無菌マウスにおけるマウスアデノウイルス腸管感染 経過に及ぼす生下時胸腺摘除の影響

田 尻 孝

EFFECT OF NEONATAL THYMECTOMY ON THE EXPERIMENTAL ENTERIC INFECTION OF GERMFREE MICE WITH A MOUSE ADENOVIRUS

Takashi TAJIRI

Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School
(Professor Hideo Noriki, Chairman)

[受付: 2月5日, 1973年]

総 括

無菌マウスにおける生下時胸腺摘除(胸摘)が, マウスアデノウイルス(MAD)腸管感染においてウイルス増殖経過と中和抗体(特に局所の)および免疫グロブリン産生にいかん影響するかをみた。MADはK 87株を, マウスはICR系無菌マウスを使用し, 胸摘は生後24時間以内に施行した。ウイルスは, 生後4—6週齢マウスに経口ゾンデにて投与した。ウイルス検出および中和抗体価測定には, DKIマウス腎初代培養細胞を用い, 免疫グロブリン定量には, アガロース内沈降反応(希釈法)を用いた。ウイルス増殖経過をみると, 胸摘を施行せずウイルスを感染せしめた群(非摘対照群)では, 投与後3週ですべてのマウスにウイルスが検出されなくなっているが, 胸摘群では3週目においても19匹中16匹のマウスに検出され, 以後次第に陽性率は低下したが, 5週目においても一部のマウスに陽性であった。血清の中和抗体価は, 非摘対照群では2週より上昇しはじめ, 6週で最高128倍にもなったが, 胸摘群では一部のマウスを除き上昇がみられなかった。小腸壁およびその内容の中和抗体価は, 非摘対照群では3週目ごろより上がりはじめたが, 胸摘群においては一部を除いて上昇しなかった。免疫グロブリン量よりみると, IgAは血清中には対照群で2—3週より増量の傾向があるが, 胸摘群ではやや

低くかつ遅いように思われた。小腸壁およびその内容においても胸摘群がさらに低くかつ遅いように思われた。血清中IgGは対照群では無処置非感染無菌マウスのレベルでわずかに増量がうかがわれたが, 胸摘群では逆に減量の傾向があつた。血清中IgMは無処置マウスと同レベルにあつた。壁および内容におけるIgGおよびIgMは検出されなかった。以上より, 胸摘は腸管におけるMADの増殖期間を明らかに延長せしめたが, この際血中のみならず局所の中和抗体(IgA)の産生を抑制あるいは遅延せしめることが明らかとなつた。以上の成績は, 局所のIgAに属する中和抗体が局所のウイルス増殖の抑制すなわち腸管抵抗性に関与していることを示唆するものと考えられる。

序 文

橋本らは, K 87マウスアデノウイルスの分離に成功して以来(Hashimoto et al. 1966), マウスアデノウイルスK 87株と近交系DKIマウス(conventional)との実験系を用いて, ウイルス腸管感染後に生ずる腸管局所の抵抗性の機序を実験的に解明しようと研究をすすめている(Sugiyama et al. 1967, Hashimoto et al. 1970, 1971)。現在までの彼らの成績によれば, K 87株は感染後2—3週でマウス腸管におけるその感染価が低下し, 以後再感染に対する抵抗性が成立するが, そこには腸管局所のウイルス中和物質が関与し, この物質はIgAクラスの免疫グロブリンに属する抗体であることなどが明

ちかとなつてきている。

しかし現在までのところ、他の機序、たとえば細胞性免疫などが関与していないという証拠がない。いつばう、岡田は、ALS (抗リンパ球血清) の影響の実験において細胞性免疫を暗示するような例を数例経験し、これを報告している (岡田 unpublished data)。

Miller (1961, 1962) や Good (1962, 1964) らにより、胸腺は感染あるいは免疫学的現象を伴う防衛反応において重要な機能を営むことが明らかにされ、同時に生後短時間内に胸腺摘除を行なえば、成長後も免疫反応の諸能力が低下した状態が持続することが明らかにされた。

そこで生下時胸腺摘除を無菌マウスに加えてその影響をみるることによつて、K 87ウイルス腸管感染における腸管低抗性の機序をさらに明確にすべく、今回の実験を計画した。また無菌マウスを使用した理由としては、あらかじめの抗原刺激が少なく、今までの橋本らの実験において、小腸壁およびその内容に IgA, IgG および IgM が検出されていないこと (Hashimoto unpublished data) や、生下時胸腺摘除後にも、いわゆる wasting の発現がないという利点などが考えられた (Sherman et al. 1963, Parrott et al. 1962, McIntire et al. 1964, Wilson et al. 1964, Miller 1962)。

材料と方法

I. 無菌マウスおよび無菌飼育

使用した無菌動物は ICR 系無菌マウスで、これは慶応義塾大学医学部微生物学教室佐々木正五教授が China Medical Board の援助により、昭和40年に米国 Charles River Breeding Laboratory で Hanschka and Miland ICR Swiss randombred strain から帝王切開により摘出された CD-1 系無菌マウスを輸入し、実験動物中央研究所の協力によつて、その量産に成功したものである (佐々木1967)。

実験の際には、妊娠している無菌マウスをアイソレーター内に移し、生下時胸腺摘除用として実験に供した。アイソレーターは実験飼育用 Trexler 型 Vinyl isolator (Trexler et al. 1957) を多少改良して使用した。Isolator 内の滅菌は、2%過酢酸をアイソレーター内で微細な霧状となるように N₂ ガスまたは空気で噴霧し、4時間以上放置後十分に新鮮濾過空気で換気した。実験器具の滅菌は123°C 25分間高压滅菌して使用した。飼料は CL-2 固型飼料 (日本クレア製) を123°C 25分間高压滅菌し、水は水道水を飼料と同様に滅菌してそれぞれ与えた。

なお、アイソレーター内の飼料、器具およびマウスについての無菌試験は、Wagner (1959) の方法に従つて

行ない、Mycoplasma (PPLO) は常用されている PPLO 培地で検出されず、ウイルスについては K 87ウイルス感染を行なっていない群についてマウス腎初代培養で陰性であった。

II. 胸腺摘除法

胸腺の摘除は Sjodin (1963), East (1962), Gross (1959), Sherman (1963), 野本 (1965), 内山 (1966) らの方法を参考にして、以下のように行なった。

手術用アイソレーターは大型飼育用アイソレーターを一部改良し、手袋の手の部分を手術用 8 号ゴム手袋に変え、手術に際しては破損防止のためさらに 1 枚の手袋をアイソレーター内ではめて行なった。四肢はブリキ製の固定台上でヘアークリップでもつて固定し、頭部固定には輪ゴムを使用した。開胸器は眼科用小型ピンセットの先端を左右両翼に曲げて作成し、鉗は眼科用鉗を改良して使用した。

手術は、母マウスの子マウス娩出時期を確認の上、必ず出生後24時間以内に施行した。

手術に際し、まず母マウスを別のケージに隔離し、母マウスの可及的静穏をはかった。

新生児は、無麻酔のもとで固定台に固定し、胸骨柄上端より下方に約 5 mm にわたつて鉗にて皮切を加え、ついで鉗を胸骨柄上端より胸骨正中線上の胸骨下に挿入し、胸骨に 2 肋間腔に相当する長さの縦切開を加えた。開胸器をかけて広く開胸すると、結締組織膜に包まれた胸腺の左右両葉が眼下に現われる。結締組織膜をピンセットにて除去し、ユニポンプ UP₂ 型に接続した先端の口径約1.5~2.0 mm のカピラールを開胸部より挿入し、胸腺を 1 葉ずつ、周囲組織より剝離する要領で下端より吸引していきながら摘除した。ここでカピラール内に残る胸腺を検し、両葉が完全に摘除されたことを確認した。開胸器をはずし、皮膚切開部をピンセットでたぐり寄せながら接着剤アロンアルファ A (三共) の少量を付けて接着せしめた。接着剤を使用することによる副作用は認められなかつた。なお以上の手術はすべて拡大鏡を通して施行した。

術後、子マウスをケージにもどし、動きの活発化を待つて、母マウスを隔離ケージよりもどした。

かようにして致命率は約27%であつた。手術による死亡と思われる原因として、血管損傷、吸引による心臓破裂および肺損傷などがあるが、死亡原因の大部分は母マウスの食殺によるものであつた。また経産マウスほど、食殺は少なかつた。

III. ウイルス

使用したウイルスは、マウスアデノウイルス K 87株

(Hashimoto et al. 1966) である。

ウイルス浮遊原液は、マウス腎初代培養細胞 (MsKTC) にて 8~10 回継代し、継代した MsKTC を 6 回凍結融解して細胞破壊し、それを遠沈し、沈渣を 0.5% ラクトアルブミン加 Hanks 液 (LH) に suspend したものである (Hashimoto et al. 1970)。なお実験に供したウイルス液は 10% エーテルで 4°C のもとに 1 夜処理し、 $2 \times 10^{4.5}$ TCD 50/ml に希釈したものである。

IV. ウイルス投与法

生後 4~6 週齢のマウスに無麻酔のもとで金属経口ゾンデを用いて、1 匹につきウイルス液 0.2 ml ずつを胃内に投与した。

V. 子マウス飼育法

胸摘マウスおよび対照マウスともに、3~4 週間母マウスとともに飼育し、以後は各々 1 匹飼育に 1 匹として交差感染を防ぎ、すべて滅菌した CL-2 飼料および水にて成長せしめた。

VI. マウス腎細胞培養

Hashimoto et al. (1966) の方法に従って行なった。すなわちマウスは慶応義塾大学微生物学教室で繁殖せしめている近交系 DKI マウス (Ushiba et al. 1962) の 4 週齢マウスを細胞源として使用した。腎臓は脱血後取り出し、Bodian (1956) の方法を修正した方法でトリプシン処理した。トリプシン液は Difco Tripsin 1:250 をリン酸緩衝食塩水にて 0.2% として使用した。

トリプシン処理した細胞は、LH にペニシリン (PC) 100 u/ml, ストレプトマイシン (SM) 100 μ g/ml, さらに子牛血清を 10% 加えた growth medium (GM) に浮遊させ 1 ml あたり 30,000 細胞浮遊液とした。細胞浮遊液は試験管に 0.5 ml ずつ分注して 4~5 日間静置してから GM 交換しさらに 2 日間放置して細胞培養試験管として実験に使用した。

ウイルス接種後観察期間中は毎週 1~2 ml の maintenance medium (MM) と交換した。MM 液は GM とは子牛血清が 3% であることおよび LH のかわりに 0.5% lactalbumin hydrolysate 加 Earle 液を使用していることが異なり、pH を CO₂ ガスで 7.4 に調整して使用した。

VII. ウイルス分離と定量法

便の採取は肛門より直接小試験管に取った。採取した便は PC 1,000 u/ml, SM 500 μ g/ml を含んだ LH 液にとかし 10% 液とし、それを 10,000 rpm で 10~15 分間遠沈し、上清を検体とした。

小腸壁の場合は中部小腸壁を採取し、上記の LH 液を加え 5% 液とし、それをホモジナイザーで均質化したあと、6 回凍結融解し、さらに便の場合と同様に遠沈し

上清を検体とした。

定量法は、MsKTC を Hanks 液で洗ったあと、各々の試験管に MM を 1 ml ずつ分注した。同一検体に対して細胞培養試験管 2 本使用し、便の場合は検体を 0.1 ml ずつ、腸壁の場合は 0.2 ml ずつ接種した。検体接種後 1 時間、24 時間、3 日目、1 週間後、さらに以後 1 週間ごとに MM を交換し、4 週目まで維持した。接種後頻回の液交は培養細胞への検体の毒性を可及的に防ぐために行なった。判定は cytopathogenic effect (CPE) が 5~7 日で出れば卍、1~2 週に出れば卅、2~4 週に出れば十、4 週になつても出なければウイルス陰性とした。なお、別の実験 (Hashimoto, unpublished data) から卍、卅、十はそれぞれほぼ 10^8 TCD 50/10mg 以上、 10^6 TCD 50/10mg、 10^4 TCD 50/10mg に相当することがわかつている。

VIII. 腸壁および内容より中和物質の抽出法

腸壁は採取後 10 ml の Hanks 液で 3 回洗浄し、その 3 倍重量の LH (1,000 u/ml PC, 500 μ g/ml SM を加えてある) を加え、ついでガラスホモジナイザーで均質化したあと、2 回凍結融解し、続いて 15,000 $\times$ g で 10 分間遠沈し、上清を不活化 56°C 30 分間処理して、さらに軽く遠沈した上清を検体とした。腸内容も上記と同様の処置を行なったが、ホモジナイズはしなかつた。

IX. 中和抗体価測定法

血清については、LH 液で 4 倍希釈した血清を不活化 56°C 30 分間処理し、これを 4 倍階段希釈した各々 0.3 ml に 100 TCD 50/0.1 ml のウイルス液 0.3 ml ずつを加え、さらに MM 液 2.4 ml を追加し 3.0 ml とした。それを 37°C 3 時間 incubate したあと、4°C に一夜静置し、その検体を Hanks 液で 1 回洗った MsKTC 試験管 2 本に 1 ml ずつ分注した。ウイルス対照としては、使用したウイルス液の原液、10 倍、100 倍、1000 倍希釈液に希釈血清のかわりに LH を 0.3 ml 加えたものを観察し、細胞対照としては、ウイルス液、希釈血清のかわりに LH 0.6 ml を加えたものを観察した。判定は、ウイルス対照の 100 倍希釈液 2 本の試験管中 1 本に CPE を認めた時点とし、その時の中和抗体価を Reed-Muench 法により算出した。壁および内容に関しても同様に施行した。

X. IgA, IgG, IgM に対する免疫血清作製法

免疫血清は実験にあたり橋本博士より恵与された (Hashimoto et al. 1971)。その作製法の大略を次に述べる。

<抗 IgA> 分泌性 IgA を産後 3~6 日後の DD 系母マウスより採取したミルクより取り出し抗原として使

用した。この抗原をうさぎの足蹠に注射し、そのうさぎより得た血清を適切な吸収操作の後、マウス IgA heavy chain に対する特異抗体と考えた。

<抗 IgG>DD 系マウス血清中の IgG を抗原とし、それをうさぎに注射して抗血清を得た。

<抗 IgM>DD マウス血清中の IgM を抗原とし、それをうさぎに注射して抗血清を作り、適切な吸収操作の後特異的な抗 IgM を得た。

XI. ゲル内沈降反応による免疫グロブリンの定量法

8×16 cm のガラス板の上に25 ml の0.9%アガロース (veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.025$) を流し、約2 mm の厚さとした。硬くなったところで70×1 mm の溝を作り、溝より3 mm 離して直径2 mm の穴を16個ずつ作った。それぞれの穴に2倍階段希釈した検体をマイクロピペットで0.004 ml ずつ別々に入れた。溝には適当に希釈した抗 IgA, 抗 IgG, 抗 IgM を0.1 ml ずつ入れた。抗免疫グロブリンの希釈はあらかじめ最高の免疫グロブリンの価が得られるように予備実験で決定した。すなわち抗 IgA は veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$) で4倍に、抗 IgG は32倍に、抗 IgM は8倍に希釈した。観察は室温に48時間放置後行なった。

XII. 白血球数算定法

マウス屠殺直前に眼窩静脈より採血用カピラールで採血し、ついで白血球算定用メランジュールを用い型のごとく Bürger-Türk 板で算定した。

XIII. リンパ球数算定法

血液塗抹標本より100分率を計算し、各検体の白血球数に乗じて算定した。

成 績

I. 生下時胸腺摘除術が、ウイルス投与マウスの血液像におよぼす影響。

1) 胸腺摘除 (胸摘) 群と非摘除 (非摘対照) 群との K 87感染後における白血球数の比較。

表1は各マウスの屠殺直前の白血球数である。週はウイルス感染後の週を表わしている。表1の平均値をさらにわかりやすくグラフにしたのが図1である。個々のマウスの白血球数にはかなりのばらつきがあるが、非摘対照群ではおおよそ順調な白血球数の増加がみられる。胸摘群では3~4週で白血球数の一時的な増加がみられるが、5~6週ではもとにもどり、2~2.5週と比較すると白血球数の増加はみられていない。

2) 胸摘群と非摘対照群との K 87感染後におけるリンパ球数の比較 (図2)

図1と比較してみるとほぼ似た図が描かれており、約

Table 1 Differential of leukocyte count of unoperated mice and thymectomized mice

Weeks after virus-challenge	Thymectomized group			Unoperated group		
	Mouse No.	Leuko-cyte count	mean count	Mouse No.	Leuko-cyte count	mean count
2.0W	43	4000	3950	34	7500	6050
	44	3900		35	6300	
				36	4400	
				49	6000	
2.5W	45	3900	3680	37	5700	6570
	46	3200		38	7000	
	47	3700		39	7000	
	48	3900				
3.0W	13	4400	5630	40	6400	7830
	14	3800		41	7000	
	15	8700		42	10100	
3.5W	17	7200	6580	1	7700	7730
	18	3600		2	7600	
	19	6200		3	7900	
	20	9300				
4.0W	21	7700	6330	4	5700	7270
	22	5900		5	8400	
	23	4700		6	7700	
	24	7000				
5.0W	25	2400	3400	7	11200	9100
	26	3400		8	9800	
	27	2500		9	6300	
	28	5300				
6.0W	29	4100	4280	10	8000	9200
	30	5800		11	10600	
	31	4500		12	9000	
	32	2700				

2,000~3,000の幅で白血球数よりも低値を示している。このことから白血球数の変化はリンパ球数の変化に平行し、胸腺摘除はリンパ球数に特異的に影響を与えていると思われる。

II. 胸摘群と非摘対照群とのウイルス感染経過についての中腸壁での比較 (図3)

非摘対照群ではウイルス増殖は2週で最高に達し、3週ですでにウイルス陰性となるのに対し、胸摘群では4~5週においてもなお、ウイルス陽性のものがある。すなわち胸摘群ではウイルス増殖期間が確実に延長していることがわかる。同様の比較を、実験に供した各々のマウ

Fig. 1 Comparison of leukocyte count in the thymectomized and in the unoperated germfree ICR mice.

—●—: Count in the thymectomized mice.
—○—: That in the unoperated mice.

Fig. 2 Comparison of lymphocyte count in the thymectomized and in the unoperated germfree ICR mice.

—●—: Count in the thymectomized mice.
—○—: That in the unoperated mice.

スの便におけるウイルス増殖の経時的変化について次に示す。

Ⅲ. 胸摘群, 非摘対照群とのウイルス感染経過についての便での経時的比較 (表2)

非摘対照群では3週までにすべてのマウスでウイルスが検出されなくなっているが, 胸摘群では3匹のみが3週でウイルス検出されなくなるだけで, 他の23匹のマウスではそれ以上の期間にわたりウイルスが検出されている。しかも No. 27マウスでは5週目においても (++) のウイルスが検出されている。これをさらにわかりやすくするために, ウイルス陽性のマウスを百分率で表わし

Fig. 3 Viral growth in the intestinal wall.

Tx.: Thymectomized mice.

Unop.: Unoperated mice.

#, ++, +, indicate respectively large, medium, and small amount of the virus recovered in the intestinal wall.

↓: Virus challenge.

たのが図4である。これによれば胸摘群では3週においても約85%の高率でウイルスが陽性となっており, 5週になつても約13%が陽性となつている。以上のことは生下時胸腺摘除が腸管におけるウイルスの増殖期間を明らかに延長せしめていることを示している。

Ⅳ. 中和活性の経時的変化 (図5)

血清中和抗体価の面よりみると, 非摘対照群では2週より抗体価はあがりはじめ, 6週で最高128倍にもなるが, 胸摘群では No. 23, 28, 29, 30のマウスを除いて他の20匹のマウスはすべて4倍から4倍以下の抗体価しか示さず, 全体の傾向として抗体価のあがりあまり認められない。小腸壁の中和抗体価は, 非摘対照群では3週であがりはじめ, 6週では最高64倍にもなるが, 胸摘群では血清におけると同様に No. 23, 28, 29, 30のマウス以外は4倍以下であり抗体価の上昇はみられない。小腸内容においては壁同様非摘対照群は3週よりあがり始めるが胸摘群では No. 23, 28のマウス以外は4倍以下である。以上より, 生下時胸腺摘除が, 血中のみならず, 局所の中和抗体価の上昇を抑制, あるいは遅延せ

Table 2. Duration of viral growth in the thymectomized and in the unoperated mice

Killed at following weeks after virus- challenge	Thymectomized group								Unoperated group							
	Mouse No.	Weeks after virus-challenge							Mouse No.	Weeks after virus-challenge						
		1	2	3	3.5	4	5	6		1	2	3	3.5	4	5	6
2.0W	43	卅	卅						34	卅	卅					
	44	卅	卅						35	卅	卅					
									36	卅	卅					
									49	卅	卅					
2.5W	45	++	卅						37	卅	卅					
	47	卅	卅						38	卅	卅					
	48	卅	卅						39 [†]	卅	卅					
3.0W	13	卅	卅	++					40	卅	卅	—				
	14	卅	卅	++					41	卅	卅	—				
	15	卅	卅	++					42	卅	卅	—				
	16	卅	卅	卅												
3.5W	17	卅	卅	卅	++				1	卅	++	—	—			
	18	卅	卅	卅	++				2	卅	—	—	—			
	19	卅	卅	卅	++				3	卅	++	—	—			
	20	卅	卅	卅	卅											
4.0W	21	卅	卅	—	—	—			4	卅	++	—	—	—		
	22	卅	卅	卅	卅	++			5	卅	卅	—	—	—		
	23	卅	卅	—	—	—			6	卅	卅	—	—	—		
	24	卅	卅	++	—	—										
5.0W	25	卅	卅	卅	—	—	—		7	卅	卅	—	—	n.t.	—	
	26	卅	卅	++	—	—	—		8	卅	卅	—	—	—	—	
	27	卅	卅	卅	卅	卅	++		9	—	卅	—	—	—	—	
	28	卅	卅	卅	—	—	—									
6.0W	29	—	卅	卅	++	—	—	—	10	卅	卅	—	—	—	—	
	30	卅	卅	n.t.	—	—	—	—	11	卅	卅	—	—	—	—	
	31	卅	卅	卅	—	—	—	—	12	卅	卅	—	—	—	—	
	32	卅	卅	—	—	—	—	—								

卅, ++, indicate respectively large and medium amount of the virus recovered in the feces.

n.t.; not tested

しめていることを示している。

V. 血清, 小腸壁および小腸内容における免疫グロブリン

免疫グロブリンの図(6—8)には, 別の実験で測定された, ウイルスを感染させていないマウスにおける各免疫グロブリンのおよその量を参考として加えた。これらは無菌マウスの場合を GFL (Hashimoto, unpublished data) とし, conventional マウスの場合を CL (Hashimoto et al. 1971) として図の中に示してある。

IgA : (図6) 血清中には, 非摘対照群では2~3週ご

ろより増量の傾向がみられるが, 胸摘群では増量の傾向がやや遅くかつ低いように思われる。小腸壁では非摘対照群は2週より急速に増量するが, 胸摘群では増量の傾向が低く, かつ遅くなっている。(例外として No. 23 マウスが高値を示している。) 小腸内容においては非摘対照群では2週より上昇しているが, 胸摘群では No. 23 マウスを除き4倍あるいは4倍以下となつている。

IgG : (図7) 血清 IgG について非摘対照群は多少ばらつきはあるが, GFL にあるように思われる。胸摘群をみるとかなりのばらつきがあるが, ほぼ半数のマウス

Fig. 4 Percentage of virus positive in the feces.

● : Thymectomized mice.
○ : Unoperated mice.
↓ : Virus challenge.

Fig. 5 Virus neutralizing antibody in the serum, intestinal wall and intestinal contents after oral challenge of the virus.

● : Thymectomized mice.
○ : Unoperated mice.
23, 28, 29, 30 : Mouse number

では低下が著しい。これは胸腺摘除によつて新たな IgG の産生が抑制され、母親より受けた IgG が次第に減少するに従つて低下したものと思われる。小腸壁および小腸内容に関しては例外を除いて検出されていない。

IgM : (図 8) 血清、小腸壁および小腸内容ともに非摘対照群と胸摘群とに差が認められず、GFL にある。

VI. 大腸内容、大腸壁、盲腸内容および盲腸壁にお

Fig. 6 Titers of immunoglobulin A class contained in the serum, intestinal wall and intestinal contents of the ICR germfree mice orally infected with K-87 virus.

● : Thymectomized mice.
○ : Unoperated mice.
CL : Conventional level.
GFL : Germfree level.

23, 27, 28, 29, 30, 32 : Mouse number

る中和抗体価、免疫グロブリンの比較

いずれの場合においても、胸摘群、非摘対照群ともに非感染実験群と著差はなかつた。

Ⅶ. 特殊例の検討 (図 9)

特殊例として、ウイルス感染経過の長短、および中和活性の面より、一部のマウスを選んで検討を加えてみた。

マウス No. 21, 23, 32 は感染経過よりみると 3 週目ですでにウイルスが検出されなくなっている。No. 23 は中和活性、免疫グロブリンの量ともに非摘対照群のレベルにあり、胸腺細胞の残存があつたと思われる。すなわち手術不成功例と思われる。No. 21 と No. 32 は中和活性 4 倍以下であるにもかかわらず、ウイルス増殖が抑制されたことは今後の検討を必要としよう。

マウス No. 28, 29, 30 は明らかにウイルス増殖の延長がみられるにもかかわらず、血清および小腸壁の中和抗体価が胸摘群の中では高値を示す。すなわち No. 28

Fig. 7 Titrers of immunoglobulin G class contained in the serum, intestinal wall, and intestinal contents of the ICR germfree mice orally infected with K-87 virus.

● : Thymectomized mice.

○ : Unoperated mice.

CL : Conventional level.

GFL : Germfree level.

28, 31, 32 : Mouse number

は血清中和抗体価64倍、小腸壁中和抗体価8倍である。No. 29は血清中和抗体価16倍、小腸壁中和抗体価4倍であり、No. 30は血清中和抗体価128倍、小腸壁中和抗体価8倍となっている。いずれもウイルス増殖の延長に局所の中和抗体の低下のみが関与しているとするにはさらに検討を要す。

マウス No. 22は4週目になつてもウイルス量は減少しているが、 $\pm$ のウイルスが検出されている。さらに血清および局所における抗体価、免疫グロブリンとともにGFLにあり上昇していない。

マウス No. 27は5週に入つてもウイルスが増殖しており、No. 22同様、各検体ともGFLにある。すなわち、No. 22, 27, とともに中和活性、免疫グロブリン両者ともに抑制されており、胸腺摘除で抗体産生が確実に抑制されているため、胸腺摘除以前にすでにばらまかれた胸腺細胞があることを考えても、ウイルス増殖がもう少

Fig. 8 Titrers of immunoglobulin M class contained in the serum, intestinal wall, and intestinal contents of the ICR germfree mice orally infected with K-87 virus.

● : Thymectomized mice.

○ : Unoperated mice.

CL : Conventional level.

GFL : Germfree level.

し長く続く可能性がある。

考 察

橋本らはウイルス腸管感染後に生ずる腸管局所の抵抗性の機序を究明する目的をもつて研究を進め、腸管抵抗性は局所で生産され腸管内に分泌される IgA 抗体に依存する現象であることを示してきた (Hashimoto et al. 1970, 1971)。

これを裏側から立証するために、体液性抗体産生に影響の強いとされている cyclophosphamide (Cy) を投与する実験をしている。それによると Cy を投与して局所の IgA 抗体を積極的に減少せしめた時に、腸管抵抗性の解除がみられている (Hashimoto unpublished data) 続いて免疫応答のもう1つの型すなわち細胞性免疫の面より検討するために、細胞性免疫に強い抑制力をもつと考えられている antilymphocyte serum (ALS) を使用することにより岡田 (unpublished data.) が抵抗性の機序を検討したが、この場合にも Cy の場合と同様、ウイルス増殖の延長がみられた。この際、個体によつては血清、小腸壁および小腸内容の中和抗体価、および免疫グ

Fig. 9 Data of selected cases of mice.

No.: Mouse number.

卅, 卅, +, indicate respectively large, medium, and small amount of the virus recovered in the feces.

NT: Neutralizing antibody titers.

S: Serum.

W: Intestinal wall.

C: Intestinal contents.

↓: Virus challenge

ロブリンの減少が認められたが、大部分には認められなかった。すなわち抵抗性の出現には抗体以外にも何かか関与していることを考えさせられる。

以上の考察の過程を経て、さらに抵抗性の機序を明確にすべく胸腺に注目したわけである。

1961年ごろより胸腺の免疫における意義が重要視され、この方面の知見が著しく増加してきた。Burnet (1962^a, 1962^b)は clonal selection説から、胸腺は禁じられたクローン(forbidden clone)を排除して免疫学的ホメオスターシス (immunological homeostasis) をつかさどると考えている。いつぼう Miller (1961, 1962)は生下時胸腺摘除の結果、免疫学的にどのような脱落状態を招来するかという観点から、また Good 一門 (1962, 1964)は、個体発生および系統発生における胸腺の発達の観点から、免疫における胸腺の役割の研究へと進み、胸腺は胎児の出産前後の時期にリンパ系細胞を多量に全身の各種リンパ系組織に送り込むと同時に、これら

のリンパ系細胞が免疫学的能力を持つ細胞 (immunologically competent cell) に分化を促進する液性因子 (humoral factor) を分泌するとしている。さらに胸腺は生下時期における上述の仕事を終了すると次第に退縮する。しかし成熟動物にX線照射をした後の免疫能力の回復が胸腺摘出動物ではおこり難いことから、成熟動物においても少なくとも障害された抗体産生組織の修復に重要な役割を果たしていると考えている。以上の研究が胸腺と免疫に関して出発点とされているが、以後数多くの研究がなされている (Miller and Osaba 1967)。

胸腺摘除についての知見を簡単にまとめてみると、

1) 齧歯類では、生下時胸腺摘除で種々の免疫能の低下をきたす。すなわち流血抗体産生 (Miller 1962, Archer 1961), 遅延型アレルギー反応 (Jankovic 1962), 同種移植免疫能 (Miller 1961, 1962, Good 1962) graft-versus-host reaction (Takeya 1964^a, Miller 1962) が低下する。

2) 流血抗体産生にはその影響がさまざまである。すなわち抗原の種類によつては全く影響を受けない。

3) 成熟後胸摘しても直ちには免疫能力に影響を受けぬ。X線照射を併用した場合は照射後の免疫能力の回復がみられない。成熟時胸摘後長期放置すると老化後の免疫能力の低下が著しい。すなわち成熟後も胸腺が働いていることを示す。

4) 新生時胸腺摘除動物の低下した免疫能力は、同種または同系胸腺の移植あるいはリンパ節細胞または脾細胞の移入によつて回復させることができる。骨髓細胞や、胎児の肝細胞のみでは回復しがたい。

5) 胸腺の移植による回復は、胸腺を Millipore diffusion chamber に入れて移入した場合にも起こりうる。このことは胸腺が液性に作用することを示唆する。

6) ニワトリでは細胞性免疫は胸腺が、抗体産生はファブリシウス嚢がつかさどる。うさぎでは虫垂、腸扁桃がある程度ファブリシウス嚢に似た機能を有す。

7) 新生時胸腺摘除マウスでは、末梢リンパ球数の減少が著しい。脾の periarteriolar sheath およびリンパ節の paracortical area からはリンパ球がほとんど消失する。形質細胞や細胞細胞はほとんど減少しない。したがって末梢リンパ系細胞には胸腺依存性細胞と胸腺非依存性細胞がある。また、胸管 drainage により得られる小リンパ球数は著しく減少する (Miller 1967, 1968, 1969)。

以上の知見を基にして胸腺摘除法が感染症の免疫に及ぼす影響について研究が進められてきた。すなわち Takeya らが, *Listeria* 症 (1964^b), 結核症 (1965),

Rowe (1963), East (1964), Hotchin (1964), Mori (1964)らがlymphocytic choriomeningitis virus (LCM) 感染症, 森らによつて腺熱感染症 (1964), エクトロメリアウイルス感染症 (1970), herpes simplex virus (HSV) Cocksackie B5 virus (1964, 1965, 1967) また, Svet-Moldavsky が influenza virus (1964), Kono が Newcastle disease virus (1969), Crispens が LDH virus (1967) など数多くの研究がなされた。

いつぼう, 胸腺摘除にあたり conventional mouse を使用すると生下時胸摘後1~4週ごろより wasting をもつて代表される症状が起こり死に至る。この原因については諸家により追求されているが, 原因が敗血症にあるとすると conventional mouse における研究は慎重でなければならない。すなわち免疫以前の問題の検討が必要となるからである。その後無菌生物の開発に成功し, 無菌マウスを使用しての wasting および各免疫現象の検討がなされている (Wilson 1964, Miller 1967, Pollard 1965, Bealmer 1966)。各研究においても無菌の状態では wasting の発症はみられておらず, しかも conventional での免疫反応とおおよそ変わらぬ反応を示すことが知られた。

今回の実験においても他家の知見と同様に血液像に関しては, 白血球数は非摘对照群で順調な数の増加がみられているのに対し, 胸摘群では3~4週で一時的な増加がみられるが, 全体の経過からみると増加しておらず, 胸摘群と非摘对照群では白血球数の増加に明らかな差が認められた。なお3~4週はウイルス増殖の著しい時期にあたり, 白血球数の一時的な増加は抗原刺激に対する何らかの反応と考えてよいと思われる。さらにリンパ球数の面より考察しても白血球数の変化がリンパ球数の変化に平行していることから, 胸腺摘除はリンパ球数の増加を特異的に抑制しているとする Miller (1962), Good (1964) らの報告とも一致する。以上のことから ICR 系無菌マウスに関して, 新生時胸腺摘除の成否を判断するときに, 白血球数が一助となりうることを示していると思われる。

wasting 発現に関しても, 実験経過中に contaminate したアイソレーターを conventionalize 後, おおよそ2~8週で90%のマウスが wasting 症状にて死亡することを経験した。このことは, wasting での死亡原因として敗血症を否定できないことを示す。

今回の実験では, 生下時胸腺摘除されたマウスにおいては K 87ウイルスの増殖が明らかに延長しており, マウスによつては4~5週で殺す時点までも延長している。すなわち何らかの形で K 87ウイルスの腸管内増殖

を助長するメカニズムが働いたことになる。さらに中和活性値測定により, 血清および腸管局所ともに抗体価上昇の抑制あるいは遅延がみられ抵抗性の解除に抗体産生抑制が関与していることを示している。すなわち, どちらかといえば体液性免疫よりも細胞性免疫に関与しているといわれている胸腺が, 今回の実験システムでは体液性免疫に影響していて, しかも血中抗体のみならず, 腸管局所の抗体産生にも影響を与えていることが明らかになったと考えられる。しかしマウス No. 21, 32のように中和抗体価の上昇が抑制されながらウイルス増殖の延長がみられない例もあるので, 他の何かの機序が関与していることを否定できない。

免疫グロブリンの面よりみれば, 特に局所の中和抗体価と平行して, 非摘对照群では局所の IgA が確実に上昇しているにもかかわらず, 胸摘群ではウイルス増殖が延長しているマウスでは局所の IgA の増加が抑制あるいは遅延している。すなわち K 87ウイルスに対する腸管抵抗性に局所の IgA 抗体が強く関与していることを示す。またウイルス増殖が延長し, 5週~6週で殺した時点での中和抗体および IgA のわずかな増加は, ウイルスの消えたあとに一致していることから, 胸腺摘除以前の生下時前後に, わずかにばらまかれた胸腺細胞の活動によるものと解釈すれば, マウス No. 22, 27もいずれウイルスが消えると思われる。

局所の抗体に関して, conventional mouse については, Lipton and Steigman (1963), Kono (1966), Bergur (1967), Ogra (1968, 1969 a, b), Dwyer (1968), Keller (1969) が poliovirus, Hashimoto (1971) が K 87ウイルスを使用して述べている。無菌マウスについては Crabbé (1969) が ferritin をのませて, Bazin (1970) は SRBC を経口的に投与して研究している。さらに Tomasi (1968) は固有層の免疫グロブリン産生細胞が IgA を産生するとし, Craig (1971) は腸管のパイエル板に precursor cell が含まれこれらが脾臓と固有層でふえて, 特に IgA を産生する免疫グロブリン産生細胞になると述べている。

以上より, 胸腺摘除は最終的には腸管の固有層における免疫グロブリン産生細胞の増加の抑制につながると解釈してよいであろう。

謝 辞

拙筆するに臨み, 御指導と御校閲を賜わった恩師乗木秀夫教授および柚木斎教授, ならびに第一外科学教室代田明郎教授に深く感謝致します。なお本研究はすべて慶応義塾大学医学部微生物学教室において行なわれたもので, 貴重な無菌動物とその研究施設を快く提供して下

さつたばかりでなく、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった佐々木正五教授ならびに橋本一男助教授に深甚の謝意を表しますとともに、種々御指導、御協力をいただいた慶応義塾大学医学部微生物学教室各位、日本医科大学大学院岡田靖朗学士に心から感謝いたします。

本研究の要旨は第19回ウイルス学会において口演された。

Summary

The enteric infection and the appearance of antibodies and immunoglobulins were examined in neonatally thymectomized germfree ICR mice.

Mouse adenovirus (MAD), strain K-87, was used in this study. Thymectomy was done within 24 hours after birth. MAD was inoculated orally to 4-to 6-week-old mice through a metal tube inserted into the stomach. The infectivity titer of the virus and the titer of neutralizing antibodies were determined in DK1 mouse kidney tissue culture. Titration of the 3 classes of immunoglobulin was performed by the precipitation in agarose gel.

In unoperated control mice, no viral growth was seen 3 weeks after challenge. In the thymectomized mice, however, a clear prolongation of viral growth was observed.

Neutralizing antibodies in the serum began to increase in titer in the control mice 2 weeks after challenge. In the operated mice, the appearance of neutralizing antibodies was retarded. These antibodies in the intestinal wall and contents began to increase in titer in the control mice 3 weeks after challenge, but their appearance was retarded in the thymectomized mice.

Immunoglobulin examinations were carried out to clarify the status of IgA, IgG, and IgM.

The titers of IgA both in the serum and in the intestinal wall and contents were significantly lower in the thymectomized mice than in the control mice. IgG in the serum increased a little within the uninfected germfree mouse level in the control mice, but decreased in the thymectomized mice. IgM in the serum was within the uninfected germfree mouse level both in the control and in the thymectomized mice.

IgG and IgM in the intestinal wall and contents were undetectable both in the operated and in the unoperated mice.

Thus, prolonged growth of the virus was observed in the neonatally thymectomized germfree mice.

At the same time, the appearance of neutralizing antibodies both in the serum and in the intestinal wall and contents was retarded. As there was no correlation between viral growth

and the presence of serum antibody, it seemed that the delayed appearance of local neutralizing antibody might have prolonged viral growth in the thymectomized mice.

Retardation of the appearance of IgA in the intestinal tract, which was undetectable in the uninfected germfree mice, was also observed in the thymectomized mice. This finding lends support to the presumption that the neutralizing antibody may belong to the IgG class of immunoglobulin.

文 献

- Archer, O. and Pierce, J. C. (1961) : Role of thymus in development of the immune response. *Fed. Proc.* **20**, 26.
- Bazin, H., Levi, G. and Doria, G. (1970) : Predominant contribution of IgA antibody forming cells to an immune response detected in extra intestinal lymphoid tissues of germfree mice exposed to antigen by the oral route. *J. Immunol.* **105**, 1049-1051.
- Bealmer, M. and Wilson, R. (1966) : Histological comparison of the thymus of germfree (Axenic) and conventional CFW mice. *Anat. Rec.* **154**, 261-274.
- Berger, R., Ainbender, E., Hodes, H. L., Zepp, H. D. and Hevizi, M. M. (1967) : Demonstration of IgA polioantibody in saliva, duodenal fluid and urine. *Nature* **214**, 420-422.
- Bodian, D. (1956) : Simplified method of dispersion of monkey kidney cells with trypsin. *Virology* **2**, 575-576.
- Burnet, M. (1962, a) : Role of the thymus and related organs in immunity. *Brit. Med. J. Sept.* **29**, 807-811.
- Burnet, M. (1962, b) : The thymus gland. *Scientific American* **207**, 50-57.
- Craig, S. W. and Cebra, J. J. (1971) : Peyer's patches, an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the Rabbit. *J. Exp. Med.* **134**, 188-200.
- Crebbe, P. A., Nash, D. R., Bazin, H., Eyssen, H. and Heremans, J. F. (1969) : Antibodies of IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *J. Exp. Med.* **130**, 723-744.
- Crispens, C. G. Jr., and Rey, I. F. (1967) : Additional studies on the effects of neonatal thymectomy and Lactate Dehydrogenase virus infection on mice. *Experimentia* **23**, 681-683.
- East, J. and Parrott, D. M. V. (1962) : Operative techniques for newborn mice using anaesthesia by cooling. *J. Endocrin.* **24**, 249-250.
- East, J., Parrott, D. M. V., Chesterman, F. C.

- and Pomerance, A. (1963) : The appearance of a hepatotropic virus in mice thymectomized at birth. *J. Exp. Med.* **118**, 1069-1082.
- East, J., Parrott, D. M. V. and Seamer, J. (1964) : The ability of mice thymectomized at birth to survive infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virol.* **22**, 160-162.
- Good, R. A., Dalmasso, A. P., Martinez, C., Archer, O.K., Pierce, J. C. and Papermaster, B. W. (1962) : The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J. Exp. Med.* **116**, 773-795.
- Good, R. A., Papermaster, B. W. (1964) : Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. *Advances in immunology* **4**, 1-115.
- Gross, L. (1959) : Effect of thymectomy on development of leukemia in C₃H mice inoculated with leukemic passage virus. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, N. Y. **100**, 325-328.
- Hashimoto, K., Sugiyama, T. and Sasaki, S. (1966) : An adenovirus isolated from the feces of mice. 1. Isolation and Identification. *Japan. J. Microbiol.* **10**(2), 115-125.
- 橋本一男, 岡田靖朗, 田尻孝, 杉原由美子, 佐々木正五 (1970) : 一, 二の免疫抑制剤のマウスアデノウイルス腸管感染に対する影響, *ウイルス*, **20**, 140-141.
- Hashimoto, K., Sugiyama, T., Yoshikawa, M. and Sasaki, S. (1970) : Intestinal resistance in the experimental enteric infection of mice with a mouse adenovirus. 1. Growth of the virus and appearance of a neutralizing substance in the intestinal tract. *Japan. J. Microbiol.* **14** (5), 381-395.
- Hashimoto, K., Yoshikawa, M., Sugihara, Y. and Sasaki, S. (1971) : Intestinal resistance in the experimental enteric infection of mice with a mouse adenovirus. 2. Determination of the neutralizing substance in the intestinal tract as an IgA antibody. *Japan. J. Microbiol.* **15**(6), 499-508.
- Hotchin, J. and Sikora, E. (1964) : Protection against the lethal effect of lymphocytic choriomeningitis virus in mice by neonatal thymectomy. *Nature* **202**, 214-215.
- Jankovic, B. D., Waksman, B. H. and Arnason, B. G. (1962) : Role of the thymus in immune reactions in rats. *J. Exp. Med.* **116**, 159-207.
- Keller, R. and Dwyer, J. E. (1968) : Neutralization of poliovirus by IgA coproantibodies. *J. Immunol.* **101**, 192-202.
- Keller, R., Dwyer, J. E., Ho, W. and D'Amodio, M. (1969) : Intestinal IgA neutralizing antibodies in newborn infants following poliovirus immunization. *Pediatrics* **43**, 330-338.
- Kono, R., Ikawa, S., Yaoi, H. Jr., Hamada, C., Ashihara, Y. and Kawakami, K. (1968) : Studies on poliovirus coproantibody. 2. Characterization of neutralizing substance in fecal extracts. *Amer. J. Epidemiol.* **83**, 14-23.
- Kono, R., Akao, Y., Sasagawa, A. Nomura, Y., (1969) : Studies on the local immunity of intestinal tract of chickens after oral administration of newcastle virus disease. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **22**, 235-252.
- Lipton, M. M. and Steigman, A. T. (1963) : Human coproantibody against polioviruses. *J. Infect. Dis.* **112**, 57-66.
- Mcintire, K. R., Sell, S. and Miller, J. F. A. P. (1964) : Pathogenesis of the post-neonatal thymectomy wasting syndrome. *Nature* **204**, 151-155.
- Miller, J. F. A. P. (1961) : Immunological function of the thymus. *Lancet* **2**, 748-749.
- Miller, J. F. A. P. (1962) : Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. Royal Soc. Ser. B.* **156**, 415-428.
- Miller, J. F. A. P., Marshall, and White, R. G. (1962) : The immunological significance of the thymus. *Advances in immunology* **2**, 111-162.
- Miller, J. F. A. P. and Osaba, D. (1967) : Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.* **47**, 437-520.
- Miller, J. F. A. P., Mitchell, G. F. and Weiss, N. S. (1967) : Cellular basis of the immunological defects in thymectomized mice. *Nature* **214** 992-997.
- Miller, J. F. A. P. and Mitchell, G. F. (1968) : Cell to cell interaction in the immune response. 1. Hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 801-820.
- Miller, J. F. A. P. and Mitchell, G. F. (1968) : Cell to cell interaction in the immune response. 2. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 821-837.
- Miller, J. F. A. P., Dukor, P., Grant, G. and Sinclair, N. R. (1967) : The immunological responsiveness of germfree mice thymectomized at birth. *Clin. Exp. Immunol.* **2**, 531-542.
- Miller, J. F. A. P. (1969) : The role of blood cells in immunity. *Brit. J. Haemat.* **16**, 331-335.
- 森良一, 野本亀久雄, 南嶋洋一, 武谷健二 (1964) : Rickettsia sennetsu (S. todayi) のマウスにおける病原性について, *ウイルス*, **14**, 226-227.
- 森良一 (1967) : 新生時胸腺摘除マウスにおける防御機構の低下—特にヘルペスウイルス感染の場合—*日本血液学会雑誌*, **30**(1), 115-119.
- 森良一 (1970) : 新生時胸腺摘除マウスにおける抗体産生および感染症, *最新医学*, **25**(1), 232-237

- Mori, R., Nomoto, K. and Takeya, K. (1964) : Effects of neonatal thymectomy on foot pad reaction caused by lymphocytic choriomeningitis virus inoculation. *Proc. Japan. Acad.* **40**, 772-775.
- Mori, R., Tasaka, T., Kimura, G. and Takeya, K. (1967) : Depression of acquired resistance against herpes simplex virus infection in neonatally thymectomized mice. *Archiv. Ges. Virusforschung.* **21**, 459-462.
- Mori, R., Takeya, K., Minamishima, Y. and Tasaki, T. (1965) : Effect of thymectomy on experimental viral infection of mice. 1. Herpes simplex virus and Coxsackie B₅ virus. *Proc. Japan. Acad.* **41**, 975-978.
- 野本亀久雄 (1965) : 胸腺摘出による免疫学的研究法, 福岡医学雑誌, **56**, 208-213.
- Ogra, P. L., Karzon, D. T., Righthand, F. and MacGillivray, M. (1968) : Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *New England, J. Med.* **279**, 893-900.
- Ogra, P. L. and Karzon, D. T. (1969 a) : Poliovirus antibody response in serum and nasal secretions following intranasal inoculation with inactivated poliovaccine. *J. Immunol.* **102**, 15-23.
- Ogra, P. L. and Karzon, D. T. (1969 b) : Distribution of poliovirus antibody in serum and nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentally tract with poliovirus. *J. Immunol.* **102**, 1423-1430.
- Pollard, M. (1965) : The use of germfree animals in virus research. *Progr. Med. Virol.* **7**, 362-376.
- Parrott, D. M. V. and East, J. (1962) : Role of the thymus in neonatal life. *Nature*, **195**, 347-348.
- Rowe, W. P., Black, P. H. and Levey, R. H. (1963) : Protective effect of neonatal thymectomy on mouse LCM infection. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **114**, 248-251.
- 佐々木正五 (1967) : 常在菌叢の構成機転, 慶応医学, **44**, 681-686.
- Sherman, J. D. and Dameshek, W. (1963 a) : Effect of thymectomy on the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). 1. Wasting disease. *Blood*, **22**, 252-271.
- Sherman, J. D., and Dameshek, W. (1963 b) : Wasting disease, following thymectomy in the hamster. *Nature* **197**, 469-471.
- Sjodin, K., Dalmaso, A. P. Smith, J. M. and Nartinez, C. (1963) : Thymectomy in newborn and adult mice. *Transpl.* **1**, 521-525.
- Sugiyama, T., Hashimoto, K. and Sasaki, K. (1967) : An adenovirus isolated from the feces of mice. 2. Experimental infection. *Japan. J. Microbiol.* **2**(1), 33-42.
- Svet-Moldavsky, G. J. Zinzar, S. N. and Spector, N. M. (1964) : Dissociation of the immunological competence in neonatally thymectomized mice and its restoration. *Nature* **202**, 353-355.
- Takeya, K., Mori, R. and Nomoto, K. (1964 a) : Antibody-forming cells of neonatally thymectomized mice. *Proc. Japan. Acad.* **40**, 572-575.
- Takeya, K., Mori, R. and Nomoto, K. (1964 b) : Effects of neonatal thymectomy on immunity against *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Japan. Acad.* **40**, 769-771.
- 武谷健二 (1965) : 胸腺と細菌感染症, 福岡医学雑誌, **56**, 217-220.
- Tomasi, T. B. and Bienenstock, J. (1968) : Secretory immunoglobulins. *Adv. Immunol.* **9**, 2-87.
- Trexler, E. C. and Reynolds, B. I. (1957) : Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals. *Appl. Microbiol.* **5**, 406-412.
- 内山武彦, 秋山武久, 沖津富士夫, 根本一郎, 牛場大蔵 (1966) : 生下時に胸腺を剔除したマウスの諸種免疫反応性と非特異的抵抗性について, 日本細菌学雑誌, **21**, 92-100.
- Ushiba, D., Kitasato, B., Saito, K., Nakano, M. and Nomura, T. (1962) : Selective inbreeding of mouse strains uniformly susceptible to mouse typhoid of those strains. 1. Trial of establishing inbred strains with different. time-to death after infection with *Salmonella enteritidis*. *Japan. J. Exp. Med.* **32**, 505-517.
- Wagner, M. (1959) : Determination of germfree status. *Ann. New York Acad. Sci.* **78**, 89-101.
- Wilson, R., Sjodin, K. and Bealmear, M. (1964) : The absence of wasting in thymectomized germfree (axenic) mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 237-239.