

日本 새매 (*Accipiter virugatus gularis*) 로부터 分離된 Paramyxovirus 에 대한 單 Clone 性 抗体

見上 彪 外 3 人
(日本 北海道大學 獸医科)

Monoclonal Antibodies Against a Paramyxovirus Isolated from Japanese Sparrow-Hawks (*Accipiter virugatus gularis*)

Hoshi, S. T. Mikami, M. Onuma and H. Izawa

(Faculty of Veterinary Medicine
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

SUMMARY

Monoclonal antibodies against Taka virus, a variant of Newcastle disease virus (NDV), were produced to compare the antigenicities of several avian paramyxoviruses including NDV. It was also used to study the active site(s) of haemagglutinin (HA) and neuraminidase activities of NDV.

Five independent hybrid cell lines, which produced monoclonal antibodies against haemagglutinin-neuraminidase (HN) molecule of Taka virus, were established. From the results of the cross haemagglutination-inhibition (HI) test the monoclonal antibodies, the HN molecule of Taka virus seemed to have at least three different antigenic determinants; one was specific for all NDV strain tested, the second was only for Taka virus and the third was for Taka virus, Bangor and Yucaipa. Furthermore the differences in the ratio of HI to neuraminidase-inhibition titers suggested that the active sites involved in HA and neuraminidase activities might be different from each other. However, since each of five monoclonal antibodies was not especially specific for either HA or neuraminidase, the possibility that a single active site on the HN molecule may be responsible for both activities has not been excluded.

日本 새매 (*Accipiter Virugatus Gularis*) 로부터 분리된 NDV 變異形의 하나인 Taka바이러스는 NDV 와 血清學的으로 관련이 있는 것으로 알려졌고 (Arias-Ibarrondo 등, 1978 a, b) 빨리 解離되는 NDV 株로 특징지어졌다. (Sekizak; 등, 1981, 1982)

NDV를 포함하는 Paramyxovirus (PMV)는 많은 種類의 鳥類에서 분리되었으며 PMV 1에서 PMV 6 (그리고 未分類群)까지 血清學的으로 구분할 수 있는 6개 (또는 7개)의 群으로 나뉘어졌다. (Alexander, 1980). 그러나 HI 반응시험과 血清中和試驗에 의한 이 그룹간의 交叉反應의 程度는 다양한 것으로 報告되었다 (Smit와 Rondhuis, 1976; Kessler 등, 1979; Nerome 등, 1978; Arias-Ibarrondo 등, 1978a, b; Hirai 등, 1979). 대조적으로 몇몇 著者들은 이러한 바이러스들이 명백히 아무런 抗原的인 聯關性이 없는 것으로 報告했다 (Alexander, 1974; Alexander와 Chettle, 1978; Kessler 등, 1979; McFerran 등, 1974; Shortridge 등, 1980).

NDV 株들과 심지어는 몇몇 NDV 株의 Clone 중에서도 닭 赤血球로 부터의 HA 解離樣相에 있어서 몇가지 중대한 차이점이 있음이 報告되었다 (Spalatin 등, 1970). PMV-1에 속하는 NDV 株들은 닭에 대한 病原性에 있어 매우 多樣했으나 일반적으로 HI 試驗에서 보여주는 交叉相關關係의 바탕에서 보면 血清學的으로 同類種 (homologous)의 그룹으로 看做된다. 그러나 中和試驗이나 免疫擴散法을 이용했을 때 약간의 抗原性的 差異가 報告되었다 (Granoff, 1959; Macpnerson과 Swain, 1956; Pennington, 1978; Upton 등, 1953).

Paranyxovirus의 外膜 (envelope)은 2개의 糖蛋白質 (glycoprotein)을 함유하고 있다 (HN 과 F). HN 糖蛋白質은 HA 能과 neuraminidase 能의 原因이 되고 (Scheid 등, 1972; Scheid와 Choppin, 1973; Shimizu 등, 1974; Tozawa 등, 1973) F 糖蛋白質은 바이러스의 浸透, 細胞融合, 溶血能과 關聯이 있다 (Honma와 Ohuchi, 1973; Scheid와 Choppin, 1974a). HA 能과 neuramidase 能에 있어서의 活性部位는 꼭 같은 HN 분자위에 있는 것으로 믿어진 다 (Scheid와 Choptm, 1974b). 最近 Portner (1981)는 Sendai 바이러스의 HA 能과 neuraminidase 能과 관련되는 HN 분자에는 확실히 두 개의 다른 部位가 있다고 報告했다.

Köhler와 Milstein (1975)은 Polyethylene glycol

(PEG) 仲介性 (mediated) 細胞融合에 의한 면양 赤血球에 대한 單clone性 抗體의 產生을 報告했다. 이 기법으로써, 抗原決定因子에 있어서의 아미노산 變化를 檢出할 수 있는 單特異性 抗體는 많은 數를 檢出하는 데 유용하였으며 이런 사실에서부터 單特異性 抗體가 다양한 분야에서 이용되고 있다. 이 技法은 다른 대량의 決定因子들에 의해 기존 면역형성이 은폐되는 미량의 抗原決定因子에 대한 抗體를 얻는데 유리하다. 그러므로 NDV 에 대한 單clone性 抗體의 이용은 NDV 株들간의 어느 정도의 血清學的 鑑別에 유용할 것 같다.

Taka 바이러스에 대한 單clone性 抗體를 이용한 現 實驗의 목적은 몇몇 NDV 株들간의 血清學的 關係를 연구하고 HA 能과 neuraminidase 能과 聯關된 HN 분자 위의 活性部位를 조사하는 데 있다.

血清學的 分析에 사용된 바이러스는 Taka 바이러스 (NDV의 變異形), Sato (Velogenic), Miyadera (mesogenic), NDV의 Hitchner B₁ 株 (lentogenic), Yucaipa/chicken/California/60 (Yucaipa), Bangor/finch/N. Irel-and/73 (Bangor), turkey/Winsconsin/68 (Ty/Wis), dove/Tennessee/4/75 (dove tenn), duck/Mississippi/320/75 (dk/Miss), Duck/Hong kong/199/77 (dk/HK/199), Pigeon/Otaru/76 (P/Otaru)였다. Taka 바이러스, NDV, Yucaipa를 제외한 이 바이러스들은 친절하게도 Dr. H. Kida 가 제공해 주었다. (Department of Hygiene and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University). 모든 標準바이러스는 11일령 鷄胎兒의 尿膜腔 內에서 增殖시켰다. 바이러스 純化는 전에 기술한 대로 (Sekizaki 등, 1982) 행하였으며 바이러스 蛋白質은 Lowry 등 (1951)의 方法에 의해 標準蛋白質로서 소血清알부민 (BSA)을 사용하여 決定하였다.

單clone性 抗體 產生을 위해 7주에서 10주령의 BALB/C 마우스를 補佐劑 (complete Freund's adjuvant)로 현탁화된 純化 Taka 바이러스 蛋白質 50 μ g으로 皮下免疫시켰으며, 2주 후에 다시 바이러스 蛋白質 100 μ g을 皮下接種하였다. 2주 후에 마우스의 腹腔내로 同量의 바이러스를 補強接種하였으며 3~5일 후 細胞融合을 위해 회생시켰다. 脾臟細胞는 Nowinski 등 (1979)이 기술한 대로 50% PEG-1000의 존재하에 P3 \times 63Ag 8. 653系統의 마우스 骨髓腫細胞 (myeloma

cell)와 融合되었으며 다시 microtiter 판에 나뉘어졌다. 交雜細胞는 10~14 일동안 매 2~3 일 간격으로 HAT 배지로써 배지교환을 되풀이하여 선발하였다. HAT 배지는 15%의 열처리 不活化된 송아지 胎兒血清, 페니실린, 스트렙토마이신, Fungizone, 1.0×10^{-4} M hypoxanthine, 4.0×10^{-7} M aminopterin, 1.5×10^{-8} M thymidine, 3.0×10^{-4} M 옥살로초산, 5×10^{-8} M 2-mercaptoethanol (2-ME)을 함유하는 Dulbecco's modified eagle's medium으로 이루어져 있다. 이 選拔이 끝나면 여러가지의 뚜렷한 交雜細胞集落이 배양상으로 명확해진다. 이 細胞集落으로부터의 培養液은 Taka 바이러스에 대한 抗體의 존재를 알아보기 위하여 LISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)와 HI 시험으로 豫備 檢査하였다.

血球凝集反應과 血球凝集抑制反應(HI) 試驗은 microtiter法으로 축소량으로 행하였다(Sever, 1962) neuraminidase 力價檢定과 NI 試驗은 세계보건기구(WHO)에서 추천한 方法에 따라 基質로서 fetuin을 사용해서 하였다.(Aymard Henry 등 1973). 한천 겔 沈降反應(AGP) 試驗은 전에 기술한 바에 따라 행하였다(Sekizaki 등, 1982). ELISA는 다음과 같이 수정하여 Voller 등(1976)과 Kearney 등(1979)의 方法에 따라 하였다. PH 9.6인 0.05M 탄산염 완충용액중의 純化된 Taka 바이러스는 96 fl (Well)을 가진 microtiter plate(Nunc, $0.5 \mu\text{g}$ viral protein/well)에 흡착시켜 공기로 건조시켰다. 1% BSA 100ml를 더하여 37°C에서 1시간 작용시켜 플라스틱 표면위의 反應하지 않은 部位를 차단한 다음, 각 孔은 0.05% Tween20 200 μl 로 세 번 씻고 交雜細胞集落으로부터의 각 培養液 50 μl 를 더하여 37°C에서 1시간동안 培養시킨 후 0.1% BSA 200 μl 로 네 번 씻었다. 抗-마우스 I_gG (1:1000 희석)로 표시된 alkaline phosphatase (Sigma, type VII-S) 50 μl 로써 37°C에서 1시간동안 반응시킨 다음 각 孔을 씻어 결합되지 않은 抗-마우스 I_gG를 제거하고 거기에 基質溶液(5% Na₂CO₃·10H₂O, 0.25% NaHCO₃, 1 mM Mg Cl₂를 함유하는 PH 9인 2.5mM P-mitrophenyl phosphoricacidin 0.05M 탄산염 완충용액) 200 μl 를 더했다. 酵素-基質反應은 37°C에서 행해졌다. 吸収量(OD 405)은 Titertek multiscan으로 측정했

다. Taka 바이러스 HN 분자에 대한 單clone性抗體의 特異性を 증명하기 위해 바이러스 溶解質과 함께 免疫沈降反應을 다음과 같이 행하였다. 붕괴된 Taka virion(室溫에서 2% Triton X-100으로 20분간 처리된 純化 Taka 바이러스)을 37°C에서 30분간 腹腔液과 작용시켰다. 이 혼합물은 미리 PH 8.0으로 조정된 Protein A Sepharose cl 4B (Pharmasia Fine Chemicals, Uppsala)에 더해져 室溫에서 가끔 흔들어주면서 2시간동안 培養하였다. 결합되지 않은 物質을 제거하기 위해 PH 8.0인 0.01M 磷酸緩衝液으로 반복하여 씻었다. 2-mercaptoethanol (2-ME)에 의해 환원되었거나 그렇지 않은 침전물은 7.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polycrylamid gel: (PAGE)에서 電氣泳動에 의해 分析하였다. 대조로서, Protein A Sepharose 4B와 더해진 腹腔液이나 바이러스 溶解質의 反應混合物도 이와같이 分析하였다.

380集落以上으로부터, 培養液이 Taka 바이러스 抗體의 존재유무를 위해 4개의 實驗에 있어 시험되었고 이것들 중 30개가 ELISA와 HI 시험에 의해 陽性으로 판명되었다. minicloning 후 制限稀釋 方法(limiting dilution method)에 의해 cloning하여 5개의 독립된 細胞系統(No. 1에서 No. 5)이 確立되었고 현재의 研究에 사용되고 있다. 각 交雜細胞系統으로부터 농축된(10배) 培養液을 한천 겔 沈降反應에 의해 마우스 免疫글로블린 綱(Class)과 亞綱(Subclass)에 特異的인 抗血清으로 시험하였을 때, clone No. 4는 I_gG_{2a}(K)의 免疫글로블린을 產生하였고 다른 것들은 I_gG₁(K)를 產生하였다.

각각의 交雜細胞가 腹腔液 生産을 위해 pristan-primed BALB/C 마우스에 주사되었다. Taka 바이러스 구성물에 대한 單clone性 抗體를 가지고 있는 각각의 腹腔液의 特異성을 免疫沈降法으로 檢査하였을 때 그것들 모두가 Taka 바이러스의 HN 분자에 대해 特異的이라는 것이 증명되었다. 비환원상태의 SDS-PAGE 分析에 있어서는 I_gG 뿐만 아니라 HN 분자, 아마도 I_gG의 非重合性 分子인 heavy chain과 light chain의 少量, 그리고 대조군에서도 관찰될 수 있는 蛋白質들을 電氣泳動시켰다. 환원상태에 있어서는 I_gG의 heavy chain과 light chain뿐만 아니라 HN 분자, 그리고 대조군에

있는 蛋白質들을 電氣泳動시켰다.

同種類의 (homologous) 바이러스와 異種의 (heterologous) 바이러스를 사용한 HI시험과 NI 시험을 위해서 腹腔液을 사용하였다. Taka 바이러스의 HA能和 Neuraminidase能은 5개 clone의 모든 腹腔液에 의해 抑制되었다(表 1.2).

交叉血球凝集抑制反應에 의하면 clone No. 1에서 No. 3으로써 얻어진 腹腔液은 다른 NDV株뿐만 아니라 Taka바이러스와도 꼭 같은 정도로 반응하였으나 다른 paramyxovirus와는 반응하지 않았다. clone No. 5로써 얻어진 腹腔液은 오직 Taka 바이러스와만 반응하고 Clone No. 4의 것은 Taka

바이러스, Bangor, Yucaipa(表 1)와 반응하였다. 腹腔液의 HI力價는, 배양액의 力價와 꼭 같은 clone No. 4를 제외하고는, 培養液의 力價보다 수백 이상이나 높았다. (資料는 보이지 않음). 交叉 NI 시험을 위해 Taka 바이러스, Miyadera株, Ty/wis, 그리고 Bangor이 사용되었다. 交叉(NI 시험)의 결과는 근본적으로 交叉血球凝集抑制試驗의 결과와 일치하였다(表 2). 이 결과는, Taka 바이러스 HN糖蛋白質의 抗原決定因子가 적어도 3群으로 나누어 질 수 있는데 그 중 하나는 시험된 NDV株 중의 공통된 것이고 하나는 Taka바이러스에 대해서만 特異的이며 나머지 Bangor와 Yucaipa에만 공

Table 1. Cross haemagglutination-inhibition tests for monoclonal antibodies to Taka virus with various strains of avian paramyxovirus

Virus	HI titer of ascitic fluid from mice inoculated with each hybridoma				
	Clone No. 1	Clone No. 2	Clone No. 3	Clone No. 4	Clone No. 5
Taka	1,024 ¹⁾ (16,224)	1,024 (64,896)	1,024 (64,896)	64 (64)	1,024 (2,048)
NDV-Sato	512	1,024	1,024	< 2	< 2
NDV-Miyadera	512	512	1,024	< 2	2
NDV-B1	512	2,048	512	< 2	2
Yucaipa	< 2	< 2	< 2	32	< 2
Bangor	< 2	< 2	< 2	64	< 2
Ty/Wis	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Dk/Miss	< 2	< 2	< 2	2	2
Dove/Tenn	< 2	< 2	< 2	< 2	2
Dk/HK/199	< 2	< 2	2	2	< 2
P/Otaru	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

1) Except ascitic fluid from mice inoculated with clone No. 4, the fluid was diluted with phosphatbuffered saline for adjusting the HI titer of 1:1024 to Taka virus before testing for another paramyxovirus. The numbers in parenthesis are HI titers of undiluted ascitic fluids of each clone.

Table 2. Cross neuraminidase-inhibition tests for monoclonal antibodies to Taka virus with 4 different avian paramyxoviruses

Virus	NI titer of ascitic fluid from mice inoculated with each hybridoma				
	Clone No. 1	Clone No. 2	Clone No. 3	Clone No. 4	Clone No. 5
Taka	1,000 ¹⁾	1,200	2,500	70	250
NDV-Miyadera	150	3,500	1,500	< 1	< 1
Bangor	< 1	< 1	< 1	4	< 1
Ty/Wis	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

1) NI titer expressed as the reciprocal of the ascitic fluid causing 50% inhibition of neuraminidase activity

통적인 것이라는 것을 시사하고 있다. 이 결과는 또한 單clone性 抗体를이용한 交叉血球凝集抑制反應이, 既存免疫血清으로는 워낙 微量의 決定 認子에 대한 抗体여서, 大量의 決定因子에 대한 抗体에 의해 은폐될 수도 있어 抗原性的 差異가 檢出 안 될 지도 모르는 NDV를 grouping하는데 사용될 수 있는 可能性을 시사하고 있다.

Taka 바이러스의 HA 反應은 특히 온도에 依存的이었다. 4℃에서 시험하였을 때는 일정한 HA 反應이 관찰되었지만은 室温(25℃)이나 37℃에서는 그렇지 못하였다. 이 현상은 PH 7.2의 조건하에서, 바이러스의 neuraminidase 능이 높기 때문인 것으로 보여진다(Sekizaki 등, 1981). 鷄胎兒 纖維牙細胞에서 形成되는 Taka 바이러스의 plague는 크기가 균일하지 않았다(Sekizaki 등, 1982) 2개의 clone이 plague로부터 分離되었다. 하나는 오직4℃에서만 HA 反應을 보였고(L⁺R⁻) 다른 하나는4℃와 室温 양쪽에서 反應을 보였다(L⁺R⁺). neuraminidase와 HA 力價의 比率를 比較했을 때 L⁺R⁻Taka 바이러스의 比率이 L⁺R⁺ Taka 바이러스와 NDV-B₁株보다 훨씬 높았다(Sekizaki 등, 1981). 닭 赤血球로부터의 解離率 또한 L⁺R⁻ Taka 바이러스가 L⁺R⁺ Taka 바이러스와 NDV-B₁株의 解離率보다 빨랐다. 지금까지의 研究에서는 Taka 바이러스의 血球凝集素 또는 neuraminidase에 대해서만 特異적인 單clone性 抗体를 產生하는 交雜種을 얻을 수는 없었다. Sendai 바이러스의 單clone性 抗体에 대해서도 결과는 비슷했다(Portner, 1981). 이 결과는 HA 能과 neuraminidase 能과 聯關되는 部位가 아주 가깝게 밀접되어 있음을 나타내고 있을

수도 있다. 따라서 이 두 개의 活性部位에 대한 考察은 결정적으로 해결되지는 않았다. 그러나 Portner(1981)는 최근 Sendai 바이러스와 NDV의 糖蛋白質의 HA 能과 neuraminidase 能은 2개의 별개의 分子部位를 가진다는 개념을 기술했다. 이것은 다음과 같은 분석에 근거한 것이다; 1) 血球凝集反應이나 宿主細胞에 대한 부착력에 결합이 있는 Sendai 바이러스 溫度感受性(ts) 變異株는 neuraminidase 能에 대해서는 溫度感受性이 없었으며 2) HN 蛋白質에 대한 單clone性 抗体의 존재하에 選拔된 Sendai 바이러스의 몇몇 抗原性 變異株는 HA 能은 抑制되었으나 抗体와 함께 neuraminidase 能에 있어서는 抑制되지 않았고 3) N-acetyl neuramic acid(10⁻⁴M)의 類似體는 Sendai 바이러스와 HDV의 neuraminidase 能은 抑制하였으나 HA 能은 어느 쪽 바이러스에서도 抑制시키지 못했다. 우리의 研究에서는, Taka 바이러스에 대한 5개 腹腔液의 HI 力價對 NI 力價의 比率는 제각기 매우 달랐으며 clone No. 4의 경우 특히 그러했다. 게다가 Taka 바이러스와 NDV-Miyadera에 대한 3개의 다른 單clone性 抗体(Clone No. 1~No. 3)의 HI 力價는 비슷했으며 Taka 바이러스에 대한 NI 力價들도 비슷했다; 그러나 NDV-Miyadera에 대한 clone No. 1의 單clone性 抗体의 NI 力價는 다른 2개 單clone性 抗体의 力價보다는 상당히 낮았다. 單clone性 抗体에 依해 選拔된 抗原性 變異株를 사용한 分析은 해 보지 않았지만 現在나 앞으로의 결과는 우리들로 하여금 NDV의 HA 能과 neuraminidase 能의 活性部位가 서로 다르지 않을까 하는 事實을 추측케 한다.

參 考 文 獻

1. Alexander, D. J. (1974). Comparison of the neuraminidase of thress avian paramyxoviruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 44, 28-34.
2. Alexander, D. J. (1980). Avian paramyxoviruses. *Veterinary Bulletin* 50, 737-752.
3. Alexander, D. J. & Chettle, N. J. (1978). Relationship of parakeet/Netherlands/449/75 virus to other paramyxoviruses. *Research in Veterinary Science* 25, 105-106.
4. Arias-Ibarrondo, J., Mikami, T., Yamamoto, H. Furusta, Y., Ishioka, S., Okada, K. & Sato, G. (1978a). Studies on a paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-hawks (*Accipiter virgatus gularis*) I. Isolation and characterization of the virus. *Japanese Journal of Veterinary Science* 40, 315-323.

5. Arias-Ibarrondo, J., Onuma, M. & Mikami, T. (1978b). Studies on a paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-hawks (*Accipiter virgatus gularis*) II. Serology and pathogenesis in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science* 40, 682-689.
6. Aymard-Henry, M., Coleman, M. T., Dowdle, W. R., Laver, W. G., Schild, G. C. & Webster, R. G. (1973). Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bulletin of the World Health Organization* 48, 199-202.
7. Granoff, A. (1959). Studies on mixed infection with Newcastle disease virus. I. Isolation of Newcastle disease virus mutants and test for genetic recombination between them. *Virology* 9, 636-648.
8. Hirai, K., Hitchner, S. B. & Calnek, B. W. (1978). Characterization of paramyxo-, herpes-, and orbiviruses isolated from psittacine birds. *Avian Diseases* 23, 148-163.
9. Homma, M. & Ohuchi, M. (1973). Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structure difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *Journal of Virology* 12, 1457-1465.
10. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *Journal of Immunology* 123, 1548-1550.
11. Kessler, N., Aymard, M. & Calvet, A. (1979). Study of a new strain of paramyxoviruses isolated from wild ducks: Antigenic and biological properties. *Journal of General Virology* 43, 273-282.
12. Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
13. Laver, W. G., Gerhard, W., Webster, R. G., Frankel, M. E. & Air, G. M. (1979). Antigenic drift in type A influenza virus: Peptide mapping and antigenic analysis of A/P PR/8/34 (HONI) variants selected with monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
14. Laway, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
15. Macpherson, L. W. & Swain, R. H. A. (1956). Strain differences in Newcastle disease virus. *Journal of Hygiene* 54, 234-245.
16. McFerran, J. B., Conner, T. J., Allan, G. M. & Adair, B. (1974). Studies on a paramyxovirus isolated from a *Archiv für die Gesamte Virusforschung* 46, 281-290.
17. Nerome, K., Nakayama, M., Ishida, M. & Fukumi, H. (1978). Isolation of new avian paramyxovirus from budgeriger (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of General Virology*. 38, 293-301. Nowinski, R. C., Lostrom, M. E., Tam, M. R., Stone, M. R. & Burnette, W. N. (1979). The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the P 15(E) Protein of ecotropic murine leukemia virus. *Virology*, 93, 111-126.
18. Pennington, T. H. (1978). Antigenic differences between strains of Newcastle disease virus. *Archives of Virology* 56, 345-351.
19. Portner, A. (1981). The HN glycoprotein of Sendai virus: Analysis of site(s) involved in hemagglutinating and neuraminidase activities. *Virology*, 115, 375-384.
20. Scheid, A. & Choppin, P. W. (1973). Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *Journal of Virology* 11, 263-271.
21. Scheid, A. & Choppin, P. W. (1974a). Identification of biological activities of paramyx paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of
22. Sendai virus. *Virology*, 57, 475-495.

23. Scheid, A. & Choppin, P. W. (1974b). The hemagglutinating and neuraminidase protein of a paramyxovirus: Interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology* 62, 125-133.
24. Scheid, A., Caligiuri, L. A., Compans, R. W. & Choppin, P. W. (1972). Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with larger SV5 glycoprotein. *Virology* 50, 640-652.
25. Schortridge, K. F., Alexander, D. J. & Collins, M. S. (1980). Isolation and properties of viruses from poultry in Hong Kong which represent a new (sixth) distinct group of avian paramyxoviruses. *Journal of General Virology* 49, 255-262.
26. Sekizaki, T., Izawa, H., Onuma, M. & Mikami, T. (1981). Studies on a paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-hawks (*Accipiter virugatus gularis*). III. Neuraminidase activity of the virus. *Archives of Virology* 69, 301-305.
27. Sekizaki, T., Izawa, H., Onuma, Mikami, T. (1982). Studies on a paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-hawks (*Accipiter virugatus gularis*). IV. Hemagglutinating activity of two clones of the virus. *Japanese Journal of Veterinary Science* 44, 275-282.
28. Sever, L. T. (1962). Application of a microtechnique to viral serological investigations. *Journal of Immunology* 88, 354-360.
29. Shimizu, K., Shimizu, Y. K., Kohama, T. & Ishida, N. (1974). Isolation and characterization of two distinct types of HVJ (Sendai virus) spikes. *Virology* 62, 90-101.
30. Smit, T. & Rondhuis, P. R. (1976). Studies on a virus isolated from the brain of a parakeet (*Neophema* sp.). *Avian Pathology* 5, 21-30.
31. Spalatin, J., Hanson, R. P. & Beard, P. D. (1970). The hemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 14, 542-549.
32. Tozawa, H., Watanabe, H. & Ishida, N. (1973). Structural components of Sendai virus. Serological and physicochemical characterization of hemagglutinin subunit associated with neuraminidase activity. *Virology* 55, 242-253.
33. Upton, E., Hanson, R. P. & Brandly, C. A. (1953). Antigenic differences among strains of Newcastle disease virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84, 69-693.
34. Voller, A., Bidewell, D. & Bartlett, A. (1976). Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infection. In "Manuals of Clinical Immunology" (N. Rose & W. Friedman, eds.), pp 506-512. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Author's address: Department of Epizootiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan. Requests for reprints should be addressed to Dr. T. Mikami.