

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Immunopathologische Untersuchungen an der Harderschen Drüse der Ratte*

Von

H. SCHÄFER und M. HENRIQUEZ

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. August 1964)

Nach Behandlung mit einem wäßrigen Extrakt aus der intraorbitalen Harderschen Rattendrüse und Freundschem Adjuvans zeigen Ratten in ihren Harderschen Drüsen entzündliche und regressive Veränderungen (HENRIQUEZ), die etwa mit den Schilddrüsenveränderungen bei einer autoantikörperbedingten Thyreoiditis vergleichbar sind, zumal bei diesen Ratten auch serologisch und immunhistologisch spezifische Antikörper gegen die Harderschen Drüsen nachgewiesen werden konnten. Es galt also, die Wirksamkeit solcher Antikörper für die Hardersche Drüse näher zu untersuchen. Als Modell bot sich dazu die Versuchsanordnung an, wie sie von HAFERKAMP für die Speicheldrüse und die Schilddrüse der Ratte verwendet worden ist. Durch die alleinige Behandlung gesunder Ratten mit Immunoglobulinen, welche heterologe Antikörper gegen die Speicheldrüsen oder Schilddrüsen dieser Tiere enthalten, gelingt es nicht, die Speicheldrüse und die Schilddrüse der Ratten sichtbar zu schädigen; erst 24 Std später injiziertes Antigen, d.h. nachinjizierter wäßriger Extrakt aus Rattenspeicheldrüsen bzw. Rattenschilddrüsen oder Fremdeiweiß ist in der Lage, in den erwähnten Drüsen regressive und entzündliche Veränderungen hervorzurufen. Diese Versuchsanordnung galt es also auf die Hardersche Drüse anzuwenden.

A. Methodik

Als Antikörperspender standen drei weibliche Hauskaninchen im Alter von $\frac{1}{2}$ Jahr und von 2—2,5 kg Gewicht zur Verfügung. Hundert Ratten beiderlei Geschlechts dienten als Antigenspender (intraorbitale Hardersche Drüse) und Antikörperempfänger.

I. Herstellung und Gewinnung von Kaninchen-Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen einen wäßrigen Extrakt aus der Harderschen Drüse der Ratte

1. Herstellung des wäßrigen Extraktes aus der Harderschen Drüse. Um die Drüse blutfrei zu erhalten, wurden die narkotisierten Ratten solange mit physiologischer Kochsalzlösung durch eine in die Aorta eingeführte Kanüle durchströmt, bis aus der eröffneten Vena cava an Stelle von Blut klare Kochsalzlösung ausfloß. Die herauspräparierte intraorbitale Hardersche Drüse wurde dann unter sterilen Bedingungen zermörsert und mit dem gleichen Gewichtsvolumen physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) — unter Zusatz eines Tropfens 0,25%iger Phenollösung auf 50 cm³ NaCl — versehen und zur Extraktion 24 Std bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Durch anschließende Zentrifugierung (1000 U/min) konnte ein zellfreier Überstand mit einem Eiweißgehalt von 1,11 g-% gewonnen werden.

* Herrn Prof. Dr. HERWIG HAMPERL zum 65. Geburtstag gewidmet. — Arbeit auf Anregung und unter Leitung von Priv.-Dozent Dr. O. HAFERKAMP.

2. Sensibilisierung der Kaninchen mit Drüsenextrakt. In den ersten 2 Wochen erhielten die Tiere je zwei intramuskuläre Injektionen von 0,1 und 0,2 ml Drüsenextrakt, das zur Steigerung der Antikörperbildung mit der gleichen Menge komplettem Freundschem Adjuvans vermischt worden war. In den folgenden 3 Wochen bekam jedes Tier in zweitägigem Abstand steigende Mengen Antigen intravenös injiziert. Die Gesamtmenge des verabreichten Extraktes betrug schließlich bei jedem Tier 1,7 ml, d.h. bei einer Konzentration der Antigenlösung von etwa 1 g-% 17 mg Drüseneiweiß. 4 Wochen nach der letzten Antigeninjektion wurden die Tiere getötet und das Serum steril gewonnen.

3. Serologischer Antikörpernachweis. a) Die Komplementbindungsreaktion wurde nach der von HENNESSEN beschriebenen und von HAERKAMP modifizierten Mikromethode ausgeführt. Das zu testende Serum wurde stets in einer Verdünnung von 1:5, das Antigen in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Verdünnungsflüssigkeit war in allen Fällen Veronal-Puffer. Kontrollen: Bei der sog. *Antigenkontrolle* trat im Reaktionsablauf an Stelle des zu testenden Serums ein Tropfen Veronal-Puffer, bei der *Testserumkontrolle* wurde das Antigen durch Pufferlösung ersetzt. Um etwaige Normalantikörper im Kaninchenserum gegen die

Hardersche Drüse der Ratte auszuschalten, reagierten bei der sog. *Normalserumkontrolle* an Stelle der Testseren Seren von Kaninchen, die nicht mit Drüsenextrakt immunisiert worden waren.

Tabelle
Komplementverdünnungsreihe für Mikro-Komplementbindungsreaktion nach HENNESSEN (gekürzt). Faktor 1,4

Stufe Nr.	Komplementgehalt %	Verdünnung
		Komplement + Puffer
10	28,9	0,3 + 0,74
9	20,6	0,2 + 1,15
8	14,8	0,2 + 1,16
7	10,5	0,2 + 1,70
6	7,5	0,1 + 1,23
5	5,4	0,1 + 1,76
4	3,8	0,1 + 2,50
3	2,7	0,1 + 3,54
2	2,0	0,1 + 5,00
1	1,5	0,1 + 7,04

Ergebnis. Die drei immunisierten Kaninchen wiesen in ihrem Serum einen Titer mit einer partiell lösenden Komplementdosis der Stufe 8 auf, die dem Verbrauch einer 14,8%igen Komplementlösung entspricht (s. Tabelle). Doch zeigte sich auch bei der Durchführung der Kontrollen ein Komplementverbrauch, und zwar bei Tier (1) bis zur Stufe 3, bei den Tieren (2) und (3) bis zur Stufe 4. Der Vergleich des höchsten Komplementverbrauchs mit dem unspezifischen Komplementverbrauch der Kontrollen ergab somit für Tier (1) einen Bewertungsquotienten von $8/3 (= 2,6)$ bei den

Tieren (2) und (3), von $8/4 (= 2)$ entsprechend dem Verbrauch einer 2,5 bzw. 2%igen Komplementlösung.

b) *Agarpräzipitationstest nach OUCHTERLONY in der Mikroausführung nach SCHEIDEGGER (genaue Ausführung s. bei HITZIG oder bei HAERKAMP.* In das zentrale Loch wurden 0,005 ml unverdünnte oder 1:1 mit Puffer verdünnte Antigenlösungen gegeben, in die kreisförmig angeordneten Löcher im Uhrzeigersinn bei 12 Uhr beginnend erst 0,005 ml unverdünntes Testserum (Ak), in die nächsten Löcher das gleiche Serum in einer Verdünnung von 1:1, 1:10, 1:20, 1:40 und schließlich in das letzte Loch bei 10 Uhr in einer Verdünnung von 1:80.

Ergebnis. Alle drei Kaninchen zeigten Präzipitate mit nur geringen Unterschieden in der Intensität. Die stärksten Präzipitate fanden sich bei unverdünnter Antigenlösung und unverdünntem Serum. Bei einer Serumverdünnung von 1:80 waren keine Präzipitate mehr zu erkennen (s. Abb. 1).

Das Ergebnis dieser serologischen Untersuchungen zeigte also, daß sich bei den immunisierten Kaninchen heterologe Antikörper gegen einen wäßrigen Extrakt aus der intraorbitalen Harderschen Drüse der Ratte gebildet hatten.

4. Gewinnung der antikörperhaltigen Immunoglobuline aus den Kaninchenseren unter immunoelektrophoretischer Kontrolle. Mit Hilfe der Immunoelektrophorese (GRABAR) in der Modifikation nach SCHEIDEGGER ließen sich die antikörperhaltigen Globuline im Bereich der γ -Globulinfraktion wahrscheinlich machen. Es zeigte sich nämlich in den Immunoelektrophoresediagrammen, bei denen ein kräftig präzipitierendes Antiserum vom Schaf gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Kaninchenseren diffundierte, eine deutliche Abschwächung der γ -Globulinpräzipitatlinien, wenn diese Kaninchenseren mit ihrem spezifi-

schen Antigen (Extrakt aus der Harderschen Drüse der Ratte) vorher abgesättigt worden waren. (Genaue Technik s. bei HAFFERKAMP.)

Die Gewinnung der so lokalisierten Immunoglobuline erfolgte durch chromatographische Fraktionierung der Seren in der DEAE (Diäthyl-Amino-Äthyl)-Cellulosesäule (s. bei BRAUN). Als Elutionslösungen dienten folgende Pufferlösungen:

- NaPO₄-Puffer 0,005 m, pH 7,0 = Gradient 1
- NaPO₄-Puffer 0,02 m, pH 6,0 = Gradient 2
- NaH₂PO₄-Puffer 0,05 m, pH 4,6 = Gradient 3
- NaH₂PO₄-Puffer 0,1 m, pH 4,6 = Gradient 4
- NaH₂PO₄-Puffer 0,3 m, pH 4,6 = Gradient 5

In den Fraktionen 1—13, die von den Gradienten 1 und 2 eluiert worden waren, stellte sich immunoelektrophoretisch reines γ -Globulin aus den Kaninchenseren dar (siehe Abb. 2), das auch tatsächlich bei einer Wiederholung des Agarpräzipitationstests (s. 3b) in einer 1%igen Lösung gegen das spezifische Antigen (Extrakt aus der Harderschen Drüse der Ratte) die gleichen Präzipitate bildete wie das entsprechende nicht aufgetrennte Serum. Bei der weiteren Chromatographie der Seren mit den Gradienten 3—5 lösten sich die anderen Serumfraktionen (α - und β -Globuline sowie Albumin) aus der Cellulosesäule, die jedoch verworfen wurden.

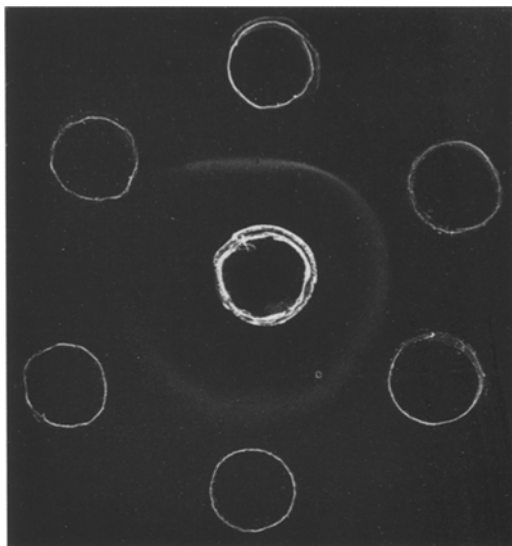


Abb. 1. Agar-Präzipitationstest (Ouchterlony). Im zentralen Loch unverdünnter wässriger Extrakt aus der Harderschen Drüse der Ratte. In den peripheren Löchern bei 12 Uhr beginnend unverdünntes, 1:1, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 verdünntes Antiserum vom Kaninchen (1). Zwischen den Löchern die Präzipitatlinie entsprechend der Reaktion zwischen Ak und Ag

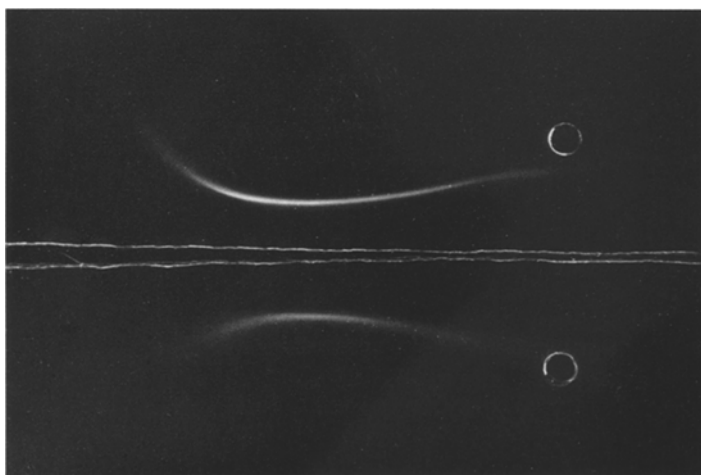


Abb. 2. Immunelektrophorese-Diagramm. Das mit dem Salzgradienten 1 aus der Cellulosesäule eluierte reine γ -Globulin reagiert nach seiner elektrophoretischen Wanderung kräftig mit dem aus dem Spalt diffundierten Extrakt aus der Harderschen Drüse der Ratte

II. Behandlung gesunder Ratten mit heterologen Antikörpern gegen die intraorbitale Hardersche Tränendrüse der Ratte und der immunohistologische Antikörpernachweis im Drüsengewebe

1. 44 gesunde Ratten erhielten intravenös 0,9 ml der 1 g-%igen Immunoglobulinlösung. 24 Std später wurde bei 14 Tieren 0,1 ml Extraktlösung aus der Harderschen Drüse, bei 10 Tieren 0,1 ml Hühnereiklar und bei 10 Tieren 0,1 ml Tetanusserum vom Pferd nachinjiziert. Die restlichen 10 Tiere erhielten keine Zweitinjektion. Kontrolle: 40 Ratten wurden nach dem gleichen Schema behandelt nur mit dem Unterschied, daß an Stelle besagter Immunoglobuline eine γ -Globulinlösung nicht immunisierter Kaninchen verabreicht wurde. Alle Tiere wurden am 21. Tag nach der 1. Injektion getötet und die intraorbitale Hardersche Tränendrüse zur Untersuchung entnommen.

2. *Immunohistologischer Nachweis* der injizierten heterologen Antikörper im Erfolgsorgan (Hardersche Drüse).

Kryostat-Schnitte von unfixierten Hälften der Tränendrüsen wurden nach kurzer Fixation (5 min) in Aceton oder Methanol 30 min mit Fluoresceinisothiocyanat markierten Antikaninchenglobulinserum überschichtet.

Kontrolle: Überschichtung der Schnitte zunächst mit einem nicht markierten Antikaninchenglobulinserum vom Schaf und dann erst nach gründlichem Spülen mit dem markierten Antikaninchenglobulinserum (Kontrolle 1). Als Kontrolle 2 dienten die Versuchstiere, die γ -Globuline von Kaninchen ohne Antikörper gegen die Hardersche Drüse der Ratte erhalten hatten. Hierbei wurden die histologischen Schnitte von der Tränendrüse nur mit dem markierten Antikaninchenglobulinserum vom Schaf überschichtet.

B. Ergebnis

Auf den Acini der Drüsen ist eine diffuse gelbgrüne Fluoreszenz des markierenden Antikaninchenglobulinserums wahrzunehmen: Sie ist auf das Cytoplasma der Zellen beschränkt und läßt die Kerne frei (s. Abb. 3). Bei den Kontrollen fehlte diese Fluoreszenz (s. Abb. 4).

Dieses Ergebnis spricht also dafür, daß der beim Kaninchen erzeugte heterologe Antikörper gegen einen Extrakt aus der Harderschen Drüse sein Ziel, die intraorbitale Tränendrüse, erreicht und sich auf dem Cytoplasma der Zellen niedergeschlagen hat.

Bei der Besprechung der *histologischen Befunde* konnten trotz unterschiedlicher Versuchsanordnung die Versuchstiere in zwei Gruppen eingeteilt werden, da die wesentlichen Veränderungen, die von Versuchstier zu Versuchstier nur leicht in bezug auf Stärke und Ausdehnung wechselten, sich im allgemeinen in einer Gruppe glichen. Zur ersten Gruppe gehören die Tiere, die nur spezifische Immunoglobuline und keine Zweitinjektion erhalten hatten, sowie die Kontrolltiere, die Kaninchenglobuline ohne spezifische Antikörper — mit und ohne Zweitinjektion — erhielten; zur zweiten Gruppe zählen die Ratten, die nach einer intravenösen Gabe von Immunoglobulinen mit den spezifischen Antikörpern 24 Std später das spezifische Antigen (Tränendrüsenextrakt), Hühnereiklar oder Tetanusserum vom Pferd erhalten hatten.

Bei den Tieren der ersten Gruppe ließen sich makroskopisch wie auch mikroskopisch an den Tränendrüsen keine krankhaften Veränderungen nachweisen: Die Drüsen zeigten ihren charakteristischen Aufbau mit den für diese Tierart in jungen Altersklassen typischen Varianten und Spontanveränderungen.

Dagegen war bei den Tieren der zweiten Gruppe schon makroskopisch eine zwar leichte, jedoch deutlich zu erkennende ödematöse Schwellung der intraorbitalen Tränendrüsen zu erkennen. In den histologischen Schnitten dieser Organe zeigte sich bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung folgendes Bild: Neben einer

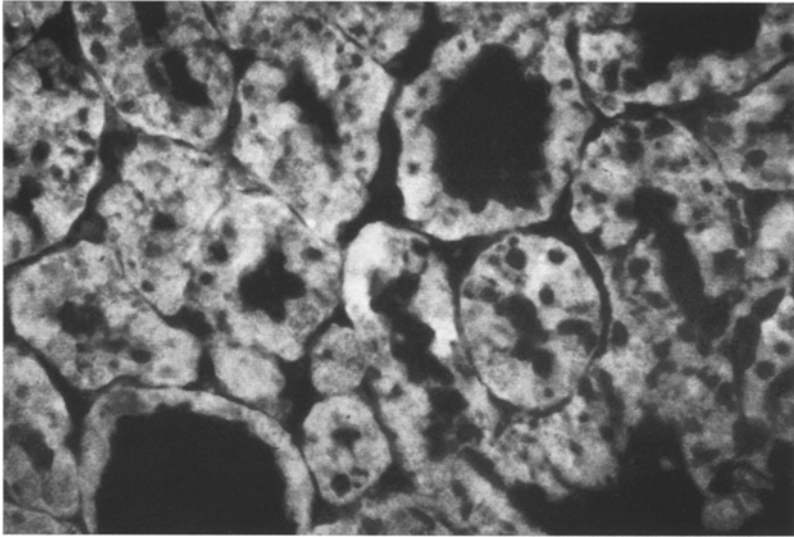


Abb. 3. Immunhistologischer Nachweis mit der Methode von COONS und KAPLAN des gesunden Ratten injizierten reinen Gamma-(Immun-)Globulins mit serologisch nachgewiesenen spezifischen Antikörpern gegen die Hardersche Drüse der Ratte mittels eines an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten Antikaninchenglobulinserums vom Schaf: Kräftige, im Präparat gelb-grüne, in der Wiedergabe weißliche Fluoreszenz der Drüsenläppchen unter Freilassung der Kerne

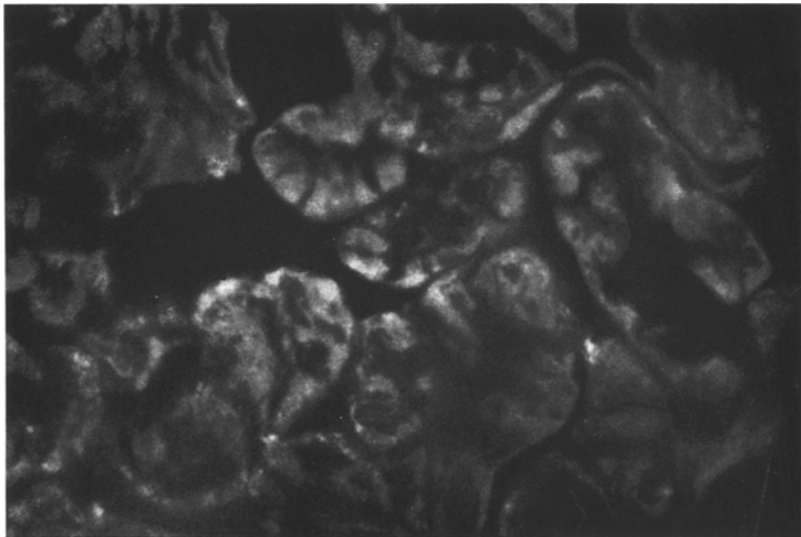


Abb. 4. Immunhistologische Kontrolle. Vor der Einwirkung des markierenden, an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikaninchenglobulinserums wurde der Schnitt mit nicht markiertem Antikaninchenglobulinserum vom Schaf überschichtet, so daß bei der nachfolgenden Einwirkung des markierenden Antikaninchenglobulinserums das vorhandene Kaninchenglobulin auf den Drüsenläppchen bereits abgesättigt war: Deutlich abgeschwächte Fluoreszenz auf den Drüsenläppchen

ödematösen Auflockerung des interstitiellen Bindegewebes weisen die Drüsenläppchen in einigen Präparaten eine Homogenisierung des Cytoplasmas mit Verlust der Zellgrenzen und der Acidophilie auf. In anderen Präparaten gehen diese Veränderungen weiter und es kommt zu Karyorhexis und Pyknose der Zellkerne; das Interstitium ist leicht mit Lymphocyten und Plasmazellen durch-

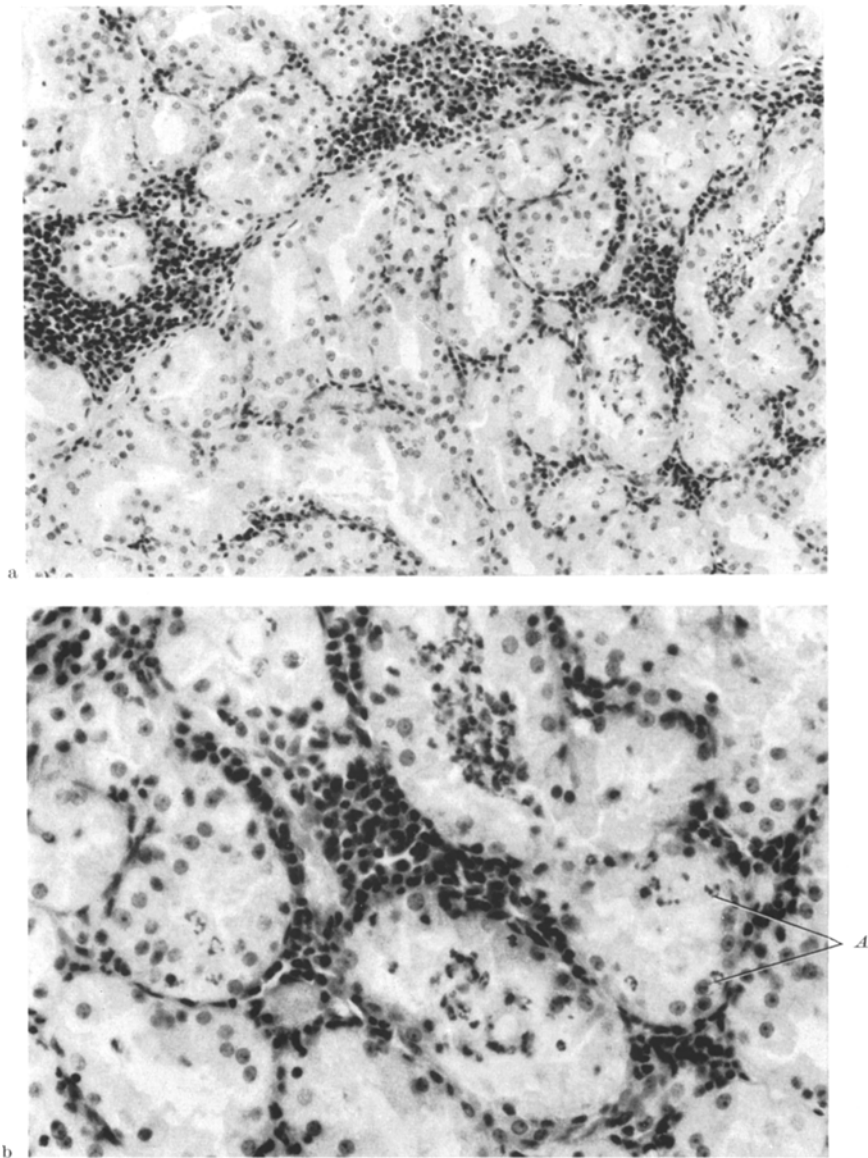


Abb. 5a u. b. Intraorbitale Hardersche Tränendrüse der Ratte 21 Tage nach der Injektion von γ -Globulin mit spezifischen heterologen Antikörpern gegen die Drüse und nachfolgender Einverleibung von Extrakt aus der Harderschen Drüse (Ag). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Starke rundzellige Infiltration im Interstitium bei regressiven Parenchymveränderungen. Vergr. $185\times$. b Bei stärkerer Vergrößerung ($460\times$) sieht man Lymphocyten und Plasmazellen zwischen Drüsen, deren Zellen sich in Nekrobiose befinden (bei A)

setzt. Bei den schwersten Veränderungen wird das histologische Bild von ausgedehnten Parenchymnekrosen mit Verlust der Drüsenstruktur beherrscht. Ein starkes Ödem und dichte plasmacelluläre und lymphocytäre Infiltrate mit vereinzelten eosinophilen Zellen sind besonders in der Nachbarschaft dieser Zelluntergänge zu finden. Die entstandenen Hohlräume sind von eosinophilen Massen und zahlreichen Kerntrümmern angefüllt (s. Abb. 5a und b). Es handelt sich

also um regressive Parenchymveränderungen mit einer ausgeprägten, nicht eitrigen, interstitiellen Entzündung, die von Fall zu Fall bei vorliegender Versuchsanordnung an Stärke, jedoch nicht in ihrer charakteristischen Eigenart variiert.

C. Besprechung

Entsprechend den vorliegenden Untersuchungsergebnissen scheint also die intravenöse Injektion von Immunoglobulinen mit heterologen Antikörpern gegen einen Gewebsextrakt aus der Glandula orbitalis interna der Ratte bei gesunden Ratten diese Drüsen bis zum 21. Tag nach Versuchsbeginn nicht wesentlich krankhaft zu schädigen, obwohl immunohistologisch nachgewiesen werden konnte, daß die Antikörper in der injizierten Immunoglobulinfraktion ihr Erfolgsorgan erreicht hatten.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von DONIACH und RORTT, die nach Übertragung von menschlichem Serum mit Antikörpern gegen Schilddrüsengewebe auf Affen an deren Schilddrüsen keine krankhaften Veränderungen erkennen konnten, auch wenn in vitro Affenschilddrüsengewebe serologisch mit dem menschlichen Serum reagierte. Auch konnten KERSTING und PETTE die passive Übertragungsmöglichkeit der experimentellen Polyneuritis durch spezifische humorale Antikörper nicht bestätigen.

Wir konnten jedoch durch eine 24 Std nach der Immunoglobulininjektion — mit Antikörpern gegen die Hardersche Drüse — verabreichte Antigengabe (Drüsenextrakt) oder sogar nur durch ein nachinjiziertes Fremdeiweiß eine regressive Parenchymschädigung mit einer nicht eitrigen Entzündung in der intraorbitalen Tränendrüse der Ratte hervorrufen.

Diese so erzeugten Veränderungen an der Tränendrüse der Ratte sind vergleichbar mit den immunopathologischen Untersuchungen von HAFERKAMP an der Schild- und Speicheldrüse der Ratte. Auch er konnte durch die Injektion von spezifischen heterologen Antikörpern gegen Schild- und Speicheldrüse der Ratte nur in Verbindung mit dem nachinjizierten spezifischen Antigen (Schild- oder Speicheldrüsenextrakt) oder auch eines Fremdeiweißes regressive und — allerdings leichtere — entzündliche Veränderungen an den genannten Organen der Ratte hervorrufen.

Das Auftreten einer Tränendrüsenschädigung bei der Nachinjektion von Drüsenextrakt läßt sich noch als Folge einer zweiten Antigen-Antikörperreaktion zwischen dem zellständig gewordenen heterologen Antikörper und dem auf dem Blutweg dorthin gelangten Antigen erklären. So nehmen HEILMEYER und MÜLLER für die Immunothyreoiditis an, daß der Autoantikörper nur dann pathogenetisch wirksam wird, wenn er aus irgendeinem Grunde mit dem Schilddrüsenantigen (Thyreoglobulin) oder der Vorstufe dieses Eiweißes im Interstitium der Schilddrüse zur Reaktion gelangt. Dagegen ist die schädigende Wirkung an den Tränendrüsen der Ratten durch die Nachinjektion von Fremdeiweiß vorerst noch völlig unklar.

Zusammenfassung

Bei Kaninchen erzeugte Antikörper gegen einen Extrakt aus der intraorbitalen Harderschen Tränendrüse der Ratte (Antigen) wurden nach ihrem serologischen Nachweis (Komplementbindungsreaktion, Agar-Präcipitationstest, Immunelektrophorese) in der Zellulose-Ionen-Austausch-Chromatographie als γ -Globulinfraktion (Immunoglobulinfraktion) isoliert und gesunden Ratten in dieser Frak-

tion intravenös injiziert. Diese Ratten zeigten nach 21 Tagen keine Veränderungen an den Harderschen Drüsen. Immunohistologisch (COONS und KAPLAN) konnte dennoch nachgewiesen werden, daß diese Immunoglobuline die Drüsen erreicht hatten. Erst ein den antikörperhaltigen Immunoglobulinen 24 Std später nachinjizierter Extrakt aus der Harderschen Drüse (Antigen) oder auch nur ein nachinjiziertes Fremdeiweiß vermochte in den intraorbitalen Tränendrüsen der Ratten krankhafte Veränderungen in Form von regressiven Parenchymschäden mit nicht eitriger Entzündung hervorzurufen.

Immunopathologic Studies of Harder's Gland of the Rat

Summary

An extract of the intraorbital Harder's gland of the rat was used as antigen to produce antibodies in the rabbit. These antibodies were measured serologically by complement fixation, agar-precipitation, and immuno-electrophoresis, then isolated by cellulose ion-exchange chromatography as the γ -globulin fraction (immune globulin fraction). The antibodies were then injected intravenously into healthy rats. After 21 days these rats showed no changes in their Harder's glands. With the immuno-histologic method of COONS and KAPLAN it could be shown, that the immune globulins had reached the glands. On the other hand, an injection 24 hours later of an extract from the Harder's gland (antigen) which contained the immune globulins (antibody) or an injection merely of foreign protein called forth pathologic changes in the intraorbital tear glands, in the form of regressive parenchymal damage with non-suppurative inflammation.

Literatur

- BRAUN, D.: Über die Präparation nephrotoxischer Antikörper in der Gamma-Globulinfraktion mittels der Zellulose-Ionenaustausch-Chromatographie. In Vorbereitung.
- COONS, A. H.: Antibodies and antigens labelled with fluorescein. *Schweiz. Z. Path.* **22**, 693—697 (1959).
- GRABAR, P.: In: *Immunopathologie in Klinik und Forschung* von P. MIESCHER u. K. O. VORLAENDER, 2. Aufl., S. 1—61. Stuttgart: Georg Thieme 1961.
- HAFERKAMP, O.: Ein tierexperimenteller Beitrag zur Immunopathologie der Speicheldrüsen. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 298—322 (1962).
- Tierexperimentelle Untersuchungen zur Immunopathologie der Schilddrüse. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **46**, Tgg 1962, S. 149—151.
- HEILMEYER, L., u. W. MÜLLER: Die autoantikörperbedingte Thyreoiditis. *Dtsch. med. Wschr.* **85**, 701—706 (1960).
- HENNESSEN, W.: Über eine Influenza-Komplementbindungsreaktion für die Praxis. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **141**, 557—564 (1955).
- HENRIQUEZ, M. G.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Immunopathologie der intraorbitalen Harderschen Drüse bei der Ratte. Inaug.-Diss. Bonn 1962.
- KERSTING, G., u. E. PETTE: Die experimentelle Polyneuritis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **179**, 333—352 (1959).
- ROTT, A. H., and D. DONIACH: Thyroid auto-immunity. *Brit. med. Bull.* **16**, 152—158 (1960).
- SCHNEIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* **7**, 103—110 (1955).

Dr. H. SCHÄFER,
Pathol. Institut der Univ. Bonn, Bonn-Venusberg

Dr. M. HENRIQUEZ,
Maracaibo (Venezuela), Sanatorio antituberculoso