

## アカザ属植物の搾汁液にみられるウイルス 感染阻止作用 (第4報)

アセトン不溶性画分の分別

佐 古 宣 道

(植物病理学教室)

昭和52年8月31日 受理

Inhibitory Effects of Sap from *Chenopodium* Plants on  
Virus Infection (Part IV).

Partial purification of acetone insoluble fraction

Nobumichi SAKO

(Laboratory of Plant Pathology)

Received August 31, 1977

### Summary

The partial purification of an acetone insoluble fraction (AIF) from the leaf sap of *Chenopodium album* L. was described in this report. AIF was prepared by the following procedures: The supernatant fluid of the leaves of *C. album* was obtained from leaf homogenates with three volumes of 0.2 M phosphate buffer solution (pH 6.0), and was added an equal volume of acetone. The precipitate was dissolved in deionized water and dialyzed against water. The solution was tentatively called an acetone insoluble fraction (AIF). AIF was separated by using 40–85% saturated ammonium sulfate fractionation. The ammonium sulfate fraction was chromatographed on a column of Sephadex G-100. This fraction was separated into six fractions on a column of DEAE-cellulose. It was found that the passing fraction through the column showed the most inhibitory action among the six fractions. The passing fraction was separated into four fractions by CM-Sephadex column chromatography. Two fractions with high activities were eluted with 0.1 M NaCl and 0.6 M NaCl in 0.01 M sodium acetate buffer, pH 3.9.

From the above results, it seems likely that two or more kinds of proteins are contained as major inhibitors of virus infection in the leaf sap from *C. album*. For purification procedure of these inhibitors in the leaf sap of higher plants, it is necessary to determine relationships between protein concentrations in fractions and these inhibitory effects on virus infection.

### 結 言

アカザ属植物の搾汁液にみられるウイルス感染阻止作用については Blaszcak ら<sup>1)</sup> がジャガイモウイルス X を用いて報告して以来、由崎ら<sup>12)</sup> によるタバコモザイクウイルス (TMV) などを用いて行なったいくつかの報告がみられる。著者は同搾汁液によるウイルス感染阻止作用に関して一連の研究を行ない、TMV<sup>4,5)</sup>、カブモザイクウイルス<sup>12)</sup> に対する阻止作用についてはすでに

報告し、前報<sup>6)</sup>では搾汁液から調製したアセトン不溶性画分にウイルス感染阻止作用のあることを報告した。

本論文ではシロザ葉の搾汁液から前報<sup>6)</sup>の方法に準じてアセトン不溶性画分を調製し、この画分に含まれるウイルス感染阻止物質の分別法について検討し、得られた画分中に含まれる蛋白質の濃度とウイルス感染阻止作用との関係についても試験したので、それらの結果を報告する。なお、実験の一部は九州大学農学部で行ない、その概要については日本植物病理学会で発表した<sup>2,3)</sup>。

### 各実験に共通な材料および方法

供試ウイルスと植物：供試ウイルスはタバコモザイクウイルス (TMV) の普通系で、これをタバコ (*Nicotiana glutinosa* L. 品種 Bright yellow) に接種して、3週間目の罹病葉から Steere<sup>9)</sup> の変法により精製したものをを用いた。検定植物には  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  の空調温室内で育成したインゲン (*Phaseolus vulgaris* L. 品種改良大手亡) の初生葉を使用した。アカザ属植物としては自生のシロザ (*Chenopodium album* L.) を用い、採取した葉を供試時まで  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

アカザ属植物の搾汁液からのアセトン不溶性画分の調製法：シロザ凍結葉にその生重量当り3倍容量の0.2Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) を加え、ホモゲナイザー (日本精機製作所製) で磨砕し、得られた磨砕液を2重にしたガーゼを用いて搾汁した。この搾汁液から遠心分離 (10,000g, 20分) により上清を採取した。つぎに、この上清に等量の冷アセトンを徐々に添加し、遠心分離 (3,500g, 10~15分) により生じた沈殿物を採取し、純水に溶解した。この溶液をViskingチューブ (#30/32) で純水下で約15時間透析し、透析中に生じた不溶物を遠心分離により除去した上清をアセトン不溶性画分として用いた。

蛋白質の定量：各種の試料中の蛋白質の濃度は分光光度計で波長 280nm における吸光度 ( $A_{280}$ ) を測定することにより定量した。また、Folin-Lowry 法に従い 750nm における吸光度を測定し、牛血清アルブミン (フラクシオン V, Armour pharmaceutical 社製) を用いてあらかじめ作製した検量線により測定値を換算して表示した場合もある。

試料のウイルス感染阻止作用の検定法：既報<sup>5)</sup> に準じて混合法により行なった。すなわち、試料に等量の TMV 接種源を加え、この混合液を検定植物の半葉に塗抹接種した。対照として残りの対半葉には、TMV 接種源に等量の純水を加えた希釈液を同様にして接種した。1試料には12半葉を用い、各実験では2~4回の反復試験を行なった。なお、TMV の濃度は波長 260nm における吸光度0.27が  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の TMV を含むという基準により定量し、接種源は  $16 \sim 32 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度になるように純化 TMV を希釈したものをを用いた。

ウイルス感染阻止率または感染促進率の算出法：検定の結果、試験半葉の病斑数が対照半葉の病斑数より少ない場合には、つぎの式に従って葉ごとに計算し、得られた値を感染阻止率と称した。

$$\text{ウイルス感染阻止率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{試験半葉における局部病斑数}}{\text{対照半葉における局部病斑数}} \right) \times 100$$

また、試験半葉の病斑数が対照半葉の病斑数より多い場合には、下記の式により計算し、その値を感染促進率と称した。いずれの場合にも供試された12葉の値の平均値で示した。

$$\text{ウイルス感染促進率 (\%)} = \frac{\text{試験半葉における局部病斑数}}{\text{対照半葉における局部病斑数}} \times 100$$

## 実験1 アセトン不溶性画分 (AIF) の硫酸分別

## 実験方法

AIF はつぎのようにして硫酸分別を行ない3画分に分けられた。すなわち、AIF に結晶硫酸を40%飽和となるよう攪拌しながら添加，溶解し2時間静置後，生じた沈殿物を遠心分離によって採取し0.005M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液を40%沈殿画分と称した。つぎに，遠心上清に85%飽和となるよう硫酸を加え，前記と同様にして生じた沈殿物の溶液を調製し，これを40~85%沈殿画分と称した。この処理により得られた遠心上清を85%上清画分と称した。これらの3画分の脱塩はVisking チューブを用い0.005M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に対して，緩衝液を2~3回取りかえながら透析することにより行なった。3画分による感染阻止作用は各画分中の蛋白質濃度の定量後，それぞれの希釈液を作製し，上記の混合法により検定された。

## 実験結果

AIF の硫酸分別による3画分の溶液に含まれる蛋白質の濃度を最初の段階で得られる搾汁液の遠心上清の液量当りに換算すると， $A_{280}$  の値（3回の測定値の平均）は40%沈殿画分では0.042 (0.020, 0.027, 0.078)，40~85%沈殿画分では0.435 (0.182, 0.333, 0.79)，85%上清画分で，0.054 (0.031, 0.074, 0.058) であった（括弧内の値は測定値）。つぎに，3画分の希釈液による感染阻止作用を試験した結果を示したものが Fig. 1 である。この結果では，40%沈

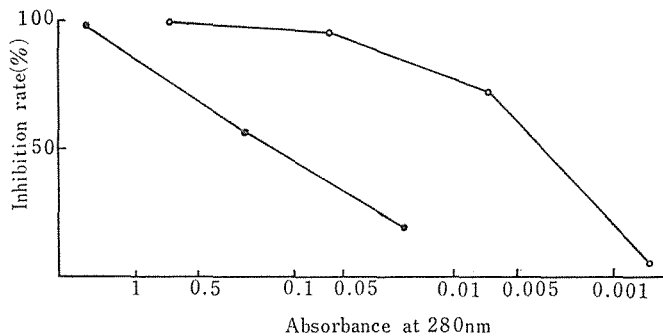


Fig. 1. The inhibitory effects of ammonium sulfate fractionation of the acetone insoluble fraction from the leaf sap of *Chenopodium album* L. on tobacco mosaic virus infection.

●, 40% saturated ammonium sulfate; ○, 40-85% saturated ammonium sulfate. Twelve half-leaves of *Phaseolus vulgaris* L. were inoculated with the mixture containing an equal volume of purified tobacco mosaic virus inoculum and the known concentrations of the fractions, whereas the control 12 half-leaves were inoculated with the inoculum diluted with an equal volume of deionized water.

Inhibition rate was an average of 12 individual values based on calculations by the following formula;  $\left(1 - \frac{\text{No. of local lesions on test half-leaf}}{\text{No. of local lesions on control half-leaf}}\right) \times 100$

殿画分では，95%の感染阻止率を示すに必要な濃度は  $A_{280}$  の1.2以上であり，これより以下の濃度では感染阻止率は漸次低下した。一方，40~85%沈殿画分は  $A_{280}$  0.05以上の濃度で TMV による局部病斑の形成をほぼ完全に抑え，得られた感染阻止率は95~100%であった。つぎに，85

%上清画分では、 $A_{280}$  0.10 の濃度で感染阻止率は87%でありこれより以下の濃度では、急激に低下した。以上の結果から、40~85%沈殿画分が低濃度でも強い感染阻止作用を示すことが明らかとなり、この画分に主要な感染阻止物質が含まれていると思われる。

## 実験2 セファデックス G-50 および G-100 カラムによる分別

本実験では、前項の実験結果から AIF の硫安 40~85%飽和画分が最も強い感染阻止作用を示したので、この画分の分別についてセファデックスカラムのゲルろ過を用いて試験した。

### 実験方法

セファデックス G-50 および G-100 (Pharmacia 社製) を用いて、膨潤させ微粒子を除いた後、セファデックスの平衡化は 0.005M リン酸緩衝液 (pH 7.5) により行なった。セファデックス G-50 カラム (1.5×42cm) には 2ml の試料を添加し、同じ緩衝液を用いて下降法により流速 10ml/hr で 2ml ずつ分取した。同時に、Uvicode II (LKB 社製) を用いて透過率を測定した。セファデックス G-100 カラム (3.5×90cm) には 8ml の試料を加え、上記と同一の緩衝液を用いて上昇法により流速 20ml/hr で 5ml ずつ分取し、その後、それぞれのフラクションの吸光度 ( $A_{280}$ ) を測定した。

### 実験結果

AIF の硫安40~85%飽和画分のセファデックス G-50 カラムによる溶出パターンを示したものが Fig. 2 である。すなわち、この画分は3つのピークに分別された。得られた3ピークによる感染阻止作用を検討した結果、I のピークでは  $A_{280}$  が0.5で感染阻止率は100%であったが、II あるいは III のピークでは  $A_{280}$  が4.0 の濃度の試料を用いても阻止作用は全くみられなかった。

つぎに、セファデックス G-100 カラムによる溶出パターンを示したものが Fig. 3 であるが、溶出されたピークを順次 I, II, III, IV と称した。これらのピークによる感染阻止作用についての検定結果では、II が低濃度 ( $A_{280}=0.05$ ) でも100%の感染阻止率を示し、I では比較的高濃度

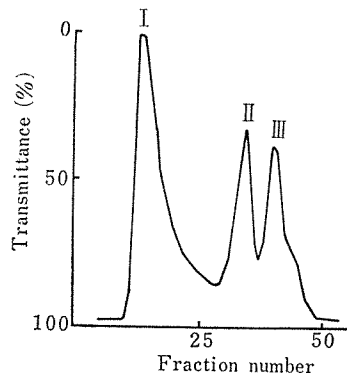


Fig. 2. Sephadex G-50 column gel filtration of ammonium sulfate (40-85%) fraction of the acetone insoluble fraction from the leaf sap of *Chenopodium album* L.

A 2 ml sample was applied to a Sephadex G-50 column (1.5×42 cm) that had been equilibrated with 0.005 M phosphate buffer, pH 7.5, and was eluted with the same buffer. The flow rate was 10 ml/h, and fractions of 2 ml were collected.

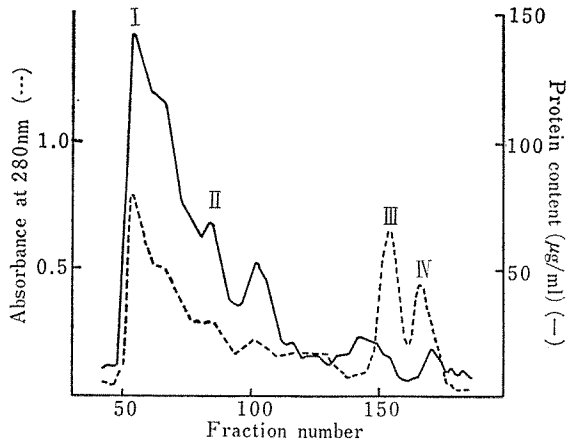


Fig. 3. Sephadex G-100 column gel filtration of ammonium sulfate (40-85%) fraction of the acetone insoluble fraction from the leaf sap of *Chenopodium album* L.

A 8 ml sample was applied to a Sephadex G-100 column (3.5×90 cm) that had been equilibrated with 0.005 M phosphate buffer, pH 7.5, and was eluted upward with the same buffer. The flow rate was 20 ml/h, and fractions of 5 ml were collected.

( $A_{280}=1.2$ ) で100%の阻止率が得られた。しかしながら、IIIあるいはIVでは高濃度 ( $A_{280}=4.0$ ) の試料でも、感染阻止作用は認められなかった。一方、Fig. 3中に Folin-Lowry 法により測定した蛋白質の濃度も併記したが、III および IV のピークではその含量は少なかった。

### 実験3 DEAE-セルロースカラムによる分別

本実験では、AIFの硫酸40～85%飽和画分の陰イオン交換セルロースカラムによる分別について試験した。

#### 実験方法

予備試験の結果から、陰イオン交換セルロースとしてはDEAE-セルロース (Brown社製) を用い、これを純水で洗滌し、微粒子を除去した後、常法に従って調製したカラム管に充填したものを使用した。カラム (1.5×13cm) の平衡化は0.005Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) で行ない、試料を添加したカラムを同緩衝液で洗った。つぎに、カラムに吸着された物質は0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.5M, 1.0M NaClを含む同緩衝液でそれぞれ段階的に溶出することにより分別された。なお、流速は95ml/hr, フラクシオン当りの容量は5mlであった。フラクシオンの吸光度を測定後、感染阻止作用の検定は混合法により行なった。

#### 実験結果

AIFの硫酸40～85%飽和画分のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果を示したものがFig. 4である。さらに、各フラクシオンの濃度と感染阻止作用との関係についての結果はFig. 5に示したとおりである。これらの結果によると、カラムを素通りした画分は $A_{280}$ が0.05以上でTMVの感染を完全に阻止し、 $A_{280}$ が0.01では90%の感染阻止率を示した。つぎに、0.1M NaClによる画分では、 $A_{280}$ が0.1での感染阻止率は90%であったが、これより以下の濃

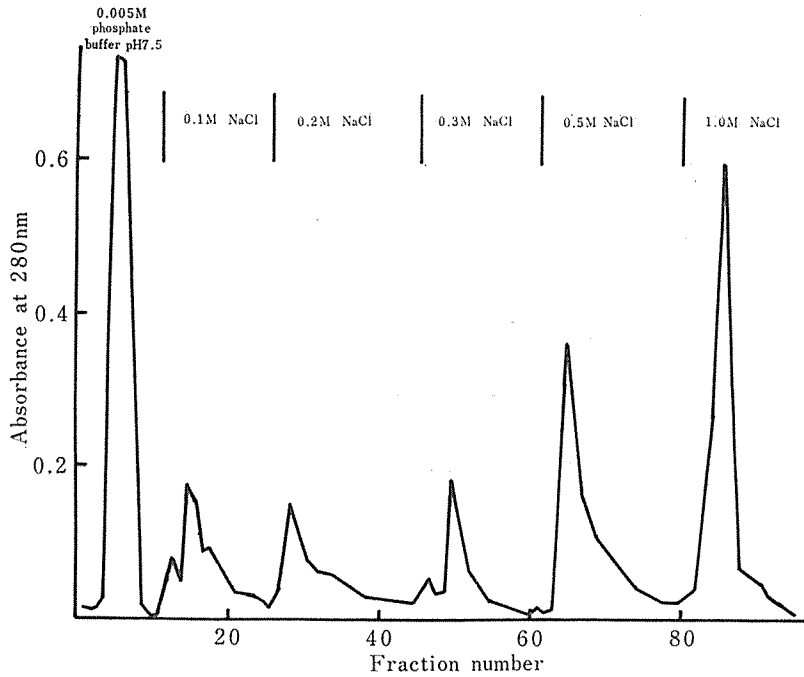


Fig. 4. DEAE-cellulose column chromatography of ammonium sulfate (40-85%) fraction of the acetone insoluble fraction from the leaf sap of *Chenopodium album* L.

A 12 ml sample was applied to a DEAE-cellulose column (1.5×13cm) that had been equilibrated with 0.005 M phosphate buffer, pH 7.5, and was eluted stepwisely with the same buffer, 0.1 M NaCl, 0.2 M NaCl, 0.3 M NaCl, 0.5 M NaCl, and 1.0 M NaCl in the same buffer. The flow rate was 95 ml/h, and fractions of 5 ml were collected.

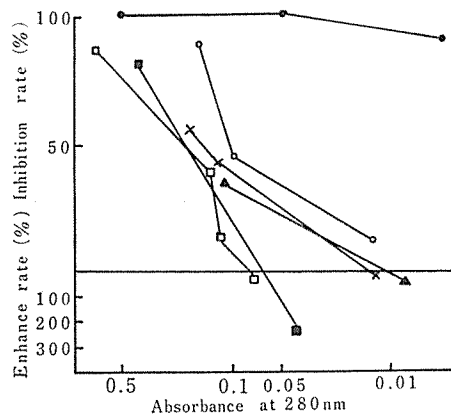


Fig. 5. The inhibitory effects of various fractions by DEAE-cellulose column chromatography on tobacco mosaic virus infection.

●, passing fraction; ○, 0.1 M NaCl fraction; □, 0.2 M NaCl fraction; ▲, 0.3 M NaCl fraction; ×, 0.5 M NaCl fraction; ■, 1.0 M NaCl fraction.

The assay method and inhibition rate were the same as in Fig. 1. Enhance rate was an average of 12 individual values based on calculations by the following formula;  $\left( \frac{\text{No. of local lesions on test half-leaf}}{\text{No. of local lesions of control half-leaf}} \right) \times 100$

度では阻止率が著しく低下した。また、0.2M による画分では、 $A_{280}$  が0.8で感染阻止率は90%となり、0.1でほぼ0、これより以下の濃度では逆に TMV 感染を促進させる傾向がみとめられた。さらに、0.3M による画分では、 $A_{280}$  が0.1で感染阻止率は40%、0.01で0となり、この濃度以下では感染を促進させた。最後に、0.5Mによる画分では、 $A_{280}$  が0.2で感染阻止率は60%、0.03で0、これより以下の濃度では感染の促進を示したが、1.0M による画分では、 $A_{280}$  が0.25で感染阻止率は80%、 $A_{280}$  が0.05以下では同じく感染を促進させる傾向がみとめられた。

以上の結果から明らかのように、このクロマトグラフィーにおける未吸着の画分が低濃度で最も強い感染阻止作用を示した。

#### 実験4 CM-セファデックスカラムによる分別

本実験では、前項の実験結果から DEAE-セルロースカラムの未吸着画分に AIF の主要なウイルス感染阻止物質が含まれていることが明らかになったので、陽イオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーによりこの画分の分別を試みた。

#### 実験方法

CM, SE-セルロースなどを用いた予備試験の結果、本実験に用いた陽イオン交換セルロースは CM-セファデックス C-25 (Pharmacia 社製) で、これを純水で数回洗滌することにより、微粒子を除いた後、常法に従って調製シカラム管に充填したものを使用した。このカラムの平衡化用の緩衝液は①0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0)、②0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.9) および ③同緩衝液 (pH 3.9) の3種類を供試した。試料の添加は Visking チューブを用いそれぞれの緩衝液に対する透析処理後に、3種類の緩衝液で別々に平衡化したカラム (1.5×21cm) に注入することにより行なった。それぞれの緩衝液を流すことにより未吸着の画分を分取した後、カラムに吸着した物質の分別は NaCl を 0.1M, 0.3M, 0.6M の濃度になるように添加した前記の3種類の緩衝液でそれぞれ段階的に溶出することにより行なった。なお、流速は 50ml/hr, フラクシオンの容量は 5ml であった。各フラクションの吸光度を測定した後、感染阻止作用の検定は混合法に従って行なった。

#### 実験結果

①および②の緩衝液でカラムを平衡化した場合には、試料のカラムへの吸着があまりみられず、添加された試料のうち70~80%が素通りした。しかし、③の緩衝液での平衡化では、試料の80~90%がカラムに吸着したので、その分別を試みた結果、得られた溶出パターンを示したものが Fig. 6 である。この結果、未吸着、0.1M, 0.3M, 0.6M NaCl による4画分が得られたので、これらの画分の濃度とウイルス感染阻止作用との関係について試験した結果を Fig. 7 に示した。

以上の結果から、0.1M および 0.6M NaCl による画分はそれぞれ  $A_{280}$  が0.03, 0.04以上の濃度で、TMV 感染を完全に阻止し、これ以下の濃度でも感染阻止率は徐々に低下するが、十分な感染阻止が認められた。つぎに、0.3M NaCl による画分では、 $A_{280}$  が0.14以上の濃度で感染阻止率は100%を示したが、0.04の濃度の場合、40%前後であった。以上の他に、未吸着画分を用いた結果では、 $A_{280}$  が0.04でかなり感染の促進が認められた。

従って、CM-セファデックス C-25 カラムクロマトグラフィーにより分別された各画分のうち、0.1M および 0.6M NaCl によって溶出された2画分に AIF に含まれる主要な感染阻止物質が存在していると思われる。

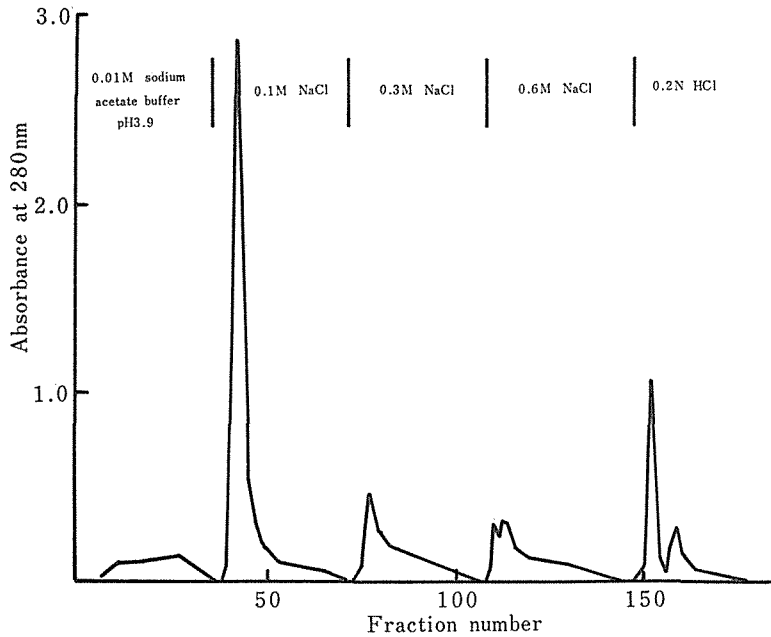


Fig. 6. CM-Sephadex C-25 column chromatography of the passing fraction by DEAE-cellulose column chromatography.

A 12 ml sample was applied to a CM-Sephadex C-25 column (1.5×21 cm) that had been equilibrated with 0.01 M sodium acetate buffer, pH 3.9, and was eluted stepwisely with the same buffer, 0.1 M NaCl, 0.3 M NaCl, and 0.6 M NaCl in the same buffer. The flow rate was 50 ml/h, and fractions of 5 ml were collected.

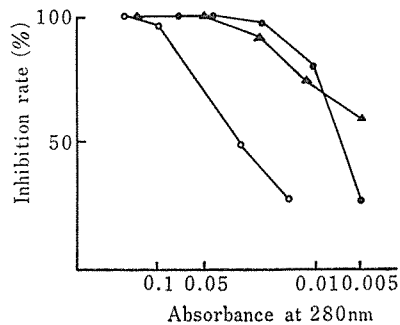


Fig. 7. The inhibitory effects of various fractions by CM-Sephadex C-25 column chromatography on tobacco mosaic virus infection.

▲, 0.1 M NaCl fraction; ○, 0.3 M NaCl fraction; ●, 0.6 M NaCl fraction. The assay method and inhibition rate were the same as in Fig. 1.

## 考 察

アカザ属植物から調製した搾汁液にはウイルス感染阻止物質が含まれていることは、すでに知られているが、その作用機作の解明にはより精度の高い実験系として、精製された感染阻止物質を用いる必要がある。この感染阻止物質の精製法については、著者は種々の検討を行ない、その



部分的精製法をすでに報告し<sup>4)</sup>、一方、この間に Smookler<sup>6)</sup> や谷口ら<sup>10,11)</sup> も同様な試験を行ない、その結果を報告しているが、この物質はいまだに単離されたとはい難いと考えられる。

本実験では、シロザ葉のアセトン不溶性画分（AIF）から得られる硫酸40～85%飽和画分に、強力な感染阻止作用が認められることを画分の濃度とその感染阻止率の関係から明らかにして、既報<sup>4)</sup>の結果を再確認した。

セファデックスによるゲルろ過では、G-100 カラムを用いれば AIF の分別ができることも明らかになった。

つぎに、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより、試料は6画分に分別され、各画分の濃度と感染への影響を検討した結果、6画分のうちで未吸着画分が最も低濃度で TMV 感染を完全に阻止したので、既報<sup>4)</sup>ですでに指摘したように、この画分が AIF に含まれる感染阻止物質の主要な部分を占めていると考えられる。しかしながら、DEAE-セルロースカラムに吸着した5画分にも、高濃度であれば TMV 感染を阻止する現象が認められる。ある種の蛋白質（例えば、アルブミン）は高濃度の条件下にすれば、ウイルス感染阻止物質としての作用を現わすこともあると報告されている<sup>7)</sup>が、この結果は、これと類似の現象と思われる。しかしながら、DEAE-セルロースカラムに吸着した画分が搾汁液の調製時に、本実験で用いたような高濃度になる可能性は実験1の結果から全く考えられないので、搾汁液を実験材料に供する場合には、吸着画分による感染阻止作用についてはあまり重要視する必要はないと思われる。

一方、これらの吸着画分には濃度が低下すると、逆に感染を促進する作用も認められたが、この事実も前述のアルブミンの場合に同様な現象があると報告されており<sup>7)</sup>、この例にもれないものと思われる。

従って、高等植物の搾汁液に含まれている感染阻止物質の精製法を検討する場合には、分離された試料の濃度とそのウイルス感染阻止作用との関係を明らかにしながら、実験を行なう必要があると考えられるが、従来、この観点からの十分な検討がなされていなかったと思われる。

つぎに、DEAE-セルロースカラムの未吸着画分から CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーにより、未吸着画分を含めた4画分が得られた。これらのうちでは 0.1M と 0.6M NaCl による画分が低濃度でも TMV 感染を完全に阻止したので、これら2画分には搾汁液（AIF）中の主要な感染阻止物質が含まれていると考えられる。本実験では、得られた画分の純度検定が欠けているが、シロザ葉の搾汁液には少なくとも2種類以上の感染阻止物質が存在するものと推測される。しかし、本実験での分別法によって得られた画分はかなり高い純度であると推測されるから、得られた結果を基礎として精製法を組立てれば、感染阻止物質の単離が可能であると思われる。

## 摘 要

本報では既報の方法により、シロザ (*Chenopodium album* L.) の搾汁液から調製したアセトン不溶性画分（AIF）を用いて、その分別法を検討した。AIF は硫酸塩析（40-85%飽和）、あるいはセファデックス G-100 カラムのゲルろ過により分別された。DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより、AIF は6画分に分別され、各画分によるタバコモザイクウイルス感染阻止作用について検討した結果、未吸着画分は低濃度で最も高い感染阻止率を示した。つぎに、この画分の CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーによる分別で得られた2画分が極めて強い感染阻止作用を示したので、シロザ葉の搾汁液には感染阻止物質として2種類以上の蛋白質が含まれていると推測した。さらに、この種の物質の精製法を検討する場合には、分離された物質

の濃度とウイルス感染阻止作用との関係を試験する必要性を指摘した。

## 謝 辞

本研究を遂行するために前九州大学教授日高醇先生には終始ご鞭撻を賜わり、また故吉井甫先生には本研究の端緒を与えられ、ご生前中絶えざる有益なご指導を賜わった。ここに記して、深謝の意を表する。

## 引用文献

- 1) Blaszcak, W., A. F. Ross and R. H. Larson (1959). The inhibitory activity of plants juices on the infectivity of potato virus X. *Phytopathology* 49: 784-791.
- 2) 佐古宣道 (1967). アカザ葉中のウイルス感染阻止物質の性状 第1報. 日植病報 33: 109 (講要).
- 3) 佐古宣道・日高醇 (1969). *Chenopodium* 属植物に含まれるウイルス感染阻止物質の性状 第2報. 日植病報 35: 126 (講要).
- 4) Sako, N. and Z. Hidaka (1968). Inhibitory effects of chenopod sap on virus infection. *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury*, The Phytopathological Society of Japan, Tokyo. 115-121.
- 5) 佐古宣道 (1975). アカザ属植物の搾汁液にみられるウイルス感染阻止作用 (第2報). 佐賀大農彙 38: 41-51.
- 6) ——— (1976). アカザ属植物の搾汁液にみられるウイルス感染阻止作用 (第3報). アセトン不溶性画分. 佐賀大農彙 40: 45-53.
- 7) Santilli, V., J. Piacitelli and J. H. Wu (1961). The effect of tobacco mosaic virus protein on virus incubation period and infectivity. *Virology* 14: 109-123.
- 8) Smookler, M. M. (1971). Properties of inhibitors of plant virus infection occurring in the leaves of species in the *Chenopodiales*. *Ann. appl. Biol.* 69: 157-168.
- 9) Steere, R. L. (1956). Purification and properties of tobacco ringspot virus. *Phytopathology* 46: 60-69.
- 10) 谷口 武・中島俊夫・山口直明・長縄行雄 (1974). アカザ (*Chenopodium album* L.) 葉中に含まれるウイルス感染阻害物質の2, 3の性質. 日植病報 40: 304-308.
- 11) Taniguchi, T. and T. Goto (1976). Purification of an inhibitor of plant virus infection occurring in the leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 42-45.
- 12) 吉井 甫・佐古宣道 (1967). アカザ搾汁液のウイルス感染阻止作用について—不和合性感染阻止物質 (アカザ搾汁液) に対する植物細胞質の過敏反応—. 日植病報 33: 244-252.
- 13) Yoshizaki, T. and D. Murayama (1966). Inhibition of tobacco mosaic virus by the juice extracted from *Chenopodium album* plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 32: 267-274.