組織培養を併用したCoxsackie virus (Group A, Type 2) の発育鶏卵培養に関する研究*

藤 田 利 和**

TOSHIKAZU FUJITA: CULTIVATION OF COXSACKIE VIRUS (GROUP A, TYPE 2) ON MOUSE TISSUE GRAFTED TO CHORIOALLANTOIS

〔受稿 2月3日 1959〕

1948年Dalldorf, G. and Sickles, G.¹⁾により Coxsackie virusが哺乳マウスに感受性を有することが発見されて以来 Suckling hamster, Suckling ferret等もこの Virus に対して感受性のあることが明らかになった。

一方 Coxsackie virus の発育鶏卵へのAdaptationに就ては過去10年間数人の研究者達によつて行なわれて来たが成功した例はなく、その成績は5~8代迄のものが多い。Dalldorf, G. and Sickles, G. (1949)²⁾は Group A, Type 1の実験で発育鶏卵に培養不可能であったことを報告し、Godenne and Curnen (1952)³⁾は漿尿膜 (C.A.M.) 上接種で Group A, Type 8 (Easton-10) を5代継代出来たことを記載し、Shaw (1952)⁴⁾は卵黄嚢に接種し継代することによつて Group A, Type 2を8代迄培養出来たことを報告している。

Huebner, Ranson (1950)⁵⁾は卵黄嚢内培養により Group A, Type 2を10代迄連続継代に成功したことを報告し、又最近研究室の菅井⁶⁾は Group A, Type 2 (Shida strain) が或る条件のもとで12代継代出来たことを報告している。

他方Coxsackie virusの組織培養はSlater, Syverton (1950)⁷⁾がGroup A, Type 4 (Minnesota-1)をMouse embryo tissueを用い、またShaw (1952)⁴⁾はChick embryo tissueを用い (No. 50376 strain) flask cultureで夫々培養出来たことを報告し、Crowell, R. L. and Syverton, J. T. (1955)⁸⁾は HeLa 細胞を、Sickles, G.M. 等 (1955)⁹⁾は Monkey kidney 及び Monkey testesのTrypsinized cellを用いGroup A, B. 各 Type の Cytopathogenic effect に就いて観察報告している。

一方発育鶏卵 C. A. M. 上に組織培養を行う手技は Cameron and Oakley (1938)¹⁰⁾が鶏胎肝組織を C. A. M. 上に移植可能であることを報告し、Goodpasture 等 (1938)¹¹⁾はHuman skin が C. A. M. 上に培養出来ることを述べ、更にBlank, H. Coriell, L. 等 (1948)¹²⁾はこの方法を利用して Herpes simplex, 及びVaccinia が継代出来たことを報じ、又 C. P. Li, M. Schaeffer and D. B. Nelson (1954)¹³⁾は Monkey kidney and Monkey skin tissue を用いて Poliomyelitis virus の発育鶏卵 C. A. M. 内長期培養を報告している。

然しかかる培養法を用い、併置した組織を取去つた後に鶏卵馴化株を得た報告は見られない。

著者は発育鶏卵内培養の困難な Coxsackie virusに對して、組織培養法を発育鶏卵内培養に併用することにより、即ちこの Virus に感受性を有する組織を発育鶏卵内培養に利用する方法を新たに試み、Virus 培養の Intermediate stepとして用いたならばCoxsackie virus の発育鶏卵馴化株を得ることが出来るのではないかと、尚又 Virus と Host との關係を追求する一法になるのではないかと考え実験を進めた結果、従来長期培養に成功していなかつた Coxsackie virus を発育鶏卵に馴化させることが出来、而もvirus titerの低下なしに長期継代が可能となる興味ある所見を得た。

実験材料

- ① Virus : Group A, Type 2, Shida strain
Poliomyelitis 患者糞便より研究室菅井⁶⁾ が分離したもの。
- ② Suckling mouse : NA 2 系生後3~4日以内のもの。

* 本論文の要旨は昭和34年4月阪大微生物病研究所集談会及び第5回日本ウイルス学会西日本支部研究発表会に発表予定

**大阪大学微生物病研究所、ウイルス学部 (主任 奥野良臣教授)

- ③ 免疫血清：予研より分与されたGroup A, Type 2 (FL 49190)を使用。
- ④ 発育鶏卵 C.A.M. に於ける組織培養材料
- (i) 組織：成熟マウスddO系生後4~5週の腎或は大腿筋肉を取り出し2~3mm³に細切した組織片。
- (ii) 培養液
Exp. 1.....	{	Hanks 液	60%	
		鶏胚浸出液	10%	
		牛血清	30%	
		(Streptomycin 100ug/ml
Penicillin 100単位/ml を含む)		
Exp. 2.....	{	YLH液	60%	
		牛血清	40%	
		(Hanks 液に Yeast extract 1gr
Lactalbumine 5gr を加えたもの)		
- ⑤ L細胞：当研究室継代のもの。(5%牛血清加YLH液で静置培養)

実験方法

① 発育鶏卵及び組織培養

成熟マウス腎及び大腿筋肉組織を無菌的に採取し、夫々ハサミで約2mm³の細片にきざみ Hanks 液で数回洗滌し、約2時間放置後培養液に再浮遊させ更に2時間37°Cに静置し7日卵に作った人工気室(窓の大きさは直径8~10mm)の C.A.M. 上に Pipetteで約10細片宛培養液と共に滴下し、窓を無菌セロファンで被いパラフィンで閉塞し、37°C24時間孵卵後再開窓し、Coxsackie virus (Group A, Type 2) 材料を C.A.M. と組織片上に0.2ml 宛接種し、37°Cで更に6日間孵卵した後開卵し、組織片を含む C.A.M. を切り取り等量の Hanks 液にて乳剤とし3000r.p.m. 20分遠心し、その上清0.2ml宛を次代卵に継代した。

これと同時にこの材料を生理的食塩水で稀釈し Suckling mouse に還元接種し Reed and Muenchの方法でMLD₅₀を測定した。

対照卵(組織片を設置せず、実験卵と同日数孵卵の C.A.M. 上に Coxsackie virus を培養した卵) 材料の MLD₅₀ も測定し比較検討した。(各系5~7ヶの発育鶏卵を使用)

② 中和実験

継代接種された Virus が所定の Coxsackie virus Group A, Type 2であるか否かを確認する為に接種材料(Exp. 2, E/11)に免疫血清を加え、中和実験を行なった。即ち継代材料を抗原とし階段稀釈を行ない、

これに等量の免疫血清を加え37°C孵卵器内で2時間作用させた後、その0.04mlを各々生後3日以内の Suckling mouse 腹腔内に接種した。一方正常マウス血清を等量加えたものを対照とし中和対数を求めた。

なお発育鶏卵内に Coxsackie virus の増殖を判定する他の指標として Mumps virus (Enders strain) との干渉現象試験をも併用した。其の方法は先に研究室で菅井⁹⁾が実施したと同様の方法によつた。

次に異つた Host への Adaptation による変化を追求する為に発育鶏卵単独で長期継代した Virus と Mouse passage の Original strain との両者に就て夫々の成熟マウス及び哺乳マウスに対する病原性と、L細胞に及ぼす影響に就て比較実験を行つた。

また発育鶏卵継代中雑菌の迷入を調べるため普通寒天、血液寒天、T.G.C.培地(液状チオグリコール酸塩培地)を用いて培養試験を行い、陽性の場合には Seitz EK で濾過し雑菌を除去した。全実験を通じ Coxsackie virus の継代は大腿骨を含めた発症マウスの筋肉組織を生理的食塩水で10%乳剤としこれを使用した。Suckling mouse への接種量は¹⁰⁾ 1代、還元接種何れの場合にも腹腔内に0.03mlとした。

③ 成熟マウスでの実験方法

5週マウスに対する Coxsackie virus の病原性を観察する為 Mouse passage の MLD₅₀6.0及び Exp. 2, E/8代 MLD₅₀6.0の10⁻¹稀釈材料を夫々成熟マウスの脳内(0.03 ml) 腹腔内(0.2 ml)に5匹宛接種し、其後3週間観察した。

④ L細胞

既述の方法で継代したL細胞を短試験管に分散し cell sheetを作らせ、3日目に Virus を接種した。即ち MLD₅₀7.0 (Mouse passage 脚乳剤), MLD₅₀6.5 (Exp. 2, E/17. C.A.M. 乳剤) 材料を夫々10⁻²に稀釈した後L細胞に接種し、24時間毎に培養液を採取し、これを Suckling mouse に還元接種し MLD₅₀ による Growth curve を測定すると共に、Coxsackie virus による Cytopathogenic effect に就て14日間にわたり観察した。

実験はその結果の再現性を確かめるため Exp. 1, Exp. 2に分けて実施した。Exp. 1の10代迄は Hanks solution 60% + Calf serum 30% + Chick embryo extract 10%の培養液を用い、Exp. 1の11代以後及びExp. 2に於ては YLH60% + Calf serum 40%の培養液で実験を行なった。

実験成績

I. 発育鶏卵培養

E=Egg Culture

EK=Adult Mice Kidney Tissue Culture on C.A.M.

EM=Adult Mice Muscle Tissue Culture on C.A.M.

E'=exchanged Egg Culture from EM Culture System

(i) Exp. 1, Exp.2に於てE, EK, EM系の継代に就て比較するとEM系が最も長期に亘り継代可能であつた。その際 E, EK 系に於ては継代数を重ねる度にMLD₅₀は漸次低下の傾向を示し, Exp. 1 E, EK系ではMLD₅₀5.75よりMLD₅₀0に, Exp. 2 E系では5.5より

り0にEK系ではMLD₅₀6.0より0に至つた。尚E系及びEK系の比較ではEK系の方がE系よりExp. 1, Exp. 2共長期間発育鶏卵内継代が可能であつた。即ち10代継代ではExp. 1, E系はMLD₅₀0になるのに対し, EK系は2.75を示し, 同様に Exp. 2, E系10代 MLD₅₀0.74に対しEK系は2.74であつた。

Exp. 1, EK 系は16代で始めて MLD₅₀0となり, Exp. 2 では17代で0となつた。即ち両実験共E系及びEK系の Coxsackie virus は漸次 virus titer が減少し遂に0となり, 長期に亘り Virus 量を一定の価を保つたまま継代することは出来なかつた。

(ii) EM系では発育鶏卵継代によりMLD₅₀はExp. 1では6.5より4.0に, Exp. 2では6.0より4.0に夫々低下するが, 両実験共6~8代より再び上昇し其後はほぼ一定価 (MLD₅₀5.5~6.5) を保持し継代された。

Table 1. Experiment 1
Mice→Mice→Mice 10% Thigh Suspension (MLD₅₀-7.24)

Host Range	Egg Culture	Adult Mice Kidney Tissue Culture on Chorioallantoic Membrane	Adult Mice Muscle Tissue Culture on Chorioallantoic Membrane
Generation			
1	5.75(a)	5.75(a)	6.50(a)
2	3.25	3.50	4.24
3	2.75	4.25	4.00
4	2.00	4.00	4.00
5	2.50	3.74	4.50
6	2.50	3.74	4.24
7	1.74	3.24	4.50
8	0.74	3.50	4.50
9	0.74	3.50	5.00
10	0	2.75	5.24
11		1.50	6.00
12		0.74	5.50→Egg Culture Generation
13		1.00	4.75 4.5(a) 1
14		1.25	4.59 4.24 2
15		0.50	4.75 4.75 3
16		0	5.50 4.75 4
17			5.00 4.50 5
18			5.24 5.24 6
19			5.00 5.00 7
20			6.00 5.50 8
21			6.24 6.00 9
22			6.24 6.50 10
			6.50 11
			6.24 12
			⋮ 13
			6.75 15

7 day old chick embryo used throughout

(a) : 50% lethality in suckling mice (back inoculation)

(iii) EM系に於てExp.1では12代, Exp. 2では11代目に夫々 Mouse 筋肉組織を C.A.M. 上に plate せず (E'系) 発育鶏卵のみ単独に用いその材料をC.A.M. に継代した. 其の成績は両実験共系列を変えと (E M→E') Exp. 1ではMLD₅₀ 5.5 より4.24に, Exp. 2ではMLD₅₀5.5より3.59と一旦MLD₅₀は低下するが, 其後5~6代頃より上昇し, 10代では Exp. 1, Exp. 2 共MLD₅₀6.5 となり其後は MLD₅₀ の低下を認めなかつた.

即ち両実験共E'系(特に10代以後)に於て Cocksackie virusが発育鶏卵に adapt したものと考えられた.

尚この実験に先立ちEM系に於てMLD₅₀が一旦低下し再び上昇の傾向を認めた材料 (即ちExp. 1, 5代 M

LD₅₀4.5 及び Exp. 2, 7代MLD₅₀5.24) を夫々Mouse 筋肉組織を除いた発育鶏卵単独の系列にて培養を試みたがMLD₅₀は急速に低下し adapt の所見を得ることが出来なかつた.

(iv) 中和実験成績

中和実験の成績は Table 3 に示す如く, 中和対数は3.5であり Exp. 2, E'11代の Virus が所定のGroup A, Type 2 のCocksackie virusであることを認めた.

(v) 干渉現象成績

干渉現象は Table 4に示す如くExp. 1, EM12代及び Exp. 2, E' 7 代では陽性であり, Exp. 1, E9代, Exp. 2, E12 代では陰性であつた. この場合接種材料のMLD₅₀はExp. 1, EM 12代は5.5. Exp. 2, E'7代は

Table 2. Experiment 2
Mice→Mice→Mice 10% Thigh Suspension (MLD₅₀~7.24)

Host Range	Egg Culture	Adult Mice Kidney Tissue Culture on Chorioallantoic Membrane	Adult Mice Muscle Tissue Culture on Chorioallantoic Membrane
Generation			
1	5.50(a)	6.00(a)	6.00(a)
2	3.74	4.24	4.50
3	3.50	4.00	4.50
4	2.59	4.00	4.24
5	2.50	3.75	4.00
6	2.00	3.50	4.24
7	1.50	3.50	5.24
8	1.24	2.50	5.24
9	1.00	3.00	5.00
10	0.74	2.74	5.24
11	0.50	1.50	5.50→Egg Culture Generation
12	0	1.50	5.00 4.50(a) 1
13		1.24	4.24 3.59 2
14		1.00	5.00 4.50 3
15		0.50	4.75 4.75 4
16		0.75	5.50 5.24 5
17		0	6.00 5.75 6
18			6.24 5.74 7
19			6.50 6.00 8
20			7.00 6.24 9
21			6.50 6.50 10
			7.24 11*
			6.50 12
			6.75 13
			⋮ ⋮
			6.50 17
			⋮ ⋮
			6.74 20

7 day old chick embryo used throughout

(a) : 50% lethality in suckling mice (back inoculation)

* : neutralized by Type 2 Antiserum (Table 3)

Table 3. Neutralization Test of Coxsackie Virus (see Table 2-*)

Serum (mice)	Dilution of Virus	Mortality Rate of Suckling Mice	MLD ₅₀
normal	10 ⁻⁵	3/3	6.74
	10 ⁻⁶	3/3	
	10 ⁻⁷	1/3	
immune	10 ⁻³	2/3	3.24
	10 ⁻⁴	0/3	
	10 ⁻⁵	0/3	

Serum Virus Mixture incubated at 37°C for 2 Hours; the Mixture 0.04 ml. inoculated intraperitoneally in Suckling Mice

5.74であり, Exp. 1, E'9代は MLD₅₀0.74, Exp. 2, E 12代は0であつた. 即ち干渉現象は Virus の MLD₅₀ が5.0 以上の時陽性を示した. 換言すれば干渉現象成績は培養系列により影響されず夫々の MLD₅₀ の値により左右されるものと思われた. この成績は研究室菅井⁶⁾の実験結果とほぼ一致する.

(vi) 本実験全期間中の発育鶏卵死亡率は15~20%を示し, 特に Fungus の迷入は6日に最高30%を示した. Fungus の迷入した材料は鶏卵の生死にかかわらず実験より除外した.

II. 成熟マウス及び Suckling mouseでの実験成績
Original strainとEgg adapted strainの両者を夫々5匹宛の成熟マウスの脳内又は腹腔内に接種し

Table 4. Interference Test of Coxsackie Virus and Mumps Virus

Experiment	H. A. Titer	Result	Original Titer of Coxsackie Virus (-log)
Exp. A	2 ²	positive	5.50
Control	2 ⁷		
Exp. B	2 ⁰	positive	5.74
Control	2 ⁸		
Exp. C	2 ⁶	negative	0.74
Control	2 ⁷		
Exp. D	2 ⁷	negative	0
Control	2 ⁷		

Material of Exp. A : 10% Chorioallantoic Membrane (CAM) Suspension of 12 Generation at Adult Mice Muscle Tissue Culture on CAM (Exp. 1)

Material of Exp. B : 10% CAM Suspension of 7 Generation at Egg Culture altered from Mice Muscle Tissue Culture on CAM (Exp. 2)

Material of Exp. C : 10% CAM Suspension of 9 Generation at Egg Culture (Exp. 1)

Material of Exp. D : 10% CAM Suspension of 12 Generation at Egg Culture (Exp. 2)

Interval of 1st (Coxsackie Virus) and 2nd (Mumps Virus) Virus : 96 Hours

Site of Interference Test : allantoic Cavity

た. 3週間の観察では両者共発症を認めることが出来なかつた.

Suckling mouseの腹腔内接種による実験では Original strain接種後平均48時間で発症するのに対し, Egg adapted strainでは84時間を要した.

即ちEgg adapted strainはOriginal strainに較べ Suckling mouse に対する発症までの潜伏期の延長を認めた.

III. L細胞

Egg adapted strainとOriginal strainをL細胞に接種24時間毎に培養液を採取し, Mouseに還元接種して測定した Growth curveを対照(L-Cell free

の Medium に Original virus を接種したもの)と比較検討した.

Fig. 1に示す如く対照では Virus 接種後144時間で MLD₅₀は0を示すのに対し, L細胞に接種した Egg adapted strain及びOriginal strainでは168時間後 MLD₅₀は夫々4.0及び3.0を示した. 又 Virus 接種後72時間に於てMLD₅₀は4.59, 及び4.5と両者共最高値を示した. この成績より72時間継代がL細胞では適当と考え, 4代に亘り培養を継続しSuckling mouseに還元接種しMLD₅₀を追及した.

又Fig. 2に示す如くL細胞4代目に於ける両者(Egg adapted virus及びOriginal virus)のMLD₅₀

Fig. 1. Growth Curve of Coxsackie Virus (C Virus) in L Cell Culture

Material of Inoculation in L Cell Culture Time(Hour)	Mice Passage C Virus	Egg Passage C Virus*	Control (contained no Cell)
24	4.24	4.50	4.00
48	4.00	4.50	
72	4.50	4.59	2.24
120	3.74	4.00	
144	3.59	3.74	0
168	3.00	4.00	
Original Titer	7.00	6.50	7.00

Fig. 1
solid Line : Egg Passage C Virus (exchanged)
dotted Line : Mice Passage C Virus
Intervals of Passage : 72 Hours

は4.0及び2.5であり、L細胞初代よりの稀釈数より計測し、Coxsackie virus (Group A, Type 2)はL細胞に増殖の傾向を認め特に Egg adapted strainに於て著るしかつた。他方L細胞に対する Cytopathogenic effect に関しては14日間の観察で両者共認めることが出来なかつた。

考 按

組織培養法の進歩に伴い、HeLa, 人胎児、猿腎細胞等を用い Coxsackie virus の培養は株によつては可能となつたが、尚发育鶏卵内培養に関しては著るしい進展が認められなかつた。著者は組織培養法と鶏卵

Fig. 2. Subculture Titer (MLD₅₀) of Coxsackie Virus in L Cell Culture

Generation	Mice Passage C Virus	Egg Passage C Virus	comparable Dilution Rate to Original Material
1	4.50	4.59	10 ⁻²
2	3.00	4.24	10 ⁻³
3	2.74	3.74	10 ⁻⁴
4	2.50	4.00	10 ⁻⁵
Original Titer	7.00	6.50

Fig. 2

* : Material of 17 Generation in Exp. 2(exchanged Mice Muscle Tissue Culture on CAM for Egg Culture)
●—● : Mice Passage C Virus
×—× : Egg Passage C Virus
△—△ : Control (contained no Cell)

培養法の2つの手技を併用することにより Egg adapted strain を得る可能性を期待して実験を進めた結果、予期の通り发育鶏卵馴化株を得 virus titer の減少なしに長期間継代することに成功したと思われる所見を得た。即ち Coxsackie Virus(Group A, Type2)の感受性組織であるマウス筋肉組織を Virus 増殖の Intermediate stepとして利用することにより、初めて Egg adapted strain を得ることが出来た。

其際 C.A.M. 上に移された組織自体は大部分发育することなく、時間の推移と共に C.A.M. に包まれ器質化、融解、吸収等が起ると思われるが、一部の組織は生存し、その生存期間中に Virus は増殖し周囲の C.A.M. に流出、伝播されるものと考えられる。かかる作用を繰返し継代することにより Egg adapted strain を得たものと思う。

即ち Host の環境を中間段階を経て徐々に変化させることにより、Virus を始めと異つた Host に adapt させることが可能となつた。

Virus と Host 間には密接な関係がある (Hostrange) と共に, Host を変化させると Virus 其れ自体の組織親和性をも人為的に変えさせることが可能となる所見であり, この事は一定の組織と他の多くの Virus との親和性の関係を論ずるに当つて一つの示唆を与えるものと考えられる。

麻疹の Edmonston strain を发育鶏卵羊膜細胞に馴化させるために, 人羊膜細胞を中間段階として使用した Enders 等 (1957)¹⁴⁾, (1958)¹⁵⁾ の成績とは方法を異にするが著者の実験は, adapt させる為に Intermediate step を置く点に於て, 共通点を見出し, 興味ある成績と思われる。

又 L 細胞に対して Egg adapted strain と Original strain が如何なる態度を示すか, 又 Adult mouse 及び Suckling mouse に対し起病性に如何なる相異を示すか等をも比較検討した結果, 前者即ち L 細胞に対しては Egg adapted strain が Cytopathogenic effect を示さなかつたが Original strain より増殖の傾向が著明であつた。又後者に関しては Egg adapted strain が Suckling mouse に於て発症までの潜伏期間の延長を示すことを証明した。

今後 Cocksackie virus の他の Strain に就ても, 感受性組織或は Adapted cell を利用し发育鶏卵内培養と Virus の性質の変化, 更に Host との関係等に関する実験を進めて行く積りである。

結 論

(1) Cocksackie virus (Group A, Type 2) は成熟マウス筋肉組織を C.A.M. 上に静置した发育鶏卵に接種継代すると, 長期に培養が可能である。

(2) 同培養法により (EM系), 10代以後にマウス筋肉組織を併置せず, 単独发育鶏卵 C.A.M. 継代を行なつたが Suckling mouse に還元接種の結果 MLD₅₀ の低下を来たことなく現在まで 15~20 代継代出来る成績を得た。即ち Group A, Type 2 Cocksackie virus の发育鶏卵馴化株を得ることに成功した。

(3) 成熟マウス腎組織を利用する EK 系培養法に於ては対照卵継代法 (E系) より長期に培養が可能であつたが, この腎組織を用いた培養法では发育鶏卵馴化株を得ることは出来なかつた。

(4) 发育鶏卵馴化株は免疫血清による中和実験により Group A, Type 2 であることを認めた。

(5) 干渉現象実験に於ては各継代系とは無関係に干渉ウイルスである Cocksackie virus が接種時 MLD₅₀ 0

以上の時, 陽性の成績を示した。

(6) 发育鶏卵馴化株は成熟マウスに対する起病性に關しては Original strain との相異を認めなかつたが, Suckling mouse に対しては発症に至るまでの潜伏期間の延長を認めた。

(7) 細胞に於ける態度では両者 (Original strain 及び Egg adapted strain) 共 14 日間の観察及び 4 代継代の観察では Cytopathogenic effect は認められなかつたが, 特に鶏卵馴化株は L 細胞数代にわたり明らかに増殖する所見を得た。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御助言を賜つた奥野良臣教授, 菅井博士, 並に研究室各位に深謝します。

・又血清の分与を賜つた予研福見博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Dalldorf, G. and Sickles, G. M.: An unidentified, filtrable agent isolated from the faces of children with paralysis. *Science*, **108**, 61-62, 1948.
- 2) Dalldorf, G. and Sickles, G. M.: A virus recovered from the faces of "Poliomyelitis" patients pathogenic for suckling mice. *J. Exp. Med.*, **89**, 567-582, 1949.
- 3) Curnen, E. C. and Godenne, M. O.: Propagation of Cocksackie virus on the chorioallantoic membrane of embryonated eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **81**, 81-85, 1952.
- 4) Shaw, M.: Cultivation of Cocksackie virus in embryonated eggs and in chick tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **79**, 718, 1952.
- 5) Huebner, R. J., S. E. Ranson and E. A. Beeman: Studies on Cocksackie virus. Adaptation of a strain to chick embryos. *Publ. Health. Rep.*, **65**, 803, 1950.
- 6) T. Sugai: Studies on the propagation and interference phenomena of Group A Type 2 Cocksackie virus in developing chick embryos. *Med. J. Osaka Univ.*, **8**, 685-694, 1958.
- 7) Slater, E. A. and Syverton, J. T.: The cultivation of Cocksackie virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **74**, 509, 1950.
- 8) Crowell, R. L. and Syverton, J. T.: The viral range in vitro of a malignant, human epithelial cell (Strain HeLa, Gey) IV. The cytopathogenicity of C viruses. *J. Immunol.*, **74**, 169, 1955.
- 9) Sickles, G. M. et al.: Recently classified types of Cocksackie virus, group A. Behavior in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **90**, 529, 1955.
- 10) C. L. Oakley: Chorioallantoic grafts of liver. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **46**, 109-120, 1938.
- 11) Good-

pasture, E. W., Douglas, B. and Anderson, K.: Study of human skin grafted upon the chorioallantois of chick embryo. *J. Exp. Med.*, **68**, 891-904, 1938. 12) Blank, H., Coriell, L. L. and Mc. Nair Scott, T. F.: Human skin grafted upon the chorioallantois of the chick embryo for virus cultivation. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **69**, 341, 1948. 13) C. P. L. M. Schaeffer, and D. B. Nelson: Multiplication of poliomyelitis virus in monkey tissues grafted

onto chorioallantois of chick embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **87** 153, 1954. 14) M. V. Milovanovic, J. F. Enders and A. Mitus: Cultivation of measles virus in human amnion cells and in developing chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **95**, 120, 1957. 15) S. L. Katz, M. V. Milovanovic and J. F. Enders: Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proc. Exp. Biol. and Med.*, **97**, 23, 1958.