

千葉医学会雑誌

第35巻 第1号

(昭和34年5月28日発行)

綜 説

無菌動物に関する研究

第1報

1. 無菌飼育装置 HMC-2 及び無菌飼育方法について
2. 腸内に於ける菌の定着・拮抗及び共生状態について
3. 血清殺菌力・白血球食菌能及び溶血補体価について

千葉大学医学部衛生学教室 (主任 谷川教授)

助教授 田波潤一郎

JUN-ICHIRO TANAMI

(昭和33年11月第35回千葉医学会総会特別講演)

緒 言

無菌動物を医学の基礎研究手段に用いようとする構想は1885年 Pasteur 教授によつて提唱されたものであるが、各方面の生物学的現象が微細に分析されるに至つた今日、生命現象を全体として把握するために動物実験が極めて重要なものであることが再確認されるようになった。

医学を含む生物学は、生きているものを対象とする学問であるだけに、全体的な概念を知ることが難かしく、実験の純粋性保持もまた困難である。無菌飼育動物は Reyniers 教授⁽¹²⁾、宮川教授⁽¹⁸⁾が言うように、一般の自然動物と違つて細菌感染という生体反応に大きな影響を与える一つの修飾条件を消去しているのみならず、飼育環境条件・飼料などを一定条件に保ち得るから複雑な生体反応をかなり純粋な場に於て観察し得ることとなる。なお、安東教授・田嶋教授・川喜田教授の言うが如く、実験動物種の純粋性も実験条件単純化の重要な因子となる。

無菌飼育実験は Nuttal 氏及び Thierfelder 氏⁽²⁾(1895)によつて始められ、Schottelius 氏⁽³⁾(1899)、Küster 氏⁽⁴⁾(1912)、Cohendy 氏⁽⁵⁾(1912)によつて受けつがれ、Glimstedt 教授⁽⁶⁾(1932)によ

つて発展せしめられ、これが Gustaffson 博士⁽¹¹⁾に受けつがれている。無菌動物飼育方法の完成とこれが応用面の確立は Reyniers 教授の努力に負うものである。1958年以降の無菌飼育の世界的な動向は、無菌飼育そのものの研究は既に終わり、無菌動物を用いる研究が活発に行われ始めている状況である。

わが国では先に内藤氏⁽¹³⁾(1935)が鶏の無菌飼育を行い、この方法に準拠し、改良を施し、本教室の赤沢博士⁽¹⁴⁾(1942)が鶏の無菌飼育に成功し、諸種腸内常住菌、空中菌などの初感染が生体に及ぼす影響を観察した。宮川教授⁽¹⁵⁾(1950)は Reyniers 教授とは別個に無菌飼育法方の研究に乗り出し、諸種の困難を克服してその方法を完成し、最近ではマジックハンド使用大型飼育タンクの研究を完成し、色々動物の大量長期無菌飼育が期待される現況である。

私共の教室では前教授松村名誉教授⁽¹⁾以来40余年間腸内細菌の生理学的意義に関して研究を続けて来た。腸内菌の初感染状況を分析的に観察するために無菌動物が必用であり、前述の赤沢博士の研究が当時の谷川助教授(現教授)の指揮の下に数名の教室員と共に始められたわけである。

終戦後数年の実施不能時期を経て1949年より無菌飼育研究を再開し、1951年より、齋藤博士⁽¹⁹⁾等により縦型の無菌飼育タンクが作製され、比較的簡単に多数の無菌鶏が飼育され、腸内菌初感染の生理学的意義が次第に明らかにされるに至つた。

その後1953年より Reyniers 教授の方式を導入し、宮川教授の方式を参照しつつ HMC 型の試作に入り、最初 HMC-1 を完成して鶏の無菌飼育を行い、諸種細菌初感染と血清殺菌力増加との関係⁽²¹⁾を実験した。1954年よりここに報告する HMC-2 型の作製に取りかかり、1955年夏に完成し、鶏雛・ラット・海獣の無菌飼育を行つた。

現在では、この研究に従事し得る人員の僅少なことから、主として海獣のみを飼育している。

海獣の系について一言すれば、現在田嶋教授の御援助を得て、新規の研究には純系の使用が可能になりつつあるが、ここに発表する成績は何れも、私共の教室で自家交配を行つた近親系であつて、大部分の成績は近親交配6~7代のものについて行つたものである。

I 無菌飼育装置 HMC-2 及び飼育方法について

1. HMC-2 の構成

(1) 空気回路の系統

本装置の全体を空気回路の順に示せば、第1図の

如くであつて、空気の滅菌には空気灼熱滅菌器と渦状ガラスウールフィルターを併用した。空気の除湿は空気取り入れ口にあるフィンコイル型デシケター及び水槽中の蛇管冷却器によつて行われる。空気の適正加温は電気ヒーターによる自動温度調節装置による。

飼育タンクの空気送入口及び空気排出のそれぞれ前後には小ガラスウールフィルターを備えるが、空気送入口のものは、配管部分内の気圧を常に一定の陽圧に保ち、且つタンク流入直前の空気の再濾過を図るものである。空気排出口のものは空気の外部からの逆流に備えるものであつて、この小フィルターを通つて排出される空気は更に消毒剤を満したトラップを経由して外界に放出される。

空気ポンプの能力は毎分60lであつて、飼育タンク2、手術タンク1に通気し得る。

本装置の詳細は別に報告する予定であるから重要な部品につき若干の説明を加えれば次の如くである。

(a) 空気灼熱滅菌器： 第1図④の断面図をもつて説明すれば、ステンレス鋼製の二重円筒であつて、下部に於て内外二筒が連通し、筒内に平均粒径0.5mmのカーボランダムを納める。筒外部は電気炉であつて、通気時筒底部の気温が600°C、筒上部の気温が160~200°Cになるように自動調節されている。本器は Gustafsson 博士の使用しているものの応用型である。

(b) 空気冷却器： 灼熱滅菌器より排出される高温空気が通常この冷却器によつて15°Cまで冷却される。第1図⑥に示すように5°Cの冷却水槽中に1/2吋銅蛇管が設備されており、水層攪拌装置を備える。蛇管下部に凝結水排出用コックを備える。

(c) 空気加温器： 冷却された空気を適温にまで上昇せしめる装置で、自動温度調節機能を有する。この概要を第1図⑧、⑦に示す。

(d) ガラスウールフィルター： 直径30cm高さ10cmの濾過板7枚よりなる。中層に幅10cmの空隙を設けてある。この概要

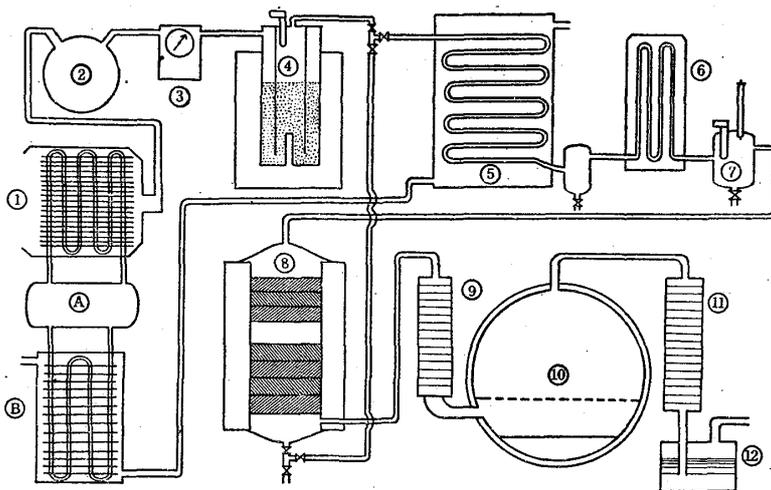


Figure 1. Air system of germ-free rearing unit HMC-2: A-Cooling unit. B-Water cooler. ①-Desiccator. ②-Air pump. ③-Gas meter. ④-Thermo sterilizing plant. ⑤-Air cooler. ⑥ and ⑦-Air temperature regulator. ⑧-Glass-wool air filter. ⑨ and ⑪-Small glass-wool filters. ⑩-Rearing tank. ⑫-Germicidal trap for exhaust.

を第1図⑧に示す。

小ペレットを重積したものである。第1図⑨及び⑩

(e) 小ガラスウールフィルター：ガラスウールに示す。

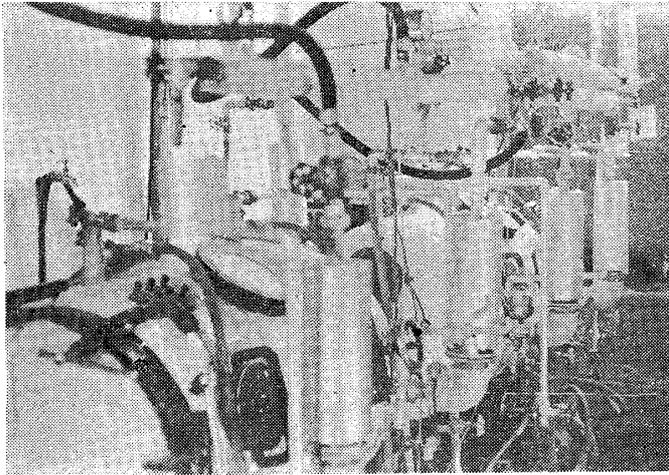


Figure 2. External view of operating tank and germ-free rearing tank.

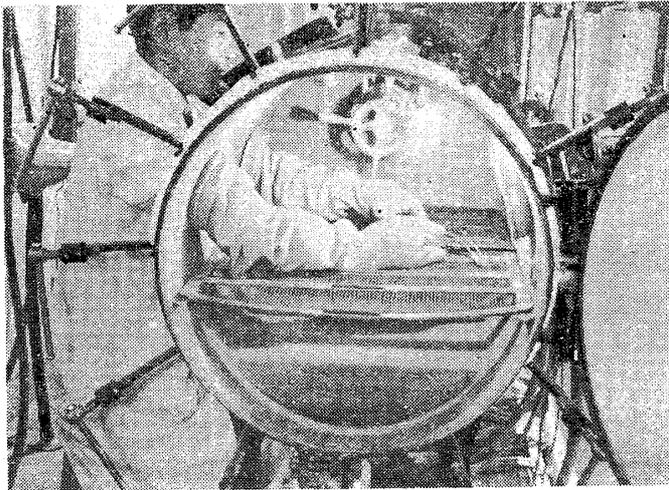


Figure 3. Internal view of germ-free rearing tank.

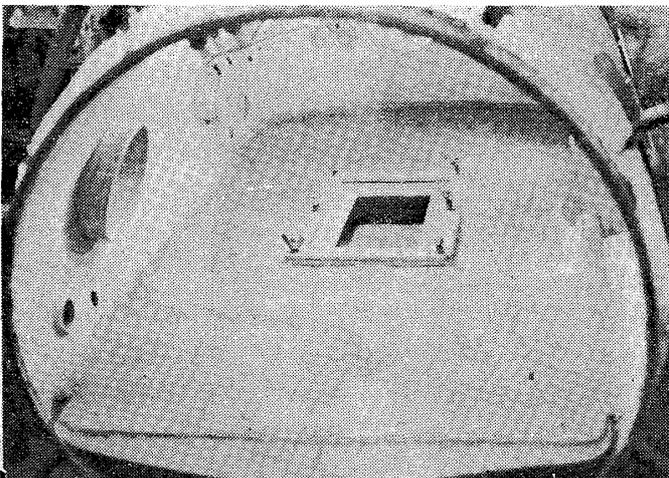


Figure 4. Internal view of operating tank.

(f) 飼育タンク：この外観は第2図に、その内景は第3図に示した通りである。5 mm 鋼板を溶接して作った高圧滅菌可能なタンクで内径 60 cm 最長径 120 cm である。本タンクの外殻は 3 cm の厚さに石綿をまきつけ保温を図つてある。

(g) 手術タンク：内景は第4図に示す如くであり、タンク本体の大き及び構造は飼育タンクと同様であるが、タンク下部に動物搬入用のタラップを有し、タラップ上部が手術を行う床となつてゐる。

飼育タンク及び手術タンクの手袋はネオプレン製又は特殊合成ゴム製のもので、タンク内面に特殊リングで固定されている。飼育タンク及び手術タンクの概要と二者の関係位置を示せば第5図の如くである。

(h) 飼料滅菌器：内径 25 cm, 最長径 65 cm の小タンクであつて、飼育タンク内に加熱滅菌後搬入すべき飼料、水、物品などを納め、飼育タンクに接合した後高圧滅菌を施し、滅菌完了後滅菌空気を送入し、タンク内容を乾燥せしめた後、本タンクに装備してある手袋を利用して物品を飼育タンク内に搬入する。物品搬入後タンク内汚物、不用品、試験用糞便などを搬出するに用いられる。

(i) ジャーミサイドルタラップ：加熱し得ざる物品を飼育タンク内に搬入するために用いるタラップであつて、飼料滅菌器と同じ様に飼育タンクに接合し、高圧滅菌完了後、薬液槽に殺菌剤液を満し、この殺菌剤液をタラップ内に流下せしめる。搬入すべき物品は、その表面を石鹼とブラシでよく洗い、滅菌水で洗滌した後タラップ入口より入れ、殺菌剤液中に一定時間沈めた後、タラップ出口より飼育タンク内に物品を取り出すのである。

(j) 二重ザイフフィルター：加熱し得ざる溶液を飼育タンク内に濾過搬入するための装置である。飼育タンクの連結

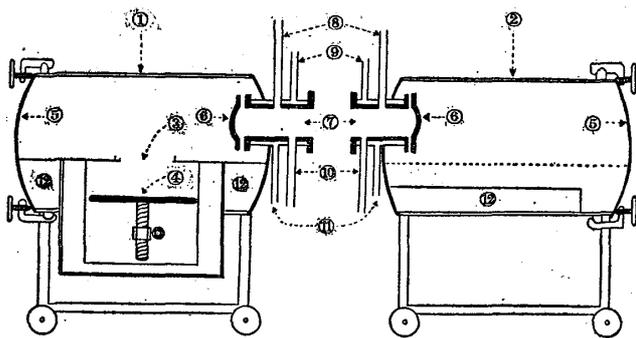


Figure 5. Longitudinal section of rearing tank and operating tank: ①-Operating tank. ②-Rearing tank. ③-Operating trap. ④-Operating table. ⑤-End door. ⑥-Inner door. ⑦-Connecting link. ⑧-Inlet pipe for steam or air. ⑨-Outlet pipe for cold water. ⑩-Outlet pipe for steam or air. ⑪-Inlet pipe for cold water. ⑫-Hot water tank.

筒の外部のフランジに適合する蓋の部分に二重ザイプフィルターを溶接したものであつて、本器は Gustafsson 博士⁽¹¹⁾の使用しているものの応用型である。

(2) HMC-2の滅菌回路

本装置全系路は一時に高圧蒸気を用いて 120°C の滅菌が可能であるが、随時フィルターの交換滅菌、飼育タンク・手術タンクの交互滅菌、飼料の滅菌搬入等、一部系路を使用中に他の系路を滅菌し、無菌空気を流通せしめて乾燥せしめる必要がある。このため配管が複雑となる。現在飼育タンク 2 個、手術タンク 1 個、フィルター 2 個、飼料滅菌器 1 個を一組として使用出来る特殊な配管系統を完成したが、この詳細及び滅菌方法は別報に記載する。

(3) 電流制御回路

飼育タンク内温度を一定に保つことは極めて必要なことである。スパイラル型調節器を用いてタンク下部の湯槽内水温を調節し、適温の維持を補っているが、調節器の不測の事故を考慮して、湯槽内水温とタンク内気温の両者を刺激源とする 2 回路の制御方式を使用することにしてゐる。空気温度は灼熱滅菌器・冷却器・加温器の自動調節作用で定まるが、この経路に故障を生じ気温が 30°C を超える場合には各部の電源が自動的に遮断され、警報が宿直者に伝達される。タンク内温度の微少な調節は湯槽内の水温による輻射熱を利用して行われているが、これもまた水温が適温以上になれば自動的に電流が遮断され警報が宿直者に伝達される。

(4) タンク内備品

手術タンク内には手術用具の外、オスバン 400 倍稀釈液、温度計、仔獸運搬用器具、ビニールシート装着用ネジ廻しなどを備える。

飼育タンク内にはタンクの天井に固定してある備えつけの天秤及び分銅、温湿度計、乳鉢、乳棒、秤量カップ、ピペット、飼料瓶、細菌検査用培地・試験管、ピンセット大小、鋏、ビタミンアンプル格納罐・ガーゼ格納罐などを備える。

飼育籠も諸種のものを用いたが、狭いタンク内に於て能率よく使用し得、手袋の破損を来さないようなものを作ることは比較的困難である。別報に現在用いている飼育籠の詳細を示したので参照されたい。

2. 無菌海獺の摘出及び飼養

鶏雛、ラット及び海獺の無菌飼育を行つたが、本報告では海獺の場合について述べる。

(1) 妊娠海獺の妊娠末期推定

恥骨縫合の開裂状況によつてこれを推定し、胎児の頭部発達状態、妊娠海獺の体重増加速度、腹部の形状等を参考にすることが出来る。

(2) 妊娠末期海獺の手術タンク内搬入

この目的に適するように作られた木製ベット上に海獺を仰臥固定し、ベット及び海獺背部を 400 倍オスバン液中 (37°C) に浸して消毒し、腹部の毛を鋏で刈り取り、脱毛クリームで短毛を除き、丁度チンキ及びアルコールで腹壁を滅菌する。手術タンクの動物搬入用タラップの入口を開き、エレベーター付きの手術台上にのせ、入口の蓋を閉鎖した後エレベーターを挙上し、海獺の腹壁が B 図に示すように無菌状態の手術タンクと動物搬入タラップとを境するビニール膜に接着するようにする。動物の位置は観察窓から覗きながら補正する必要がある。動物搬入用タラップの入口の操作と手術開始直前の手術面の模様を観察窓から見た所を示せば A 図及び C 図の如くである。

(3) 皮膚切開

ビニール膜と腹壁とを同時にピンセットを用いて固く摘み、ビニール膜と腹壁とに同時にメスを用いて小切開を加え、切端をペアンで固定する。次にその小切開をクーパーを用いて前後に延長するのであるが、一步毎にペアン固定を密に行い、オスバン液を滴下して行く。適宜の大きさの切開口完成後、切開断端をオスバンを浸したガーゼで覆いペアンで固定

する。皮膚切開口完成状況を示せばD図の如くである。

(4) 腹筋及び腹膜切開

状況により、腹筋と腹膜を同時に切開することもあり、また両者を別々に分けて行う場合もある。この切開は皮切の場合と同じであるが、ペアン固定は比較的粗でよく、腸管を損傷せざるよう十分な注意を要す。

(5) 子宮の露出

切開断端をオスパンを浸したガーゼで覆つた後、注意して切開口を拡ろげ、腸管を避けつつ子宮を引き出して露出せしめ、子宮壁をオスパン液で擦拭する。子宮露出完了の模様をE図に示す。次に子宮壁を通して見られる胎児の頭部に当る子宮壁に先端鈍円のクーパーを用いて切開を加え、羊膜につつまれた胎児を取り出し、手早く鼻・口の部分を覆う羊膜を剥ぎ取り、次に臍帯を小ペアンで止め、切断し、全身より羊膜を除くようにする。取り出した直後の幼獣はF図に示すように横臥のままであるが、30分位すれば大部分が立上り、動き始める。

幼獣は摘出が完了すれば、予め連結してある飼育タンクに移す。手術タンク及び飼育タンクは30°Cに保温されていることが必要である。

(6) 飼 養

飼養はすべてネオプレン手袋を通して手で行う。作業の外観はG図に示した如くである。飼育タンク内温度は最初24時間は30°C、以後少しずつ温度を下げて3日目に26°Cとし、1週間以後は23~25°Cに調節する。湿度は60~70%に保持するように努める。

乳餌料・水及びビタミンCは生後18時間から与える。最初4~5日は3時間おきに乳餌料をピペットにて与えるが、適当量を強制給餌にならないように投与する。ビタミンCは窒素置換の完全な注射用アンプル封入のものを120°C 25分間滅菌して飼育タンク内に搬入し、ピペットを用いて経口投与する。

飼養は給餌の外に幼獣の清潔保持に注意し、特に肛門部分の清拭を行い、又タンク内の清潔整頓に心掛けねばならない。尿によつて濡れた布片類は蓋付きの空罐に納めねばならない。

乳餌料は宮川教授の研究室で小林博士⁽¹⁷⁾が創製したNG-27を用いている。私共はこの餌料を内径2.5 cm長さ15 cmのガラス小瓶に分注して、120°C 25分滅菌後タンク内に移して給餌している。

NG-27は生後20日まで10 ml/1日より20 ml/1

日に増量して与える。Vitamin Cは生後30日まで隔日に10 mgずつ、30日以後は25 mgとする。

固形餌料は同じく小林博士のNG-36を用いているが、生後5日目よりこれを与え、生後20日まで5 g/1日から10 g/1日に漸増して与える。20日を過ぎると15~20 g/1日とし、30日を過ぎればNG-27を止めてNG-36のみ20 g/1日を与え、次第にこの量を増加する。自由摂取の場合の飼料量は3時間ごとの観察に於て飼料鉢中に残りが殆んどなくなる分量が望ましいのであるが、この調整はかなり困難である。

以上の他に濾紙片を与え、また水に併用して時々0.85%の食塩水を与える。

NG-27及びNG-30の処法を記載すれば次の如くである。

NG-36 海溟中成仔食 (100 g 当)

大豆粉	70.0 g
蔗 糖	9.0 g
アラビアゴム	12.0 g
仮性マグネシウム	0.5 g
醋酸カリウム	2.5 g
混合塩 (Hegsted's S. M. IV)	4.0 g
パンピタン	1.0 g
フオリアミン	2.5 mg
カチーフ	2.5 mg
フレスミン	15.0 γ
ピオチン	100.0 γ
塩化コリン	0.3 g
イーストエキス	0.5 g
肝臓エキス	25.0 mg
イノシトール	100.0 mg
パントテン酸カルシウム	10.0 mg
PABA	5.0 mg
ビタミンB ₁	9.0 mg
ビタミンB ₂	2.0 mg
ピリドキシン	2.0 mg

(V)

混 合 塩 (S. M. IV)
(Hegsted, 1941)

CaCO ₂	600 g
K ₂ HPO ₄	645 g
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	150 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	204 g
NaCl	335 g
Fe (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ · 6H ₂ O	55 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 g
KJ	1.6g
ZnCl ₂	0.5 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.6 g

NG-27 海獣乳仔食 (300 g 当)

全粉乳	100.0 g
蒸留水	200.0 ml
大豆油	1.5 ml
パンビタミン	3.0 g
フオリアミン	7.5 mg
カチーフ	7.5 mg
フレスミン	30.0 γ
ビオチン	300.0 γ
塩化コリン	0.15 g
各種付加ビタミン(V)	中成仔食処方 ³⁾ の3倍量

飼育10日目の無菌海獣をH図に示す。この時期のものはピペットによる給餌を行わないものであるが、この写真では試みにピペット給餌を行った。

3. 無菌試験並びにタンク内に細菌を搬入する方法

(1) 無菌試験

予め滅菌搬入してある飼育タンク内のチオグリオレート培地 (T. G. C. 培地) を試験管に分注し、これに可検物 (手術時の胎児羊膜, ガーゼ片, タンク内を擦拭したガーゼ浸出液, 糞便, 餌料等) を投入し, 飼料滅菌器を用いて外界に搬出し, 22°C, 30°C 及び 37°C の恒温箱中に 24 時間保存したものを無菌箱に移して次の各培養基に塗布又は投入し細菌試験を実施する。

- (a) 糞便及び飼料は塗抹染色して顕鏡する。
- (b) T. G. C. 培地, 1% 糖入ブイヨン, 肝・肝ブイヨンを用いる増菌試験を行う。
- (c) ツァイスラー血液平板を用いる好気培養試験を行う。
- (d) ツァイスラー血液平板を用いる嫌気培養試験を行う。

(2) タンク内に細菌を搬入する方法

当該菌株を適宜の培地に培養し, 培地の影響を除外したい場合には無菌的に遠心して洗滌し, 生理的食塩水に浮遊せしめた菌液を作製する。搬入には適当量の菌稀釈液を滅菌アンプル中に溶封し, ジャーミサイダルトラップを通して行う。アンプル封入は無菌箱中にて行い, 搬入菌量の推定は白金耳による生菌数の算定を基準にして稀釈法を用いて行うか, 浮遊液の濁度を測定してこれを行うことが出来る。

II 腸内に於ける細菌の定着・拮抗及び共生現象

無菌動物に母獸糞便・人糞などから分離した乳酸

杆菌・腸球菌・大腸菌などを経口投与して単独又は重感を起さしめ, 単独菌の感染定着状況, 重感染の場合の拮抗並びに共生現象について研究した。

菌投与後の排出糞便は, 極力飼料混入を避けるため, 敷布の交換を頻回に行い, 糞便を籠下に備えたオスバン液 (200 倍稀) 積中に落とし込むようにした。

定着状況は, 糞便内菌数の算定と, 腸管各部の絨毛間隙内菌数の算定を行つてこれを確かめた。

糞便内菌数の算定は, 検査すべき海獣の籠の敷布を更新し, 排便をまつて直ちにこれを採取し, タンク外に搬出し, 適宜稀釈後, 適宜の培地に塗布して好氣的又は嫌氣的に培養を行つた。

腸管各部の絨毛間隙内菌数は, 実験期間終了後タンクを開放して動物を取り出し, 心臓穿刺によつて採血を行つて死亡せしめ, 腸管各部の一定長を切取つた。残余の死屍は病理学的研究用の材料として肉眼的観察事項を記載した上で, フォルマリン固定を行い, 各種臓器の病理組織標本を作製した。

先に採取した腸管各部の一定長のものは, 腸管を切り開き, 10 cc ずつの生理的食塩水を納めた 3 本の試験管中にて順次洗滌する。この際 3 本目の試験管中の細菌数が 10^3 以下に抑えられ程度に洗滌する必要がある。洗滌後の腸管を無菌的に秤量し, 乳鉢中にて一定量の食塩水を加えつつ磨砕し, 一定度の稀釈を行つた後選択培地上に塗布して夫々の菌数を分離算定した。

二種類の大腸菌の重感染に於ける分離算定にはフェージによる型分離を試みた。

本報告に記載した無菌海獣腸管に定着しうる菌株の由来と使用した選択培地などについて述べれば次の如くである。

(a) *Lactobacillus acidophilus*: 母獸海獣由来の菌株で形状・生物学的性状が Bergey の記載に一致するものである。本間の培地⁽³³⁾に塗布し嫌気培養を行つた。

(b) *Streptococcus faecalis*: 母獸海獣由来の菌株で形状・生物学的性状が Bergey の記載に一致するものである。Azide 培地に塗布して好気培養を行つた。

(c) *Lactobacillus bifidus*: 母獸海獣由来の菌株で Bergey の記載に一致するものである。ツァイスラー血液平板を用いる嫌気培養を行つた。

(d) *Escherichia coli* M₁: 母獸海獣由来の菌株で 6 頭の母獸から分離した 8 株の大腸菌がどれも血清学的に 0-104 に一致したので代表的にその一株

を実験に使用した。Eosin-methylenblue (E. M. B.) 培地を用いて好気培養を行つた。

(e) *Escherichia coli* F₆: 人体由来の菌株であつて血清学的に 0-101 に分類される菌株である。E. M. B. 平板による分離を行つた。この菌株は Phage T₆g によつて選択的に溶菌されるから、*E. coli* M₁・*E. coli* F₆ 重感染動物の糞便から任意の 100 個の菌株を分離し、各菌株の Phage 感受性を試験し、全菌株中に含まれる F₆ 菌株の%を調べたものである。

(f) *Bacillus* X: 好気性有芽胞杆菌であつて、試験管内に於てビタミン B₁ 分解能力を有した。固形飼料滅菌不完全により迷入したものと推定される。再試験の結果無菌海猿腸管内によく定着した。普通飼育海猿には定着しないものと思われる。

1. 無菌海猿の発育

無菌飼育海猿の発育状況を普通飼育及び滅菌飼料 (NG-27 及び NG-36) を用いた人工飼育群と比較してみると第 6 図に示した如くである。体重増加速度は無菌群と人工飼育群との間に著明な差がなく、無菌群の発育は普通飼育のものよりも低い発育速度を示した。特に初期体重減少が著明であつた。最近の経験では飼育方法の改善と帝王切開実施時期の適切なことより、この初期体重減少の期間及び程度が軽減され、一般に良好な発育を見るようになってきている。

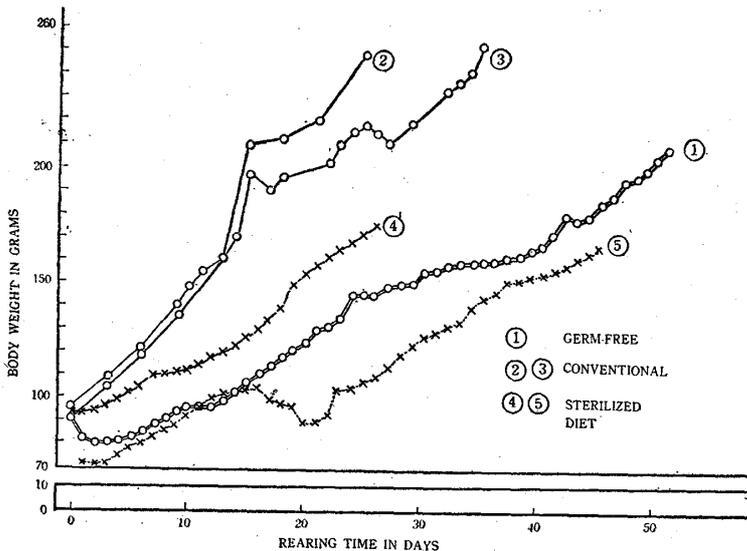


Figure 6. Growth curves of guinea pigs: Curve ① shows the average growth of 42 germ-free reared guinea pigs compared with the growth curves of conventionally reared (②, ③) and artificially reared (④, ⑤) guinea pigs. Artificial rearing includes feeding on sterilized diet and maintaining a temperature the same as germ-free rearing.

2. *E. coli* M₁ と *E. coli* F₆ の定着・拮抗現象

E. coli M₁, *E. coli* F₆ 共に無菌海猿腸管によく定着し得る。腸管内発育速度は *E. coli* M₁ (以下 M₁ 菌) が *E. coli* F₆ (以下 F₆ 菌) よりも速やかであつた。

M₁ 菌を無菌飼育 20 日目の海猿に約 3×10^8 経口投与すると、投与後 3 日目の糞便中より 10^9 /g 以上の菌を検出し、粘液下痢便となり、粘液を混入するに至り、全例 3~7 日にして死亡した。死亡前血液中の菌を検査してみると M₁ 菌が検出され、本菌の敗血症を思わせる所見を得た。

死後の剖検によれば、腸管全域の発赤、腸間膜血管の拡大を認め、回盲部粘膜上皮のエロジオンを認めた。腸間膜リンパ節の組織像を見ると、充血、細胞数増加、Erythrophage 等が認められ、変性細胞群が数多く発見された。この一例を図 LC に示した。普通飼育海猿及び無菌飼育海猿の腸間膜リンパ節組織像 (図 LA 及び図 LB) と比較対照されたい。

F₆ 菌約 3×10^8 投与では M₁ 菌の如き糞便内菌数の急激な増加が認められず、徐々に菌数が増加して投与後 20 日前後に 10^9 /g 以上に達した。この際軽度の下痢、粘液の排泄が認められ、一例に於て F₆ 菌投与後 24 時間目の血中に F₆ 菌の存在を証明した。しかし、全例の剖見結果からすれば、腸管各部に異常を認めず、組織標本の顕微鏡所見に於ても、粘膜上皮下組織の発達促進が見られ、自由細胞の出現及び少数の遊走細胞を認め得るのみで著明な病的所見を見出さなかつた。図 IC にこの例を示す。普通飼育海猿及び無菌飼育海猿の回腸組織像 (図 IA 及び図 IB) を比較対照されたい。

腸間膜リンパ節に於ても、細胞の増加、濾胞の出現等、リンパ節の強化充実を思わせる像が認められたが、変性細胞像等の病的変化を認めなかつた。

M₁ 菌、F₆ 菌共に普通飼育動物 (海猿、ラット及びマウス) に対する病原性を欠き 10^5 程度の菌量を腹腔内注射しても認むべき変化を生ぜず、山羊血、海

豚血及び人血に対する溶血反応も認められなかつた。

M₁ 菌と F₆ 菌との比較的大量 (約 7 × 10⁵) を同時に無菌海豚飼育 20 日目のものに経口投与し、以後日を追つて行つた糞便検査の結果は第 7 図に示す如く、F₆ 菌は 24~28 時間までに検出不能となつた。海豚 5 匹中 3 匹は投与後 3 日目に死亡し、2 匹は 7 日目に死亡した。死後、腸管各部の絨毛間隙内菌の状態を調査してみると第 7 図の柱状グラフに示す通り、腸管各部の 0.2g 当りに存在する M₁ 菌の数が求められたが F₆ 菌の存在を認めなかつた。組織学的所見は M₁ 単独投与群と同じであり、死亡前の血中から M₁ 菌が証明された。

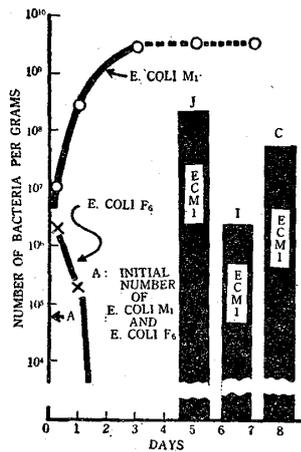


Figure 7. Resident state of *E. coli* M₁ and *E. coli* F₆: *E. coli* M₁ and *E. coli* F₆ (about 7 × 10⁴) were administered to 3 germ-free reared guinea pigs on the 20th day after birth. Number of bacteria in feces of each animal was examined and *E. coli* M₁ and *E. coli* F₆ were separated, using phage typing method, and calculated. Column graph shows the number of *E. coli* M₁ (ECM 1) in the papillar cavities of the mucous membrane, in each part of the intestinal canal (0.2g), at the end of the experiments. J, I and C represent jejunum, ileum and colon respectively. This figure shows one result out of the 5 experiments.

次に F₆ 菌大量 (約 7 × 10⁴) M₁ 菌少量 (約 3 × 10³) を前回と同様の条件で無菌海豚に投与してみると糞

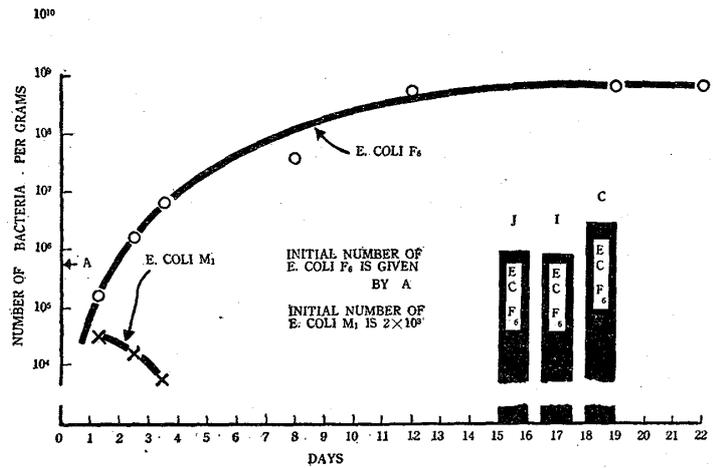


Figure 8. Resident state of large amount of *E. coli* F₆ and small amount of *E. coli* M₁: *E. coli* F₆ (about 7 × 10⁴) and *E. coli* M₁ (about 2 × 10³) were administered to 3 germ-free reared guinea pigs on the 20th day after birth. Number of bacteria in feces of each animal was examined and *E. coli* F₆ and *E. coli* M₁ were separated, using phage typing method, and calculated. Column graph shows the number of *E. coli* F₆ (ECF₆) in the papillar cavities of the mucous membrane, in each part of the intestinal canal, at the end of the experiments. J, I and C represent jejunum, ileum and colon respectively. This figure shows one result out of 3 experiments.

便中の M₁ 菌は第 8 図に示す如く、投与後 3~4 日にして見出し得なくなつた。この際は海豚死亡せず組織学的所見は F₆ 菌単独投与群と同様であつた。大腸菌投与後 22 日目にこれを殺し、絨毛間隙内に存在する細菌数を算定して見ると第 8 図の柱状グラフで示す通り、F₆ 菌が腸管各部の絨毛間隙内から検出されたが M₁ 菌は検出されなかつた。

3. 乳酸菌群と *E. coli* M₁ との共生・拮抗現象

乳酸菌群として、母獸より得た *L. acidophilus*, *Strept. faecalis*, *L. bifidus* を用いた。何れの菌株に於ても 10⁷~10⁸ の生菌を無菌海豚に経口投与して、腸内に菌が定着し増殖し始める速度が M₁ 菌よりも緩徐であつたため、乳酸菌群の各々を M₁ 菌投与の 24~72 時間前に行つた。

一般に乳酸菌群を無菌海豚に投与すると発育速度が改善されるが、特に *L. bifidus* の投与によつて著明であつた。

発育促進の例を示せば第 9 図の如くである。

前節に於て述べた通り、M₁ 菌の腸内初感染は致死的な効果を与えるが、この致死的效果は乳酸菌群

の何れか一つを予め投与しておくことによつて消去せしめられるものであつたが、菌株の特殊性がこの拮抗現象に現われていた。

(1) *L. acidophilus* (約 4×10^7) を投与し 24 時間後に *E. coli* M₁ (約 3×10^3) を投与した場合の二菌の拮抗ないし共生現象

日を追つて糞便内の菌数を検査して行くと第 10 図に示すが如く、一旦増加した M₁ 菌は次第に減少し、 7×10^6 程度に安定し、*L. acidophilus* は 10^9 以上を維持する一定の平衡状態に達した。大腸菌投与後 20 日目に殺し、腸管各部の絨毛間隙内菌の数を分離算定してみると第 10 図柱状グラフに示す通り、大腸では糞便内菌数と類似した関係で両菌が検出され、回腸では M₁ の方が上回り、空腸

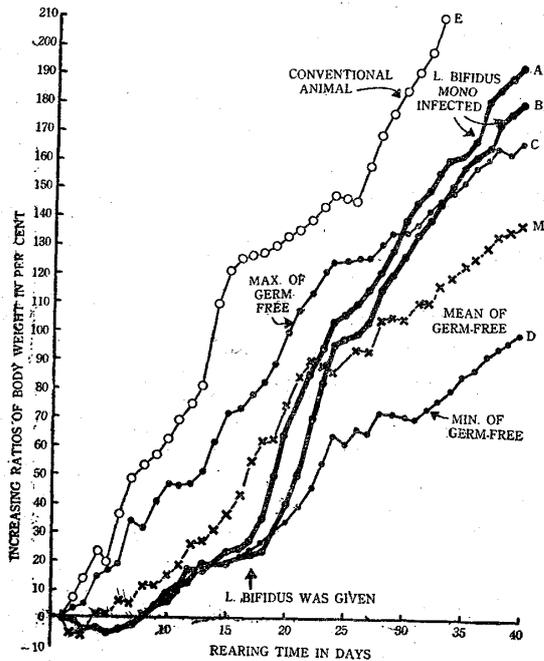


Figure 9. Special growth of *L. bifidus* mono-infected guinea pigs: A and B show growth rate curves of two germ-free reared animals administered with *L. bifidus* (about 8×10^7) on 17th day after birth. C, M and D show the growth curves of germ-free reared animals. C and D represent maximum and minimum growth rate of the 80 germ-free reared animals. About sixty per cent of them are very much like the curve M. Increasing ratios of A and B after 18th day are approximately the same as that of conventionally reared animal E.

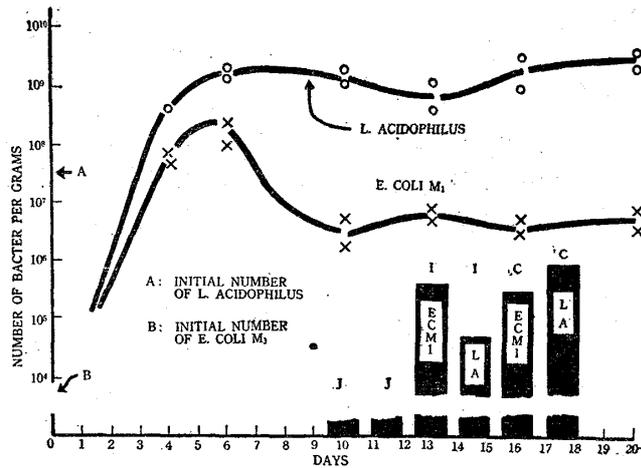


Figure 10. Resident state of *L. acidophilus* and *E. coli* M₁: *L. acidophilus* (about 4×10^7) were administered to 5 germ-free guinea pigs on the 20th day after birth, *E. coli* M₁ (about 3×10^3) were administered to them on the 21st day after birth. Number of bacteria in feces of each animal were examined and *L. acidophilus* and *E. coli* M₁ were separated, using specific culture media, and calculated. Column graph shows the number of *L. acidophilus* (LA) and *E. coli* M₁ (ECM 1) in the papillar cavities of the mucous membrane, in each part of the intestinal canal, at the end of the experiments. J, I and C represent jejunum, ileum and colon respectively. This figure shows one result out of the 5 experiments. It is noted in all these cases that the symbiotic resident phenomena between the two kinds of bacteria, both in feces and in the papillar cavities, are observed, and the number of *E. coli* M₁ is always found of less than that of *L. acidophilus*.

からは両菌とも検出されないか、或る例では $10^3 \sim 10^4$ 程度の *L. acidophilus* を検出した。

組織学的検査によれば、腸管各部に異常所見を認めず、粘膜上皮下組織は軽度に充血的であり、わずかに自由細胞の出現を認め、無菌動物の場合よりも上皮下組織の発達が促進されている所見を認めた。この所見は殆んど *L. acidophilus* 単感染海獺に於ける腸管各部の組織像と一致する所見であつて、M₁ 菌の障害作用が認められないことを物語るものである。図 10D に *L. acidophilus* 単感染海獺の回腸の所見を示したが、M₁ 菌・*L. acidophilus* 重感染海獺の回腸所見はこれと殆んど同じであつた。図 10B の無菌飼育海獺の回腸の所見及び図 10A の普通飼育

海狸回腸の所見と比較して *L. acidophilus* 単感染の場合の特質を知ることが出来る。

(2) *Strept. faecalis* (約 3×10^7) を投与し 24 時間後に *E. coli* M₁ (約 3×10^3) を投与した場合の二菌共生現象

日を追って糞便内菌の検査を続けると第 11 図に示した如く、両菌共に $10^9/1g$ 以上の増加を示し、両者優劣なく腸管内に定着した。菌投与後 20 日目に海狸を殺ろし、腸管各部の絨毛間

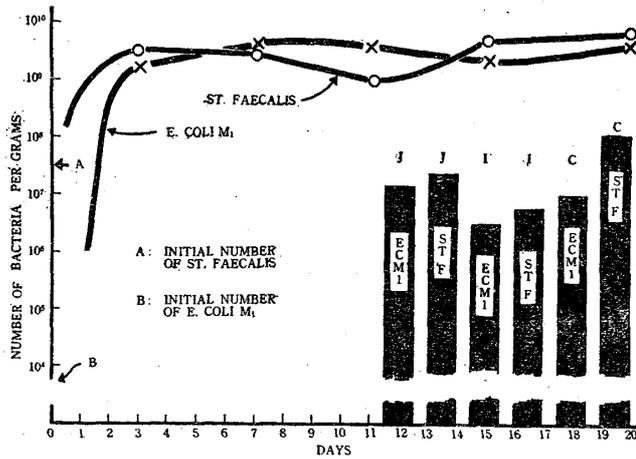


Figure 11. Resident state of *St. faecalis* and *E. coli* M₁: *St. faecalis* (about 3×10^7) were administered to 5 germ-free guinea pigs on the 20th day after birth, and *E. coli* M₁ (about 3×10^3) were administered to them on the 21st day after birth. Number of bacteria in feces of each animal were examined and *St. faecalis* and *E. coli* M₁ were separated, using specific culture media, and calculated. Column graph shows the number of *St. faecalis* (STF) and *E. coli* M₁ (ECM I) in the papillar cavities of the mucous membrane in each part of the intestinal canal, at the end of the experiments. J, I and C represent jejunum, ileum and colon respectively. This figure shows one of the result out of the 5 experiments. It is noted in all these cases that the symbiotic resident phenomena between both kinds of bacteria, both in feces and in the papillar cavities, can be observed.

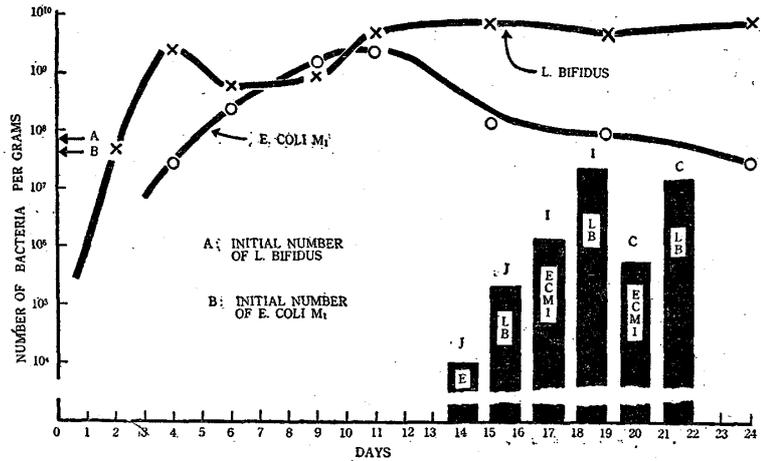


Figure 12. Resident state of *L. bifidus* and *E. coli* M₁: *L. bifidus* (about 8×10^7) were administered to 5 germ-free reared guinea pigs on the 17th day after birth, *E. coli* M₁ (about 6×10^7) were administered to them on 21st day after birth. Number of bacteria in feces of each animal was examined and *L. bifidus* and *E. coli* M₁ were separated, using specific culture media, and calculated. In this case, both kinds of bacteria could be found and the number of *E. coli* M₁ were less than *L. bifidus*.

Column graph shows the number of *L. bifidus* (LB) and *E. coli* M₁ (ECM I) in the papillar cavities of the mucous membrane, in each part of the intestinal canal. This figure shows one result out of the 5 experiments.

隙内菌を検査してみると第 11 図柱状グラフに示す通り、腸管各部に略同数の *Strept. faecalis* と M₁ 菌とが共存することが判明した。この場合の腸管各部の組織学的変化は *L. acidophilus* 単感染の場合と殆んど同じく、上皮下組織のわずかな発達を認めた。

(3) *L. bifidus* (約 8×10^7) 投与後 72 時間後 *E. coli* (約 6×10^7) M₁ を投与した場合の二菌拮抗・共生現象
日を追って糞便内菌検査を行つてみると、

第 12 図に示すように、一旦増加した M_1 菌が $7 \times 10^7/1g$ 程度に減少し、*L. bifidus* は $7 \times 10^9/1g$ の多数を認めるようになる。菌投与後 24 日目に海狸を殺りし、腸管各部の絨毛間隙内菌を調査してみると第 12 図柱状グラフに示すように腸管各部に於て *L. bifidus* 優位の定着状況を示すものであることが判明し、空腸に於ける両菌の存在は一般に他の部分に比較して少いことが知られた。

同様の実験を *L. bifidus* (約 8×10^7) 投与後 24 時間目に M_1 菌 (約 3×10^3) 投与する実験を行つて見ると第 13 図に示すが如く、*L. bifidus* は著明に増加し、2~3 日後に $10^9/1g$ 以上となり、 M_1 菌は次第にその数を減じて菌投与後 9 日目以後は検出し得なくなつた。菌投与後 22 日目に殺りし、腸管各部の絨毛間隙内菌を調査したが何れの部位からも *L. bifidus* のみが検出された。腸管各部の組織学的所見は何れも *L. acidophilus* 単独感染の場合と同じく、上皮組織のわずかな発達が認められた。

以上の如く乳酸菌群が最初に腸内感染を起し、一定数以上が腸管絨毛間隙内に定着すると引き続き投与された M_1 菌の障害性が防止される。この防止

は M_1 菌の腸粘膜通過阻止作用が主なる機転であるらしく思われ、組織標本から得られた知見によれば、この阻止作用は上皮組織の発達に密接な関係があるものと考えられる。

乳酸菌群初感染 M_1 菌追加感染の場合の腸間膜リンパ節の病理的变化は、細胞数の増加、構造の充実、濾胞形成、2 次小節移行型の発生等であるが、これは全く乳酸菌単独感染の場合のリンパ節の変化と同じであつて、乳酸菌群の初感染が先ず粘膜上皮組織及びリンパ節等に組織充実に作用し、一旦強化された各組織は追加感染する菌の通過を許さないように働くものと考えられる。例として乳酸菌単独感染海狸のリンパ節の組織像を示せば図 LD の如くである。

なお、腸管内特に絨毛間隙に於ける 2 菌株の拮抗現象も見のがすことの出来ない問題であつて、わずか 24~72 時間の間に完全な腸管防禦能が成立するとは思われないので、この間に於ける腸内拮抗現象は、障害菌の発育阻止ないしは抑制現象の発現上重要な意義をもつものと思われる。

(4) *Bacillus X* の定着性

Bacillus X は好気性芽胞形成桿菌であるがよく無菌海狸腸管内に定着し増殖する。本菌を無菌動物飼育 20 日目のものに約 10^4 を経口投与すると 7 日~10 日にして糞便 1g 中 10^8 程度の本菌出現を認めることが出来た。この際海狸は一時的に下痢便となり体重の増加が停止するが、2~3 日にしてその症状が消退する。菌投与後 20 日目に海狸を殺りし、解剖を行つてみると、肉眼的に腸管各部の異常を認めず、組織標本に於ける所見は図 IE に示すが如く腸管各部の上皮組織がよく発達し、図 LE に示すが如く腸間膜リンパ節もよく発達し、2 次小節が多数認められた。

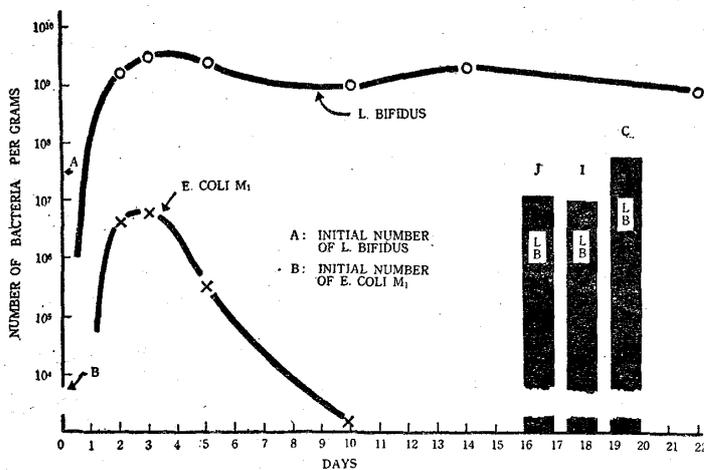


Figure 13. Resident state of *L. bifidus* and *E. coli M₁*: *L. bifidus* (about 6×10^7) were administered to 5 germ-free guinea pigs on the 20th day after birth, *E. coli M₁* (about 3×10^3) were administered to them on the 21st day after birth. Number of bacteria in feces of each animal was examined and *L. bifidus* and *E. coli M₁* were separated, using specific culture media, and calculated. In this case *E. coli M₁* could not be found in feces after 10 or 14 days after the administration of *E. coli M₁*.

Column graph shows the number of *L. bifidus* (LA) in the papillar cavities of the mucous membrane, in each part of the intestinal canal. This figure shows one result out of the 5 experiments.

III 血清殺菌力、白血球食菌能及び溶血補体価

1. 細菌初感染に伴う血清殺菌力の変動

E. coli M₁, *E. coli F₆*, *L. acidophilus*, *L. bifidus*+*E. coli M₁* を無菌飼育 20 日目 (*L. bifidus* + *E. coli*

M₁重感染の場合は前者を17日目後者を20日目)に投与し、生後40日目まで飼育した後殺して血清を採取し、Salmonella typhi 0-901に対する血清殺菌力を相沢教授⁽³⁰⁾の記載した方法に従って測定した。但し E. coli M₁ 投与のものについては菌投与後5日目の血清につき殺菌力の測定を行った。

表に現わして比較したものである。

無菌海狸40日飼育の血清殺菌力は低く、大腸菌単感染或は普通飼育40日目の海狸の血清殺菌力は高く、後2者の殺菌力は略同等であつた。この成績を示せば第14図の如くである。なお、本図右に示した普通飼育海狸の血清は1:1, 1:2, 1:4と稀釈

したものの殺菌を併せ示してある。

L. acidophilus 単感染海狸40日飼育の血清殺菌力は第15図に示すが如く、E. coli F₆ 単感染或は普通飼育海狸40日目の血清殺菌力よりも著るしく低いものであつた。

L. bifidus 及び E. coli M₁ 重感染海狸の血清殺菌力は第16図に示すが如く無菌海狸の血清殺菌力よりは高く、普通飼育或は E. coli F₆ 単感染海狸のそれよりは著るしく低いものであつた。

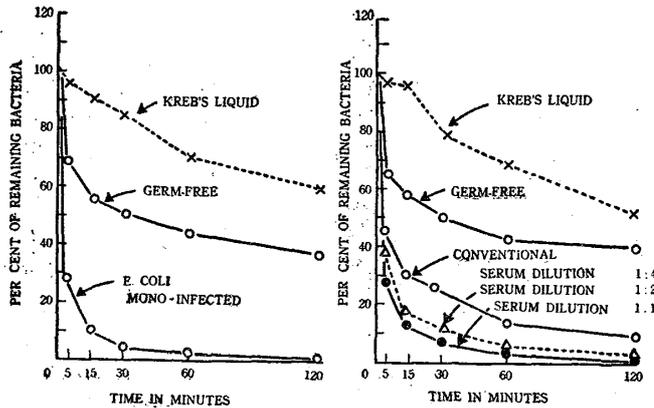


Figure 14. Bactericidal power of sera of germ-free reared guinea pigs: Left figure shows the low bactericidal power of serum of germ-free reared animal compared to that of E. coli F₆ mono-infected. Right figure shows the low bactericidal power of serum of germ-free reared animal compared to that of conventionally reared. Serum of the animal was diluted into 1:1, 1:2 and 1:4 with saline, and the bactericidal power of each diluted serum was tested. Test bacterium is Salmonella typhi 0-901.

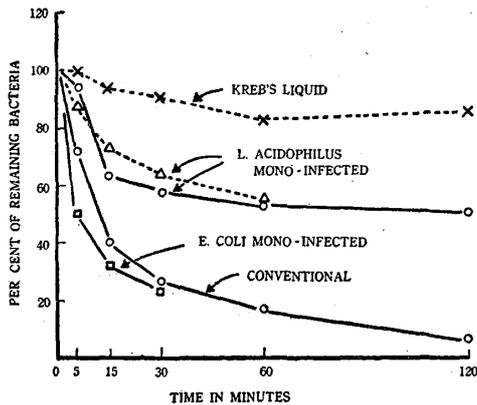


Figure 15. Bactericidal power of sera of L. acidophilus mono-infected guinea pigs: Sera of two animals those were administered with L. acidophilus show lower bactericidal power than that of E. coli M₁ mono-infected and conventional animals.

この実験は比較すべき海狸の血清を同時的に採取し、同時的に同一条件の下に測定を実施し、これを

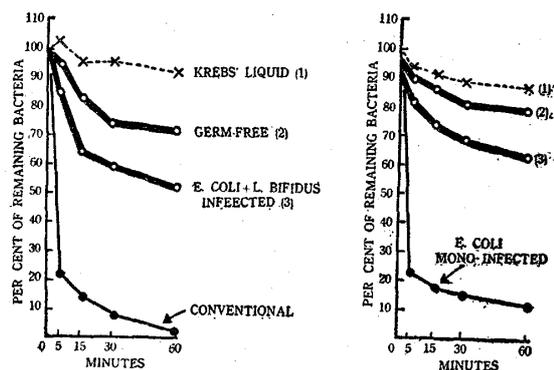


Figure 16. Bactericidal power of sera of E. coli M₁ and L. acidophilus double infected guinea pigs: Order of power of the sera is as follows;

Conventional or L. acidophilus and E. coli mono-infected > E. coli M₁ infected > Germ-free

Test bacterium is Salmonella typhi 0-901.

	A. N. ST.	P. P. L.		A. N. ST.	P. P. L.
G ₁ L + G ₁ S	3.3	86%	G ₃ L + G ₃ S	2.2	72%
G ₁ L + C ₁ S	3.0	84%	G ₃ L + C ₃ S	3.4	80%
C ₁ L + G ₁ S	4.7	90%	C ₃ L + G ₃ S	4.6	82%
C ₁ L + C ₁ S	5.3	94%	C ₃ L + C ₃ S	5.2	90%
	A. N. ST.	P. P. L.		A. N. ST.	P. P. L.
G ₂ L + G ₂ S	3.0	80%	G ₄ L + G ₄ S	2.8	74%
G ₂ L + C ₂ S	3.5	82%	G ₄ L + C ₄ S	2.9	74%
C ₂ L + G ₂ S	5.2	92%	C ₄ L + G ₄ S	4.8	82%
C ₂ L + C ₂ S	5.4	92%	C ₄ L + C ₄ S	5.6	86%

Figure 17. Comparative illustration of phagocytic activity of leucocyte of germ-free and conventional guinea pigs: Four groups of animals each consisting one germ-free and one conventional animal were examined. Phagocytic activity of leucocytes of germ-free animals is as a whole lower than that of the conventional.

G: Germ-free guinea pigs. GL: Leucocyte of G. GS: Serum of G. C: Conventional guinea pigs. CL: Leucocyte of C. CS: Serum of C. A. N. ST: Average number of *St. aureus* (Terajima) ingested by leucocytes (phagocytic index).

P. P. L.: Percentage of phagocytosis leucocytes (phagocytic percentage).

白血球 1 個当りの食菌数である食菌係数も食菌を認められる白血球数の全白血球数に対する比率であ

る食菌率も共に無菌海狸の場合には普通飼育の場合よりも低く現われた。また、同じ白血球に対する無

	A. N. ST.	P. P. L.		A. N. ST.	P. P. L.
C ₁ L + C ₁ S	5.4	94%	C ₂ L + C ₂ S	4.8	90%
C ₁ L + D ₁ S	4.6	90%	C ₂ L + D ₂ S	5.0	88%
D ₁ L + C ₁ S	4.0	84%	C ₂ L + G ₁ S	3.8	86%
D ₁ L + D ₁ S	4.3	86%	D ₂ L + C ₂ S	4.0	84%
			D ₂ L + D ₂ S	4.0	86%
			D ₂ L + G ₁ S	3.4	84%
			G ₁ L + C ₂ S	2.8	76%
			G ₁ L + D ₂ S	2.6	82%
			G ₁ L + G ₁ L	2.8	80%

Figure 18. Phagocytic activity of leucocyte of germ-free, double infected and conventional guinea pigs: Phagocytic activity of leucocyte of germ-free animal is as a whole lower than that of the conventional and double infected (*L. bifidus* and *E. coli* M₁) animals. Order of the phagocytic activities of the three kinds of leucocytes are as follows;

Conventional > Double infected > Germ-free.

Order of the three kinds of sera in combined action (opsonin action) of serum and leucocyte are as follows;

Conventional > Double infected > Germ-free.

C: Conventional guinea pig. D: Double infected guinea pig. G: Germ-free guinea pig. CL: Leucocyte of C. DL: Leucocyte of D. GL: Leucocyte of G. CS: Serum of C. DS: Serum of D. GS: Serum of G. A. N. ST.: Average number of *St. aureus* (Terajima) ingested by leucocytes (phagocytic index). P. P. L.: Percentage of phagocytosis leucocytes (phagocytic percentage).

菌飼育海豚及び普通飼育海豚の血清の組合せ作用、即ち opsonin 作用は普通飼育動物の血清の方が強いように思われた。

次に無菌飼育海豚, *L. acidophilus*+*E. coli* M₁ 重感染海豚及び普通飼育海豚の3者について、同上的方法で夫々の白血球食菌能を測定してみると第18図に示すようになった。

無菌飼育海豚と重感染海豚の白血球食菌能を比較してみると食菌係数も食菌率も無菌海豚の白血球の方が重感染海豚の白血球よりも小さい値をとつた。また、重感染海豚の白血球食菌能は無菌飼育海豚のものより高く普通飼育のものより低いことが食菌係数及び食菌率を比較することによつて知られた。また同じ白血球に夫々の海豚の血清を加えて食菌能を調べた血清 opsonin 作用の比較に於ては、普通飼育の血清が最も強く、重感染のものがこれに次ぎ無菌飼育のものが最も低く現われた。

この血清の白血球食菌能賦活作用の強さの順位即ち、opsonin 作用の順位は夫々の血清の有する *Salmonella typhi* 0-901 に対する殺菌力の強さの順位に一致して現われた。

3. 細菌感染に伴う溶血補体価の変動

普通飼育海豚, *L. acidophilus* 単感染海豚, *E. coli* M₁ 単感染海豚及び無菌飼育海豚の溶血補体価

を細菌学実習提要に示されている Kolmer の方法に準拠して測定した。

普通飼育の溶血補体価と無菌飼育のそれを比較してみると、無菌飼育40日目の海豚では補体価が普

GROUP	TREATMENT	SERUM ml							
		0.20	0.15	0.10	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
C	L. ACIDOPHILUS 40 DAYS	##	##	##	+	+	+	+	-
		##	##	+	+	+	+	±	±
		##	##	##	##	+	+	+	+
D	CONVENTIONAL 40 DAYS	##	##	##	##	##	+	+	+
		##	##	##	##	##	+	+	+
		##	##	##	##	##	##	+	+
E	E. COLI M ₁ 23~27 DAYS	##	##	##	##	##	##	+	+
		##	##	##	##	##	##	±	-
		##	##	##	+	+	+	±	-

Figure 20. Titre of complement of haemolysin reaction: Group D shows the titre of conventionally reared guinea pigs. Group C and E show the titre of *L. acidophilus* and *E. coli* mono-infected animals respectively. A clear difference between C, D and E could not be found. Haemolysin titer (3 U.) and erythrocyte (3%) are used.

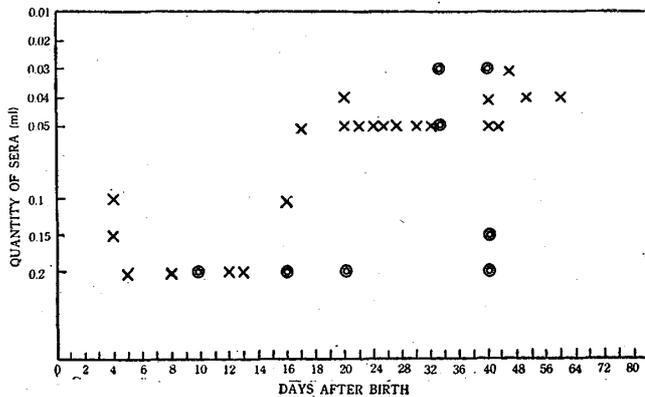


Figure 19. Variation in titre of complement of guinea pigs according to rearing term: Titre of complement of conventionally reared animals show a low value from the 5th to the 13th day, and after the 14th day the titre increases rapidly. Titre of complement of germ-free reared animals show a low value until the 20th day, and thereafter titre of some of the animals reach the value of conventionally reared animals, but in some cases it remains at a low value.

◎ germ-free × conventional

通飼育のそれと同等なこともあり、時に低いこともあり統一された結果を得ることが出来なかつた。そこで、生後日数を異にする22匹の海豚と生後日数を異にする8匹の無菌海豚の溶血性補体価を測定して表示してみると第19図の如き結果となつた。即ち、普通飼育の海豚では生後3週目から以後力価が上昇するが、無菌海豚では力価の上昇が遅くれ生後3週間以後に上昇が見られる場合があり、3週間以後になつても力価の上昇が認められないこともあつた。この成績で溶血補体価とは完全溶血を認めた試験管列中の最少補体価を指したものである。

L. acidophilus 及び *E. coli* M₁ の単感染を受けた海豚の補体価は第20図に示す如くであつて、例数が少ない関係上明確にはいい難いが、細菌初感染と補体価の変動との間には著るしい相関が無さそうであつた。

考 察

私共の教室では松村教授の時代から40年余にわたり腸内細菌の研究に従事し、特に所謂非病原性の腸内常住菌について研究を重ねて来た。1940年頃から腸内常住菌の生物学的意義を知るため、動物の無菌飼育を試みて来た。1951年以来比較的多数の鶏雛の無菌飼育が出来るようになり、好気性芽胞形成菌・葡萄球菌・*Pseudomonas*・*Achromobacter*・大腸菌群・乳酸菌群・*Clostridium*群・*Candida albicans*群等の単感染・重感染が生体に及ぼす影響を研究し、幾多の成績を報告して来た。本報告では1955年以降海猿の無菌飼育に成功し、主として大腸菌群、乳酸菌群の単感染及び重感染実験を行い、所謂非病原性の腸内菌が生体に初感染し定着した場合所謂生体の防禦能力が如何なる変動を受けるかを明らかにしようと試みた研究結果について纏め得た一部の成績をここに記載したものである。

腸内感染並びに発病起転に関して研究を進める際採らるべき直接的な実験方法は経口投与による動物実験に勝るものはない。しかし普通飼育動物では常住細菌群の複雑な影響によつてその本質を把握することが非常に困難となる。各種抗生剤を投与して腸内細菌のあるものを抑さえ、抗生剤耐性の目的菌株を与えて行う実験が考えられるが、既に諸菌の感作を受けた後の生体であれば、生体側の条件の複雑性は依然として解消し得ない問題となる。

X線を生体に照射して感染性(Infectivity)を増大せしめ、目的菌を投与して感染発病の起転を探ろうとする幾多の試みがあるが、これまた前述の如くすでに諸菌の感作を受けた後の生体を対象にしており、C. P. Miller等(1951)の実験によつて明らかな如く、腸内常住菌の血流内侵入が行われ、これまた複雑な現象を解析せざるを得ないこととなる。

従つてこの種の実験研究を行うには無菌動物を用いる外はない。

腸管内に侵入した菌が生体にどのような反応をひき起すかを知るため、私共は無菌海猿に数種の所謂非病原菌を単感染又は重感染せしめ、夫々の菌の単独感染がひき起す生体反応が重感染によつてどのように変化するかを研究した。ここで生体に明瞭な変化を与える主役を演ずる菌株が必要となるが、この主役の菌として私共は母獸より離れた大腸菌分M₁株(0-104)を使用した。本菌は普通飼育海猿には所謂菌体内・外毒素の作用を認めないが、無菌海

猿には敗血症症状を呈せしめ得るものであつた。

私共が先に⁽²¹⁾腸管内に侵入した菌に対する生体反応のモデルと想定した経路に従つて本報告の成績に従来私共の手によつて纏められた其他の成績を付加して総括的に考察を加えてみると次の如くである。

(1) 腸内に侵入した菌は腸管内に於いて諸種の発育阻止的な作用をうけるが、特に常住大腸菌或は乳酸菌群の拮抗的発育阻害を受ける。

この点に関しては本報告に於ける *E. coli* M₁(0-104)と *E. coli* F₆(0-101)間に於ける拮抗現象並びに乳酸菌群と *E. coli* M₁との拮抗的共生現象は極めて明解な示唆を与える所のものである。

E. coli F₆大量感染に対して *E. coli* M₁が定着せず、*L. bifidus*大量感染定着後に *E. coli* M₁が定着せざることは、腸内に於いて拮抗的な発育阻止が極めて活発に行われていることを示すものである。

(2) 菌が腸粘膜を通過し、毛細血管或はリンパ管に侵入する可能性が考えられる。

私共の実験成績からすれば、無菌海猿の腸粘膜上皮下組織及び腸間膜リンパ節の構造は粗糙であつて、初感染の菌が上皮を通過し血流及びリンパ管中に侵入し得ることは *E. coli* M₁の場合明らかに認められ、*E. coli* F₆の場合に1例認められた。乳酸菌群では血流内に菌の存在を証明したことはなかつたが、菌体の一部或は菌体の成分が血液・リンパ液中に侵入する可能性がある。*E. coli* M₁が侵入すれば血流中に於て増殖するか、エロジオンを起した腸粘膜面から引き続きM₁菌の侵入があり海猿は死亡するに至る。しかし、最初に乳酸菌群の何れかの菌株が粘膜上皮下に影響を与えるとその組織及びリンパ節の構造が充実化され後から感染した *E. coli* M₁の体内侵入を防禦する作用を現わすものと思われる。もともと腸管上皮細胞組織は生菌・菌体破片等を通過せしめず、消化された栄養粒体のみを選択的に吸収通過せしめる能力を有している筈であるが、この選択能力が乳酸菌群初感染によつて影響を受けるかどうかは明らかでない。

(3) 菌が血流中に侵入すると血清の殺菌作用、白血球の食菌作用などを受ける。

無菌動物に於ては普通動物或は大腸菌単感染動物よりも血清殺菌力が低いことは鶏雛に於て最初知られたが、無菌飼育海猿に於ても同様な結果が得られ、更に無菌鶏雛では *Clostridium Welchii*単感染の

鶏、無菌海獣では *Pseudomonas aeruginosa* 単感染海獣の血清殺菌力が上昇していることが知られた。

大腸菌群の *E. coli* M₁, *E. coli* F₆ の単感染海獣に於ては著るしい血清殺菌力の上昇が認められ、この上昇は菌感染後3~7日にして認められるが、この際は必ずしも、普通動物に見られるような、典型的なリンパ節或は腸管組織の構造上の完成を必要としないように思われる。

急激な血清殺菌力の上昇は菌体（或は菌体成分）の血流内侵入が契機となつて起こるように思われる。これは *E. coli* M₁ の血流内侵入が阻止されたと考えられる乳酸菌群の事前投与群に於ては腸管内に M₁ 菌が定着しているにもかかわらず血清殺菌力が上昇しなかつたことでも知られるが、腸管組織、リンパ組織等の構造上の変化と血清殺菌力の増強機転との関係、更に抗体・補体と血清殺菌力との関係は死菌体・菌体成分の各分劃を接種した場合の変化を追求することによつて明確にされる必要がある。

白血球の食菌能を無菌海獣及び菌感染海獣とで比較してみると後者の方が明らかに強い食菌能を示した。この実験結果を opsonin 作用の点から考察すると殺菌力の強い血清の opsonin 作用が強く、この作用の弱い血清は opsonin 作用も弱く現われたが、白血球自体の食菌能は菌感染海獣のものが明らかに無菌海獣のものよりも高いことが知られた。白血球食菌能を賦活する感染菌の因子が血清殺菌力の増強因子と同じく大腸菌その他の菌に由来することは明らかであるが、食菌能賦活起転の本質に関する解明は今後の研究にまたなければならない。

以上の如く、血流中に侵入した菌は血清殺菌力並びに白血球食菌能等によつて殺菌的作用を蒙るのであるが、この二種の殺菌的作用は腸内に於ける或る種の菌の初感染によつて高められるものであることが知られる。

溶血性補体価は個体により大腸菌の初感染によつて上昇せしめられるものもあり、低位に止まるものもあり、力価の動揺と細菌感染との間に一定の傾向を見し得ないが、無菌飼育海獣に於ても普通飼育海獣に於ても飼育日数の長くなるにつれて溶血性補体価の上昇が認められる。これは栄養的な因子に左右される或る組織細胞の充実ないし新生に関係してこの種の補体が増加するものであるように思われる。

私共の取りあつてきた無菌動物(海獣・鶏雛)は何れも初代のものであつて、しかも40日飼育の

ものが考察の対象となつた主なるものである。しかし、これ等の実験成績から生体に対する細菌の初感染が生体防禦能力増進上重大な影響を与えているものであることが知られる。

無菌海獣と菌感染海獣との間に於ける、溶血補体価、血清殺菌力、白血球食菌能、抗体産生能の差を調査研究することによつて所謂液性抵抗の全貌を覗い知ることが出来るものと思われ、これが私共の今後の研究方向である。現在までに得られた成績は完全な概念を組み立てるには不十分なものではあるが、細菌初感染と生体反応の変化という立場から総括的に以下の如く述べる事が出来よう。

溶血性補体は母体より比較的多量に受けつがれ得る物質であつて、生後の個体に於ては非特異的な条件によつてこの物質の増加或は減少が起こる。恐らく、生体の液性抵抗性を支える物質として最も基本的な又広範な作用を現わす可能性のある蛋白粒子の総称と考えられる。

殺菌物質はわずかしか母体から受けつがれない。生後或る種の菌の感染によつて血清の殺菌力が急激に上昇せしめられることは、その特異性の面から考えて恐らく、或る種の菌体物質の血流内侵入と特定組織細胞に対する刺激がこれに関与しているものと考えられるが補体との関係は明かでない。

白血球の食菌能は母体から受けつがれた性質であると思われるが、生後或る種の菌体成分が、特定の組織細胞に刺激を与え、白血球の産生が促進され、同時に白血球食菌能が賦活されるものと考えられる。

上述の血清殺菌力の上昇程度に関しては所謂 R. E. System の構造完成状況が直接その影響を及ぼさないが、白血球食菌能の賦活に関しては R. E. System の構造完成状況が多分に関与してくるものようである。

抗体産生能力と特定菌株の初感染との関係は只今研究中の所であつて、未だ結論を得るに至っていないが、この場合は、所謂 R. E. System の構造完成が重要な意味を有するものであつて、無菌海獣に対する初回抗原接種が抗体産生を招来せず、R. E. System 増殖刺激に引続く初回抗原接種が有効であつたことはこの間の起転を示唆するものと思われる。

一般に、自然飼育海獣では、溶血補体・血清殺菌物質・白血球・抗体作用等が複雑に組合さつていて生体防禦反応の解析が極めて困難であるに反し、無菌動物では生来的な生体反応と生後の附加的な生体

反応とが或る程度区別出来るから、抗体産生の如き 以上述べた関係を模式的に表示すれば第 21 図の重要な生体防禦能力の基礎的研究をなす上に極めて 如くである。好都合なものというべきである。

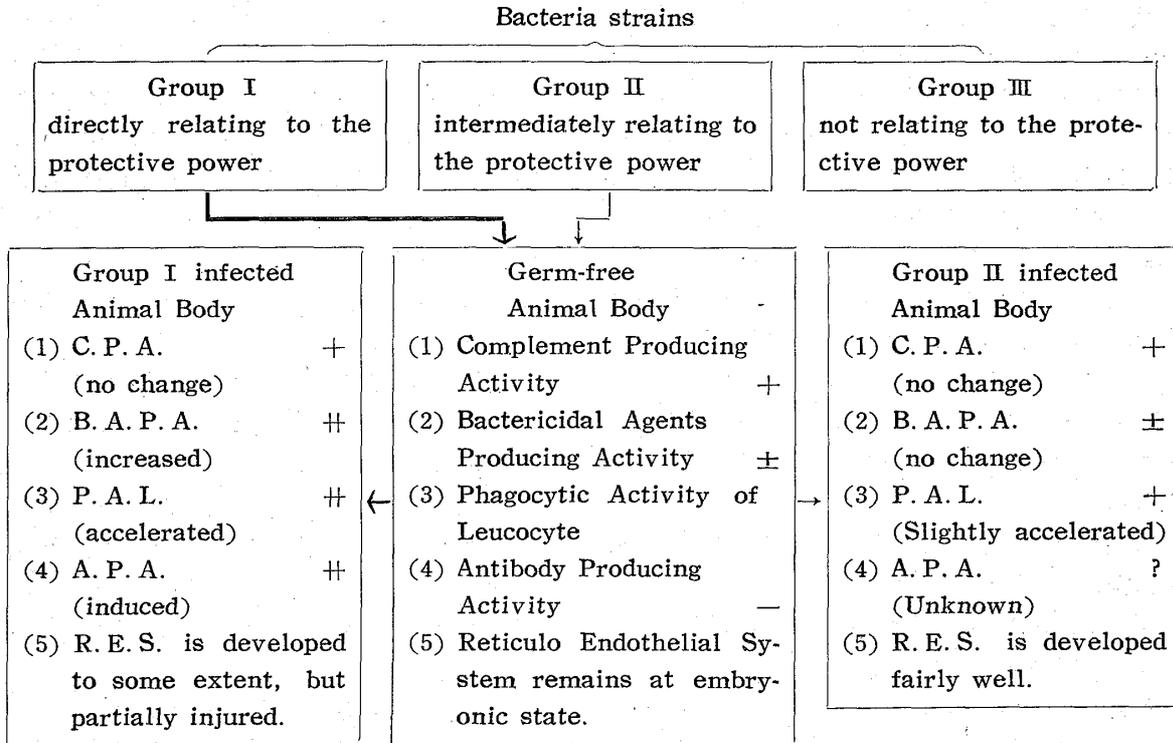


Figure 21. Schematic illustration concerning the relationships between so called protective power of living body and initial intestinal infection with bacteria. Group I includes *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium welchii* etc. Group II includes *Lactobacillus* group, certain kinds of aerobic spore-forming bacteria etc. Group III includes certain kinds of yeast and that of *Staphylococcus*. (1)-represented by complement for haemolysin titre. (2)-represented by bactericidal power of sera against *Salmonella typhi* 0-901. (3)-represented by phagocytic activity of leucocyte against *Staphylococcus aureus* Terajima. (4)-represented by agglutinin titre for *Salmonella typhi* 0-901. Heavy arrow shows the route for influence of group I and light arrow shows that of group II.

総 括

私共の教室で 1942 年以来行つてきた無菌飼育の経験に基き、Reyniers 教授、Gustafsson 教授及び宮川教授の装置に示唆を得て HMC-2 型無菌飼育装置を完成した。本装置は全体として小型な一組を形成し、使用方法が簡便である。多数の動物を飼育し或は長期無菌飼育を計画する際は装置の組を増加すれば安全である。装置の一組は手術タンク 1・飼育タンク 2、これに附属する空気回路及び滅菌回路を含めたもので、手術タンクが既に備わつて居れば飼育タンク 3 を一組とする別の組を作ることが出来る。一組の作製に要する費用は 1957 年現在で 250

~300 万円であつた。

この装置を用いて 1955 年以来行つて来た実験のうち、主として無菌海溟に諸種のいわゆる非病原菌を経口投与して行つた菌初感染の生体に及ぼす影響に関する知見を略述すれば次の如くである。

無菌海溟腸管内に経口投与された諸菌のうち、あるものは腸管内に定着し、あるものは腸管内に定着しなかつた。

定着し得る菌の中でも定着後その増殖速度に菌種別、由来別の差が見られた。例えば母獣由来の *Escherichia coli* (0-104) M₁, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus faecalis* はよく定着した。なお、人間由来の *Es-*

cherichia coli (0-101) F₆, 外界由来の *Bacillus X* (好気性芽胞形成菌) もよく定着増殖した。

定着増殖可能菌の中の M₁ 菌は無菌腸管内に於て急激な増加を示し、回盲部にエロジオンを生じ、腸間膜リンパ節に細胞変性を生ぜしめ、敗血症症状による海獣の死亡をもたらした。

その外の菌は無菌腸管内に定着増殖しても動物に障害を与えることなく、腸粘膜上皮組織の発達を促進し、腸間膜リンパ節の充実を来した。この性質は F₆ 菌及び *Bacillus X* に於て特に著明であつた。

M₁ 菌の無菌海獣に対する障害ないし致死作用は F₆ 菌大量同時投与及び乳酸菌群の事前投与によつて消去された。この際は組織学的所見に於ても M₁ 菌の障害を思わしめるものを認めず、F₆ 菌単感染及び夫々の乳酸菌単感染の場合と略同様な所見を示した。

M₁ 菌或は F₆ 菌投与によつて低い無菌海獣の血清殺菌力 (*Salmonella typhi* 0-901 に対する) が急激に増強され、同じ日数を経た普通飼育海獣と略同等の殺菌力を示した。

M₁ 菌投与に先立つて *L. bifidus* を投与した場合の海獣血清殺菌力はわずかに上昇するのみで、大腸菌 M₁ 或は大腸菌 F₆ 単独投与のものに遙かに及ばなかつた。

血清殺菌力の増強は大腸菌群の菌体或は菌体成分が血流中に侵入することによつて引き起されると思われる。この際腸管組織及び腸間膜リンパ節に於ける普通飼育動物に見られる程度の構造上の完成状態は必ずしも必要ではないように思われるが、組織細胞の変化と血清殺菌力の増強現象との間には重要な関連性があるものと思われる。

無菌海獣の白血球食菌能 (*Staphylococcus aureus* 寺島株に対する) は低く、普通飼育海獣のそれは高く、M₁ 菌及び *L. bifidus* 重感染海獣のそれは無菌海獣の場合より高く現われた。

無菌海獣血清の白血球食菌能に対する opsonin 作用は弱く、菌感染海獣の同上の白血球に対する opsonin 作用は強く現われた。この関係は血清の殺菌力の程度に應ずるものであつた。

溶血性補体価の菌初感染による変動は明らかでなかつた。即ち、溶血性補体価の変動は菌感染によつて起るとゆうよりは、有菌無菌にかかわらず飼育日数の長いもの程上昇したが、無菌海獣のそれは、普通飼育の場合よりも遅れて上昇が認められた。

以上の如く、無菌腸管に於ける菌の初感染は生体防禦能力の面から重大な影響を及ぼしているものであることが知られた。即ち、所謂非病原菌、或は腸内細菌群というものの中には、単独では腸管組織及び隣接リンパ組織を強く刺激するものがあり、また弱く刺激するものもある。この刺激の強さに応じて各組織の発達が促進されることもあり、破壊に導かれることもあるが、2種以上の菌が重感染するところの刺激の強さが適当に調整される。腸管粘膜上皮組織及び腸間膜リンパ節の充実化に伴つて、後から感染する菌の血流侵入が阻止される。

細菌初感染と生体防禦力に關与する要素のあらわれ方を総括すれば次の如くである。

溶血性補体は母獸から子獸に受け継がれ、無菌子獸も補体を産生し、細菌初感染と補体産生能増加との間に直接的な關係を見出せなかつた。

血清殺菌力は殆んど母獸から受け継がれることがなく、或る種の菌の初感染によつてその出現が誘発されたが、所謂網状内皮系の構造の完成程度と血清殺菌力の程度とは密接に關連していないように思われた。

白血球食菌能は母獸より受けつがれ、或る種の細菌初感染によつて増強された。白血球食菌能の増強程度は網状内皮系の構造完成と關連するものらしく思われる。

初回抗原接種による抗体産生能力は、無菌動物では殆んど認められず、或る種の菌の初感染に伴う網状内皮系の構造完成と密接に關連して抗体産生能が出現した。この点に關する実験成績の詳細及び抗体と補体、補体と殺菌物質との關係などは今後の研究を俟つて第2報として発表する予定である。

本研究に当り終始御懇篤な御指導を賜つた谷川教授に深謝し、有益な御助言を頂いた Reyniers 教授、Gustafsson 教授、宮川教授、岡林教授、川喜田教授に深甚の謝意を表わす。なお、実験機械の一部を援助されたカルピス食品 KK、飼料の特別調製粉乳を分与下された森永乳業 KK に対して感謝する。

なお、本研究は、戸叶博士・富岡学士・菅沼学士・中村学士・山田学士・神原学士・大高学士・川崎学士・林学士等と協同して行った。

参 照 文 献

- (1) Matsumura, S.: J. Amer. Med. Ass.,

- 92, 1325, 1929.
- (2) **Nuttal, G. H. F. u. Thierfelder, H.:** *Z. physiol. Chemie*, **21**, 109, 1895.
- (3) **Schottelius, M.:** *Arch. Hygiene*, **34**, 210, 1899.
- (4) **Küster, E.:** *Zbl. Bact.* **54**, 55, 1912.
- (5) **Cohendy, M.:** *Ann. Inst. Pasteur*, **26**, 106, 1912.
- (6) **Glimstedt, G.:** *Verh. Anat. Ges., Anat.*, **75**, 78, 1932.
- (7) **Stenquist, H.:** *Anat. Anz.*, **78**, 68, 1934.
- (8) **Glimstedt, G.:** *Acta Path. Microbiol., Scand., Suppl. XXX*, 1936.
- (9) **Balzan, N.:** *Ann. Physiol.*, **13**, 370, 1937.
- (10) **Reyniers, J. A.:** *LOBUND Report 1*, 1946.
- (11) **Gustaffson, B.:** *Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. LXXIII*, 1948.
- (12) **Reyniers, J. A.:** *LOBUND Report 2*, 1949.
- (13) 内藤良一: *日微生物病理誌*, **30**, 14, 1936.
- (14) 赤沢喜三郎: *千葉医会誌*, **20**, 9, 1942.
- (15) 宮川正澄: *名古屋医会誌*, **64**, 237, 1950.
- (16) 河合正太郎・斎藤佐文: *千葉医会誌*, **30**, 6, 750, 1954.
- (17) 小林龍吉: *日病理会誌*, **43**, 総会号, 438, 1954.
- (18) 宮川正澄: *日新医学*, **42**, 10, 553, 1955.
- (19) 斎藤佐文: *千葉医会誌*, **31**, 1, 107, 1955.
- (20) 谷川久治・他: *生体の科学*, **7**, 5, 235, 1956.
- (21) 田波潤一郎・他: *総合医学*, **14**, 1, 27, 1957.
- (22) 福島 俊: *千葉医会誌*, **33**, 3, 459, 1957.
- (23) 海宝豊徳: *千葉医会誌*, **34**, 2, 406, 1958.
- (24) 長谷川博道: *千葉医会誌*, **34**, 5, 1470, 1959.
- (25) **Wright, A. E. & Douglas, S. R.:** *Proc. roy. Soc.*, **72**, 364, 1903; *Ibid.*, **73**, 136, 1904.
- (26) **Neufeld, F. & Rimpau, R.:** *Dtsh. med. Wschr.*, **11**, 1458, 1904.
- (27) **Neufeld, F. & Rimpau, R.:** *Z. Hyg. Infektr.*, **51**, 283, 1905.
- (28) **Dozois, T. F., Seifter, S. & Ecker, E. E.:** *J. Immunol.*, **47**, 215, 1943; *Ibid.*, **49**, 31, 1944.
- (29) 緒方富雄: *血清学実験法* (南山堂), 1944.
- (30) 相沢 憲: *日衛学誌*, **6**, 3, 115, 1951.
- (31) **Adler, F. L.:** *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **74**, 561, 1950; *Ibid.*, **79**, 590, 1952.
- (32) **Adler, F. L.:** *J. Immunol.*, **70**, 69, 1953.
- (33) 本間 道・他: *小児科臨床*, **7**, 3, 11, 1954.
- (34) **Pillemer, L. et al.:** *Science*, **120**, 279, 1954.
- (35) 藤井絢子・他: *日衛学誌*, **10**, 2, 127, 1955.
- (36) 吉田英一: *日細菌学誌*, **11**, 11, 947, 1956.
- (37) 戸叶公明: *千葉医会誌*, **34**, 2, 392, 1958.

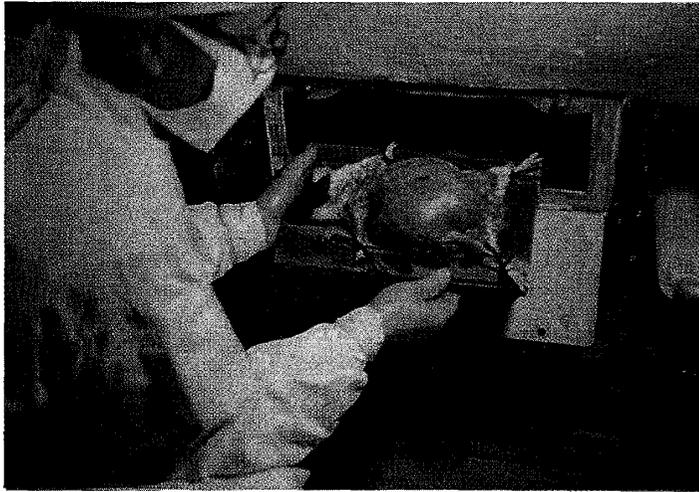


Figure A. Insertion of the animal into the operating trap: The hair of the animal is cut from her abdomen, a large area over the abdomen is cleaned with a depilatory, washed with warm detergent and the entire abdominal surface is swabbed with tincture joditi and alcohol. The animal is then tied down to the operating board. This figure shows that the animal is now ready to be inserted into the operating trap.

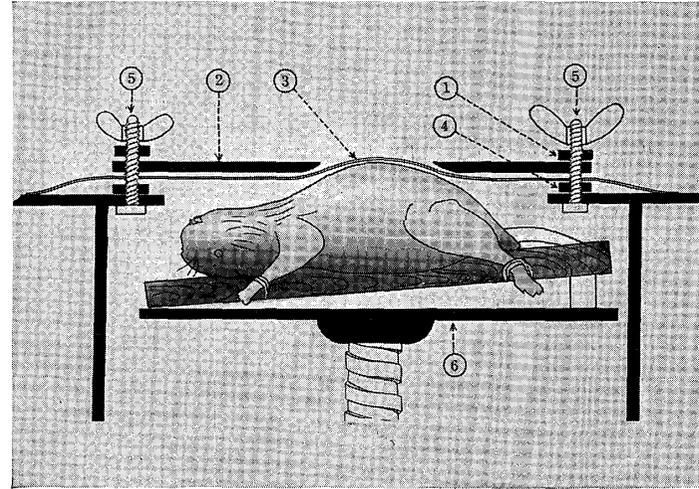


Figure B. Pregnant animal in the operating trap: The animal is inserted in the trap, and put on the operating table. Then the animal pushed up until its abdominal skin touches the vinyl membrane. ①-Steel frame to press the rubber plate and vinyl membrane to edge of the trap ②-Rubber plate having an opening for operation. ③-Vinyl membrane through which the pregnant animal can be operated on ④-Rubber packing. ⑤-Screw to bolt the frame. ⑥-Operating table.

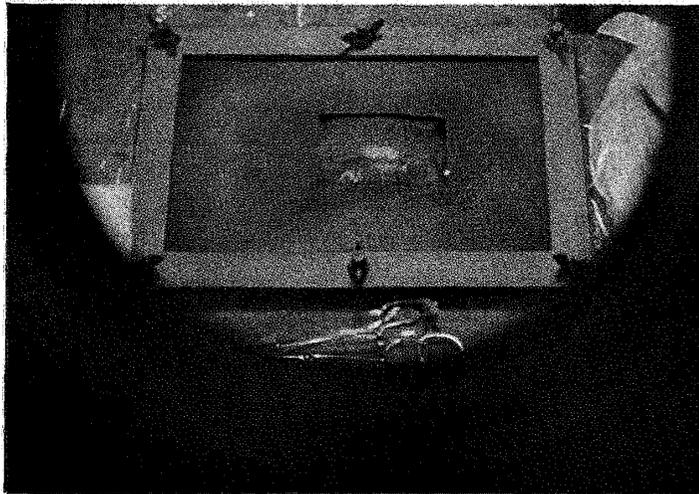


Figure C. View of the operation field from the viewing port of the tank: The space over the membrane can be filled with the germicide directly before the operation.

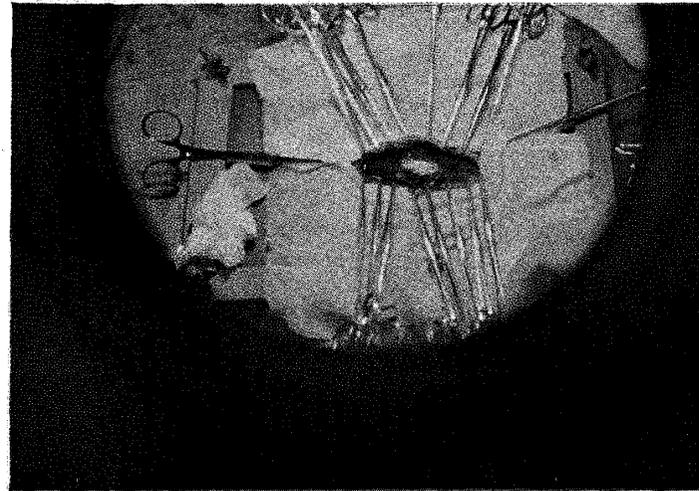


Figure D. Skin incision: The skin along with the membrane is picked up, the fold is cut through with an operating knife, and fasted with hemostats. The small incision is extent front and rear, the edges of incised skin and membrane must be fasted and sterilized with the germicide step by step according to the operating process. After the skin is incised, the edges of the wound are covered with gauzes wetted with the germicide and these gauzes are secured to the skin with hemostats.

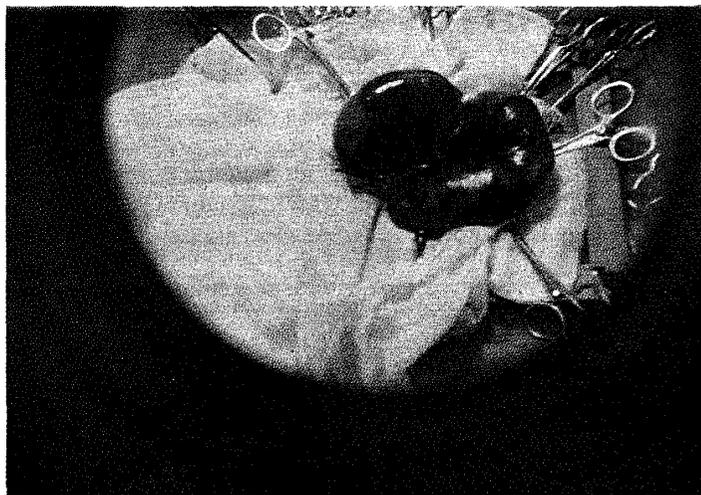


Figure E. Exposure of the uterus. The abdominal muscles and the peritoneum are cut with an operating knife and scissors, retractors are used to separate the edges of the wound, and then the uterus is exposed and is laid out on sterile gauzes.

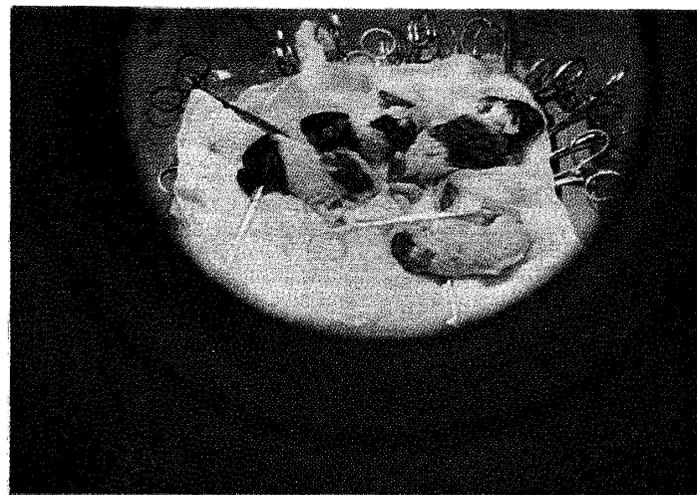


Figure F. Delivery of the young. The exterior of the uterus is swabbed with the germicide and is cut open using a pointed scissors, the young are exposed and the amnions are removed, then the umbilical cords are cut after clamping them off with hemostats. This figure shows the young soon after the Caesarean section.

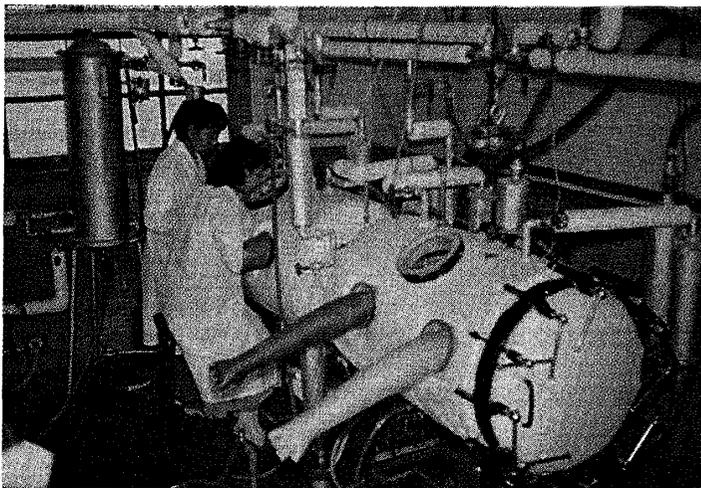


Figure G. Rearing manipulation through the artificial rubber gloves.

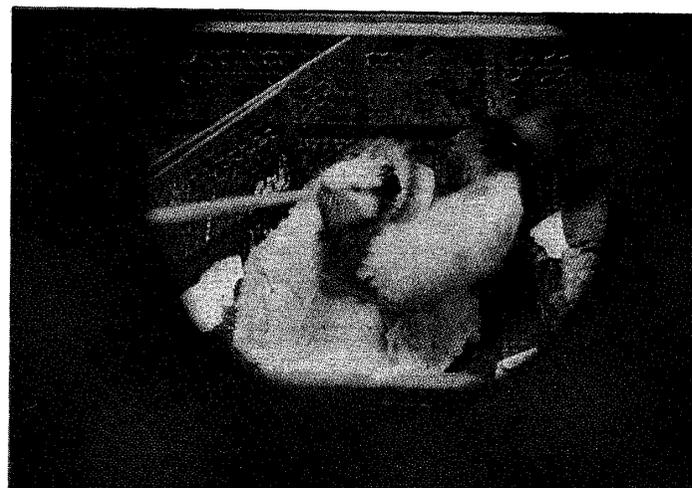


Figure H. The germ-free rearing guinea pigs 10 days old. The milk formula is given by hand-feeding every three hours during the beginning three or five days. After the fifth day from birth both milk and solid diet are served to the animals, and the animals can eat at their own will. This figure shows a hand-feeding of milk to the animal, but it is only a try.

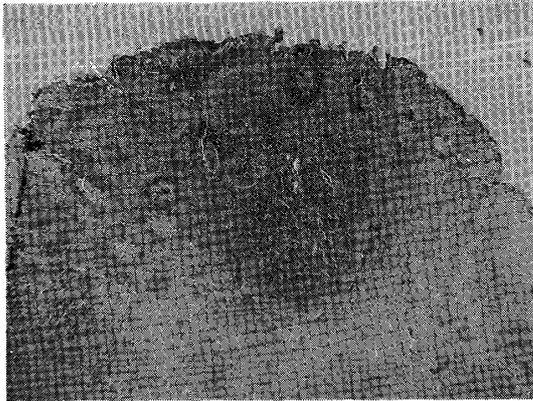


Figure LA: Microscopic feature of the mesenteric lymph node of conventionally reared guinea pig. 40 days old. 25 ×.

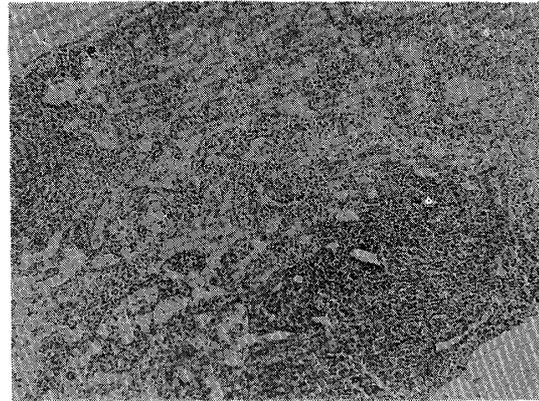


Figure LB: Microscopic feature of the mesenteric lymph node of germ-free reared guinea pig. 40 days old. 70 ×.

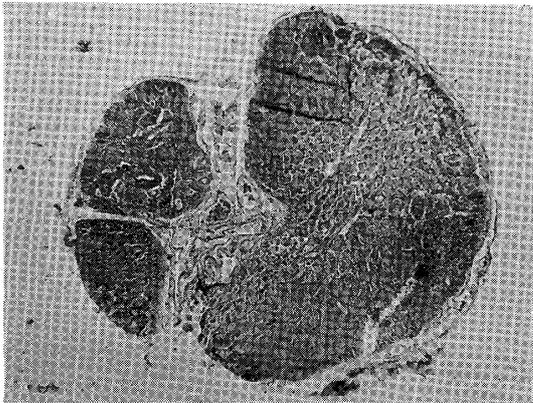


Figure LC: Microscopic feature of the mesenteric lymph node of *E. coli* M₁ mono-infected guinea pig. 27 days old; animal died of bacteremia caused by the bacteria. 25 ×.

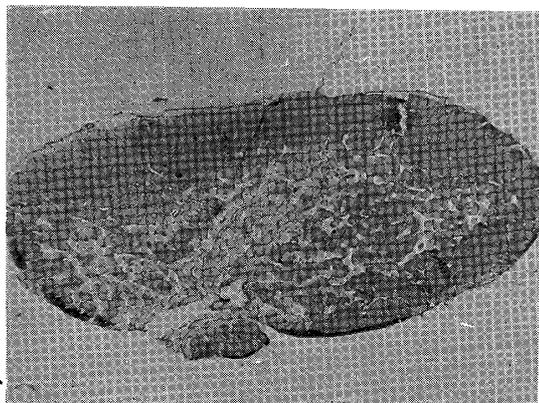


Figure LD: Microscopic feature of the mesenteric lymph node of *L. acidophilus* mono-infected guinea pig. 40 days old. 25 ×.

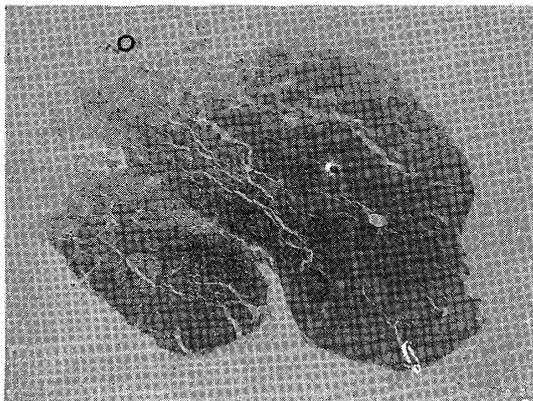


Figure LE: Microscopic feature of the mesenteric lymph node of *Bacillus X* (certain kind of aerobic spore-forming bacillus) mono-infected guinea pig. 40 days old. 25 ×.

Microscopic feature of mesenteric lymph nodes of the animals is summarized as follows:

In group A, structure of the cortex and the medulla are complete and these two portions are clearly distinguishable; plenty of cells among the reticular tissues and the germinal centers (Flemming's secondary nodes) are observed.

In group B, distinction between the cortex and the medulla is not clear, and a small amount of cells are thinly distributed among them. Lymph node is generally rough in appearance.

In group C, structure of lymph nodes is generally developed to some extent, and the cells among the reticular tissues are many but mass of cells undergoing degeneration can be found among them. The capillaries filling with erythrocytes are observed. No germinal center exists.

In group D, structure of the cortex and the medulla is like group C, but degenerated cells cannot be found and few of the nodules of transitory type are detected.

In group E, structure of the lymph nodes is properly developed as in group A, and plenty of cells can be observed in it, many germinal centers are observed.

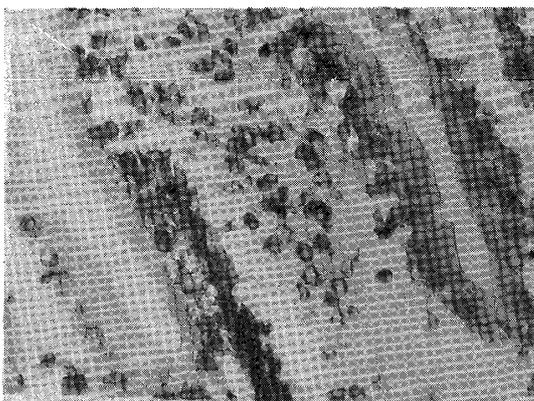


Figure IA: Microscopic feature of the ileum of conventionally reared guinea pig. 40 days old. 280 \times .

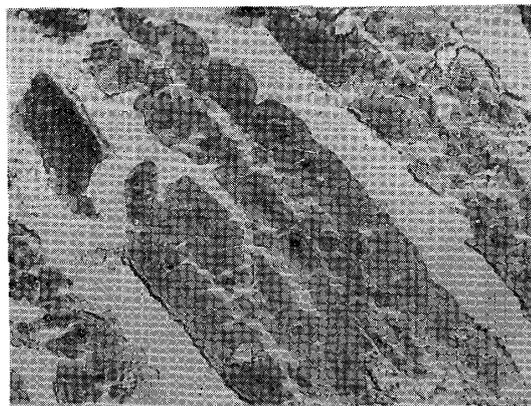


Figure IB: Microscopic feature of the ileum of germ-free reared guinea pig. 40 days old. 280 \times .

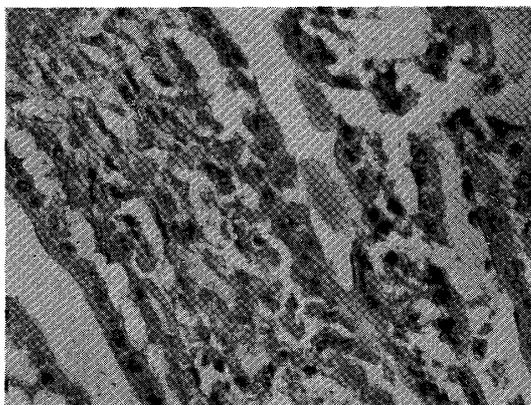


Figure IC: Microscopic feature of the ileum of *E. coli* F₆ mono-infected guinea pig. 40 days old. 280 \times .



Figure ID: Microscopic feature of the ileum of *L. acidophilus* mono-infected guinea pig. 40 days old. 280 \times .

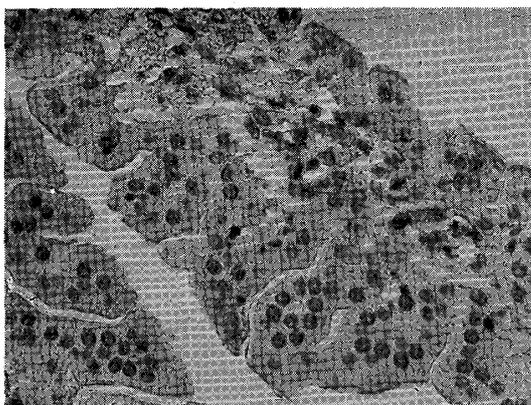


Figure IE: Microscopic feature of the ileum of *Bacillus X* (certain kind of aerobic spore-forming bacillus) mono-infected guinea pig. 40 days old. 280 \times .

Microscopic feature of ileum of the animals is summarized as follows:

In group A, the subepithelial connective tissues are properly developed, the free cells of the tissues and a small number of wandering cells can be observed.

In group B, the subepithelial connective tissues are poorly developed and very few free cells can be found.

In group C, D and E, the subepithelial connective tissues are developed to some extent, particularly, in group C free cells of the tissue and wandering cells can be observed.