



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	T細胞のSubpopulation
Author(s)	大原, 達
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 1-7
Issue Date	1976-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26495
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P1-7.pdf



T 細胞の Subpopulation

大 原 達

(北海道大学免疫科学研究所 血清学部門)

(昭和 50 年 11 月 11 日受付)

現代免疫学の流れにおいて、1960 年代は免疫化学の時代、1970 年代は T 細胞学 (T-ology) の時代と言われる。前者の時代においては、各クラス免疫グロブリンの相次ぐ発見とその構造・機能に関する研究が免疫学の主流をなし、後者の時代に入るや、T リンパ球を中心とする細胞動態学的な方向へと多くの学者は研究の進路を変えた。このような T-ology の発展を辿って Gershon¹⁾ は 3 つの時期を区別している。第 1 期は言うまでもなく、immune system に thymus の関与することが発見された事に始まり、続く第 2 期は、thymus 由来の T 細胞がそれ自身は抗体を産生しないけれども、抗体産生に当って重要なヘルパー作用を営むことが確立された時代である。更に研究が進むと、T 細胞は免疫応答を助けるばかりでなく、時にはこれを抑制する細胞でもあるという事実が次第に集積されて来た。Gershon によるとこの時期が T-ology の第 3 期をなす golden age の始まりである。B 細胞の働きは比較的単一で、抗体産生に与かるだけであるのに対し、T 細胞は上記作用のほかに、(i) in vivo で遅延型反応、GVH 反応、移植片拒否反応などいわゆる細胞性免疫に関与し、(ii) in vitro では effector cell として標的細胞を破壊・死滅せしめ、(iii) 感染免疫において重要な意義を持ち、さらに (iv) 免疫監視の役割を果たす、などその働きは極めて多彩である。Gershon が比喩的に述べている如く、T 細胞こそは immunological orchestra の conductor であって、上記作用の一切を司りつゝ、生体のホメオステシスを微妙にコントロールする役目を担う細胞である。

このような複雑な働きが同じ T 細胞によって行われているのか、それぞれ異った subpopulation によるものかについては意見の分れるところであるが、これまでいろいろな学者が T 細胞の分類ないし subpopulation の記載を試みていることは事実である。これらは T 細胞の ontogeny, 物理的・生物学的性状, life span, 表面レセプター, 機能等それぞれ異なった観点から分類されたもので、全体的には甚だ統一を欠く。ここでは subpopulation 相互間の関連付けには重点を置かず、諸学者による分類を羅列することによって T 細胞の複雑性を概観す

ると共に、その多様性を通じて T 細胞のよりよき理解の一助にしたいと考えるものである。

1. Life span による分類

骨髄中にある stem cell は胸腺に migrate して来て、ここで胸腺の特異な環境、特にその humoral factor や 骨髄系細胞の影響によって分化抗原 θ (最近では Thy 1 と記載される) を獲得し、最初に持っていた H-2 抗原を失う (100% ではない) が、³H-thymidine uptake によって調べると、胸腺のリンパ球は life span の上から 2 つの population に分けられる。1 つは 3 日から 5 日の short life のものであり、他の 1 つは、齧歯類では数カ月、ヒトでは数カ月から数年に及ぶ long life のものである。short-lived のリンパ球は胸腺細胞の major component で 95% 以上を占め、これらはほとんど胸腺内で死に、その機能はよく分っていない²⁾。短命の胸腺細胞は新しく thymus に入ってきた形の大きなリンパ球の大部分に相当し、胸腺の cortex に位置する。残りの僅かなパーセントは、分化が進むにつれて大きさを減じ、medullary portion に見いだされるようになる。これが long-lived のリンパ球で、thymus から出て血流およびリンパ管を通して体内を再循環する。

2. Raff and Cantor の T₁ と T₂

Raff ら³⁾ は GVH 反応の研究から T 細胞には機能的に異なった 2 つの subpopulation があることを見だし、それぞれ T₁ cell, T₂ cell と名付けた。この 2 つの type の主な性状の比較は Table 1 に示す如くである。

T₁ cell は胸腺と脾に多く、生体内では antilymphocyte serum (ALS) に比較的 insensitive であるが、anti θ に対しては T₂ より感受性が高く、adult thymectomy を受けると短期間で減少ないし消失する。T₂ はこれに反しリンパ節、胸管、末梢血に多く、ALS に極めて高い感受性を示し、adult thymectomy の影響を受けにくい。彼らはこの 2 つの type を異なった maturation stage にあるとし、T₁ は T₂ より未熟な細胞と考えている。life span からみると T₁ は short-lived, T₂ は long-lived である。Raff らは機能との関係について全く触れていないが、Gershon¹⁾ は T₁ を suppressor cell, T₂ を

Table 1. Properties of T₁ and T₂ Cells

Property	T ₁	T ₂
1. Surface antigens		
TL	-	-
θ^a	+	+
MPLA	+	+
2. Peripheral lymphoid tissue of highest concentration		
	Spleen	Blood, thoracic duct, lymph node
3. Recirculation		
	No	Yes
4. Sensitivity to ALS in vivo		
	+	##
5. Removal by thoracic duct drainage		
	No	Yes
6. Effect of adult thymectomy		
	↓ in 2-6 weeks	↓ after 30 weeks
7. Migration in vivo		
	To spleen > lymph node	To lymph node > spleen

^a On this scale thymocytes would be ##.

(Raff, M. C. et al: Progr. Immunol 1 (ed. B. Amos), p. 89, 1971, Acad. Press より)

helper cell とする考えが attractive であると述べている。なお T 細胞の機能に関して、適量の T 細胞は helper として働き過剰の T 細胞は suppressive に働くという実験成績^{4)~6)} も得られているが、少なくとも両細胞は X 線に対する感受性を異にし、suppressor T cell は highly radioresistant⁷⁾ であるのに対し helper T cell は radio-sensitive⁸⁾ である。

Raff らのように名前はつけていないが、ALS と adult thymectomy に対する態度から Kappler⁹⁾, Araneo¹⁰⁾ も T 細胞を 2 つの population に分けている。すなわち (i) short-lived, ATS-resistant で thymectomy により減少する細胞と (ii) long-lived, ATS-sensitive で thymectomy の影響を受けない細胞の 2 つで、これらはそれぞれ T₁, T₂ に相当する。ALS (または ATS) も thymectomy も共に T 細胞を減少せしめるが、いずれも単独では約半分の T 細胞しか eliminate 出来ず、両者を併用すると T 細胞は完全に枯渇せしめられる。すなわち adult thymectomy と ALS は、その標的細胞を異にする。

3. Surface antigen による分類

Shortman¹¹⁾ は、細胞表面の抗原によって胸腺細胞を (i) low level H-2, high level θ を持つ population と、(ii) high H-2, low θ の population の 2 つの subclass に分けた。(i) は胸腺細胞の 85% を占める major population で胸腺皮質のリンパ球であり、steroid に感受性を持ち TL 抗原 positive である。(ii) は残りの 15% を構成する minor population で末梢の T 細胞に似た性状を持ち、steroid 抵抗性で TL 抗原を欠く。彼らは

マウス spleen のリンパ球を albumin gradient によって分画し、同じく surface antigen によって 2 つの subclass に分けたが、この場合 gradient の軽い分層に分離される minor population が上記 (i) の性質を示す。

4. Mitogen に対する反応性による分類

Con A と PHA は共に T 細胞に対する強力な mitogen であるが、一方 thymocyte は PHA に反応せず、Con A に対しても neonatal の胸腺細胞は反応性が弱い¹²⁾。しかし、T 細胞もすべてのものが両 mitogen に対して同じような反応をするものではなく、Stobo¹³⁾ は PHA と Con A に対する反応性の違いによって T 細胞に 2 つの subset を区別している。(i) 第 1 の subpopulation は両方の mitogen にはほぼ等しい反応性を示すもの (PHA: Con A ratio が 1 に近い) で密度の高い θ determinant を有し、(ii) 第 2 のタイプは主として Con A に反応するもの (PHA: Con A ratio が低く 0.3 内外) で、比較的低い density の θ determinant を持つ。両者はまた recirculating pattern が異なり、(i) は lymph node-seeking, (ii) は spleen-seeking である。更に重要なことは、両 population の機能が違っている事で、(ii) の T 細胞は mixed lymphocyte culture において "killer cell" として働き、GVH 反応においては effector cell として働く。両者の比較は、纏めて Table 2 に示した。

なお Stobo¹³⁾ は PHA, Con A に対する反応性と θ 抗原発現の ontogeny を調べているので、参考までにその結果を掲げておく。Fig. 1 はこれをグラフに描いたもので、左半分は胸腺細胞、右半分は脾細胞について、

Table 2. Characteristics of T cell subsets

PHA : Con A	~1.0	~0.3
θ Density	~3+	~1+
Recirculation pattern	Recirculates; lymph node-seeking	Rel. sessile; spleen-seeking
Location	Lymph node and spleen	Spleen and bone marrow
Rad. sensitivity	Rel. sensitive	Rel. resistant
Function	Mixed lymphocyte reactivity	Specific "killer" cell
	Amplifier cell in GVH	Effector cell in GVH
		Required for DNA synthesis in response to antigen

Stobo, J. D. et al: J. Immunol. 110, 362, 1973 より)

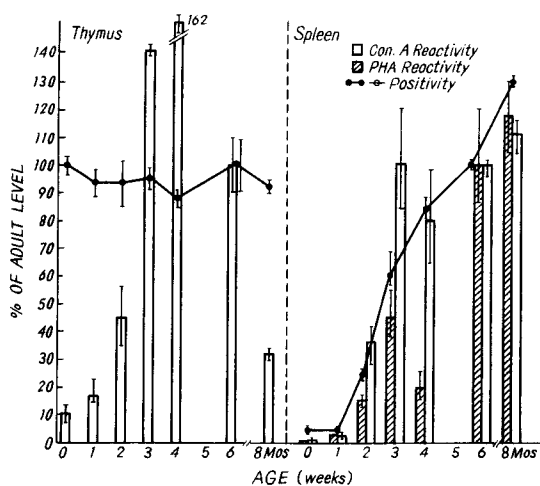


Fig. 1. Ontogeny of PHA and Con A responsiveness and of the frequency of θ bearing cells in murine thymocyte and spleen cell populations (Stobo, J. D. et al.: Cell. Immunol. 4, 367, 1972 より) 図の各 value は 6 週齢マウスの値を 100 として百分率で表わされている

それぞれ 6 週令の値を 100 として percentage で示した。胸腺細胞は PHA に反応しないので Con A reactivity のみ示されているが、生後 2 週まで比較的弱かったこの reactivity は、3 週目から急激に上昇して 4 週目にはピーク (162%) に達する。 θ 抗原の陽性度は僅かの増減はみられるものの、ほぼ constant に 100% の値が保たれる。これに反し、脾細胞の θ 抗原陽性度は、はじめ negligible に過ぎない生下時、1 週令のレベルから 100% の 6 週令まで直線的に増加し、8 カ月後には更にこれを上廻る値を示した。注目すべき点は、幼若マウスの脾細胞が Con A reactivity については adult level に対しかなりの percentage を占めるのに、PHA reactivity は格段に低いことである。このことは幼若時の胸腺から

migrate してくる細胞が比較的 immature であることを示すもので、neonatal animal は thymus から大形の細胞を release し、older animal は predominantly に small cell を release する、という Unanue ら¹⁵⁾ の成績とよく一致する。

5. Cell size による thymocyte, T Cell の分類

Herzenberg ら¹⁶⁾ は胸腺細胞を 3 つのタイプ、T 細胞を 2 つのタイプ、 T_1 , T_2 に分類した。後者は Raff らの分類した T_1 , T_2 と同じものであるが、前者は細胞の大きさに従って large, small, medium の 3 つに分けたもので、それぞれの性状は Table 3 に示す如くである。localization, life span, cortisone や mitogen に対する反応性、表面抗原などからみて、large size のものは最も immature なりリンパ球であり、medium size のリンパ球は性状が T 細胞に近く、最も成熟度の高いものと考えられる。

6. Tcss と Tcsr

Moorhead ら¹⁷⁾ は、LAF₁ マウスについて corticosteroid に対するリンパ球の反応性を調べ、spleen 中の T 細胞を 2 つの subpopulation, Tcss と Tcsr に分けた。T に付した subscript, css と csr は、それぞれ corticosteroid sensitive, corticosteroid resistant の略である。両者とも θ -bearing, PHA responsive であるが、Tcss は short-lived, non-circulating で splenic T cell の majority を占める細胞であり、Tcsr は long-lived, recirculating で脾臓内 T 細胞の minority population である。後者の T 細胞はヘルパー作用と GVH 活性を持つ。なお彼らによれば骨髄中に TcsrA なる第 3 のタイプが存在し、この T 細胞は PHA に反応するが corticosteroid および anti- θ 血清に resistant であるという。

7. Bach らの T_1 と T_2

T 細胞は spontaneous に SRBC とロゼットを作る性

Table 3. Properties of Thymocyte Subpopulations

Cell Size	Large	Small	Medium
% of Thymus	5-7%	85-90%	5-7%
Anatomy	Subcapsular zone of cortex	deeper cortex	medulla
Life Span	Rapidly turning over	long-lived	long-lived
Resistance to cortisone	No	No	Yes
Responsiveness to mitogens	No	No	Yes
Thy-1 (θ)	#	#	+
TL	+	+	-
H-2	+	+	#

(Herzenberg, L. A. et al: Progr. Immunol II, Vol. 2, p. 116, 1974 より)

Table 4. Characteristics of Rosette-Forming Lymphocytes in Normal CBA Mice

Location (%RFC)	B	T ₀	T ₁	T ₂
	Bone marrow (30%) Spleen (30%)	Bone marrow (70%)	Thymus(100%) Spleen (70%)	Lymph nodes (90%) Peripheral blood (90%)
In Vitro sensitivity to AZ	500 μ /m ℓ	100 μ g/m ℓ	1 μ g/m ℓ	50 μ g/m ℓ
In Vitro sensitivity to A θ S	<1/10	1/40	1/600	1/300
Early effect of adult thymectomy	-	-	+	-
Early in vivo effects of ALS	-	-	-	+
Sensitivity to thymic hormone	-	+	-	-

(Bach, J-F et al: Cell. Immunol. 6, 394, 1973 より)

状を持つが (rosette-forming cell, RFC), Bach ら¹⁸⁾ は azathioprine (AZ) に対する感受性から RFC を highly sensitive の T₁ と low sensitive の T₂ に分けた。その臓器内分布および性状は Table 4 に示す通りである。こゝにいう T₁ と T₂ は Raff and Cantor のそれと typing の基礎が違うけれども、Bach らの論文をみると T₁ は ALS に insensitive で thymectomy により速やかに消失し、T₂ は ALS に感受性が高く thymectomy によって消失しないから、両者の T₁ と T₂ は identical なものと思われる。なお、Table 4 において T₀ の記号を与えられた細胞は、骨髄中にある RFC で θ 抗原は僅かに positive であり、thymus RFC の precursor と考えられるものである。

8. 細胞の微細構造による分類

Matter ら¹⁹⁾ は電子顕微鏡によってリンパ球の微細構造を調べ、T 細胞を T₁, T₂, T₃ の3つに分類した。Fig. 2 はそれぞれの形態・構造を模式的に示したものである。ごく簡単にその特徴を述べれば次の如くである。T₁ は小さいし中型のリンパ球で明るい cytoplasm を持ち、organelles が少ないこと、polyribosome を欠くこと以外特徴に乏しい。T₂ は大型で時に blast like の形態を示し、かなりの量の polyribosome を持つ。この polyribosome は時に rosette のような形態をとることがある。また polyribosome の間および細胞膜近くに連続した層として灰色で amorphous な物質のあることが特異である。しばしば細胞膜と結合した黒っぽい granule を

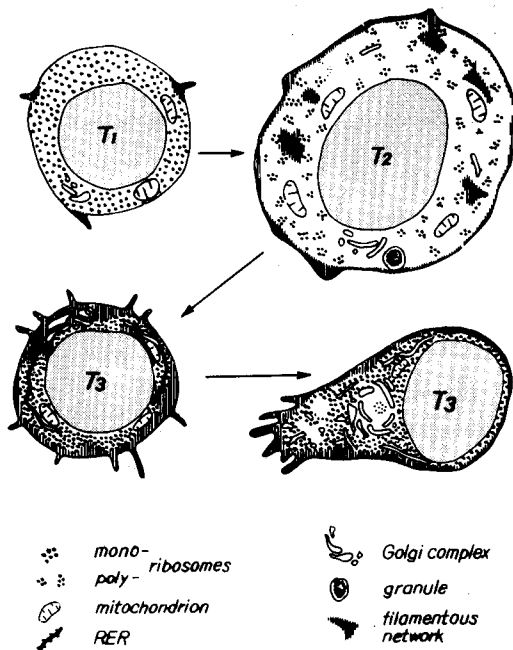


Fig. 2. Structure of T_1 , T_2 , T_3 and a possible pathway for T cell differentiation (Matter, A. et al.: J. Exp. Med., 136, 1008, 1972 より)
RER: rough endoplasmic reticulum

持つ。 T_3 は最も特徴的で、大きさはsmallないしmedium-sizedであるが、非常にdarkに見えるので、特別なmarkerなしに低倍率で容易に識別し得る。黒っぽく見える理由は、(i) 密に詰ったmonoribosomeのclusterがしばしば大量に存在すること、(ii) organellesを欠く大きな灰色のareaがあること、による。B. pertussisやmastocytomaに対する初期免疫応答では、大リンパ球である T_2 が特に目立って現われる。また T_3 は多数のribosomeと著明なfilamentous networkが発達していることから分化の最も進んだリンパ球と考えられ、一方 T_1 には分化を暗示するような特徴が何ら認められないことから、 T_1 は抗原刺激によって T_2 にtransformし、更に進んで最終的には T_3 になると考えられる。 T_3 には偽足を含めてpinocytosis活性があると彼らは推測した。3者の関係については、いろいろな観察から T_1 =virgin T cell, T_2 =activated T cell, T_3 =differentiated T cellとしている。

9. Kondaらの Thi , Thc と Tpc , Tpm

Alloantigenに対するimmunocompetence, 表面抗原, cortisone, PHAに対する反応性その他から, Kondaら²⁰⁾はthymocyteを2つ, T細胞を2つのsub-

populationにそれぞれ分類した。主な性状は次の如くである。

(i) Thi (=thymus incompetent): 胸腺細胞の dominant subpopulationで80ないし90%を占め, alloantigenを認識せず, PHAの刺激を受けない。BSA密度勾配超遠心では高いdensityのregionに分画され, anti θ , anti-TLにhighly sensitive, cortisone処理により消失する。anti-Gix, anti-Lyにも高感受性を示すがH-2抗血清には感受性低い。

(ii) Thc (=thymus competent): 胸腺細胞の minor subpopulationでalloantigenを認識する。PHA反応性(-), BSA gradientではlow average density, TL, Gixをほとんど持たない。

(iii) Tpc : 末梢にある“virgin”のantigen reactive T cell. 分布の点を除けば Thc とidenticalな細胞。

(iv) Tpm : 末梢にあるmemory T cell.

Table 5は以上を含めて, 4者の性状を纏めたものである。この分類をCohen and Clamanの分類と比較すると Thi = $Tcss$, Thc = $Tcsr$ であり, Raff and Cantorのそれと比較すれば, Tpc and Thc = T_1 , Tpm = T_2 である。

10. heteroantiseraによる分類とsurface markerとの関係

T細胞の分類・性状と機能はこれまで述べて来たように甚だ複雑であるが、以上のほかにマウスのリンパ球でウサギを免疫した各種のheterologous antiseraによって, T細胞の機能的に異ったsubsetを区別しようとする試みが幾つかなされている。1974年英国のブライトンで開かれた第2回国際免疫学会議ではT cell subsetsとT cell markersに関する2つのworkshopが持たれ, この点いろいろ論議されたが, 各学者の意見はかなりまちまちであった。例えばCantorとStoboを座長としたワークショップでは, helper T cell precursorはLy1とLy2の両者を持つのに反し, killer T cellはLy determinantを欠く, と報告され²¹⁾, 一方RaffとMendesを座長とするワークショップでは, 前者はLy1のみを有し, 逆にkiller T cellはLy2とLy3を持つと報告される²²⁾など, 甚だ不統一である。ただCon A responding cellがThy+, Ly1+, Ly2-, PHA responding cellがThy+, Ly1+, Ly2+であることは2つのワークショップで一致していた。

なおこのワークショップのほか, T cell subpopulationの機能に関しては, GVH反応を起すT細胞とhelper作用を持つT細胞はin vivoにおけるcorticosteroid感受性を異にすること²³⁾, Peyer板中のT細胞

Table 5. Summary of Characteristics of Tentative Mouse T Cell Subpopulations

Property of subpopulation	Th ₁	Th ₂ and T _{pc}	T _{pm}
Distribution	Thymus cortex	Uncertain	Thymus-dependent areas of peripheral lymphoid tissues
Size, appearance	Small, lymphoid cell	Large, lymphoid cell	Small lymphocytes
Relative density in BSA gradient	High	Low	High
Per cent of cells	80-90% of thymus	2-10% of thymus; unknown proportion of peripheral T cells	20-30% of spleen or lymph node cells
Cortisone effect in vivo	Sensitive	Insensitive	Insensitive
Relative irradiation effect in vivo	Sensitive	Less sensitive	Less sensitive
Membrane antigens			
θ	High	Low, but required	Low
TL	High	Low or absent	Absent
Gix	High	Low or absent	Absent
Ly	High	Low	Low
H-2	Low or absent	Intermediate	High
PC.1	Absent	Absent	Absent
Functional attributes			
Primary alloantigen recognition	No	Yes	Probable yes
PHA stimulation	No	Yes	Yes
Cooperative effect—SRBC	No	Yes	Untested
LPS stimulation	No	No	No

(Konda, S. et al: J. Exp. Med. 136, 1461, 1972 より)

は helper 活性を持つが GVH 活性は持たないこと²⁴⁾, T₁ cell は helper cell の precursor であり, T₂ cell は cytotoxic lymphocyte の precursor であること²⁵⁾ (ただしこの場合の T₁ は thymocyte, T₂ は peripheral T cell を指す), T-RFC と helper T cell は異ったタイプの細胞であること²⁶⁾, などが報告されている。helper T cell と suppressor T cell の異同については, 前述の如く適量の T 細胞は helper, 過剰の T 細胞は suppressor として働くという考えと両者を異った細胞と考える説があって意見の一致をみないが, 一般的には後者が次第に支持を受けつつあるように思われる。

おわりに

T-ology の時代に相応しく, T 細胞の性状や機能に関して夥しい数の研究が重ねられており, subpopula-

tion についても以上述べた以外に沢山の報告がなされている。ここでは似かよったものは捨て, 主なもののみを挙げたが, 分類の仕方や観察方法は区々であり, ここに述べなかったものを含めてその成績には一致しない点が多く見受けられる。このような不一致は科学の分野において珍らしいことではないが, 同時にこの事は T 細胞の性状, 機能において, 追究すべき点が多々残されていることを示すものでもあろう。T 細胞はその多彩な働きの故に, いろいろな名称がつけられているが, 相互の関係には未確定の点が多く, また同じ notation を用いながら内容的に違っている場合があることは, これまで述べた通りである。今後の研究によってこれらが次第に整理されることを願うと共に, これを通じて複雑巧妙な免疫の機構がより一層明らかにされることを期待したいと思う。

引用文献

- 1) Gershon, R. K.: In "Contemporary Topics in Immunology" Vol. 3 (Ed. Cooper, M. D. et al.) 1, 1974, Plenum Press.
- 2) Weiss, L.: The Cells and Tissues of the Immune System, Prentice-Hall Inc. Englewood, Cliffs, N. J. 1972.
- 3) Raff, M. C. and Cantor, H.: Progr in Immunol. Vol. 1, 83, 1971.
- 4) Feldmann, M. and Nossal, G. J. V.: Transpl. Rev. 13, 3, 1972.
- 5) Feldmann, M.: Nature, New Biol, 242, 82, 1973.
- 6) Huchet, R. and Feldmann, M.: Eur. J. Immunol., 4, 768, 1974.
- 7) Peavy, D. L. and Pierce, C. W.: J. Exp. Med., 140, 356, 1974.
- 8) Taussig, M. T.: Curr. Topics Immunol. Microbiol., 59, 125, 1972.
- 9) Kappler, J. W., Hunter, P. C., Jacobs, D. and Lord, E.: J. Immunol., 113, 27, 1974.
- 10) Araneo, B. A., Marrack, P. C. and Kappler, J. W.: J. Immunol., 114(2), 747, 1975.
- 11) Shortman, K., Cerottini, J.-C. and Brenner, K. T.: Eur. J. Immunol., 2, 313, 1972.
- 12) Stobo, J. D. and Paul, W. E.: Cell. Immunol., 4(4), 367, 1972.
- 13) Stobo, J. D. and Paul, W. E.: J. Immunol., 110(2), 362, 1973.
- 15) Unanue, E. R., Grey, H. M., Rabellino, E., Campbell, P. and Schmitke, J.: J. Exp. Med., 133, 1188, 1971.
- 16) Herzenberg, L. A. and Herzenbery, L. A.: Progr. Immunol. II. Vol. 2 (eds. L. Brent and J. Holborow), p. 116, 1974, North-Holl and Pub. Co.
- 17) Moorhead, J. W. and Claman, H. N.: Cell. Immunol., 5(1), 74, 1972.
- 18) Bach, J.-F. and Dardenne, M.: Cell. Immunol., 6, 394, 1973.
- 19) Matter, A., Lisowska-Bernstein, B., Ryser, J. E., Lamelin, J.-P. and Vassalli, P.: J. Exp. Med., 136, 1008, 1972.
- 20) Konda, S., Naka, Y. and Smith, R. T.: J. Exp. Med., 136, 1461, 1972.
- 21) Cantor, H. and Stobo, J.: Progr. Immunol, II. Vol. 3 (eds. L. Brent and J. Holborow) p. 304, 1974.
- 22) Raff, M. C. and Mendes, N. F.: Progr. Immunol. II. Vol. 3, p. 300, 1974.
- 23) Segal, S., Cohen, I. R. and Feldmann, M.: Science, 175, 1126, 1972.
- 24) Katz, D. H. and Perey, D. Y. E.: J. Immunol. 111(5), 1507, 1973.
- 25) Wagner, H., Rölinghoff, M. and Shortmann, K.: Progr. Immunol. II. Vol. 3, 111, 1974.
- 26) Elliot, B. E., Haskill, J. S. and Axelrad, M. A.: J. Exp. Med., 138, 1138, 1973.