

## ラブドウイルス科のフクオカウイルスの赤血球凝集能

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	野田, 雅博 三浦, 潔 山中, 敬三
巻/号	42巻12号
掲載ページ	p. 871-875
発行年月	1989年12月

# ラブドウイルス科のフクオカウイルスの赤血球凝集能

野田雅博\*<sup>1)</sup> 三浦 潔\*<sup>1)</sup> 山中敬三\*<sup>1)</sup> 稲葉右二\*<sup>2)</sup>

(平成元年 9 月 22 日受理)

Hemagglutination with Fukuoka Virus Belonging to the Rhabdoviridae  
MASAHIRO NODA (Higashi-Hiroshima Livestock Hygiene Service Center,  
Prefecture of Hiroshima, Hiroshima 724), KIYOSHI MIURA,  
KEIZOU YAMANAKA and YUJI INABA

## SUMMARY

Five strains of Fukuoka virus which were isolated from biting midges and cattle blood, were tested for hemagglutination (HA). All tested strains agglutinated erythrocytes from geese, chickens, guinea-pigs, mice, sheep and horses at 4°C, 22°C and 37°C. The HA was dependent on the pH of phosphate-buffered saline (PBS) used as the erythrocyte diluent when using borate-buffered saline (pH9.0) with 0.4% bovine serum albumin as the antigen diluent. The optimal pH of the PBS was from 5.4 to 5.8. The HA was not dependent on salt concentration. The HA-inhibiting antibody titers of individual cattle sera showed a significant correlation with their neutralizing titers, the correlation coefficient being 0.967 ( $p < 0.01$ ).

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 42, 871~875 (1989).

## 要 約

ラブドウイルス科に属するウイルスで、ウシヌカカおよびコガタアカイエカから分離されたフクオカ-11株、および牛血液から分離された62-48-21株、61-38-18株、62-102-3株、63-35-2株の計5株のフクオカウイルスについて、赤血球凝集素(HAin)の存在を検討した。その結果、5株のウイルスの感染細胞培養液はいずれもガチョウ、鶏、モルモット、マウス、馬およびヒツジ赤血球を4、22および37°Cで凝集した。赤血球凝集(HA)反応はpH依存性を示し、抗原希釈液として0.4%牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(pH9.0)、および赤血球希釈液としてリン酸緩衝食塩液を用いた場合、pH5.4~5.8で最高のHA価が得られた。また、この反応は塩濃度に影響されなかった。HA反応は免疫血清により特異的に抑制された。野外牛血清の赤血球凝集抑制抗体および中和抗体は相関係数 $r = 0.967$ で、強い相関関係を示した。

われわれは、さきに牛血液から4株のラブドウイルスを分離し、これらは血清学的にフクオカウイルス<sup>5)</sup>と同一のウイルスであることを報告<sup>8)</sup>した。

ラブドウイルス科のウイルス、たとえば狂犬病ウイルス、水胞性口炎ウイルスなどでは、すでに赤血球凝集素(HAin)の存在が明らかにされている<sup>4,7)</sup>。さらに、KANekoら<sup>6)</sup>は牛流行熱(BEF)ウイルス群に属するウイルスのうち、*Tortilla Flat* (CSIRO 368株)ウイルスについて、また、SHORTHOSEら<sup>9)</sup>は*Adelaide River*ウ

イルスについて、それぞれHAinの存在を報告している。

そこで、フクオカウイルスの5株についてHAinの存在を検討したところ、いずれのウイルスもHAinを有していることを明らかにしたので報告する。

## 1. 材 料 と 方 法

### 1) ウ イ ル ス

フクオカウイルスのフクオカ-11、62-48-21、61-38-18、62-102-2および63-35-2株を用いた。ウイルスはHmLu-1細胞の感染細胞培養液をウイルス液とし、使用するまで-80°Cに保存した。なお、フクオカ-11株は農林水産省家畜衛生試験場から分与を受けたもの、ほかの株は当所で分離されたものをそれぞれ用いた。

\*<sup>1)</sup> 広島県東広島家畜保健衛生所(東広島市西条御条町1412-1)

\*<sup>2)</sup> 日本大学農獣医学部(神奈川県藤沢市亀井野1866)

Key Words: ラブドウイルス, HA.

## 2) 培養細胞

主として HmLu-1 細胞を用いた。増殖培養液 (GM) および維持培養液 (MM) は、既報<sup>14)</sup>に準じ調整した。GM に  $3 \times 10^5$  / ml に調整した細胞浮遊液を 500 ml の培養角ビンには 30 ml ずつ、あるいは  $11 \times 100$  mm の試験管には 0.5 ml ずつ分注して、それぞれ 37°C で 2～3 日間静置培養し、単層形成後使用した。これらは、ウイルスの増殖および感染価の測定に用いた。その他、初代培養細胞の牛腎 (BK) 細胞、鶏腎 (CK) 細胞および株化培養細胞の BHK 21 細胞、BEK-1 細胞、MDBK 細胞、Vero 細胞、CPK 細胞、IB-RS-2 細胞、RK-13 細胞、MDCK 細胞を用いた。これらは、ウイルスの増殖試験に用いた。

## 3) 赤血球凝集素の調整

HAin は HmLu-1 細胞の感染細胞培養液を限外濾過法で 1/50 に濃縮して調整した。すなわち、30 ml の単層形成した HmLu-1 細胞を細胞洗浄液<sup>14)</sup>で 3 回洗浄したのち、ウイルスを接種 (moi=0.01) し、37°C で 60 分間吸着した。MM を 30 ml 加え、37°C で 4～6 日間培養した感染細胞培養液を 3,000 × g、15 分間遠心沈殿した上清をウイルス液とした。限外濾過は、ペリコンラボカセットシステム (XX 420 LC, Millipore 社, USA) を用いウイルス液を PT 濾過膜 (PTGC OLC M 2, 分画分子量 100,000, Millipore 社, USA) で連続的に濾過して約 1/50 に濃縮した。なお、ウイルス液は氷水中で冷却しながら濾過を行った。濾過前および濾過後の試料について、それぞれ感染価および赤血球凝集 (HA) 価を測定した。

## 4) 赤血球

主としてガチョウ赤血球を用いた。すなわち、ガチョウ赤血球をリン酸緩衝食塩液 (PBS; 0.15 M NaCl, 0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.2) で 3,000 rpm, 10 分間、3 回遠心洗浄後、CLARKE と CASALS<sup>2)</sup>の方法に準じ調整した PBS (0.1 M NaCl, 0.2 M リン酸緩衝液, pH 5.8) に 0.3% に浮遊した。なお、以下の試験では特に記載しない場合、pH 5.8 の PBS を用いた。その他、牛、馬、ヒツジ、モルモット、マウス、ヒト (B 型) および鶏赤血球を用い、それぞれ上述と同様に処理したのち、所定の濃度に調整した。

## 5) 感染価の測定

ウイルス液を MM で 10 倍階段希釈し、各希釈あたり 4 本のあらかじめ細胞洗浄液で 3 回洗浄した HmLu-1 細胞培養試験管に 0.1 ml ずつ接種した。37°C で 60 分間吸着したのち、MM を 0.5 ml 加え、37°C で 10 日間培養した。感染価は細胞変性効果 (CPE) を観察して、Behrens-Kärber 法により、50% 組織培養感染量 (TCID<sub>50</sub>) / 0.1 ml を算出した。

## 6) 抗血清

フクオカウイルスのフクオカ-11 株、62-48-21 株および BEF ウイルスの YHL 株に対する免疫血清は既報<sup>8)</sup>で用いたモルモット免疫血清を使用した。

## 7) ウイルス増殖試験

単層形成したそれぞれの細胞培養試験管にウイルスを接種 (moi=0.01) し、37°C で 60 分間吸着したのち、細胞洗浄液で 3 回洗浄後、MM を 0.5 ml 加え 37°C で培養した。毎日 4 本の試験管の感染細胞培養液を回収して、これらの感染価および HA 価を測定した。

## 8) 赤血球凝集および赤血球凝集抑制反応

HA および赤血球凝集抑制 (HI) 反応は CLARKE と CASALS<sup>2)</sup>の方法に準じて、マイクロタイター法で行った。すなわち、0.4% 牛血清アルブミン (Fraction V, Armor 社, USA; BSA) を含むホウ酸緩衝食塩液 (0.1 M NaCl, 0.05 M ホウ酸緩衝液, pH 9.0; BBS) を用いて 2 倍階段希釈した HAin; 0.025 ml に BBS を 0.025 ml 加え 0.05 ml とした。PBS (pH 5.8) で 0.3% に調整したガチョウ赤血球浮遊液を 0.05 ml 加え、振とう混和したのち、22°C に 120 分間静置した。判定は HA を示した最高希釈倍数の逆数を HA 価とした。

HI 反応は BBS を用いて 2 倍階段希釈した被検血清 0.025 ml に 4 単位/0.025 ml に調整した HA 抗原 0.025 ml を加え、振とう混和後、4°C で 18 時間反応させた。0.3% ガチョウ赤血球浮遊液を 0.05 ml 加え振とう混和後、22°C で 120 分間静置した。判定は、HA を完全に抑制した血清の最高希釈倍数の逆数を HI 価とした。なお、被検血清は既報<sup>8)</sup>に準じてカリオン処理および赤血球処理を行い供試した。

## 9) 中和試験

既報<sup>8)</sup>に準じて行った。

## 2. 成績

### 1) 各株の感染細胞培養液の赤血球凝集性

フクオカ-11, 61-38-18, 62-48-21, 62-102-2 および 63-35-2 株のそれぞれの感染 HmLu-1 細胞培養液のガチョウ赤血球に対する HA 性を試験した。その結果、いずれの株もガチョウ赤血球を凝集し、HA 価はそれぞれ 16, 16, 32, 16 および 16 倍を示した。なお、PBS の pH は 5.8 である。

### 2) 感染細胞培養液の濃縮

感染細胞培養液の HA 価は低いため、限外濾過法による濃縮を試みた。HA 価 16 および 32 倍を示すフクオカ-11 および 62-48-21 株の感染細胞培養液をそれぞれ 1/50 に濃縮した液の HA 価は 256 および 512 倍を示し、いずれも濃縮前の試料にくらべ 8～16 倍の HA 価の上昇を認めた (表 1)。なお、濃縮前および濃縮後

の試料の感染価はそれぞれ  $10^{6.25}$ ,  $10^{6.25}$  および  $10^{7.0}$ ,  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml であった. したがって, 以下の試験には, これら濃縮 HAin を用いた.

表1 感染培養液の限外濾過法による濃縮

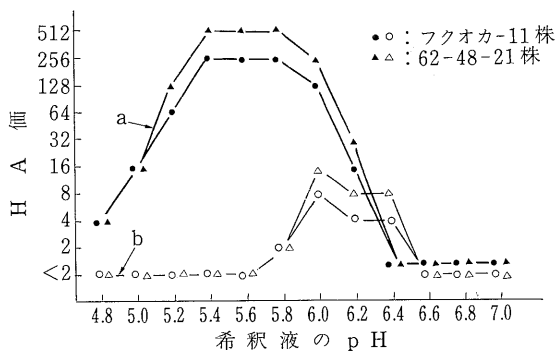
ウイルス株	濃縮前のHA価(感染価)	濃縮率	濃縮後のHA価(感染価)
フクオカ-11	32(6.25)*	1/50	256(7.0)
62-48-21	32(6.25)	1/50	512(7.25)

注) \*: log TCID<sub>50</sub>/0.1 ml

表2 HA 反応に及ぼす希釈液の NaCl のモル濃度の影響

ウイルス株	NaCl のモル濃度	PBS の pH*								
		4.8	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4
フクオカ-11	0.1M	4**	16	64	256	256	256	128	16	<2
	0.15M	4	16	64	256	256	256	128	16	<2
	0.2M	4	16	32	128	128	128	64	16	<2
	0.3M	2	8	32	32	64	64	32	8	<2
	0.4M	2	2	4	16	16	16	2	2	<2
62-48-21	0.1M	4	16	128	512	512	512	256	32	<2
	0.15M	4	16	128	512	512	512	256	32	<2
	0.2M	4	16	64	256	256	256	128	16	<2
	0.3M	2	8	32	128	128	128	32	8	<2
	0.4M	2	4	8	32	32	32	8	4	<2

注) \*: 抗原は BBS で希釈し, これに各種 pH の PBS で調整した赤血球浮遊液を加えた. \*\*: HA 価



a: HA 抗原および赤血球浮遊液は BBS (pH 9.0) および PBS (pH 4.8~7.0) で希釈した  
b: HA 抗原および赤血球浮遊液は同一の PBS (pH 4.8~7.0) で希釈した

図1 HA 反応に及ぼす希釈液の pH の影響

表3 HA 反応に及ぼす各種動物赤血球の影響

血球*	試験数	フクオカ-11株		62-48-21株	
		陽性数	HA 価	陽性数	HA 価
牛	5	0	—	0	—
鶏	3	3	16~32**	3	16~32
ガチョウ	2	2	256	2	512
モルモット	2	2	4~16	2	16~32
馬	1	1	64	1	64
人	1	0	—	1	—
マウス	2	2	4~16	2	4~16
ヒツジ	1	1	16	1	32

注) \*: 0.3% 赤血球浮遊液を PBS (pH 5.8) で調整

\*\* : 22°C における HA 価

### 3) 赤血球凝集反応に及ぼす希釈液の pH の影響

HA 反応に及ぼす希釈液の pH の影響を検討した. フクオカ-11 および 62-48-21 株由来の HAin を BBS を用いて希釈したのち, 種々の pH を示す PBS を用い調整したガチョウ赤血球浮遊液を混合して HA 価を測定した. その結果, HAin は PBS の pH が 4.8~6.2 の間で HA が認められ, HA 価は pH 5.4~5.8 の間で最高となり, それぞれ 256 および 512 倍を示した. いっぽう, HAin および赤血球浮遊液を種々の pH を示す同一の PBS で希釈し, 同様に HA 価を測定した. その結果, フクオカ-11 および 62-48-21 株由来の HAin は pH 5.8~6.4 の間で HA が認められ, HA 価は pH 6.0 で最高となり, それぞれ 8 および 16 倍を示した (図 1).

つぎに, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 および 0.4 M NaCl 液と 0.2 M リン酸緩衝液を用いて種々の pH を示す PBS を調整し HA 反応を行った. その結果, フクオカ-11 株ではいずれのモル濃度の NaCl 液を用いて調整した PBS においても, pH 4.8~6.2 の間で HA が認められ, HA 価は pH 5.4~5.8 の間で最高となり, 0.1 M および 0.15 M では 256 倍, 0.2 M では 128 倍, 0.3 M では 64 倍および 0.4 M では 16 倍を示し, モル濃度の上昇にともない HA 価は低下した. 62-48-21 株でも同様の成績が得られた (表 2). したがって, 以下の試験には 0.1 M NaCl と 0.2 M リン酸緩衝液で pH 5.8 に調整した PBS を用いて赤血球浮遊液を調整した.

### 4) 赤血球凝集反応に及ぼす反応温度の影響

HA 反応に及ぼす反応温度の影響を検討するため, 4°C で 8 時間, 22°C で 2 時間, および 37°C で 2 時間の反応条件で HA 反応を行った. その結果, いずれの反応条件においても HA 価 512 倍を示した. したがって, 以下の試験では 22°C で 2 時間の反応で行った.

### 5) 赤血球凝集反応に及ぼす各種動物赤血球の影響

HA 反応に及ぼす各種動物赤血球の影響を検討するため, 22°C で HA 反応を行った. その結果, ガチョウ赤血球がもっとも高い感受性を示し, フクオカ-11 および 62-48-21 株では, それぞれ 256 および 512 倍の HA 価を示した. また, 鶏, モルモット, マウスおよびヒツジ赤血球も感受性を示したが, ガチョウ赤血球にくらべ 1/8 ~ 1/128 低い HA 価を示した. いっぽ

う、牛およびヒト赤血球はいずれも HA 陰性であった (表 3)。

6) HmLu-1細胞および各種培養細胞におけるウイルスの増殖および赤血球凝集素の産生

表 4 各種培養細胞におけるウイルス (62-48-21 株) の増殖および HAin の産生

培養細胞	CPE	ウ イ ル ス 接 種 後 日 数								
		0	1	2	3	4	5	6	7	
HmLu-1	+	<0.5* <2	2.5 <2	4.5 <2	6.25 16	6.0 32	5.5 32	5.0 32	4.75 32	
BHK21	+	<0.5 <2	<0.5 <2	2.25 <2	3.5 8	4.5 16	5.25 32	5.0 32	4.5 32	
Vero	+	<0.5 <2	3.75 <2	5.75 <2	6.25 16	5.5 32	5.25 32	5.25 32	5.0 32	
BEK-1	-	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	
MDBK	-	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	1.5 <2	1.75 <2	1.75 <2	1.5 <2	1.5 <2	
CPK	-	<0.5 <2	<0.5 <2	1.25 <2	2.25 <2	2.25 <2	2.5 <2	2.5 <2	2.5 <2	
IB-RS-2	-	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	1.25 <2	2.0 <2	2.5 <2	
RK-13	-	<0.5 <2	1.5 <2	2.5 <2	3.5 <2	4.0 <2	4.25 <2	3.75 <2	3.5 <2	
MDCK	-	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	
BK	-	<0.5 <2	<0.5 <2	1.0 <2	1.25 <2	2.25 <2	3.25 <2	3.0 <2	3.0 <2	
CK	-	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	<0.5 <2	1.0 <2	1.25 <2	1.25 <2	1.0 <2	

注) \*: 上段 (感染価 log TCID<sub>50</sub>/0.1 ml) 下段 (HA 価)

表 5 免疫血清に対する HI 反応

抗 原	抗 血 清					
	フクオカ-11株		62-48-21株		YHL株	
	免疫前	免疫後	免疫前	免疫後	免疫前	免疫後
フクオカ-11株	<10	320	<10	320	<10	<10
62-48-21株	<10	320	<10	320	<10	<10
61-38-18株	<10	160	<10	160	<10	<10
62-102-2株	<10	160	<10	320	<10	<10
63-35-2株	<10	160	<10	160	<10	<10

HmLu-1 細胞における 62-48-21 株の増殖および HAin の産生を調べた。その結果、感染価はウイルス接種 3 日後に最高となり、10<sup>6.25</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 ml を示し、その後、日数の経過とともに低下した。いっぽう、HAin の産生はウイルス接種 3 日後から認められ、4 日後に最高となり、HA 価 32 倍を示し、この値は 7 日後まで持続した。

その他、各種培養細胞におけるウイルスの増殖および HAin の産生を調べた。その結果、BHK 21 および Vero 細胞においてウイルスは CPE をともなってよく増殖し、感染価はウイルス接種 5 および 3 日後に最高となり、それぞれ 10<sup>6.25</sup> および 10<sup>6.25</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 ml を示した。HAin の産生は、ウイルス接種 3 日後から認められ、4 および 5 日後に最高となり、HA 価はいずれも 32 倍を示した。RK-13, MDBK, CPK, IB-RS-2, BK および CK 細胞においてもウイルスの増殖は認められたが、いずれも HAin は産生されなかった。また、BEK-1 細胞ではウイルスは増殖しなかった (表 4)。

7) 免疫血清の赤血球凝集抑制抗体と中和抗体の関係

フクオカ-11, 62-48-21 および BEF ウイルスの YHL 株免疫血清を用いて HI 反応を行った。

フクオカ-11, 62-48-21, 61-38-18, 62-102-2 および 63-35-2 株の HAin はフクオカ-11 および 62-48-21 株免疫血清に対して、320, 320, 160, 160, 160 および 320, 320, 160, 320, 160 倍の HI 価を示し、特異的に HA が抑制された。いっぽう、BEF ウイルス YHL 株免疫血清に対しては、いずれの株もすべて HI 価 < 10 を示した (表 5)。なお、フクオカ-11, 62-48-21 および YHL 株免疫血清のそれぞれのホモウイルスに対する中和抗体価は、512, 512 および 512 倍である。

8) 赤血球凝集抑制抗体と中和抗体の相関関係 広島県内で飼養されている牛から無作為に採材された

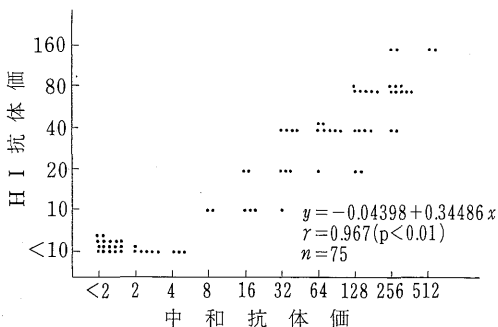


図 2 HI 抗体価と中和抗体価の関係

血清 75 例を用いて, HI 抗体価および中和抗体価を測定し, 両者の相関関係を検討した. その結果, 両者は  $\gamma = 0.967$  ( $p < 0.01$ ) で強い相関関係が認められた (図 2).

### 3. 考 察

これまでラブドウイルス科に属するウイルスのうち, リッサウイルス属の狂犬病ウイルス, ベジキュロウイルス属の水胞性口炎ウイルスなどにおいて HAin の存在が報告<sup>4,7)</sup>されている.

われわれは, さきに牛血液から 4 株のラブドウイルスを分離し, これら 4 株のウイルスはホシヌカカ (*Culicoides punctatus*) およびコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) から分離されているフクオカウイルスと同一のウイルスであることを報告<sup>8)</sup>した. そこで, これらウイルスの HAin について種々検討した. その結果, 供試したフクオカウイルスのフクオカ-11 株およびわれわれが分離した 4 株 (62-48-21, 61-38-18, 62-102-2 および 63-35-2 株) のウイルスにはいずれも HAin が存在した.

HA 反応は pH 依存性で成立した. すなわち, CLARKE と CASALS<sup>2)</sup>らの報告に準じ, 抗原希釈液として 0.4% BSA 加 BBS, 赤血球希釈液として pH 5.4 ~ 5.8 の PBS を用いた場合, 最も高い HA 価が得られた. いっぽう, 抗原および赤血球希釈液として同一の PBS を用い HA 反応を行ったところ, pH 5.8 ~ 6.4 の間で HA 反応は成立したが, 得られた HA 価は上述の方法にくらべ 1/32 低い価であった.

KANEKO ら<sup>6)</sup>は Tortilla Flat ウイルスの HA 反応は抗原希釈液として 0.4% 加 BBS, 赤血球希釈液として PBS を用い行ったときに成立し, その PBS の至適 pH は 5.2 ~ 5.8 であったこと, また抗原および赤血球希釈液として PBS のみを用いた場合は HA は成立しなかったことを報告している.

赤血球希釈液に用いる PBS の NaCl のモル濃度を 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 および 0.4 M の濃度で調整し, HA 反応を行ったところ 0.1 および 0.15 M 濃度が最適であった. Tortilla Flat ウイルスの HA 反応において同様のことが報告<sup>6)</sup>されている. いっぽう, 狂犬病ウイルスやオルビウイルス属およびブニヤウイルス属の HA 反応において, pH および塩濃度依存性で HA 反応は成立することが報告されている<sup>1,3,10,11,12,13)</sup>.

感染細胞培養液を限外濾過法により 1/50 量に濃縮した試料の HA 価は濃縮前の試料にくらべ HA 価は 8 ~ 16 倍上昇した.

HA 反応は 4, 22 および 37°C のいずれの反応温度においても成立した. Tortilla Flat ウイルスにおいても

同様のことが報告<sup>6)</sup>されている. いっぽう, 狂犬病ウイルスにおいては HA 反応は 22 および 37°C の反応温度では成立しない<sup>7)</sup>.

HAin はガチョウ, 鶏, モルモット, マウス, 馬およびヒツジ赤血球をよく凝集し, とくにガチョウ赤血球をよく凝集したが, 牛およびヒト (B 型) 赤血球は凝集しなかった.

ウイルスは HmLu-1 細胞においてよく増殖し, HAin はウイルス接種 3 日後から感染細胞培養液中に産生され, その HA 価は 4 日後に最高値 32 倍を示し, 7 日後まで持続した. そのほか, ウイルスは BHK 21 および Vero 細胞でもよく増殖し HAin も産生された.

5 株のウイルスの HAin はフクオカ-11 および 62-48-21 株免疫血清により特異的にその HA は抑制された.

牛血清の HI 抗体と中和抗体は相関係数  $\gamma = 0.967$  で強い相関関係が認められ, HI 反応は抗体測定の一手法として有用と思われる.

### 引用文献

- 1) BEATY, B. J., SHOPE, R. E., CLARKE, D. H.: *J. Clin. Microbiol.*, 5, 548~550 (1977).
- 2) CLARKE, D. H. and CASALS, J.: *Am. J. Trop. Med.*, 7, 561~573 (1958).
- 3) GOTO, Y., INABA, Y., KUROGI, H. et al.: *Vet. Microbiol.*, 1, 449~458 (1976).
- 4) HALONEN, P. E., MURPHY, F. A., FIELDS, B. N., et al.: *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.*, USA, 127, 1037 (1968).
- 5) KANEKO, N., INABA, Y., AKASHI, H., et al.: *Aust. Vet. J.*, 63, 29 (1986).
- 6) KANEKO, N., INABA, Y., AKASHI, H., et al.: *Vet. Microbiol.*, 11, 1~11 (1986).
- 7) KUWERT, E., WIKTOR, T. J., SOKOL, F., et al.: *J. Virol.*, 2, 1381~1392 (1968).
- 8) 野田雅博, 山下秀之, 三浦 潔, ほか: 日獣会誌, 42, 549~555 (1989).
- 9) SHORTHORSE, J., KANEKO, N., AKASHI, H., et al.: *Aust. Vet. J.*, 63, 236 (1986).
- 10) TOKUHISA, S., INABA, Y., MIURA, Y., et al.: *Arch. Virol.*, 69, 291~294 (1981).
- 11) TOKUHISA, S., INABA, Y., MIURA, Y., et al.: *Arch. Virol.*, 70, 75~78 (1981).
- 12) TOKUHISA, S., INABA, Y., SATO, K.: *Vet. Microbiol.*, 7, 177~181 (1982).
- 13) TOKUHISA, S., INABA, Y., MIURA, Y., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45, 15~21 (1983).
- 14) 山下秀之, 原 元宣, 野田雅博, ほか: 日獣会誌, 39, 774~780 (1986).