプシン (Miles, Co., 4×cryst.) をといた 磷酸緩衝液 1.0ml を標本の 1.0ml に加え、37°C の恒温槽で 60 分間反応させ。その後トリプシンの作用をとめる為に、56°C の恒温槽で 10 分間処理し、ただちに標本のウイルス抑制効果を測定した。トリプシンを含まない磷酸緩衝液 1.0ml と標本 1.0ml とを混合したものを対照として同様に処理した。その結果が図 1 に示してある。さらに異種細胞に対する効果をしらべる為に MEC-VSV 系でウイルス

Fig. 1 Effect of trypsinization on the plaque inhibiting capacity of CEF-interferon sample.

ス抑制効果をしらべた。CEF-VSV 系で測定すれば各々 1 PDD₅₀, 1/4 PDD₅₀ に相当する標本が MEC-VSV 系では 4%~6% の抑制にとどまつた。

以上の結果から、このウイルス抑制効果を示す物質は ①熱に安定である。②pH 2.0 に安定である。③10⁶g×4 時間の遠心沈澱処理で上清に残る。④トリプシン感受性である。⑤細胞特異的である。⑥異種ウイルスに対しても作用する等の性質を有していることが明らかとなつたので、これをインターフェロンと同定した。

実験結果

① 1 回の測定に見られるばらつき 我々の採用した CEF-VSV 系に於て、1 回の測定に見られるばらつき (測定内のばらつき) の大きさを知る為に、IF 処理群と IF 非処理群 (対照) とにそれぞれ 8 本のびんを用いて出現する VSV のブラック数を算定した (表 2)。ブラック数の平均値には 2 倍以上の差があるにもかかわらず、不偏分散はほぼ同じである。このようにウイルス希釈液を何本かのびんに接種する場合、手技その他の条件が適当であれば、そこに現われてくるブラック数は、ポアソン分布に適合しているはずである。そこでこれ等のブラック出現がポアソン分布に適合しているか否かを検討した (松本, 1964)。有意水準 0.05 でポアソン分布への適合を棄却できないが、IF 処理群の適合は対照よりも劣っていることがわかる (表 2)。すなわち IF 処理することが測定内のばらつきを大くしているものと推

Table 2. Amount of Variation Encountered in Replicate Bottles

Variable	Control Bottles	Interferon-treated Bottles
No. of Plaques	46 53 56 56 61 62 66 66	15 15 19 21 22 23 28 34
Mean	58	22
Variance	47.1	41.3
Standard Deviation	6.9	6.4
Chi-square	5.66	13.05
Corresponding Values of p	0.70>p>0.50	0.10>p>0.05

定される。

②-a くり返し測定に見られるばらつき——IF 処理しない場合 測定をくり返したときに見られるばらつき(測定間のばらつき)について知る為に、同一ロットの VSV を用いて、日を変えて4回の対照測定を行なった(表3-A)。それぞれの測定に於けるブラック出現がポアソン分布に良く適合していることは χ^2 検定により明らかである(表3-B)。

測定間のばらつきの大きさと他の原因によるばらつき(誤差)の大きさを分散分析によつて比較してみると(表3-C)、前者は後者よりも有意に大きい。しかしそれぞれのブラック数の平均の差を検討してみると、最も差の大きいものの間にも有意の差があるとはいえない。したがつて対照系では測定間のばらつきは測定内のばらつきよりも大きい、得られた平均ブラック数に有意の差が出る程ではなく、対照系の再現性は良いものと推定される。

②-b くり返し測定に見られるばらつき——IF 処理した場合 2つの IF 粗標本AおよびBについて、それぞれ3回ずつ CEF-VSV 系を用いて、くり返し IF 力価を測定した。第4表には、5段階に希釈された IF によるウイルス抑制効果が% Plaque Inhibition(% P.I.)で示してあり、また% P.I. からプロビット法(Weber, 1961)によつて求めた PDD₅₀ 値とその95%の信頼限界が与えてある。それぞれの PDD₅₀ 値の信頼上界値と下界値とは約2倍の相違がある。また標本AおよびB共に測定日によつて示される IF 力価は約2倍までばらついている。このばらつきは対照系におけるばらつきと

Table 3-A Plaque Assay of VSV on Different Days

Variable	Date of Titration			
	0323	0326	0330	0406
No. of Plaques	46 ^a 53 56 56 61 62 66 66	50 50 59 62 62 66 66 76	53 55 60 61 62 66 66 76	30 35 41 43 46 48 52 42
Mean	58	59	62	42
Variance	47.1	46.2	51.8	58.0
Standard Deviation	6.9	6.8	7.2	7.6

^a Dilution Factor=1.7×10⁶

Table 3-B The χ^2 Test for Goodness of Fit of VSV Plaques to Poisson Distribution

Date	Heterogeneity Chi-square	Degrees of Freedom	Corresponding Values of p
Mar. 23 1970	5.84	7	0.70>p>0.50
Mar. 26 1970	4.68	6	0.70>p>0.50
Mar. 30 1970	5.82	7	0.70>p>0.50
Apr. 6 1970	8.26	6	0.50>p>0.30

Table 3-C Analysis of Variance

Factor	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F _s
Date	1506.3	3	502.1	6.96
Error	1874.7	26	72.1	
Total	3381.0	29		

$$F_{26}^3(0.01)=4.64$$

IF 処理によるばらつきとが積算されたものと考えられるので、IF 処理は測定間のばらつきを大きくする原因となつているものと推定される。

③-a 標本接種液量とウイルス抑制効果との関係——IF 濃度が一定の場合 我々の測定系に於て、接種液量を変えることによつてウイルス抑制効果がどのように変化するかを検討した。ひとつの IF について、その接種液量を0.2ml, 0.4ml, 0.8ml の3段階とり、その他の条件は同じにして、示されるウイルス抑制効果をしらべた。IF 粗標本(標本C)とそれに10⁶g の遠心沈澱処理を加えた IF 標本(標本D)との2つについて行なつた測

Table 4. Replicate Titration of Two Interferon Samples by the Plaque Inhibition Method

Sample	Date	Interferon Dilution					Interferon Titer/0.2ml		
		1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	PDD ₅₀	L.L. ^a	U.L. ^b
A	Mar. 2 1970	70.2 ^c	67.4	53.9	39.0	33.3	76	54	106
	Mar. 9 1970	70.7	52.0	34.1	30.9	0.0	37	27	56
	Mar. 12 1970	63.9	64.9	52.5	40.5	13.9	59	43	79
B	Mar. 16 1970	65.2	46.7	24.3	23.5	10.4	28	20	38
	Mar. 19 1970	64.3	45.7	14.3	12.9	1.4	25	18	34
	Mar. 23 1970	74.8	58.8	53.8	27.7	26.9	58	42	82

^a Lower confidence limit ^b Upper confidence limit ^c % plaque inhibition

Fig. 2 Relationship between volume of interferon and plaque inhibiting capacity.

Crude IF-sample (▲-▲) and partially purified IF-sample (Δ-Δ)

定の結果が図2に示してある。標本C、標本Dの各々の場合の回帰直線は $y=63.0x$, $y=65.5x$ で与えられ、両回帰直線の間に有意の差はない。(ただし、図2では縦軸が1/50に縮小されている。) 回帰直線への適合度は標本Dの液量0.2mlの場合を除外すれば、両標本ともほぼ同程度に良い。すなわちウイルス抑制効果はどちらの場合にも接種液量増加に正比例して増大しており、用量-反応関係は直線的でゆがんでいない。したがってIFによるウイルス抑制効果は標本内に含まれる全IF量に正比例して現われると推定される。

③-b 標本接種量とウイルス抑制効果との関係——IF

Table 5-A Table of Mean Plaque Numbers

Total IF Amount per Bottle	Inoculum Size/Bottle			Control
	0.2ml	0.4ml	0.8ml	
1PDD ₅₀	24.1 ^a (24.1) ^b	26.1 (27.0)	27.3 (30.9)	52.2 (27.0)
1/4PDD ₅₀	39.1 (88.7)	42.9 (51.6)	45.0 (24.0)	

^a Mean plaque numbers in 8 bottles

^b Variance

濃度を変化させた場合あらかじめIF価のわかっている標本を希釈して、接種液量を0.2ml, 0.4ml, 0.8mlとしたとき、それぞれに含まれる全IF量が1PDD₅₀あるいは1/4PDD₅₀となるようにして6種類のIF被検液を作った。1被検液あたり8本のびんを使用して、前と同様の方法を用いてウイルス抑制効果をしらべ、④びん当りの全IF量を一定にして被検液の接種液量を変化させると、示されるウイルス抑制効果にどのような影響があるか、また⑤測定内のばらつきにどのような影響があるかについて検討した。対照と6種類の被検液とについて、それぞれ、プラック数の平均および不偏分散が表5-Aに示してある。びん当りの全IF量が1PDD₅₀である場合には接種液量が0.2ml, 0.4ml, 0.8mlと変化しても、示されるウイルス抑制効果はほぼ同一である(図3)。すなわち、濃度が5PDD₅₀/ml, 2.5PDD₅₀/ml, 1.25PDD₅₀/mlと変化しても示されるウイルス抑制効果には差が認められない。びん当りの全IF量が1/4PDD₅₀である場合には、3種の被検液についてプラック数の平均値に有意の差はみられないが、接種液量が少ない程、つまりIF濃度が高まる程、ウイルス抑制効果が強く現われる傾向がみられる(図4)。しかし、用量-反応直線の面から検討してみると(図4)、直線の勾配は液量をびん当たり0.8mlとした場合がもつとも大きく0.4ml, 0.2mlの順に小さくなっている。プロビット法を用いる

Fig. 3 Effect of concentration of CEF-interferon on the plaque inhibiting capacity.

Fig. 4 Effect of volume of inoculum of CEF-interferon on the plaque inhibiting capacity.

Volume of inoculum is: Δ ; 0.2ml/bottle, $\triangle$; 0.4ml/bottle and $\blacktriangle$; 0.8ml/bottle. Dotted line shows the theoretical dose-response relationship.

Table 5-B The χ^2 Test for Goodness of Fit of VSV Plaques on IF-treated CEF to Poisson Distribution

Total IF	Volume of Inoculum	Heterogeneity Chi-square	Degrees of Freedom	Corresponding Values of p
1PDD ₅₀	0.2ml	7.01	7	0.50 > p > 0.30
	0.4ml	7.24	7	0.50 > p > 0.30
	0.8ml	6.79	6	0.50 > p > 0.30
1/4PDD ₅₀	0.2ml	15.78	7	0.05 > p > 0.02
	0.4ml	8.41	7	0.30 > p > 0.20
	0.8ml	3.64	7	0.90 > p > 0.80
Control		2.58	5	0.95 > p > 0.90

Table 5-C The χ^2 Test for Goodness of Fit of the Actual to the Theoretical Plaque Numbers

Total IF	Volume of Inoculum	Heterogeneity Chi-square	Degrees of Freedom	Corresponding Values of p
1PDD ₅₀	0.2ml	7.65	7	0.50 > p > 0.30
	0.4ml	7.24	7	0.50 > p > 0.30
	0.8ml	7.50	6	0.30 > p > 0.20
1/4PDD ₅₀	0.2ml	21.06	7	0.01 > p > 0.001
	0.4ml	9.26	7	0.30 > p > 0.20
	0.8ml	3.75	7	0.90 > p > 0.80

と、この用量-反応直線の勾配の逆数が PDD_{50} 値の標準偏差を与えるので (Weber, 1961), 勾配が大きい程、標準偏差は小さくなる。したがって接種液量を 0.8ml としたときは 0.4ml, 0.2ml としたときよりも測定系の精度を良くしていることになる。

接種液量とばらつきとの関係を知る為、対照および 6 種の被検液のそれぞれについてブラックの出現がポアソン分布に適合しているか否かをしらべた (表5-B)。びん当りの全 IF 量が 1 PDD_{50} であるときは液量の多少によらず、3 群ともきわめて良く適合しているが、全 IF 量を $1/4PDD_{50}$ にしたときには液量が減少するにつれて、すなわち IF 濃度が高まるにつれて測定内のばらつきが大きくなり、適合が悪くなる傾向がみられる。

また理論値からのばらつきがブラック数のポアソン分布を仮定したときにも起り得る程の大きいか否かを検討した (表5-C)。なお、全 IF 量を 1 PDD_{50} または $1/4 PDD_{50}$ としたときの理論値としては対照での平均ブラック数の $1/2$ または $7/8$ ブラック数を採用した。前と同様に全 IF 量を 1 PDD_{50} としたときには適合が良いが、全 IF 量を $1/4PDD_{50}$ としたときには液量が少なくなる程ばらつきが大きくなっている。液量を 0.2ml としたときのばらつきは特に大きくポアソン分布しているとは考えられない。

以上から、次のことが推定される。(i) IF 処理によって測定内のばらつきは大きくなる。(ii) しかし、その程度はビン当りの全 IF 量や接種液量等の条件によって左右されて、必ずしも一様ではない。(iii) そして特に全 IF 量が少ない条件下で接種液量を少なくすることが測定内のばらつきや理論値からのばらつきを大きくしている。すなわち、この測定系の精度および正確度をともに悪くしている。

考 按

% P.I. による IF 力価測定は一般に連続 2 倍希釈で行なわれており、それによって得られた値には ± 2 倍程度の誤差のあることが報告されている (Wagner, 1968)。我々も CEF-VSV 系で得られた値の信頼上界値と下界値とでは約 2 倍の相違のあること、および測定時が異なれば同一標本の力価も約 2 倍の範囲でばらつくことを明らかにした。こうしたばらつきは細胞-ウイルス系すなわち対照系のばらつきと細胞を IF 処理することによって起るばらつきとの積としてあらわれており、さらに IF 処理によるばらつきは IF 細胞の相互作用のばらつきや、IF の希釈誤差による、そして希釈段階のとり方によるばらつき等の積算されたものと考えられる。また IF 処理によるばらつきの中では IF 細胞相互作用によ

るばらつきが最も重要であろう。なぜならそれは細胞の生理状態 (Possman, 1969) のみならず、IF の濃度および液量等によってその大きさが異なるからである。我々の用いた CEF-VSV 系では IF 量とウイルス抑制効果との関係は直線的で、ゆがみのないことがわかった。

ただしまた我々の実験から、IF 濃度の低い時に接種液量を少なくするとばらつきが大きくなるという結果も得られている。しかもすでに接種液量を一定にして IF 濃度を变化させたとき、IF 濃度が高くなると直線的用量-反応関係は成立しなくなるという Ho (1962, 1963) の報告がある。他に IF のウイルス抑制効果は接種液中の IF 濃度に比例するのであり、全 IF 量には無関係であるという報告 (Baron, 1967) がある。この場合にはブラック抑制法ではなく、攻撃ウイルス (VSV) を一段増殖させたのちのウイルス量を対照と比較してウイルス抑制効果を判定している (Baron, 1967, 1968)。この判定法の相違からこのような関係が得られたものと思われる。しかし、我々の系に於ても接種量を 1.0ml, 2.0 ml と増加してゆくことによって用量-反応関係が乱れ、終には抑制効果が全 IF 量によらず、IF 濃度だけに左右される系となる可能性を否定できない。したがってこのような直線的な関係は常に成り立つとは限らず、適当な IF 濃度と液量が CEF に与えられてはじめて得られるものであろう。すなわち接種された IF はまず細胞に情報を与え、それによって 2 次的に細胞抑制が発現し、しかもそれは Single hit kinetics による (Bader, 1962) と考えられる。したがって適当な CEF-IF の相互作用を保証できるような濃度と液量とが細胞に与えられなければならない。実際上は細胞表面を一様にひたすのに十分な液量 (この系では 0.8ml) と 50% P.I. 点を含める為め広い範囲にわたる検体の希釈 (例えば 4 倍希で 3 段階) が必要であろう。

測定間のばらつきもまた CEF を IF 処理することによって大きくなるが、ここでは、ロットのちがいに由る、CEF の IF 処理に対する感受性の差をはじめとして、細胞の生理状態に由来するばらつきが重要な役割をはたしていると考えられる。そして測定間のばらつきは IF 濃度や希釈範囲を適正にとつたとしても、なお現われてくるであろう。こうした測定間のばらつきを最小限にする為には、比較すべき IF 標本をできるだけ同一測定時内に測定することが望ましい。また Lindenmann (1963) の提唱するように標準 IF との相対力価で PDD_{50} 値を求める方法も測定間のばらつきを小さくするのに有効であろう。しかしこの場合には標準 IF の作製、およびその保存に問題が残されている。

Summary

We examined the variation encountered in the interferon (IF) assay system which is based on the plaque inhibition method, using vesicular stomatitis virus in chick embryo fibroblast (CEF) cells. The results obtained are summarized as follows.

1. Intra-assay variation of plaque numbers is increased by treatment of IF in CEF cells.
2. Intra-assay variation of plaque numbers is larger than intra-assay variation in the untreated system, although the former is not so large as causing the significant difference in mean plaque numbers of titrations repeated. The maximum value of 50% plaque-depressing dose obtained, however, is found to be larger than the minimum by a factor of two, when the same IF-sample is repeatedly assayed in this system.
3. Intra-assay variation of plaque numbers is influenced by the IF-concentration and the total IF-amount per bottle.
4. Under the constant IF-concentration, the virus inhibitory effect of IF augments in proportion to the volume of inoculum, in other words, is directly proportional to the total IF-amount per bottle. Under the constant IF-amount per bottle, on the other hand, the virus inhibitory effect is constant, irrespective of the volume of inoculum.

文 献

- 1) Bader, J. P. (1962) : Production of Interferon by Chick Embryo Cells Exposed to Rous Sarcoma Virus. *Virology*, **16**, 436-443.
- 2) Baron, S., Buckler, C. E., McCloskey, R. V. and Kirschstein, R. L. (1966) : Role of Interferon during Viremia I. Production of Circulating Interferon. *J. Immunol.*, **96**, 12-16.
- 3) Baron, S., Buckler, C. E., Levy, G. B. and Friedman, R. M. (1967) : Some Factors Affecting the Interferon-Induced Antiviral State. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **125**, 1320-1326.
- 4) Baron, S., Buckler, C. E. and Dianzani, F. (1968) : Some Determinants of the Interferon-Induced Antiviral State. *In Interferon*, (Ed) Wolstenholme, G. E. V. and O'Connor, M. p. 186-203, J. & M. Churchill, London.
- 5) Baron, S. (1969) : Interferon: Production, Assay, and Characterization. *In Fundamental Techniques in Virology* (Ed) Habel, K. and Salzman, N. P. p. 399-410. Academic Press, New York and London.
- 6) Ho, M. (1962) : Kinetic Consideration of the Inhibitory Action of an Interferon Produced in Chick Cultures Infected with Sindbis Virus. *Virology*, **17**, 262-275.
- 7) Ho, M. (1963) : Effect of an Interferon on Synthesis of Viral Ribonucleic Acid and Plaque Formation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **112**, 511-515.
- 8) Lindenmann, J. and Gifford, G. E. (1963) : Studies on Vaccinia Virus Plaque Formation and Its Inhibition by Interferon III. A Simplified Plaque Inhibition Assay of Interferon. *Virology*, **19**, 302-309.
- 9) 松本 稔 (1964) : ウイルスの定量, ウイルス学 (編集), 東昇, 石田名香雄 p. 421-442, 朝倉書店, 東京.
- 10) Possman, T. G. and Vilcek, J. (1969) : Influence of the Rate of Cell Growth and Cell Density on Interferon Action in Chick Embryo Cells. *J. Virol.*, **4**, 7-11.
- 11) Simizu, B. and Takayama, N. (1969) : Isolation of Two Plaque Mutants of Western Equine Encephalitis Virus Differing in Virulence for Mice. *J. Virol.*, **4**, 799-800.
- 12) Wagner, R. R., Levy, A. H. and Smith, T. J. (1968) : Techniques for the Study of Interferons in Animal Virus-Cell Systems. *In Methods in Virology IV*, (Ed) Maramorosch, K., and Koprowski, H. p. 1-52, Academic Press, New York and London.
- 13) Weber, E. (1961) : Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner. p. 456-478, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.