Paul Ehrlich-
Institut
Bibliothek
Frankfurt a. Main

ARBEITEN AUS DEM STAATSINSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE UND DEM GEORG SPEYER-HAUSE ZU FRANKFURT A. M.

BEGRÜNDET VON PAUL EHRLICH

HERAUSGEGEBEN VON

DR. W. KOLLE
DIREKTOR DES STAATSINST. FÜR EXP. THERAPIE UND DES GEORG SPEYER-HAUSES
O. HONORARPROFESSOR AN DER UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

Heft 23

I. R. Prigge und O. Hartoch, Untersuchungen über die Wertbestimmung des Dysenterieserums mit Hilfe eines hochwertigen Shiga-Kruse-Toxins. Mit 2 Abbildungen im Text.

II. I. Costero, Studien an Mikrogliazellen (sog. Hortegazellen) in Gewebskulturen von Gehirn. Mit 6 Abbildungen im Text.

III. E. Küster und G. Elkes, Wirkung der B.C.G.-Immunisierung bei Affen, Meerschweinchen und Kaninchen. Mit 1 Abbildung im Text.

IV. Werner Fischer und Gertraudis Klinkhart, Untersuchungen über Hämagglutination und Hämolyse bei Feldhasen, Feldkaninchen und Stallkaninchen. II. Mitteilung. Mit 4 Abbildungen und 8 Tabellen im Text.

Mit 13 Abbildungen und 8 Tabellen im Text

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1930

Aus dem Staatlichen Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. W. Kolle).

I.

Untersuchungen über die Wertbestimmung des Dysenterieserums mit Hilfe eines hochwertigen Shiga-Kruse-Toxins.

Von

Prof. Dr. **R. Prigge**,
Mitglied des Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.,

und

Dr. **O. Hartoch**,
Mitglied des Instituts für experimentelle Medizin in Leningrad.

(Mit 2 Abbildungen im Text.)

I.

Die Wertbestimmung der antitoxischen Sera beruht im wesentlichen auf einem sehr einfachen Prinzip. Man ermittelt diejenige Dosis Toxin, die durch eine bestimmte Antitoxinmenge, z. B. durch eine Antitoxineinheit, eben neutralisiert wird. Die Einverleibung von Mischungen, die diese Prüfungsdosis des Testgiftes und eine Einheit Antitoxin enthalten, darf bei den Versuchstieren niemals zum Tod führen. Zur Ermittlung des Antitoxingehaltes eines Serums stellt man nun Gemische her, die die Prüfungsdosis des Testgiftes und wechselnde Mengen des zu untersuchenden Serums enthalten. Diejenige Serummenge, die die Prüfungsdosis des Testgiftes eben neutralisiert, enthält gerade eine Antitoxineinheit.

Mischungen, die die Prüfungsdosis des Testgiftes und eine Einheit Antitoxin enthalten, sind definitionsgemäß so beschaffen, daß alle Versuchstiere, denen sie eingespritzt werden, am Leben bleiben. Wird die der Prüfungsdosis des Giftes beigemischte Antitoxinmenge um einen bestimmten Betrag herabgesetzt, z. B. um 10 Proz., so erweisen sich die Mischungen als derart giftig, daß sämtliche Tiere nach ihrer Einverleibung sterben. Toxin-Antitoxin-Gemische, deren Antitoxingehalt zwischen den beiden Grenzwerten (1,0 und 0,9 AE) liegt, sind ebenfalls giftig, und zwar in verschiedenem Grade; die Anzahl der bei allmählicher Verminderung der Antitoxinmenge von 1,0 auf 0,9 AE sterbenden Tiere nimmt nämlich nach und nach zu und durchschreitet alle Zwischenwerte zwischen 0 und 100 Proz. Die Mengen nichtgebundenen Giftes, die in den Gemischen enthalten sind bzw. aus ihnen nach der Injektion frei werden, steigen also von der dosis certe tolerata bis zur dosis certe letalis. Die bei geringer Verminderung der Antitoxindosis wirksamen Toxinmengen sind so klein, daß nur die em-

pfindlichsten Tiere sterben; bei weiterer Herabsetzung des Antitoxingehaltes der Gemische kommen immer größere Toxinmengen zur Wirkung, so daß auch resistentere Tiere sterben. Gemische der Prüfungsdosis des Testgiftes mit 0,9 AE lassen schließlich eine dosis certe letalis frei und töten sämtliche Tiere.

Wenn die Bindungsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin so wie in dem geschilderten Beispiel liegen, hat man zur Durchführung einer Wertbestimmung die Prüfungsdosis des Testgiftes mit wechselnden Mengen des zu prüfenden Serums zu mischen, die eine geometrische Reihe mit dem Quotienten $\frac{9}{10}$ bilden, z. B. mit $\frac{1}{81}, \frac{1}{90}, \frac{1}{100}, \frac{1}{111}, \frac{1}{123} \cdots$ ccm. Angenommen, das Serum enthalte im Kubikzentimeter 105 Antitoxineinheiten, so werden sich alle Gemische, die $\frac{1}{105}$ ccm oder mehr Serum enthalten, als ungiftig erweisen; andererseits müssen alle Gemische, die $\frac{9}{10} \cdot \frac{1}{105} = \frac{1}{117}$ ccm oder weniger Serum enthalten, die Versuchstiere töten, denen sie injiziert werden. Dagegen können Tiere, welchen Gemische mit einem zwischen den beiden Grenzdosen liegenden Serumgehalt einverleibt werden, entweder sterben oder am Leben bleiben. Führt man den oben erwähnten Reihenversuch aus, so sind also zwei Ergebnisse möglich:

(1)

Tier Nr.	Injektion		Ergebnis
	Gift	Serum	
1	Prüfungsdosis	1/81 ccm	lebt
2	„	1/90 „	lebt
3	„	1/100 „	lebt
—> 4	„	1/111 „	†
5	„	1/123 „	†

(2)

Tier Nr.	Injektion		Ergebnis
	Gift	Serum	
1	Prüfungsdosis	1/81 ccm	lebt
2	„	1/90 „	lebt
3	„	1/100 „	lebt
—> 4	„	1/111 „	lebt
5	„	1/123 „	†

Im 1. Fall ist der als Aequivalent der Antitoxineinheit ermittelte Wert — 1/100 ccm — größer als 1/105 ccm, d. h. größer als der wahre Wert; im 2. Fall ist der gefundene Wert — 1/111 ccm — kleiner als der wahre. Im 1. Fall hat das Resultat einen Fehler von + 5,0 Proz., im 2. Fall einen Fehler von —5,4 Proz. Der Serumgehalt von Gemischen, die — wenn auch nur bei einzelnen Tieren — bereits tödlich wirken, muß stets < 1,0 AE (im vorliegenden Fall also < 1/105 ccm) sein; andererseits muß der Serumgehalt von

Mischungen, die von einzelnen Tieren noch vertragen werden, stets > 0,9 AE (1/117 ccm) sein. Führt man also den Reihenversuch mit anderen als den oben als Beispiel angeführten Serummengen aus, so wird der als Aequivalent der Antitoxineinheit angenommene Wert stets kleiner als 1,11 AE (1/95 ccm) und stets größer als 0,9 AE (1/117 ccm) sein; selbstverständlich müssen die hier in Betracht kommenden Reihen stets den Quotienten $\frac{9}{10}$ haben. Die Grenzen des mit der Versuchsanordnung verknüpften Fehlers sind also mit +11 Proz. bzw. —10 Proz. des wahren Wertes anzugeben. Eine Methode der Antitoxinbestimmung, deren Fehlergrenzen so nahe beieinander liegen, besitzt den für praktische Zwecke erforderlichen Genauigkeitsgrad.

II.

Ganz anders liegen die Verhältnisse, wenn die Gift-Serum-Gemische durch eine Verminderung der Antitoxinmenge um Beträge von etwa 10 Proz. nicht so giftig werden, daß sämtliche Versuchstiere sterben. Wenn z. B. erst nach Verminderung des Antitoxins um 75 Proz. eine für alle Tiere tödliche Toxinmenge zur Wirkung gelangt, nimmt die Genauigkeit der Antitoxinbestimmung ganz erheblich ab. Die mit der Prüfungsdosis des Testgiftes zu mischenden Serummengen bilden in dem jetzt als Beispiel gewählten Fall eine geometrische Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{4}$. Die als Aequivalent der Antitoxineinheit erscheinenden Werte liegen alsdann zwischen 4,0 und 0,25 AE, und die Grenzen des der Versuchsanordnung anhaftenden Fehlers sind mit + 300 Proz. und — 75 Proz. anzugeben! Wollte man geometrische Reihen mit größeren Quotienten, etwa mit dem Quotienten $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{\sqrt{2}}$ oder $\frac{1}{\sqrt[4]{2}} \cdots$ wählen, so würde die positive Fehlergrenze mehr und mehr an 0 herangerückt, während die negative Fehlergrenze unverrückt bliebe. Z. B. würde bei Verwendung einer Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{2}$ der höchste Wert, den das Resultat annehmen könnte, < 2,0 AE sein. Weil nämlich der Serumgehalt von Gemischen, die noch Giftigkeit zeigen, d. h. überhaupt noch den Tod eines Versuchstieres bewirken können, stets < 1,0 AE ist, muß der Antitoxingehalt des in der Reihe vorangehenden, als ungiftig befundenen Gemisches stets < 2,0 AE sein. Der positive Grenzwert, dem sich der Fehler nähern kann, sinkt somit auf +100 Proz. Da andererseits erst eine Verringerung der zur Neutralisierung der Prüfungsdosis erforderlichen Antitoxinmenge um mindestens 75 Proz. eine für sämtliche Versuchstiere tödliche Toxinmenge freiläßt, so bleibt der negative Grenzwert, dem sich der Fehler nähern kann, auch dann, wenn die Versuchsanordnung sich einer Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{2}$ bedient, —75 Proz. —

Wenn der Quotient der zur Antitoxinbestimmung gewählten Reihe größer als etwa $\frac{3}{4}$ ist, ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven Fehlers bei der Geringfügigkeit des Abstandes der Reihenglieder nur klein, z. B. kommt bei einer Reihe mit dem Quotienten $\frac{4}{5}$ ein positiver Fehler nur dann zustande, wenn ein Versuchstier stirbt, welchem ein Gemisch mit einem Antitoxingehalt von > 0,8 AE injiziert worden ist, d. h. eines der Gemische, die noch von der überwiegenden Mehrzahl der Tiere vertragen werden. Im allgemeinen wird man es also mit einem negativen Fehler zu tun haben. Nun wird die Wahrscheinlichkeit, daß ein Versuchstier stirbt, dem ein Gemisch mit verhältnismäßig hohem, der vollen Antitoxineinheit angenäherten Antitoxingehalt injiziert worden ist, um so größer, je größer der Quotient, d. h. je zahlreicher die Glieder der Versuchsreihe — und somit auch die zwischen die beiden Grenzwerte 1,0 und 0,25 AE fallenden Glieder — werden; damit nimmt auch die Wahrscheinlichkeit zu, daß der als Aequivalent der Antitoxineinheit erscheinende Wert nur um einen geringen Betrag unterhalb des wahren Wertes liegt.

Wenn somit im besprochenen Beispiel die Verwendung von Reihen mit Quotienten, die größer als $\frac{1}{4}$ sind, theoretisch eine erhöhte Genauigkeit der Resultate verspricht, so kann ein solches Verfahren bei der Wertbemessung antitoxischer Sera doch keine tatsächliche Anwendung finden, weil die in Betracht kommenden Reihen eine ganz unverhältnismäßig große Anzahl von Gliedern haben müßten. Außerdem würden die Ergebnisse der Reihenversuche eine — wenn auch nur scheinbar — völlig regellose Form annehmen. Schon wenn anstelle einer Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{4}$ eine solche mit dem Quotienten $\frac{1}{2}$ benützt wird, kann sich bei der Auswertung eines 160 AE im ccm enthaltenden Serums folgendes Resultat ergeben:

Tier Nr.	Injektion		Ergebnis
	Gift	Serum	
1	Prüfungsdosis	1/50 ccm	lebt
2	„	1/100 „	lebt
3	„	1/200 „	†
4	„	1/400 „	lebt
5	„	1/800 „	†
6	„	1/1600 „	†

In 1/200 bzw. 1/400 ccm des Serums sind nämlich 0,8 bzw. 0,4 AE enthalten, also Mengen, die zwischen den Grenzdosen (1,0 und 0,25 AE) liegen und mit der Prüfungsdosis des Testgiftes Gemische bilden, die nur für einen gewissen Prozentsatz der Versuchstiere tödlich wirken.

Wenn also der Unterschied zwischen der Antitoxinmenge, die die Prüfungsdosis des Testgiftes eben neutralisiert, i. e. für alle Versuchstiere ungiftig macht, und der Antitoxinmenge, die eine für sämtliche Tiere tödliche Giftmenge zur Wirkung gelangen läßt, sehr groß ist, so muß zur Antitoxinmessung ein Verfahren herangezogen werden, das von dem im I. Abschnitt gekennzeichneten Prinzip abweicht und den besonderen Verhältnissen Rechnung trägt.

III.

Die geplante Einführung der Internationalen Einheit des Dysenterieantitoxins in Deutschland gab den Anlaß, die Bindungsverhältnisse zwischen Dysenterietoxin und -Antitoxin von neuem zu studieren. Die Prüfung der antitoxischen Shiga-Kruse-Sera wird auf Grund der Untersuchungen von Kolle, Heller u. de Mestral (1, 2) und Sachs u. Georgi (3) heute allgemein mit Hilfe der Mischungsmethode an weißen Mäusen durchgeführt. Dies ist vor allem durch den von Kolle, Schlossberger und Prigge (4) erbrachten Nachweis möglich geworden, daß das Toxin des Shiga-Kruse-Bazillus einheitlich ist, und daß die nach verschiedenen Verfahren hergestellten Giftpräparate prinzipiell gleichwertig sind und sich bei der Wertbemessung der antitoxischen Ruhrsera wechselweise vertreten können. Besonders gut eignen sich hierfür vorsichtig abgetötete und getrocknete Bazillenleiber [Sudmersen u. Eagleton (5), Sudmersen, Runge u. O'Brien (6)], weil sie im Verhältnis zur Trockensubstanz sehr hohe Toxinmengen enthalten. Ein aus getrockneten Bazillenleibern bestehendes, sehr hochwertiges Ruhrgift wurde auch zu den im folgenden beschriebenen Untersuchungen benützt.

Zu seiner Gewinnung wurden 48 Stunden alte Agarkulturen des Shiga-Kruse-Stammes „Behringwerke" mit destilliertem Wasser abgeschwemmt und 15 Minuten lang auf 58° C erwärmt. Die Aufschwemmungen wurden mit 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert; der nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit zurückbleibende Bodensatz wurde im Exsikkator vorgetrocknet. Dann wurde das Trockengut sorgfältig pulverisiert, mit Phosphorsäureanhydrid im Vakuum getrocknet und in evakuierten Glasröhrchen eingeschmolzen.

Von 100 Kolle-Schalen wurden nach diesem Verfahren ungefähr 7 g eines hochwirksamen Giftes gewonnen, das unter Verwendung einer sehr großen Anzahl von Versuchstieren genau ausgewertet wurde. Zu den Untersuchungen wurden weiße Mäuse verwandt, die mindestens 15 g und höchstens 16 g wogen. Es ergab sich, daß 0,01 mg des Trockengiftes die dosis certe letalis[1]), d. h. die kleinste Menge darstellt, welche bei 100 Proz. der Versuchstiere innerhalb von 5 bis spätestens 7 Tagen den Tod bewirkt; meistens sterben die Mäuse am zweiten oder dritten Tag nach der Injektion

1) Bei den bisher beschriebenen Giften lag die dosis certe letalis stets wesentlich höher (nicht unter 0,02 mg).

des Giftes. Die dosis certe tolerata des studierten Trockengiftes ist 0,0005 mg.

Nachdem durch vergleichende Untersuchungen (7) bereits vor längerer Zeit festgestellt worden war, daß 1 deutsche Antitoxineinheit 36 internationalen Antitoxineinheiten entspricht, war zunächst zu ermitteln, welche Menge von dem als Testgift zu benützenden Trockentoxin durch 1 internationale Antitoxineinheit neutralisiert wird.

Tabelle I.

Intravenös injiziertes Gemisch (Vol. 0,5 ccm)		Zahl der Tiere	Davon gestorben
Deutsches Dysenterie-Standardserum[1])	Trockengift		
1/36 ccm = 1 AE	0,7 mg	3	3
dgl.	0,65 „	3	3
„	0,6 „	3	3
„	0,55 „	3	3
„	0,5 „	3	3
„	0,45 „	6	6
„	0,4 „	9	9
„	0,35 „	9	8 +
„	0,3 „	6	5 +
„	0,25 „	6	4 +
„	0,2 „	6	3 +
„	0,15 „	9	2 +
„	0,135 „	30	5 +
„	0,125 „	27	0 ←
„	0,1 „	9	0
„	0,05 „	3	0

Aus Tabelle I geht hervor, daß eine Mischung, welche die einer internationalen Antitoxineinheit entsprechende Menge deutschen Standardserums und 0,125 mg Trockengift enthält, bei intravenöser Injektion von 15—16 g schweren weißen Mäusen regelmäßig vertragen wird. Die Menge von 0,125 mg, also das 12,5fache der Dosis certe letalis, stellt somit die „Prüfungsdosis" des derzeit im Gebrauch befindlichen Dysenterie-Testgiftes dar. Wie Tabelle I zeigt, läßt sich die „Prüfungsdosis" bei Verwendung zahlreicher Tiere sehr genau festlegen: Gemische, die eine um knapp 10 Proz. höhere Giftmenge — 0,135 mg — enthalten, entfalten bereits bei einem nicht ganz kleinen Anteil der Versuchstiere tödliche Wirkungen.

IV.

Wie im I. und II. Abschnitt auseinandergesetzt wurde, ist die genaue Kenntnis des Verlaufes der Toxin-Antitoxin-Absättigung eine wesentliche Voraussetzung für die möglichst exakte Wertbemessung der antitoxischen Sera. Um die Bindungsverhältnisse zwischen dem studierten Gift und Dysenterieantitoxin aufzuklären, wurde die Giftigkeit von Gemischen geprüft, die

1) Die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge Standardserum wurde durch Zusatz von 14,5 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgelöst.

die Prüfungsdosis des Trockengiftes und wechselnde Mengen von deutschem Dysenterie-Standardserum enthielten. Diese Methode, die ursprünglich von Ehrlich (8) zu Ermittlung der „Giftspektren" des Diphtherietoxins angewandt worden ist, ist zuerst von Trevan (9) zu Untersuchungen über die Neutralisation von Dysenterietoxin durch -Antitoxin herangezogen worden.

Tabelle II.

Intravenös injiziertes Gemisch (Vol. 0,5 ccm)		Zahl der Tiere	Davon gestorben	Prozent
Trockengift	Deutsches Dysenterie-Standardserum[1])			
0,125 mg	1/36 ccm = 1,0 AE	12	0	0
dgl.	0,9 ·1/36 ccm = 0,9 AE	17	0	0
„	0,8 ·1/36 „ = 0,8 „	18	1	5,6
„	0,75·1/36 „ = 0,75 „	9	0	0
„	0,7 ·1/36 „ = 0,7 „	8	2	25,0
„	0,65·1/36 „ = 0,65 „	9	1	11,1
„	0,6 ·1/36 „ = 0,6 „	9	3	33,3
„	0,55·1/36 „ = 0,55 „	9	5	55,6
„	0,5 ·1/36 „ = 0,5 „	15	9	60,0

Wie Tabelle II zeigt, ergab sich, daß mit fortschreitender Verringerung des Antitoxingehaltes der Gemische die Giftigkeit nur sehr langsam steigt. Durch Verminderung der zur Neutralisierung der Testgiftdosis erforderlichen Antitoxinmenge auf die Hälfte gelangt eine Giftmenge zur Wirkung, die nur bei etwa zwei Drittel der Versuchstiere tödlich wirkt. Diese Giftmenge ist also kleiner als die dosis certe letalis.

V.

Bei der Prüfung der antitoxischen Ruhrsera wird in Deutschland als Standard ein Dysenterieserum verwandt, das in genau abgemessenen Mengen getrocknet und in Vakuumröhrchen eingeschmolzen ist. Wird der Inhalt eines Vakuumröhrchens durch Zusatz von 14,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, so gewinnt man 14,54 ccm einer Serumverdünnung, die in 1 ccm 1 deutsche bzw. 36 internationale Antitoxineinheiten enthält. Bei der Einführung der internationalen Antitoxineinheit soll das deutsche Standardserum mit dem von Statens Seruminstitut in Kopenhagen abgegebenen internationalen Standardserum in Uebereinstimmung gebracht werden. Da das internationale Standardserum in 1 ccm 200 internationale AE enthält, muß also die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge des deutschen Standardserums so gelöst werden, daß eine Serumverdünnung resultiert, welche ebenfalls 200 internationale Antitoxineinheiten in 1 ccm enthält. Da nach der bis jetzt gültigen Lösungsvorschrift

1) Die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge Standardserum wurde durch Zusatz von 14,5 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgelöst.

14,54 ccm einer Serumverdünnung gewonnen werden, welche in 1 ccm 36 internationale Antitoxineinheiten enthält, ergibt sich die Gleichung

$$14{,}54 \cdot 36 = x \cdot 200$$

$$x = \frac{14{,}54 \cdot 36}{200} = 2{,}62 \text{ ccm.}$$

Wenn also der Inhalt eines Vakuumröhrchens ad volumen 2,62 ccm gelöst wird, gewinnt man eine Serumverdünnung, die in 1 ccm 200 internationale Antitoxineinheiten enthält. Die Menge physiologischer Kochsalzlösung, die zur Herstellung dieser Lösung erforderlich ist, beträgt 2,58 ccm. D. h.: wenn man die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge deutschen Standardserums durch Zusatz von 2,58 ccm auflöst, so gewinnt man 2,62 ccm einer Lösung, welche in 1 ccm 200 internationale Antitoxineinheiten enthält.

In 1/200 ccm einer nach dieser Vorschrift hergestellten Lösung des deutschen Standardserums ist somit das Aequivalent von 1/36 ccm einer nach der früheren Vorschrift hergestellten Lösung bzw. gerade 1 internationale AE enthalten. Zur Ergänzung der in Abschnitt IV mitgeteilten Untersuchungen wurde in großen Reihen unter Verwendung zahlreicher Tiere abermals die Giftigkeit von Gemischen studiert, die die Prüfungsdosis des Testgiftes und wechselnde Mengen von Dysenterie-Standardserum enthielten; das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III[1]).

Intravenös injiziertes Gemisch (Vol. 0,5 ccm)		Zahl der Tiere	Davon gestorben	Prozent
Trockengift	Deutsches Dysenterie-Standardserum[2])			
0,125 mg	1/200 ccm	23	0	0
dgl.	0,75·1/200 ccm	24	4	16,7
„	0,7 ·1/200 „	12	1	8,3
„	0,65·1/200 „	12	2	16,7
„	0,6 ·1/200 „	12	5	41,7
„	0,55·1/200 „	11	5	45,4
„	0,5 ·1/200 „	24	16	66,7
„	0,45·1/200 „	24	20	83,3
„	0,4 ·1/200 „	11	8	72,7
„	0,35·1/200 „	10	9	90,0
„	0,3 ·1/200 „	12	12	100,0
„	0,25·1/200 „	12	12	100,0

Vergleicht man die in Tabelle II wiedergegebenen prozentualen Sterblichkeitszahlen mit den entsprechenden (durch rechteckige Umrandung gekennzeichneten) Werten in Tabelle III, so findet man eine gute Uebereinstimmung: bei Verminderung der Antitoxinmenge auf 0,6 AE wurde eine Sterblichkeit von 33 Proz. festgestellt (Tabelle II), während das Gemisch, das 0,6·1/200 ccm des nach der neuen Lösungsvorschrift zubereiteten Standardserums ent-

1) In Tabelle III sind auch die mit deutschem Standardserum gespritzten Tiere aus Tabelle V (S. 25) aufgenommen.

2) Die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge Standardserum wurde durch Zusatz von 2,58 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgelöst.

hielt (Tabelle III), 41 Proz. der Versuchstiere tötete; bei 0,55 AE bzw. 0,55·1/200 ccm starben 55 Proz. bzw. 45 Proz., und bei 0,5 AE bzw. 0,5·1/200 ccm starben 60 Proz. und 66 Proz. der Mäuse. Die in 1/200 ccm des nach der neuen Vorschrift gelösten Dysenteriestandardserums enthaltene Antitoxinmenge entspricht somit der Antitoxinmenge (1 internat. AE), die in 1/36 ccm einer nach alter Vorschrift hergestellten Lösung enthalten ist.

Ueberblickt man die in den verschiedenen Versuchsreihen gewonnenen Ergebnisse, so erhält man das in Tabelle IV wiedergegebene Bild von dem Verlauf der Absättigung einer bestimmten Toxindosis durch wechselnde Mengen Antitoxin.

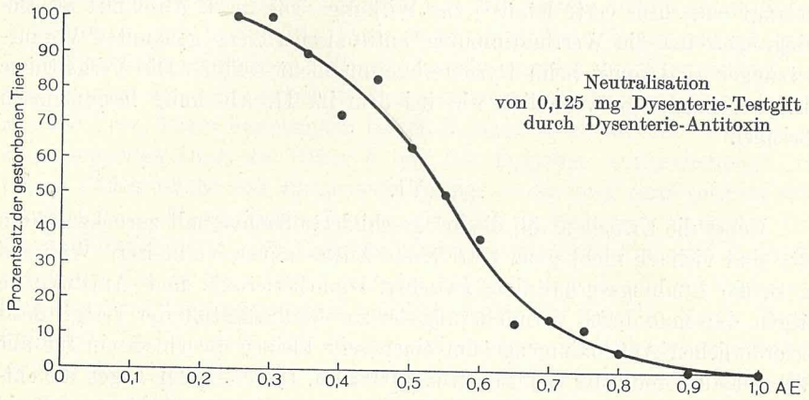


Fig. 1.

Tabelle IV.

Intravenös injiziertes Gemisch (Vol. 0,5 ccm)		Zahl der Tiere	Davon gestorben	Prozent
Dysenterie-Testgift „1929“	Dysenterie-Antitoxin			
0,125 mg	0,25 AE	12	12	100,0
dgl.	0,3 „	12	12	100,0
„	0,35 „	10	9	90,0
„	0,4 „	11	8	72,7
„	0,45 „	24	20	83,3
„	0,5 „	39	25	64,1
„	0,55 „	20	10	50,0
„	0,6 „	21	8	38,1
„	0,65 „	21	3	14,3
„	0,7 „	20	3	15,0
„	0,75 „	33	4	12,1
„	0,8 „	18	1	5,6
„	0,9 „	17	0	0
„	1,0 „	35	0	0

Fig. 1 gibt die auf Grund der in Tabelle IV enthaltenen Einzeldaten konstruierte Neutralisationskurve wieder. Die in den Gemischen enthaltenen Antitoxinmengen sind als Abszissen, die Prozentsätze der durch die Gemische jeweils getöteten Mäuse als Ordinaten eingetragen. Die in Fig. 1 wieder-

gegebene Kurve stimmt gut mit den von Trevan (9) unter etwas abweichenden Bedingungen gefundenen Kurven überein. Trevan hat die Prozentsätze der Ueberlebenden als Ordinaten eingezeichnet; es sind also die Spiegelbilder seiner Kurven mit der hier wiedergegebenen Kurve in Vergleich zu setzen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß durch die Herabsetzung der zur Neutralisierung der Testgiftdosis erforderlichen Antitoxinmenge um geringe Beträge, z. B. um ein Zehntel, nur eine geringe Menge Gift wirksam wird, die lediglich bei einem geringen Prozentsatz der Versuchstiere zum Tod führt. Erst durch Verminderung der Antitoxinmenge auf $^3/_{10}$ des vollen Betrages gelangt eine dosis certe letalis[1]) zur Wirkung. Die im I. Abschnitt als Bedingungen für die Wertbestimmung antitoxischer Sera genannten Voraussetzungen sind somit beim Dysenterieserum nicht erfüllt. Die Verhältnisse liegen vielmehr ganz ähnlich wie bei dem im II. Abschnitt besprochenen Beispiel.

VI.

Ueber die Ursachen, auf die der geschilderte Sachverhalt zurückzuführen ist, sind vielfach nicht ganz zutreffende Auffassungen verbreitet. Während z. B. die Bindungsverhältnisse zwischen Diphtherietoxin und -Antitoxin so liegen, daß man durch Verminderung der zur Neutralisation der Testgiftdosis erforderlichen Antitoxinmenge um einen sehr kleinen Bruchteil ein für alle Versuchstiere tödliches Gemisch erhält [Otto u. Hetsch (11)], liegen die entsprechenden Grenzwerte beim Dysenterieserum so weit auseinander, daß ein bei allen Tieren den Tod bewirkendes Gemisch erst nach Herabsetzung des Antitoxingehaltes um 70 Proz. resultiert.

Die relative Spanne zwischen den beiden Grenzwerten hängt nach Trevan (9) und Blake u. Okell (10) von drei Faktoren ab: 1) von der Menge des in der Testgiftdosis enthaltenen Toxoids, 2) von der Zahl der in der Testgiftdosis enthaltenen doses certe letales, 3) von den Unterschieden in der individuellen Giftempfindlichkeit der Versuchstiere.

Schlossberger u. Hartoch (16) haben festgestellt, „daß auch beim Dysenterietoxin die antitoxinneutralisierenden Eigenschaften der Giftlösungen mit deren Toxizität keineswegs parallel verlaufen". Bei Untersuchungen mit vier verschiedenen Giften fanden sie, „daß zur Neutralisation von je

1) Trevan (9) sowie Blake u. Okell (10) haben vorgeschlagen, die Bezeichnungen „d. l. 50", „d. l. 75", „ d. l. 100" usw. für solche Giftmengen einzuführen, die 50 bzw. 75 bzw. 100 Proz. der Versuchstiere töten; die Ausdrücke „d. l. 100" und „dosis certe letalis" bezeichnen somit gleiche Werte. — Ist die Menge freien Giftes, die nach Injektion eines Toxin-Antitoxin-Gemisches (z. B. 0,125 mg Testgift + 0,1 AE) im Tierkörper zur Wirkung gelangt, größer als eine Dosis certe letalis, so kommt dies bei der hier gewählten Darstellungsweise (Fig. 1) selbstverständlich nicht zum Ausdruck; der Verlauf der Toxin-Antitoxin-Bindung wird durch Sterblichkeitskurven nur mittelbar und nur in einem beschränkten Bereich erfaßt (vgl. auch Fußnote S. 20).

5 tödlichen Dosen recht wechselnde, bis um das Dreifache differierende Antitoxinmengen erforderlich" waren. „Diese Befunde sprechen zweifellos dafür, daß auch im Dysenterietoxin ungiftige, aber antitoxinbindende Stoffe, also sogenannte Toxoidmodifikationen in wechselnder Menge vorhanden sind."

Auf Grund der bekannten Vorstellungen vom Wesen der Toxoide ist zu der Erklärung von Trevan (9) zu bemerken, daß zwar die Zahl der in der Testgiftdosis enthaltenen doses certe letales durch die Menge des in der Testgiftdosis enthaltenen Toxoids bedingt wird, daß aber die relative Spanne der erwähnten Grenzwerte selbst nur von der Zahl der in der Testgiftdosis enthaltenen doses certe letales abhängig ist. Die relative Spanne, die z. B. bei Verwendung einer bestimmten Dosis eines aus 50 Proz. Toxin und 50 Proz. Toxoid zusammengesetzten Giftes A besteht, nimmt bei Verwendung der äquivalenten (i. e. ebensoviel Bindungseinheiten enthaltenden) Menge eines aus 100 Proz. Toxin bestehenden Giftes B genau so ab wie bei Verwendung einer doppelten Dosis des Giftes A und der doppelten Antitoxinmenge. In beiden Fällen erhöht sich übrigens die geringe — der dosis certe tolerata entsprechende — Menge freien Toxins, die auch in biologisch neutralen Gemischen enthalten ist, aufs Doppelte, und zwar im ersten Fall, weil an Stelle von freiem Toxoid freies Toxin erscheint, im zweiten Fall, weil bei Verdoppelung der Reaktionskomponenten ziemlich genau die doppelte Menge Toxin freibleibt. Zur Neutralisation des neu auftretenden Toxinüberschusses ist im zweiten Fall doppelt soviel Antitoxin erforderlich wie im ersten Fall; das Verhältnis $\frac{\text{Antitoxin}}{\text{Toxin}}$ bzw. $\frac{\text{Antitoxin}}{\text{Toxin} + \text{Toxoid}}$ wird aber in beiden Fällen das gleiche.

Die Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit der Versuchstiere sind selbstverständlich die Voraussetzung für die oben erwähnte Spanne der Grenzwerte; bei absolut gleichartiger Giftempfindlichkeit aller Tiere müßten die beiden Grenzwerte zusammenfallen. Es ist aber nicht richtig, die Größe des tatsächlich bestehenden Abstandes ausschließlich mit der Zahl der in der Testgiftdosis enthaltenen doses certe letales und der Größe des Unterschiedes zwischen der dosis certe tolerata und der dosis certe letalis des Dysenteriegiftes in Zusammenhang zu bringen. Auch beim Diphtherietoxin ist die Giftdosis, die alle Meerschweinchen einer Gewichtsklasse tötet, etwa fünfmal so groß, wie die Dosis, die von allen Tieren vertragen wird. Trotzdem bewirkt, wie oben (S. 10) erwähnt, eine ganz geringfügige Herabsetzung der Antitoxinmenge bereits, daß man anstelle eines für alle Versuchstiere verträglichen ein für alle Versuchstiere tödliches Gemisch erhält. Dies trifft auch dann zu, wenn die Testgiftdosis nur wenige doses certe letales enthält. Die gegenseitige Absättigung von Diphtherietoxin und -Antitoxin verläuft also so, daß bei Verminderung des in den Gemischen enthaltenen Antitoxins um einen verhältnismäßig kleinen Betrag bereits ein relativ großer Anteil des Toxins in Freiheit

bleibt[1]). Die Unterschiede in der Giftempfindlichkeit von weißen Mäusen gegenüber Dysenteriegift sind zwar noch wesentlich höher als die von Meerschweinchen gegenüber Diphtherietoxin; das Verhältnis dosis certe tolerata: dosis certe letalis wird übereinstimmend mit 1:20 angegeben [Trevan (12) u. a., vgl. auch S. 5 f.]; trotzdem könnte die Spanne zwischen der Antitoxinmenge, die eine gegebene Menge Dysenteriegift neutralisiert, und der Menge, die eine dosis certe letalis freiläßt, sehr klein sein. Wie oben gezeigt wurde, bleibt aber von der Prüfungsdosis des studierten Giftes, die 12,5 doses certe letales enthält und durch eine Antitoxineinheit neutralisiert wird, erst nach Verringerung der Antitoxinmenge um 70 Proz. eine dosis certe letalis frei. Während also zur Absättigung von 11,5 doses certe letales 0,3 AE notwendig sind, erfordert die Neutralisierung der letzten d. c. l., also einer sehr viel kleineren Giftmenge, 0,7 AE, i. e. mehr als das Doppelte! Nicht die hohen Differenzen in der Giftempfindlichkeit der Versuchstiere sind die wesentliche Ursache des weiten Abstandes der Antitoxin-Grenzwerte, sondern der besondere Verlauf der Absättigung des Toxins durch das Antitoxin, demzufolge der Uebergang von der dosis certe tolerata zur dosis certe letalis bei fortschreitender Antitoxinverminderung mit beträchtlicher Verzögerung zustande kommt. —

S. Schmidt (13) hat die Auffassung geäußert, daß aus einer gegebenen Toxin-Antitoxinmischung im Tierkörper ganz verschiedene Giftmengen freiwerden können; wenn solche Unterschiede auch vorstellbar sind, so fehlen doch die experimentellen Grundlagen, die eine solche Annahme beweisen. Die Unterschiede in der Wirkung, die ein und dasselbe Gemisch bei verschiedenen Tieren hervorruft, sind einstweilen durchaus vereinbar mit der Vorstellung, daß aus einem Gemisch in verschiedenen Tierkörpern ceteris paribus stets etwa die gleiche Giftmenge frei wird; die Gleichartigkeit des Milieus im subkutanen Gewebe oder im Blut spricht durchaus hierfür. Selbstverständlich reagieren aber die verschiedenen Tiere auf die in Frage kommende identische Giftmenge je nach ihrer individuellen Empfindlichkeit ganz verschieden. Für diese Erklärung spricht auch das Verhalten von Meerschweinchen gegenüber unterneutralisierten Diphtherie-Toxin-Antitoxin-Gemischen. Kolle und Prigge fanden, daß die von 100 Proz. der Versuchstiere vertragene Menge eines solchen Gemisches etwa = $^1/_5$ der Dosis ist, welche 100 Proz. der Tiere tötet. Der Abstand entspricht also dem vom reinen Gift her bekannten Intervall; d. h. die Menge des im Tierkörper zur Wirkung gelangenden Giftes ist unter sonst gleichen Bedingungen dem injizierten Quantum des Gemisches proportional. Wenn neben der individuellen Giftempfindlichkeit noch Unterschiede in der Fähigkeit, den Toxin-Antitoxinkomplex zu zer-

1) Von dem Diphtheriegift „1925" (dosis certe letalis = 0,015 ccm) wurden im März 1930 0,33 ccm (= 22 d. c. l.) durch 1,13 AE neutralisiert; Gemische von 0,33 ccm + 1,0 AE wirkten bei allen Versuchstieren tödlich. Durch Herabsetzung der Antitoxinmenge um < 12 Proz. wurde also 1 dosis certe letalis frei.

legen, eine wesentliche Rolle spielten, müßten bei einem gewissen Prozentsatz von Versuchstieren noch aus einem unter dem beobachteten Grenzwert liegenden Quantum einer Toxin-Antitoxin-Mischung tödlich wirkende Giftmengen freiwerden. —

VII.

Da die bei der Titration des antitoxischen Dysenterieserums mit Hilfe des einfachen Reihenversuches zu ermittelnden Werte mit Fehlern verknüpft sind, die innerhalb sehr weiter Grenzen schwanken (vgl. Abschnitt II und V), muß jedes Gemisch an einer größeren Anzahl von Versuchstieren geprüft werden. Stellt man Aufschwemmungen her, die die Prüfungsdosis des Testgiftes und fallende Mengen eines Serums von unbekanntem Antitoxintiter enthalten, so findet man Gemische, die den einen Teil der Versuchstiere töten, während sie die übrigen am Leben lassen. Verfügt man über eine genaue Neutralisationskurve, wie sie in Fig. 1 wiedergegeben ist, so lassen sich aus ihr ohne weiteres die in den betreffenden Gemischen enthaltenen Antitoxinmengen entnehmen; man hat lediglich den Punkt der Kurve festzustellen, dessen Ordinate dem Prozentsatz der durch ein Gemisch getöteten Tiere entspricht: die zugehörige Abszisse entspricht dem Antitoxingehalt der Mischung, aus dem sich der Antitoxintiter des geprüften Serums ohne weiteres ergibt.

In der Praxis wird es nicht möglich sein, derartige Kurven für die jeweils verwandten Gifte zu beschaffen. Man begnügt sich dann damit, einen Punkt der Neutralisationskurve möglichst genau festzulegen, d. h. etwa die prozentuale Sterblichkeit von 15—16 g schweren weißen Mäusen zu bestimmen, denen ein die Testgiftdosis und 0,5 AE enthaltendes Gemisch injiziert wird. Legt man dem zur Titration eines Serums durchzuführenden Mischversuch eine geometrische Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{2}$ zugrunde, so findet man ein oder zwei Gemische, die nur einen gewissen Teil der Versuchstiere töten.

1. Beispiel.

Es möge sich um ein Serum handeln, das in 1 ccm 960 AE enthält. Dann ergibt sich:

Injektion					Prozentsatz der getöteten Tiere
Gift	Serum				
Prüfungsdosis	1/100	ccm	(= 9,6	AE)	0 Proz.
„	1/200	„	(= 4,8	„)	0 „
„	1/400	„	(= 2,4	„)	0 „
„	1/800	„	(= 1,2	„)	0 „
„	1/1600	„	(= 0,6	„)	33 „ ←
„	1/3200	„	(= 0,3	„)	100 „
„	1/6400	„	(= 0,15	„)	100 „
„	1/12 800	„	(= 0,075	„)	100 „

Hat man nun vorher festgestellt, daß Mischungen der Testgiftdosis mit 0,5 AE bei 66 Proz. der Versuchstiere tödlich wirken, so zeigt der Reihenversuch, daß 1/1600 ccm des geprüften Serums > 0,5 AE enthält. Schließt man nunmehr eine zweite Versuchsreihe mit dem Quotienten 9/10 an, etwa 1/1600 (= 0,6 AE) —1/1800 (= 0,53 AE) —1/2000 (= 0,48 AE) usw., und findet für das 1/1800 ccm Serum enthaltende Gemisch eine Sterblichkeit von 58 Proz. und für 1/2000 ccm Serum eine Sterblichkeit von 75 Proz., so wird man 1/1800 als Titerdosis ansehen, d. h. als das Aequivalent von 0,5 AE. 1/900 ccm ist also das Aequivalent von 1,0 AE, und als Antitoxingehalt des geprüften Serums ergeben sich 900 AE/ccm.

2. Beispiel.

Auswertung eines 640 AE in 1 ccm enthaltenden antitoxischen Ruhrserums:

Injektion		Prozentsatz der getöteten Tiere
Gift	Serum	
Prüfungsdosis	1/100 ccm (= 6,4 AE)	0 Proz.
„	1/200 „ (= 3,2 „)	0 „
„	1/400 „ (= 1,6 „)	0 „
„	1/800 „ (= 0,8 „)	8,3 „ ←
„	1/1600 „ (= 0,4 „)	83,3 „ ←
„	1/3200 „ (= 0,2 „)	100 „
„	1/6400 „ (= 0,1 „)	100 „
„	1/12 800 „ (= 0,05 „)	100 „

Der einer halben Antitoxineinheit entsprechende Wert ergibt sich, wie folgt:

Injektion		Prozentsatz der getöteten Tiere
Gift	Serum	
Prüfungsdosis	1/1000 ccm (= 0,64 AE)	16,7 Proz.
„	1/1200 „ (= 0,53 „)	58,0 „ ←
„	1/1400 „ (= 0,46 „)	75,0 „

Gefundener Wert des geprüften Serums: 600 AE.

Das geschilderte Verfahren basiert auf der Verwendung einer Giftdosis, die in einer direkten Relation zur Antitoxineinheit steht, nämlich derjenigen Menge, welche durch 1 AE eben biologisch neutralisiert wird; und als „Ziel" der Titration fungiert die Sterblichkeitsrate, die einem Gemisch dieser Giftdosis mit 0,5 AE zugeordnet ist. Selbstverständlich ist es nicht notwendig, gerade mit einer derartig festgelegten Giftmenge zu arbeiten; auch jede beliebige andere Giftmenge kann zur Ausführung der Titrationen dienen, sofern sie in Mischung mit 0,5 AE mehr als 0 Proz. und weniger als 100 Proz. der Versuchstiere tötet, d. h. sofern dem Gemisch ein eindeutig festgelegter Punkt einer Neutralisationskurve zugeordnet ist: stets sind 0,5 AE in dem Gemisch mit übereinstimmender Sterblichkeitsrate enthalten. Allerdings empfiehlt es sich, als „Zielpunkt" möglichst solche Punkte zu wählen, die im steilen Teil einer Sättigungskurve liegen, weil hier Veränderungen der Antitoxinmenge

wesentlich größere Veränderungen der Sterblichkeitsquote entsprechen als im Anfangs- oder Endteil der Kurve und weil infolge dieser Vergrößerung der „Ausschläge" die Genauigkeit der Ergebnisse zunimmt.

Wenn die Testgiftdosis ohne direkte Beziehung auf die Antitoxineinheit so gewählt wird, daß sie in Mischung mit 0,5 AE n Proz. der Versuchstiere tötet, darf man nicht außer acht lassen, daß die doppelte Antitoxinmenge — 1,0 AE — zu ihrer Neutralisation keineswegs erforderlich oder ausreichend zu sein braucht. Denn man kennt in diesem Fall nur einen einzigen Punkt einer Neutralisationskurve, während der Gesamtverlauf und der Endpunkt völlig unbekannt sind. Wählt man z. B. von dem studierten Gift statt 0,125 mg eine kleinere Menge, die in Mischung mit 0,5 AE nur 33 Proz. der Versuchstiere tötet, so besagt dies, daß der Endpunkt der Neutralisationskurve[1]) sich nach links verschiebt, d. h. daß weniger als 1,0 AE zur Neutralisierung der Testgiftdosis erforderlich ist; bei Verwendung einer in Mischung mit 0,5 AE für 83 Proz. der Versuchstiere tödlichen Dosis verschiebt sich der Endpunkt der Neutralisationskurve dagegen nach rechts, d. h. 1 AE reicht nicht aus, um alle Mäuse am Leben zu halten, sondern es bedarf hierzu einer höheren Antitoxinmenge.

Bei der Festlegung des „Zielpunktes" ist man auch in der Wahl der Antitoxindosis an keine bestimmte Menge gebunden. Statt auf 0,5 AE kann das ganze Verfahren auch auf 1,0 AE oder einen anderen Wert abgestellt werden, möglichst einen solchen, mit dem sich leicht rechnen läßt. Z. B. geht die dänische Vorschrift für die Wertbemessung der antitoxischen Dysenteriesera von einer Testgiftdosis aus, die in Mischung mit 1 internat. AE 33⅓ Proz. der Versuchstiere tötet; das Prinzip der Titration ändert sich hierbei in keiner Weise: stets enthält diejenige Menge eines zu prüfenden Serums, die in Mischung mit der Testgiftdosis ebenfalls 33⅓ Proz. der Versuchstiere sterben läßt, gerade 1,0 AE.

Bei der Titration der Sera besteht somit eine ziemlich weitgehende Freiheit in der Wahl des „Zielpunktes". Die Methode bleibt in allem Wesentlichen unverändert, gleichgültig, ob man den als „Ziel" dienenden Punkt ohne Rücksicht auf eine bestimmte Neutralisationskurve festlegt oder ob man das elegantere Verfahren wählt, zunächst die durch 1,0 AE biologisch neutralisierte Giftdosis zu bestimmen, und alsdann zu ermitteln, welcher Prozentsatz der Versuchstiere durch Gemische dieser Testgiftdosis mit einem Bruchteil der Antitoxineinheit getötet wird.

Selbstverständlich muß zur Kontrolle der Ergebnisse stets ein Vergleich mit dem Standardserum durchgeführt werden. Bei jeder Titration muß also auch die Giftigkeit eines Gemisches der Testgiftdosis mit derjenigen Menge des Standardserums geprüft werden, welche die als Vergleichswert („Zielwert") dienende Antitoxindosis enthält. Auf die Bedeutung dieses Vergleiches wird im IX. und X. Abschnitt näher eingegangen.

1) Vgl. Fig. 1; als Ende der Neutralisationskurve ist der Punkt bezeichnet, der einem biologisch neutralen Gemisch entspricht.

VIII.

Die staatliche Prüfung der antitoxischen Sera hat die Aufgabe, die Wertangaben der Fabriken einer möglichst genauen Kontrolle zu unterziehen. Wird z. B. ein Diphtherieserum als 500fach bezeichnet, so ist nur zu prüfen, ob 1/500 ccm des Serums einen Mindestgehalt von 1 AE besitzt. Das Serum wird zugelassen, wenn dies der Fall ist, zurückgewiesen, wenn dieser Wert nicht erreicht wird. Dagegen ist es nicht Aufgabe der staatlichen Kontrolle, einen etwa vorhandenen Mehrgehalt an Antitoxin auszuwerten. Ebenso ist die Ermittlung des Antitoxingehaltes der Dysenteriesera nicht Sache des Prüfungsinstitutes, sondern der Fabriken. Das Prüfungsinstitut hat hinwiederum genauestens nachzuprüfen, ob die Sera mindestens den von den Fabriken angegebenen Antitoxingehalt aufweisen. Zur Darlegung der Methode sei im folgendon der allgemeine Gang eines Prüfungsverfahrens beschrieben.

Ebenso wie die Titration ist die Prüfung der antitoxischen Ruhrsera auf einem Vergleich mit der Wirksamkeit des Standardserums aufgebaut. Zur Ausführung der Prüfung wird das Dysenterie-Standardserum durch Zusatz von 2,58 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Aus dieser Lösung wird eine Ausgangsverdünnung hergestellt, die in 0,25 ccm 1 internationale AE, d. h. in 1 ccm 4 AE enthält.

Da 1 ccm des jetzt eingeführten Standardserums 200 internationale AE enthält, ist es 50fach zu verdünnen.

Aus dem zu prüfenden Dysenterieserum wird gleichfalls eine Ausgangsverdünnung hergestellt, die entsprechend der Wertangabe der Fabrik in 0,25 ccm 1 internationale AE enthalten müßte.

Da z. B. von einem als 500fach bezeichneten Serum 1/500 ccm 1 internationale AE enthalten muß, ist das Serum 125fach zu verdünnen.

Bei der Wertbestimmung werden fallende Mengen der aus dem Standardserum hergestellten Ausgangsverdünnung sowie der aus dem zu prüfenden Dysenterieserum hergestellten Ausgangsverdünnung, z. B. 0,25 — 0,1875 — 0,125 ccm, stets in gleichem Flüssigkeitsvolumen (0,25 ccm) enthalten, mit der Prüfungsdosis des Testgiftes vermischt. Die einzelnen Gemische werden nach einstündigem Stehen bei 37° C weißen Mäusen von 15—16 g in eine Schwanzvene eingespritzt. Es erhalten demnach

Mäuse		Serum	Toxin
		Standardserum	
A. Kontrollen	1. Serie	0,25 ccm Ausgangsverdünnung **(1,0 AE)**	0,25 ccm Testgiftaufschwemmung (Prüfungsdosis)
	2. „	0,1875 ccm = 0,25 ccm ¾-Verdünnung **(0,75 AE)**	dgl.
	3. „	0,125 ccm = 0,25 ccm ½-Verdünnung **(0,5 AE)**	„

Mäuse		Serum	Toxin
		Dysenterieserum x	
B. Prüfungstiere	4. Serie	0,25 ccm Ausgangsverdünnung	0,25 ccm Testgiftaufschwemmung (Prüfungsdosis)
	5. „	0,1875 ccm = 0,25 ccm ¾-Verdünnung	dgl.
	6. „	0,125 ccm = 0,25 ccm ½-Verdünnung	„

Als Prüfungsdosis wird diejenige Giftmenge verwendet, welche im Mischversuch durch die einer Antitoxineinheit entsprechende Menge des Standardserums eben neutralisiert wird. Diese Menge beträgt bei dem zurzeit im Prüfungsinstitut gebrauchten Testgift 0,125 mg (vgl. III. Abschnitt; Tabelle I).

Die Beobachtungsdauer für die Tiere beträgt sieben Tage. Sera, die in den bezeichneten Dosen ebensoviel Mäuse sterben lassen wie das Standardserum, besitzen den angegebenen Wert. Sera, die mehr Tiere sterben lassen, besitzen einen geringeren als den angegebenen Wert. Sera, die noch in Mengen von 0,1875 und 0,125 ccm der Ausgangsverdünnung bei mehr Mäusen lebensrettend wirken als das Standardserum, besitzen einen höheren als den angegebenen Wert.

Da bei Verwendung der aus Bakterienleibern bestehenden Trockengifte in sehr vereinzelten Fällen Mäuse an unspezifischen Schädigungen (Schock usw.), die mit der spezifischen Wirkung des Dysenterietoxins nichts zu tun haben und durch Antitoxin nicht zu verhüten sind, bereits wenige Stunden nach der Injektion der Gemische sterben, dürfen nach dem Vorschlag der Standardisierungskommission der Hygieneorganisation des Völkerbundes (14) Mäuse, die vor Ablauf von 18 Stunden zugrunde gehen, bei der Wertbemessung und Prüfung des antitoxischen Dysenterieserums nicht in die Berechnungen einbezogen werden; der einem Gemisch zugeordnete Prozentsatz der Sterblichkeit wird also jeweils von denjenigen Tieren ermittelt, die sich 18 Stunden nach der Injektion noch im Versuch befunden haben.

Auch in der vorliegenden Arbeit sind alle Werte unter Berücksichtigung dieser Vorschrift festgestellt worden; allerdings waren Frühtode der erwähnten Art nur sehr selten zu beobachten. Vielleicht lag dies daran, daß das zu den Untersuchungen verwandte Trockengift besonders hochwertig war, so daß 0,125 mg als Prüfungsdosis genügten; da von den meisten Giften erst höhere Dosen — 0,3 bis 0,5 mg — hierfür ausreichen, werden den Mäusen im allgemeinen größere Mengen der unspezifisch wirkenden bakteriellen Substanzen einverleibt. —

Das geschilderte Verfahren beschränkt sich nicht darauf, die Wirksamkeit einer bestimmten Serumdosis zu prüfen, d. h. mit der Wirksamkeit der entsprechenden Antitoxinmenge zu vergleichen. Es wird vielmehr die Wirksamkeit von drei verschiedenen Serumdosen gegenüber der Testgift-

dosis ermittelt, die drei genau festgelegten Punkten der Neutralisationskurve — 1,0, 0,75, 0,5 AE (vgl. Fig. 1) — entsprechen. Hierdurch wird die Genauigkeit der Prüfung erheblich gesteigert, weil die mit der statistischen Methode bzw. mit der Zahl der Versuchstiere zusammenhängenden Fehler reduziert werden; die verschiedenen Versuchsreihen „kontrollieren" sich gegenseitig. Die Punkte der Neutralisationskurve, auf die ein Prüfungsverfahren eingestellt wird, können selbstverständlich ebenso willkürlich festgelegt werden wie bei der einfachen Titration (s. Abschnitt VI). Immerhin wird man im allgemeinen solche Punkte berücksichtigen, die der vollen Antitoxineinheit und solchen Bruchteilen entsprechen, welche in einem einfachen Zahlenverhältnis zu ihr stehen. Bei dem oben dargelegten Verfahren retten also Sera, deren Wert genau den Angaben der Fabrik entspricht, in Dosen von 0,25 ccm der Ausgangsverdünnung sämtliche Tiere, während Gemische mit 0,1875 ccm bzw. 0,125 ccm Ausgangsverdünnung etwa 10 Proz. bzw. 60 Proz. der Versuchstiere töten. Sind die Sera unterwertig, so kommt das in allen 3 Prüfungsserien in einer Erhöhung der Sterblichkeitsrate zum Ausdruck; sind sie überwertig, so zeigt sich dies in der 5. und 6. Serie (0,1875—0,125 ccm) durch Herabsetzung des Prozentsatzes der Sterblichkeit. Alle drei Serien fungieren somit als Indikatoren einer etwaigen Minderwertigkeit, dagegen nur die 5. und 6. Serie als Indikatoren einer Ueberwertigkeit.

Die Antitoxinwerte bilden annähernd eine geometrische Reihe mit dem Quotienten $\frac{1}{\sqrt{2}}$ (1,0—0,75—0,5 statt 1,0—0,707—0,5). Ist also der Antitoxingehalt eines Serums etwa 30 Proz. geringer als angegeben, so findet man in jeder Versuchsserie ungefähr die Sterblichkeit, die erst der nächstfolgenden Serie zukäme; ist umgekehrt der Antitoxingehalt etwa 40 Proz. höher als angegeben, so findet man in jeder Serie nur ungefähr die Sterblichkeit, die der vorangehenden Reihe zukäme.

Auch die Prüfungsdosis des Testgiftes kann ebenso willkürlich festgesetzt werden wie für die Auswertung der Sera (s. S. 14 und 15). Man ist an sich durchaus nicht daran gebunden, gerade eine Giftmenge zu wählen, die durch 1,0 AE neutralisiert wird; freilich wird ein Verfahren, das auf einer derartig festgelegten Dosis aufgebaut ist, eleganter erscheinen als eine Methode, welche auf diese Bindung verzichtet. Bevor ein Testgift in Gebrauch genommen wird, muß festgestellt werden, wie die mit Hilfe einer bestimmten Antitoxinmenge fixierte Prüfungsdosis durch die übrigen der Prüfungsordnung zugrunde gelegten Antitoxinmengen abgesättigt wird; d. h. es muß ermittelt werden, wieviel Mäuse nach Injektion von Gemischen sterben, welche die Prüfungsdosis und die betreffenden Antitoxinmengen enthalten.

Für die oben dargelegte Prüfungsmethode muß also nach Ermittlung der durch 1,0 AE eben neutralisierten Giftmenge, d. h. der Prüfungsdosis, bestimmt werden, wieviel Mäuse durch Gemische der Prüfungsdosis mit 0,75 bzw. 0,5 AE getötet werden.

Die Wahl der Prüfungsdosis ist, wie wir sahen, prinzipiell der Willkür überlassen. Man kann also z. B. diejenige Menge eines Giftes M zur Prüfungsdosis bestimmen, die in Mischung mit 1,0 AE 33⅓ Proz. der Versuchstiere tötet. Eine weitergehende Definition ist jedoch nicht möglich. Sollen also bei der Prüfung etwa Gemische untersucht werden, die $^2/_3$ AE enthalten, so muß empirisch festgestellt werden, welche Sterblichkeitsrate derartigen Gemischen zukommt. Findet man nun, daß einem Gemisch der Prüfungsdosis mit $^2/_3$ AE eine Sterblichkeit von 66 $^2/_3$ Proz. zugeordnet ist, so gilt dieser Befund einzig und allein für dasjenige Gift, mit dem er erhoben worden ist. Verwendet man nun ein Gift N, etwa ein solches, dessen relativer Toxoidgehalt[1]) höher ist als derjenige des Giftes M, so verläuft seine Neutralisationskurve flacher als die des Giftes M. Hat man also diejenige Dosis des Giftes N ermittelt, die in Mischung mit 1,0 AE 33⅓ Proz. der Versuchstiere tötet, so töten Gemische dieser Dosis mit $^2/_3$ AE keineswegs $66^2/_3$ Proz. der Mäuse, sondern weniger. Es ist also nicht angängig, die Prüfungsdosis als diejenige Menge zu definieren, die in Mischung mit 1 AE 33⅓ Proz. der Versuchstiere und in Mischung mit $^2/_3$ AE $66^2/_3$ Proz. tötet. Eine Freiheit von der Art, daß man die Testgiftdosis in feste Relation nicht nur zu einer einzigen, sondern zu zwei (oder mehr) Antitoxindosen setzen könnte, besteht nicht. Man muß sich klar machen, daß die bei einem bestimmten Gift festgestellten Verhältnisse nur dann bei einem anderen Gift angetroffen werden, wenn es genau die gleiche Zusammensetzung, d. h. den gleichen relativen Toxoidgehalt und somit die gleiche Absättigungskurve besitzt wie das erstere. Wenn das nicht der Fall ist, können die zwei gegebenen Antitoxinmengen (Abszissen) korrespondierenden Sterblichkeitszahlen (Ordinaten) entweder weiter auseinander oder näher beieinander liegen. Und zwar werden sie weiter auseinander liegen, wenn der Toxoidgehalt niedriger, dagegen näher beieinander, wenn er höher als bei dem „Vergleichsgift" ist.

Die dänische Prüfungsvorschrift definiert als Prüfungsdosis diejenige Giftmenge, die in Mischung mit 1 AE höchstens $33^1/_3$ Proz. und in Mischung mit $^2/_3$ AE mindestens $66^2/_3$ Proz. der Versuchstiere tötet. Hierfür gilt das eben Gesagte mit folgender Einschränkung: Es werden sich zwar von allen Giften, die den gleichen oder einen geringeren Toxoidgehalt wie das „Vergleichsgift" besitzen, Dosen ermitteln lassen, die dieser Vorschrift genügen, also Dosen, die durch Antitoxinmengen von 1,0 und 0,67 AE so weit neutralisiert werden, daß der Quotient der zugeordneten Sterblichkeitswerte (Ordinaten) 1:2 ($33^1/_3$:$66^2/_3$) oder kleiner wird. Und zwar lassen sich für jedes Gift dieser Art zwei Grenzdosen feststellen: eine kleinere, die in Mischung mit $^2/_3$ AE gerade noch $66^2/_3$ Proz. der Tiere sterben läßt (und in Mischung mit 1 AE weniger als $33^1/_3$ Proz. tötet), und eine größere, die in Mischung mit 1 AE nicht mehr als $33^1/_3$ Proz. tötet (und in Mischung mit $^2/_3$ AE mehr als $66^2/_3$ Proz. sterben läßt). Die Dosen, die zwischen diesen Grenzen liegen, genügen der Definition. Dagegen gibt es von Giften, die einen höheren Toxoidgehalt als das „Vergleichsgift" besitzen, keine Dosis, die die gestellten Bedingungen erfüllt: eine Dosis, die in Mischung mit 1 AE $33^1/_3$ Proz. der Ver-

1) vgl. S. 11.

suchstiere tötet, reicht hier nicht aus, um in Mischung mit $^2/_3$ AE $66^2/_3$ Proz. sterben zu lassen, und eine (höhere) Dosis, die in Mischung mit $^2/_3$ AE $66^2/_3$ Proz. der Mäuse tötet, läßt in Mischung mit 1 AE mehr als $33^1/_3$ Proz. der Tiere sterben!

Aus dem Gesagten geht hervor, daß die Prüfungsdosis des Dysenterie-Testgiftes nicht zu mehreren Antitoxinmengen in gebundene Relation gebracht werden kann, wie die dänische Prüfungsvorschrift verlangt, sondern nur zu einer einzigen. Es muß also gefordert werden, daß die übrigen Neutralisationspunkte für jedes Testgift, das bei der Prüfung des Antitoxingehaltes der Dysenteriesera verwendet wird, empirisch ermittelt werden.

IX.

Bei der Titration und Prüfung des antitoxischen Dysenterieserums mit Hilfe von weißen Mäusen spielen periodische Schwankungen in der Giftresistenz der Versuchstiere eine viel größere Rolle, als früher angenommen wurde. O'Brien (15), Blake (ined.) und Trevan (9) konnten zeigen, daß die Toxizität von Gemischen mit konstantem Toxin- und Antitoxingehalt im Januar und Februar am höchsten ist, von März ab allmählich abnimmt, im Juli ihr Minimum erreicht, hierauf allmählich wieder zunimmt und im Dezember wieder in die Nähe des Maximum gelangt. Dies bedeutet, daß die Neutralisationskurve einer bestimmten Toxinmenge sich mit dem Wechsel der Jahreszeiten fortwährend ändert und erst nach einem Jahr wieder den ursprünglichen Verlauf nimmt[1]). Dies könnte den Anschein erwecken, als ob die auf Grund der Neutralisationskurven oder einzelner ihrer Punkte ausgeführten Titrationen und Prüfungen ihrer sicheren Grundlagen beraubt wären.

Trevan (9) nimmt an, daß die in den verschiedenen Monaten sich ergebenden Neutralisationskurven einer bestimmten Toxinmenge in einem einfachen Zusammenhang stehen, demzufolge zu einem beliebigen Ordinatenpaar in allen Kurven Paare von Punkten gehören, deren Abszissen in einem konstanten Verhältnis stehen. Eine einzige — zu irgendeinem Zeitpunkt aufgenommene — Kurve würde hiernach bei Verwendung eines Standardserums jederzeit die Ablesung des Antitoxingehaltes eines zu prüfenden Serums gestatten. Man hätte nur die prozentuale Sterblichkeit festzustellen, die durch zwei Gemische bedingt wird, welche übereinstimmende Mengen von dem Standardserum und dem zu prüfenden Serum enthalten; die Abszissen der zu den gefundenen Prozentzahlen (Ordinaten) gehörigen Kurvenpunkte

1) Selbstverständlich betreffen diese Aenderungen nur die Sterblichkeitskurve. Dagegen dürfte die Bindung des Toxins durch das Antitoxin in den verschiedenen Jahreszeiten ganz gleich verlaufen (vgl. S. 12). Die Mengen freien Giftes, die nach der Injektion der Toxin-Antitoxin-Gemische zur Wirkung gelangen, sind daher im Sommer und im Winter gleich groß, wenn die Mischungen gleichmäßig vorbehandelt werden und wenn mit Mäusen, also homoiothermen Versuchstieren gearbeitet wird.

wären alsdann proportional dem Antitoxingehalt der beiden Gemische bzw. der zu ihrer Herstellung benützten Sera.

Abgesehen davon, daß die beiden von Trevan (9) mitgeteilten Kurven auf Grund einer nicht sehr großen Anzahl experimentell bestimmter Punkte (4 bzw. 3) konstruiert sind, können freilich aus verschiedenen Gründen auch die Voraussetzungen, von denen er ausgeht, nicht als bewiesen angesehen werden. Vor allem steht es nicht fest, ob die jahreszeitlichen Schwankungen der Resistenz von weißen Mäusen gegen das Dysenterietoxin bei den verschiedenen Individuen proportional sind. Wenn man aber eine solche Voraussetzung als richtig annimmt, so würde sie bedeuten, daß man im Sommer zur Erreichung eines bestimmten Effekts ein gewisses Vielfaches, z. B. das k-fache der im Winter erforderlichen Toxinmenge braucht. Die Dosis certe letalis (d. l. 100) wäre im Sommer k-mal so groß wie im Winter; die d. l. 50 wäre ebenfalls k-mal so groß wie im Winter usw. Z. B. wurde während der Zeit vom 21. XII. 1929 bis 6. I. 1930 festgestellt, daß die d. l. 100 des zu allen Untersuchungen benützten Giftes 0,01 mg betrug; im Sommer würde die d. l. 100 somit $k \cdot 0{,}01$ mg (etwa $1{,}5 \cdot 0{,}01$ mg o. ä.) betragen[1]).

Auch die Giftmenge x_1, die nach der Injektion eines unterneutralisierten Gemisches (etwa : 0,125 mg Testgift + 0,8 AE) zur Wirkung gelangt und die im Sommer ebenso groß ist wie im Winter (vgl. S. 12), bewirkt im Sommer nicht den gleichen Effekt wie im Winter; wenn die Menge x_1 im Winter 5 Proz. der Versuchstiere getötet hat, so würde im Sommer erst eine k-mal so große Giftmenge, also $k \cdot x_1$ gerade so viel Tiere töten. Die Antitoxindosis, die nach Zusatz zu 0,125 mg Testgift die Giftmenge $k \cdot x_1$ freiläßt, möge um $^1/_{10}$ kleiner sein als die Antitoxindosis, welche die Giftmenge x_1 freiläßt, möge also 0,72 AE betragen.

Die Giftmenge x_2, welche im Winter 85 Proz. der Mäuse tötet, läßt im Sommer ebenfalls nur einen kleineren Prozentsatz der Versuchstiere sterben; erst die Giftmenge $k \cdot x_2$ würde im Sommer bei 85 Proz. der Tiere tödlich wirken. Wenn die Antitoxindosis, welche die Giftmenge x_2 freiläßt, 0,4 AE beträgt, so darf nun durchaus nicht angenommen werden, daß diejenige Antitoxindosis, welche die Giftmenge $k \cdot x_2$ freiläßt, gleichfalls wieder um $^1/_{10}$ kleiner sei, also 0,36 AE betrage bzw. daß bei Verminderung der Antitoxindosis um $^1/_{10}$ gerade die Giftmenge $k \cdot x_2$ freibleibe.

Die Giftmenge $k \cdot x_2$ bleibt vielmehr erst dann frei, wenn die Serumdosis um mehr als $^1/_{10}$ verringert wird. Denn weil die Zahl der in 0,125 mg Gift enthaltenen tödlichen Dosen im Sommer kleiner ist als im Winter, steigt

1) Die in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen sind während der Zeit vom 17. Dez. 1929 bis 11. Febr. 1930 durchgeführt worden, also während der Zeit der höchsten Giftempfindlichkeit der Mäuse. Nur der am Ende dieses Abschnittes mitgeteilte Vergleich zwischen dem deutschen und dem dänischen Dysenteriestandardserum wurde vom 26. März bis 2. April 1930 vorgenommen. Eine Resistenzerhöhung bei den Versuchstieren ließ sich allerdings Ende März noch nicht feststellen.

die relative Spanne zwischen der zur Neutralisierung der Testgiftdosis erforderlichen Antitoxinmenge und der Menge, die eine Dosis certe letalis zur Wirkung gelangen läßt (vgl. Abschnitt VI, S. 10 und 11 und Abschnitt VIII, S. 19). Die verschiedenen Kurven stehen also nicht in dem oben erwähnten Zusammenhang; sondern den zu einem bestimmten Ordinatenpaar gehörigen Punkten einer Sommerkurve sind Abszissen zugeordnet, deren Quotient größer ist als der Quotient der zu den entsprechenden Punkten einer Winterkurve gehörigen Abszissen.

Zur näheren Begründung dieser Auffassung sei folgendes ausgeführt. Alle hierher gehörigen Ueberlegungen gehen von der Voraussetzung aus, daß man im Sommer stets k-mal soviel Gift zur Erzielung eines bestimmten Effektes braucht wie im Winter (s. S. 21). Zwei Punkte A_1 und B_1 mit gleicher Ordinate, von denen der eine in einer Winterkurve (A), der andere in einer Sommerkurve (B) liegt (vgl. Fig. 2), stellen Gemische dar, die — zu differenten

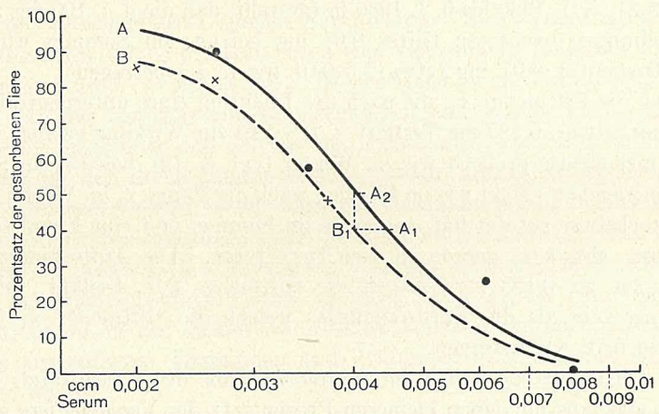


Fig. 2.

Zeiten — den gleichen Prozentsatz Versuchstiere töten. Die Giftmengen, die diese Gemische zur Wirkung gelangen lassen, sind verschieden. B_1 enthält k-mal soviel freies Gift wie A_1. Das Gleiche gilt für alle anderen Paare von Punkten mit gleicher Ordinate. Jeder Punkt in der Sommerkurve (B) stellt ein Gemisch dar, welches k-mal soviel freies Gift zur Wirkung gelangen läßt wie das Gemisch, das durch den Punkt mit gleicher Ordinate in der Winterkurve (A) wiedergegeben wird.

Der in der Winterkurve gelegene Punkt A_2, der die gleiche Abszisse wie B_1 hat, stellt dasselbe Gemisch dar wie B_1; B_1 und A_2 enthalten gleiche Mengen Gift und Serum, sind also identisch. A_2 enthält somit k-mal soviel freies Gift wie A_1. Es ist nun die Frage zu beantworten, wie sich die Antitoxindosen in Gemischen verhalten, die durch die Punkte A_1 und A_2 oder durch analoge Punktpaare dargestellt werden. Allgemein ausgedrückt: es soll untersucht werden, wie die Antitoxinmenge eines Gemisches verändert werden muß, damit das k-fache der ursprünglichen Menge freien Giftes zur Wirkung gelangt.

Trevan nimmt an, daß die verschiedenen Kurven — bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabes für die Abszissen — im steilen (praktisch

linearen) Teil Parallelen sind bzw. daß die Sommerkurven durch einfache Linksverschiebung aus den Winterkurven entstehen. Hiernach würden durch eine gleichartige Verminderung der Antitoxindosen die freien Toxinmengen so erhöht, daß die Resistenzsteigerung, die bei den Versuchstieren im Sommer eintritt, genau kompensiert würde; und Punkte mit gleicher Ordinate — A_1 und B_1 usw. — müßten in der obigen Abbildung stets den gleichen Abstand besitzen. Punkte der Kurve A, deren Fußpunkte den nämlichen Abstand besitzen — A_1 und A_2 usw. —, würden somit Gemische mit Mengen freien Giftes darstellen, welche in einem konstanten Verhältnis stünden.

Das würde besagen, daß bei Herabsetzung der Antitoxindosen um einen bestimmten Prozentsatz die zur Wirkung gelangenden Toxinmengen proportional zunähmen. Bezeichnet man 1) die Menge freien Giftes, die nach Injektion eines Toxin-Antitoxin-Gemisches zur Wirkung gelangt, mit x, 2) das Vielfache von x, das bei Verringerung der Antitoxindosis um $^1/_{10}$ zur Wirkung gelangt, mit $n \cdot x$ und 3) die Gesamtmenge des in der Prüfungsdosis enthaltenen Toxins mit P, so müßte also n eine Konstante sein. Es wäre also $n = k$. Nimmt nun x den Wert $\frac{P}{k}$ an, so fände man $n \cdot x = P$. Dies würde bedeuten, daß eine bestimmte Antitoxindosis die Giftmenge $\frac{P}{k}$ frei läßt und daß in Gegenwart einer nur um $^1/_{10}$ kleineren Antitoxindosis das gesamte Toxin frei wäre! Wird $x > \frac{P}{k}$, so fände man $n \cdot x > P$. Da in einer Mischung, die überhaupt noch Antitoxin enthält, selbstverständlich ein gewisser Toxinanteil gebunden ist, und da $n \cdot x$ nicht größer sein kann als die Gesamtmenge des in der Prüfungsdosis enthaltenen Toxins P, ist die Voraussetzung, daß n eine Konstante sei, unzutreffend. n wird vielmehr um so kleiner, je größer die Menge des bereits in Freiheit befindlichen Toxins wird; der Wert, dem sich n unbegrenzt nähert, ist 1.

Umgekehrt läßt sich leicht zeigen, daß eine proportionale Erhöhung der in den Gemischen enthaltenen freien Toxinmengen nur dann zustande kommt, wenn die Antitoxindosen nicht um einen gleichen, sondern um einen steigenden Prozentsatz vermindert werden. Gelangt nach Herabsetzung einer bestimmten Antitoxindosis, z. B. 0,8 AE, um $^1/_{10}$ anstelle der freien Giftmenge x_1 die Giftmenge $k \cdot x_1$ zur Wirkung, so müssen 0,4 AE um mehr als $^1/_{10}$ verringert werden, wenn anstelle von x_2 die Giftmenge $k \cdot x_2$ zur Wirkung kommen soll.

Paare von Gemischen mit freien Giftmengen, welche in einem konstanten Verhältnis stehen, werden also in Kurve A durch Paare von Punkten dargestellt, deren Fußpunkte um so weiter auseinanderliegen, je mehr sie sich dem Koordinatenanfang nähern. In gleicher Weise wächst der Abstand der in Kurve B liegenden Punkte von den in Kurve A liegenden Punkten mit gleicher Ordinate. Die Neutralisationskurve verschiebt sich also vom Winter zum Sommer nicht nur nach links, sondern wird — bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabs für die Abszissen — auch flacher.

In Fig. 2 stimmt Kurve A mit der von Trevan mitgeteilten Kurve A überein. Kurve B verbindet dagegen die Kreuze (d. h. die von Trevan tat-

sächlich ermittelten Werte) so, daß man eine Abflachung gegenüber Kurve A deutlich erkennt, während bei Trevan (9) Kurve B ebenso steil gezeichnet ist wie A. Da sich Kurve B in Fig. 2 enger an die tatsächlich bestimmten Werte (Kreuze) anfügt als in der Zeichnung von Trevan, kommt die hier gewählte Darstellung dem wirklichen Sachverhalt wohl am nächsten.

Die Annahme einer einfachen Linksverschiebung (ohne Abflachung) ließe sich nur durch komplizierte Hilfsvorstellungen stützen, etwa durch die Hypothese, daß der Koeffizient n (s. oben) unregelmäßig abnehme oder daß die Dosis certe tolerata des Dysenteriegiftes im Sommer mehr wachse als die Dosis certe letalis; man müßte sich im letzteren Fall vorstellen, daß die Resistenz bei den empfindlichsten Mäusen im Sommer besonders stark zunähme, bei den an sich widerstandsfähigeren Tieren dagegen in geringerem Maße. —

X.

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, ist es nicht möglich, einer und derselben Neutralisationskurve zu verschiedenen Jahreszeiten alle Werte zu entnehmen. Trotzdem läßt sich die Titration und die Prüfung der antitoxischen Ruhrsera jederzeit mit der gleichen Genauigkeit durchführen.

Wird die Titration nach dem in Abschnitt VII besprochenen Verfahren (S. 13 ff.) durchgeführt, so kann man freilich aus der Sterblichkeitsrate, die einer Serumdosis zugeordnet ist, nicht jederzeit direkt auf ihren Antitoxingehalt schließen. Es genügt also nicht, den „Zielpunkt“ einmalig festzulegen. Vielmehr muß man bei jeder Titration die Sterblichkeitsquote, die einer bestimmten Antitoxindosis zugeordnet ist, neu bestimmen, indem man jeweils einen Versuch mit der Prüfungsdosis des Testgiftes und mit einer bestimmten Menge des Standardserums, z. B. mit 0,5 AE ausführt (vgl. Abschn. VII, S. 13 f.). Dies ist der Kernpunkt des Standardprinzips! Findet man, daß die Sterblichkeit bei irgendeiner Dosis des untersuchten Serums höher oder niedriger ist als die Sterblichkeit bei dem den Vergleich ermöglichenden Gemisch der Testgiftdosis mit Standardserum (0,5 AE), so weiß man, daß der Antitoxingehalt der in Frage kommenden Dosis des geprüften Serums kleiner oder größer ist als 0,5 AE, allerdings nicht wieviel kleiner oder größer. Erst die weitere Prüfung größerer oder kleinerer Serumdosen gestattet die allmähliche Annäherung an den Zielpunkt und macht es schließlich möglich, diejenige Serummenge zu finden, welcher die gleiche Sterblichkeit zugeordnet ist wie der Vergleichsdosis des Standardserums und welche somit den gleichen Antitoxingehalt — 0,5 AE — besitzt. Es ist für dieses Verfahren durchaus gleichgültig, daß die gewählte Testgiftdosis in Mischung mit 0,5 AE im Sommer weniger Versuchstiere tötet als im Winter. Wenn die Verschiebungen allerdings so erheblich werden, daß ein allzu kleiner Prozentsatz der Mäuse getötet wird, ist eine Erhöhung der Testgiftdosis nicht zu vermeiden, weil bei weitgehender Verkleinerung der „Ausschläge“ die Genauigkeit der Ergebnisse abnimmt (vgl. S. 14 f.). Behält man die Testgiftdosis unverändert bei, so geht selbstverständlich eine ursprünglich etwa vorhandene Relation auf den Endpunkt der Neutralisationskurve verloren. Mit anderen Worten: die Neutralisationskurven verschieben sich im Sommer nach links; wurde im Winter als Testgiftdosis diejenige Menge gewählt, die durch 1,0 AE eben neutralisiert wurde, so bedarf es im Sommer zur Neutralisierung einer geringeren Menge.

Ganz analog liegen die Verhältnisse bei der in mehreren Untersuchungsserien ausgeführten Prüfung des Wertes der Ruhrsera auf Grund der von den Fabriken gemachten Angaben. Auch hier ändern die Resistenzschwankungen nichts am Prinizp des Verfahrens, weil jede Dosis stets im Vergleich mit der entsprechenden Dosis des Standardserums geprüft wird. Bei einer Prüfungsmethode, die eine durch 1,0 AE eben neutralisierte Giftmenge als Prüfungsdosis benützt (s. S. 16 ff.), wird eine Erhöhung bzw. Neueinstellung der Testgiftdosis bei stärkeren Veränderungen in der Resistenz der Versuchstiere praktische Vorteile vor der Beibehaltung der ursprünglich gewählten Menge haben. Wenn sich nämlich der Endpunkt der Neutralisationskurve zu weit nach links verschiebt, verliert die vierte Versuchsserie — 1,0 AE — ihre Bedeutung als Indikator einer etwaigen Minderwertigkeit des geprüften Serums; eine mäßige Minderwertigkeit läßt sich alsdann nur auf Grund des Ausfalls der fünften und sechsten Serie — 0,75 und 0,5 AE (s. S. 17) — feststellen. Dieser Nachteil ist nur durch Erhöhung der Testgiftdosis zu vermeiden. Umgekehrt müssen Giftdosen, die im Sommer festgelegt worden sind, gegebenenfalls im Winter herabgesetzt werden.

Als Beispiel für eine Serumprüfung sei hier ein Vergleich zwischen dem deutschen und dem dänischen (internationalen) Dysenterie-Standardserum angeführt (Tabelle V).

Tabelle V.

Dysenterietestgift „1929“	Deutsches Dysenterie-Standard-serum[1])	Zahl der Tiere	Davon gestorben	Prozent	Dänisches Dysenterie-Standard-serum	Zahl der Tiere	Davon gestorben	Prozent
0,25 ccm Testgiftaufschwemmung = 0,125 mg	1/200 ccm	11	0	0	1/200 ccm	12	0	0
dgl.	3/800 „	12	2	16,7	3/800 „	12	3	25
„	1/400 „	12	8	66,7	1/400 „	12	9	75

Tabelle V zeigt eine gute Uebereinstimmung in der Wirkung der verglichenen Sera. Zur Ausführung des Versuches wurde das deutsche Dysenterie-Standardserum so aufgelöst, daß 1/200 ccm die gleiche Menge Antitoxin enthielt, welche bei Lösung nach der alten Vorschrift in 1/36 ccm enthalten ist (vgl. S. 8). Die in Tabelle V aufgeführten Mengen — 1/200, 3/800, 1/400 ccm — sind somit Mengen von 1/36, 1/48, 1/72 ccm der bis

1) Die in einem Vakuumröhrchen enthaltene Menge Standardserum wurde durch Zusatz von 2,58 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

jetzt benützten Standardlösung äquivalent. Das Ergebnis des in Tabelle V wiedergegebenen Vergleichs bestätigt von neuem die in Statens Seruminstitut in Kopenhagen und im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. erhobenen Befunde. Es sind also

1/36 ccm Deutsches Dysenterie-Standardserum „alt"
= 1/200 ccm Deutsches Dysenterie-Standardserum „neu"
= 1/200 ccm Dänisches (internationales) Dysenterie-Standardserum
= 1,0 AE.

Literatur.

1) Kolle, W., Heller, O., und de Mestral, V., Die Wertbestimmung des Dysenterieserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1908, S. 809.
2) Dieselben, Beitrag zur Wertbestimmung des antitoxischen Dysenterieserums. Arb. Inst Inf. Krankh. Bern, 1908, H. 1, S. 1.
3) Sachs, H., und Georgi, W., Zur Wertbestimmung des antitoxischen Dysenterieserums Dtsch. med. Wochenschr., 1918, S. 610.
4) Kolle, W., Schlossberger, H., und Prigge, R., Ueber Eigenschaften, Wirkungsart und Wertbestimmung des Dysenterieserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1924, S. 1104. — Société des Nations, Organisation d'Hygiène, C. H. 213, Genf 1924.
5) Sudmersen, H. J., und Eagleton, A. J., Standardization of antidysentery serum, Lancet, 1921, Bd. II, S. 1109.
6) — Runge, B. F., und O'Brien, R. A., Standardization of Antidysentery(Shiga)-Serum. Brit. Journ. of exp. Path., Vol. 5, 1924, S. 100.
7) Schlossberger, H., und Wichmann, F. W., Untersuchungen über die Bindungsverhältnisse von Dysenterietoxin und Dysenterieantitoxin. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 107, 1927, H. 3/4, S. 716.
8) Ehrlich, P., Ueber die Giftkomponenten des Diphtherietoxins. Berl. klin. Wochenschr., 1903, Nr. 35/37.
9) Trevan, J. W., A statistical note on the testing of anti-dysentery sera. Journ. of Path. and Bact., Bd. 32, 1929, S. 127.
10) Blake, A. V., und Okell, C. C., Standardisation of antidysentery serum: effect of increased test dose of toxin on the accuracy of titration. Journ. of Path. and Bact., Vol. 32, 1929, S. 121.
11) Otto, R., und Hetsch, H., Die Prüfung und Wertbemessung der Sera und Impfstoffe. Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Ther., 1927, H. 19, S. 63.
12) Trevan, J. W., The error of determination of toxicity. Proc. of the Roy. Soc. B, Vol. 101, 1927, p. 483.
13) Schmidt, S., Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Toxin und Antitoxin bei fraktionierter Sättigung (Diphtherie und Tetanus). Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 59, 1928, S. 82.
14) Bericht der Standardisierungskommission über Dysenterieserum. Société des Nations, Organisation d'Hygiène, C. H./S.S./57.
15) O'Brien, R. A., Standardisation du sérum antidysentérique (Shiga). Société des Nations, Organisation d'Hygiène, C.H./S.S./52, 1928.
16) Schlossberger, H., und Hartoch, O., Weitere Untersuchungen über die Wertbestimmung des antitoxischen Dysenterieserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1925, Nr. 45.

Aus d. Chemotherap. Forschungsinst. Georg Speyer-Haus zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. W. Kolle).

II.

Studien an Mikrogliazellen (sogen. Hortegazellen) in Gewebskulturen von Gehirn[1]).

Von

I. Costero.

(Mit 6 Abbildungen im Text.)

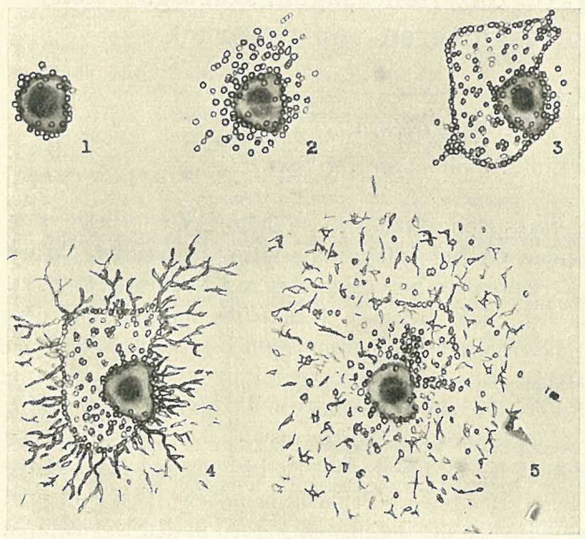
Seit den Untersuchungen von Harrison im Jahre 1907, welcher zum ersten Male die Entwicklung der Nervenfasern „in vitro" beobachtete, haben zahlreiche Autoren das Verhalten des Nervengewebes in Explantaten studiert. Einige Forscher haben sich, dem Beispiele Harrisons folgend, mit dem Studium von künstlich außerhalb des Organismus am Leben erhaltenen Gehirnfragmenten beschäftigt: Burrows, Shorey, Ingebrigtsen, Sanguinetti, Levi, Studnicka, Olivo usw. Andere wie Legendre und Minot, Marinesco und Minea, Henneguy, Levaditi, usw. haben Spinalganglien in vitro kultiviert, während M. R. Lewis, W. H. Lewis, und Matsumoto Sympaticus-Nervenelemente züchteten. Schließlich haben Harrison und Ingebrigtsen auch das Verhalten der peripheren Nerven in den Explantaten studiert.

Alle diese Autoren haben im allgemeinen ihre Arbeiten auf das Studium der das Nervensystem konstituierenden Hauptelemente, nämlich der Nervenzellen und ihrer Ausläufer in den Gewebskulturen gerichtet. In den Arbeiten findet man aber keine nur auf das Studium der anderen zwei dem Gehirn eigenen Zellelemente, Glia- und Hortegazellen, gerichtete Untersuchungen, und nur beiläufig sind die anderen Zellen, welche in den Kulturen des Nervengewebes proliferieren, erwähnt.

In meinen Untersuchungen hatte ich Gehirnfragmente von 2 bis 3 Monaten alten menschlichen Embryonen kultiviert, auch von neugeborenen Meerschweinchen und von Hühnerembryonen zwischen dem 7. und 20. Bruttage und dabei mein Augenmerk hauptsächlich auf die wandernden Körnchenzellen gerichtet, welche aus dem explantierten Nervengewebe entstehen.

1) Abgeschlossen am 17. Febr. 1930.

Diese Elemente sind in der Hauptsache charakterisiert durch ihr spätes Auftreten, im Gegensatz zu der Schnelligkeit, mit welcher die Fibroblasten erscheinen. Nur selten trifft man in den ersten 24 Stunden zwischen den Fibroblasten der Kulturen isolierte Wanderzellen, und in den Fällen, in denen die Entwicklung der Fibroblasten ganz ausbleibt, erleidet das explantierte Gewebsfragment anscheinend während vieler Stunden keine Veränderung, welche eine übermäßige Proliferation von Zellen vermuten ließe. Im allgemeinen pflegen 24 Stunden nach dem Ansetzen der Kultur von Gehirnstückchen die ersten Wanderzellen zu erscheinen, welche dann mit Vorliebe am Rande des explantierten Fragmentes gelagert sind (Figur 1, 1). Die Form dieser zuerst auftretenden Zellen ist rundlich; von ihrer Oberfläche gehen kurze und feine pseudopodienartige, oder fadenförmige Verlängerungen aus, welche fortwährend ihre Form, Größe und Lage verändern, um ebensoschnell die alte Form wieder anzunehmen. Sie gehen von dem ganzen Zellkörper nach allen Seiten aus, gleichsam ein Haarbündel oder Federbüschel bildend. Diese Elemente sind weiter charakterisiert durch ihre bedeutende Größe und durch ein grobkörniges Protoplasma von starkem Lichtbrechungsvermögen, in welchem man sehr häufig auch einige kugelförmige Vakuolen von sehr verschiedener Größe wahrnehmen kann, obgleich sie fast immer klein sind. Der infolge der protoplasmatischen Trübung in vielen Fällen nur schwer sichtbare Kern ist von runder oder eiförmiger Form, zeigt eine oder zwei lichtbrechende nebenkernartige Körnchenbildungen und hat meistens eine exzentrische Lage.



Eig. 1.

Von den morphologischen und Struktureigenschaften, welche wir soeben beschrieben haben, abgesehen, läßt sich nur weniges, was Aufschluß über die Natur dieser freien und beweglichen Zellelemente geben könnte, sagen. Harrison (1910), welcher schon in seinen ersten Kulturen des Rückenmarks des Frosches ähnliche Zellen beobachtete, bestimmte ihre Natur in seinen

Arbeiten nicht und beschränkte sich auf die Erwähnung des konstanten Vorkommens dieser Elemente in den Kulturen. Aus ihrer Beweglichkeit aber schloß er, daß sie mit der Entwicklung der Nervenfasern nichts zu tun haben.

Burrows (1911) betont verschiedentlich, daß sich häufig in seinen Nervengewebe-Kulturen des embryonalen Huhns mesenchymale Elemente entwickelten. Aber er behandelt ihre Morphologie und ihre Struktureigenschaften nicht ausführlich genug, um beurteilen zu können, ob die Zellen, welche er erwähnt, den von mir studierten gleichen.

Ingebrigtsen (1913) stößt in seinen Studien über die Degeneration und Regeneration der Neurone in vitro auf einen Zelltypus mit mächtigen amöboiden Bewegungen und körniger Struktur, von deren Protoplasma charakteristische, gekrümmte, amöboide Filamente ausgehen. Dieser Autor scheint dazu zu neigen, diese Elemente als Bindegewebszellen zu betrachten.

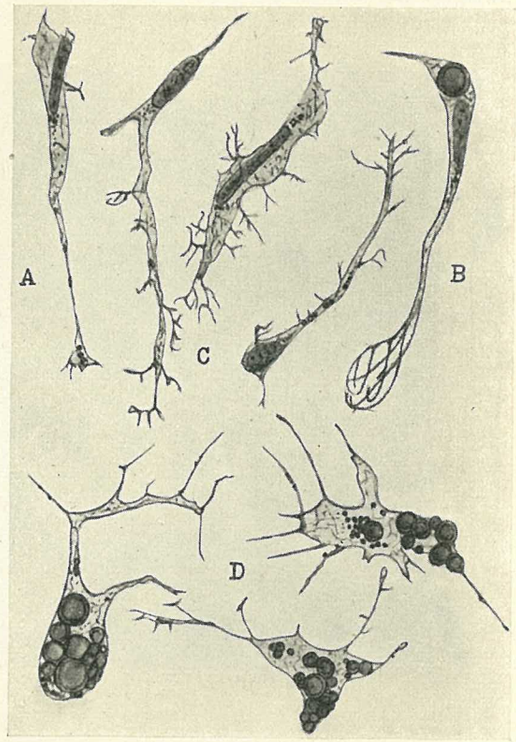


Fig. 2.

Schließlich hat auch Olivo (1927) in seinen Kulturen von Gewebe des Zentralnervensystems mit den unsrigen vergleichbare Wanderzellen gefunden, von denen er zwei Typen beschreibt: Kugelförmige Zellen mit großenFetttropfen in ihrem Protoplasma und ferner verzweigte Elemente mit kleinen Körnchen.

Nach meinen Beobachtungen möchte ich sagen, daß diese runden, beweglichen, körnigen Zellen, welche in 100 Proz. in meinen Kulturen in Erscheinung traten, im ganzen, sowohl morphologisch als auch physiologisch den körnigen Zellen entsprechen, welche sich in einer großen Anzahl pathologischer, besonders entzündlicher Gehirnprozesse zwischen Nerven- und Gliazellen finden.

Seit den grundlegenden Arbeiten von Rio-Hortega kennt man das Vorhandensein einer dritten von den Nerven- und Neurogliaelementen

verschiedenen Zellart, der sogenannten Mikroglia, welcher bei normalen und pathologischen Verhältnissen im Gehirn wichtige Funktionen zukommen.

Ohne auf nähere Einzelheiten einzugehen, über die bereits in früheren Veröffentlichungen berichtet ist, sei hier nur bemerkt, daß es sich, wie Rio-Hortega in seinen ersten Arbeiten darlegte, um Zellen von kleiner Gestalt handelt, die in Schnitten und im ungefärbten Präparat zahlreiche, sehr verzweigte und mit reichlichen und feinen stachligen Auswüchsen bedeckte Ausläufer aufweisen, so daß sie ein charakteristisches Aussehen besitzen. Diese Elemente finden sich bei dem erwachsenen Individuum in allen Teilen des Gehirns, und ihre Haupteigenschaften sind die in gewissen Fällen sehr aktiven amöboiden Bewegungen und die phagozytäre Tätigkeit. Die Mikroglia spielt nach Hortega im normalen Gehirn beim Stoffwechsel der Nerven- und Gliazellen eine wichtige Rolle und vermag in pathologischen Fällen, die Zerstörungsprodukte und Fremdkörper, welche sich im Gehirn vorfinden, aufzunehmen. Rio-Hortega nimmt an, daß die Mikroglia mesodermalen Ursprungs ist, eine Auffassung, die durch wichtige Argumente gestützt wird, die aber trotzdem heute noch für einige Autoren einen Streitpunkt bildet.

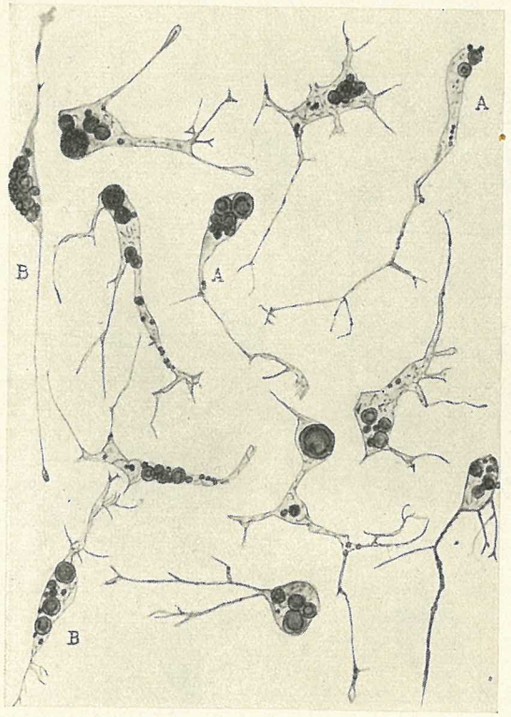


Fig. 3.

Die grundlegenden Forschungen von Rio-Hortega haben zahlreiche Arbeiten zur Folge gehabt, deren Autoren im wesentlichen die Ergebnisse des spanischen Gelehrten bestätigen und die Kenntnis von dieser neuen Zellgattung um einige interessante Details vermehrt haben. Wir führen hier die Namen von Collado, Asua, Bailey und Hiller, Kreutzfeldt, Metz, Spatz, Alberca, Penfield, Cajal, Costero, L. Enriquez, Gallego, Poldermann, Winkler, Schaffer, Pruijs, R. Corria, Bratiano und Llombart und Jonesco, Mihaiesti und Tupa an, von denen

sich einige um die Klärung der Frage, die uns hier beschäftigt, ganz besonders verdient gemacht haben.

Es ist nötig hervorzuheben, daß auch nach meinen Beobachtungen die Mikroglia keine direkte Beziehung zu irgend einer der Varietäten der Neuroglia (Polydendroglia und Oligodendroglia) hat. Die physiologische Aktivität und die Eigenschaften der Hortegazellen bieten keinen Anhaltspunkt, der begründeterweise diese Beziehung vermuten ließe, und sie sprechen im Gegenteil dafür, daß die Mikroglia in der feineren Struktur des Nervengewebes ein drittes Zellelement bildet. Andererseits ist ihr Ursprung aller

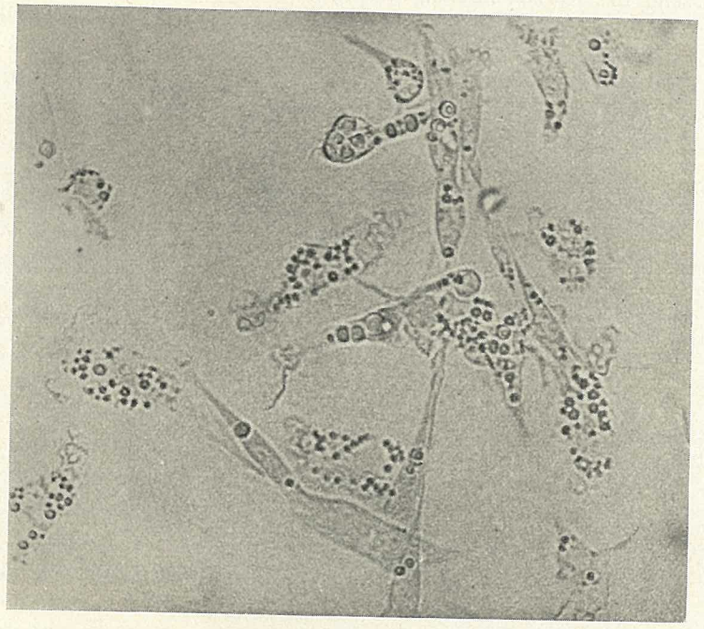


Fig. 4.

Wahrscheinlichkeit nach mesodermal und deswegen von dem der Neuroglia sehr verschieden.

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, einen weiteren, eventuell sehr gewichtigen Beweis für den mesodermalen Ursprung der Hortegazellen zu führen, wobei wir in Erwägung ziehen, daß die körnigen und beweglichen Zellen, welche mit absoluter Konstanz in den Kulturen der Nervenzentren erscheinen (Huhnembryo von 15—20 Bruttagen) nur emigrierte Formen der Mikrogliazellen darstellen, deren Aehnlichkeit mit den in vitro kultivierten Makrophagen und Monozyten evident ist.

Um zu diesem Schluß zu kommen, haben wir die beweglichen, körnigen Zellen studiert, indem wir dazu vorzugsweise tierische Nervengewebskulturen in den letzten Tagen der embryonalen Entwicklung gebraucht haben. Wenn

sich, wie es oft vorkommt, zur gleichen Zeit keine Fibroblasten entwickeln, so kann man beobachten, daß die entstandenen körnigen Wanderelemente schnell eine beträchtliche Invasionszone einnehmen und in ihnen eine, wenn auch nicht absolut konstante, charakteristische Orientierung in Erscheinung tritt, indem die in ihrer Emigration am weitesten fortgeschrittenen Zellen sich in einer von einer Schicht von eng aneinander gelehnten Elementen gebildeten Reihe vereinigen, welche einen Plasmahof von verschiedener Größe und Form umgrenzt, der die verbleibenden Wanderelemente und das ganze oder einen Teil des explantierten Fragmentes umschlossen hält.

Wenn die Körnchenzellen, welche zuerst in den Kulturen erscheinen, im großen und ganzen den Fettkörnchenformen der Mikrogliazellen gleichen,

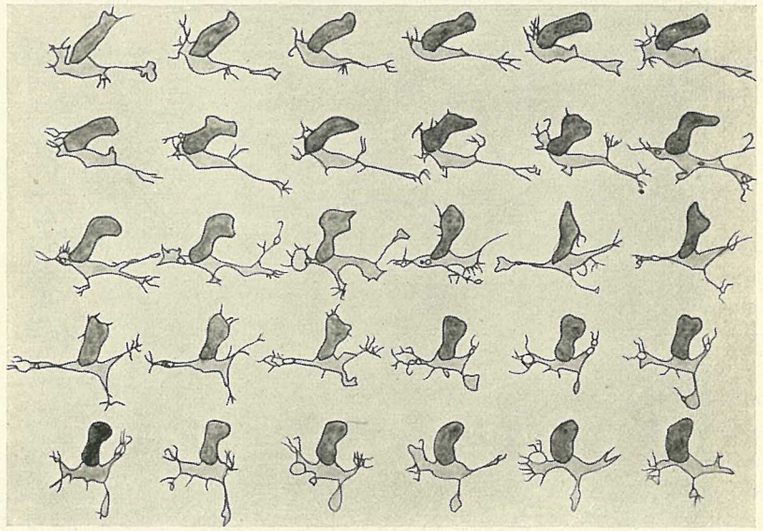


Fig. 5.

so ist die morphologische Identität nicht weniger deutlich, welche zwischen den länglichen Wanderzellen unserer Kulturen und den Stäbchenzellen der für die Hortegazellen charakteristischen Wanderformen besteht.

Die länglichen Wanderzellen in Gehirnkulturen haben die Eigentümlichkeit, sich an ihren Enden zu vereinigen, um sternförmige Zellreihen zu bilden, von welchen seitwärts ebenfalls reihenmäßig angeordnete Elemente ausgehen, deren Gesamtheit eine sehr charakteristische, stark verzweigte Gruppenbildung ergibt (Fig. 1, Nr. 4). Sowohl die Bildung der zellulären Grenzlinie als die der verzweigten Reihengruppen ist ein vorübergehendes Phänomen, welches mit zunehmendem Alter der Kultur bald verschwindet, und dann durch Trennung und Emigration der sie bildenden Zellelemente diffus wird (Fig. 1, Nr. 5). Die länglichen Zellen erreichen dann den Rand des Gerinnsels, indem sie lange, mehr oder weniger verzweigte Ausläufer aus-

schicken, die verschiedenartig gestaltet sind (Fig. 2 und 3). Es treten bei diesen Elementen sehr häufig große Fetttropfen mitunter sehr früh in Erscheinung.

Wenn wir diese mit großen verzweigten Pseudopodien versehenen Zellen mit den Hortegazellen vergleichen, welche sich in den anormalerweise erweichten Teilen des Gehirns finden, dann sehen wir wieder dieselben ähnlichen Verhältnisse, welche wir hinsichtlich der runden und stäbchenförmigen Elemente hervorgehoben haben.

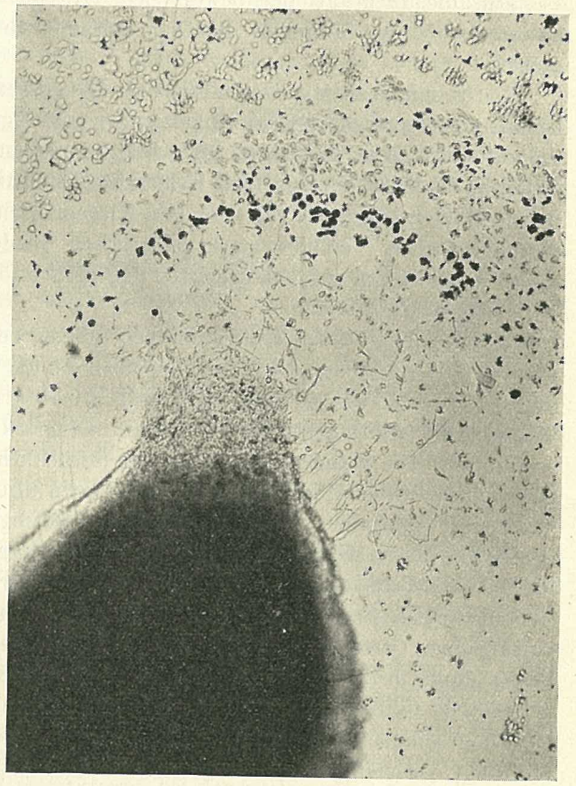


Fig. 6.

Die normale Mikrogliazelle hat, wie Rio-Hortega bewiesen hat, eine besonders verzweigte Form, indem sie zahlreiche, feine protoplasmatische Ausläufer besitzt, welche sich, von dem kleinen Zellkörper ausgehend, immer weiter verzweigen. Da nach Rio-Hortega die Form der Mikrogliazellen als Wanderzellen von der physikalischen Natur des betreffenden Mediums außerordentlich abhängig sind, wird es logischerweise sehr schwer sein, in dem geronnenen Plasmatropfen, den das Kulturmedium darstellt, ebenso ausgeprägt wie bei den im Gehirn vorhandenen Hortegazellen ramifizierte Elemente zu finden, wie sie sich in den verwickelten Maschen des Nervennetzes befinden. Diese Schwierigkeit ist offensichtlich; jedoch haben wir das Glück gehabt in verschiedenen Kulturen Wanderelemente zu finden, die, wenn sie auch nicht mit derselben Kompliziertheit wie die im Gehirn vorkommende Mikroglia, verzweigt sind, so doch zur Genüge die Fähigkeit jener Elemente bewiesen, sich deutlich zu verzweigen (Fig. 4). Diese verzweigten Elemente standen unter sich durch Anastomose in direkter Verbindung, vielfach nahmen diese sternförmigen Zellen bald die gewöhnliche runde Form in der Kultur ein.

Die Vitalität dieser Wanderzellen ist in vitro sehr groß; sie zeigen sich in alten Kulturen auch dann noch beweglich, wenn die Entwicklung und Beweglichkeit der Fibroblasten und der anderen Elemente desselben Explantates bereits zum Stillstand gekommen sind. Diesen Umstand habe ich mir zu Nutzen gemacht, um Reinkulturen der Mikroglia zu erhalten, indem ich den ersten Plasmawechsel 24 Stunden später vornahm, als es für die Fortzüchtung der Fibroblasten erforderlich wäre.

Für die Identität der beweglichen Körnchenzellen unserer Nervenkulturen mit der Mikroglia sprechen folgende Beobachtungen und Tatsachen:

1. Die mit starken Gestaltsveränderungen und Pseudopodienbildung einhergehende Beweglichkeit; diese auffällige Eigenschaft, die schon die Aufmerksamkeit Harrisons auf sich lenkte, ist ein leicht zu beobachtendes Merkmal, welches die aus dem Gehirnstückchen ausgewanderten Zellen in hohem Maße besitzen. In Fig. 5 sind die ausgeprägten und schnell erfolgenden morphologischen Veränderungen zeichnerisch wiedergegeben, welche eine dieser Wanderzellen auf dem geheizten Objekttisch (37°) während 30 Minuten der Beobachtung aufwies.

2. Eine Folge dieser außerordentlich großen Veränderungen des Protoplasmas mit Aussendung von Pseudopodien ist die rasche Fortbewegung dieser Elemente, wie sie sich auch nach Rio-Hortega bei experimentellen aseptisch im Gehirn gesetzten Wunden in Schnitten nach 24 Stunden nachweisen läßt. Die Wanderzellen durcheilen tatsächlich große Strecken mit ungewöhnlicher Geschwindigkeit, vor allem, wenn ihre Bewegungen durch die Nähe einer Substanz von chemotaktischer Wirkung begünstigt werden.

3. Die für die Mikroglia so charakteristische phagozytäre Eigenschaft hat eine außerordentliche Intensität. Wie Rio-Hortega bewies, beschränken sich die seinen Namen führenden Zellen nicht darauf, leblose Substanzen aufzunehmen (Reste von Myelin, rote Blutkörperchen usw.), sondern sie vermögen durch ihre phagozytäre Aktivität auch polymorphkernige Leukozyten, gelegentlich sogar plasmatische Zellen in sich aufzunehmen. Wenn man z. B. zu dem gewöhnlichen Kulturmedium eine isotonische Karminaufschwemmung hinzufügt, verschlingt die Mikroglia die Farbstoffkörnchen mit solcher Intensität, daß das Kulturplasma bald von der Farbsubstanz frei wird und die Mikrogliazellen mit Karminkörnchen vollgepfropft erscheinen (Fig. 6). Diese phagozytäre Kraft der Kulturmikrogliazellen erinnert an die Namen von Abräumzellen (Merzbacher) und Scavengercells (Bevan Lewis), die man den pseudopodischen Formen der Mikroglia gab. Auch rote Blutkörperchen werden schnell und gierig verschlungen, ebenso andere Fremdkörper, welche zufälliger- oder künstlicherweise sich in den Kulturen vorfinden; sie werden von den Wanderzellen umgeben, und je nach ihrer Art von ihnen aufgenommen; in diesen Fällen nehmen die Körnchenzellen rundliche Formen an, die ganz und gar den von Rio-Hortega gezeichneten fettkörnigen Zellformen der Mikroglia gleichkommen.

Der Vergleich der in den Kulturen gewachsenen, in vollster Entwicklung befindlichen und nach der Methode von Rio-Hortega gefärbten Elemente mit den Formen, die die Mikroglia bei einer im Gehirn applizierten Wunde in gefärbten Schnitten aufweist, spricht auch für die Identität der beweglichen Zellen mit den Hortegazellen (Mikroglia). Dabei ist zu berücksichtigen, daß zwar auch andere mesodermale Elemente (Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten) die gleiche Färbung annehmen. Charakteristisch für die Mikrogliazellen ist aber ihr Gehalt an einer großen Menge von kugeligen Einschlüssen, die schon frühzeitig auftreten und in einem solchen Ausmaße bei anderen Zellen nicht beobachtet werden. Durch meine Versuche konnte nicht entschieden werden, ob die Mikroglia aus Fibroblasten entsteht oder nicht; in Zustandsbildern unterscheiden sich aber die Mikrogliazellen durch die angeführten Merkmale von den gewöhnlichen Fibroblasten, und zwar vor allem durch die stets zu beobachtenden großen Kugeln, so daß sie als besondere Zellart anzusehen sind.

Zusammenfassung.

1. Die Wanderzellen, welche regelmäßig aus den in vitro kultivierten Nervengewebsstückchen auswachsen (Huhnembryo von 15—20 Bruttagen) haben alle morphologischen, funktionellen und strukturellen Eigenschaften, welche die Mikrogliazellen („Hortegazellen") charakterisieren.

2. Ich nehme an, daß diese Kulturelemente die Wandermikroglia des explantierten Fragmentes darstellen.

3. Die in den Kulturen bestehende Aehnlichkeit zwischen diesen aus den Nervengewebsstückchen ausgewanderten Elementen und den Makrophagen und Monozyten anderer Gewebsstückchen entspricht dem von Rio-Hortega betonten Parallelismus zwischen der Mikroglia und den in den entsprechenden Organen durch histologische Methoden studierten mesodermalen Elementen.

Die Arbeit ist entstanden in der Abteilung für Zellforschung des Georg Speyerhauses zu Frankfurt a. M. Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Direktor des Institutes, Herrn Geheimrat Kolle, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen, und ganz besonders danke ich Fräulein Dr. Vollmar für ihre Anregung und Unterstützung bei den vorliegenden Versuchen.

Literatur.

Alberga, Intervención precoz de la microglía en las heridas experimentales. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 11, 1926, p. 81.
Bailey and Hiller, The interstitial tissues of the central nervous system. Journ. nerv. a. ment. Dis., Vol. 59, 1924, p. 337.
Bergman, Ueber Hortega-Zellen und Neurophagie. Nederlandsch. Tijdschr. v. Geneesk., Bd. 70, 1926, S. 2064.
Bisceglie und Juhasz-Schaffer, Die Gewebezüchtung in vitro. Berlin 1928.
Bolsi, Plache senili e microglia. Riv. pat. nerv. e. ment, Vol. 32, 1927, p. 65.
Brantiano und Llombart, La mésoglie (microglie) dans la maladie de Borna. C. R. Soc. Biol., T. 51, 1929, p. 792.
Burrows, The growth of tissues of the chick embryo outside the animal body, with special reference to the nervous system. Journ. exp. Zool., Vol. 10, 1911, p. 63.

Cajal, Beitrag zur Kenntnis der Neuroglia des Groß- und Kleinhirns bei der progressiven Paralyse. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 100, 1926, S. 738.
Carrel and Ebeling, Pure cultures of large mononuclear leucocytes. Journ. exp. Med. Vol. 36, 1921, p. 365.
— — The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage. Journ. exp. Med., Vol. 44, 1926, p. 261 u. 285.
Collado, Participación de la microglía en el substratum patológico de la rabia. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 9, 1919, p. 175.
Costero, Conocimientos actuales sobre el tercer elemento de los centros nerviosos. Clin. y Lab., Vol. 20, 1926, p. 7.
Creutzfeldt und Metz, Die morphologische und funktionelle Differenzierung der Neuroglia. Med. Ges., Kiel, Sitzg., Bd. 19, 1924, S. 4.
— — Ueber Gestalt und Tätigkeit der Hortegazellen bei pathologischen Vorgängen. Zeitschrift f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 106, 1926, S. 18.
Fischer, Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro. München 1927.
Gallego, Alteraciones vasculares y de la microglía en el moquillo del perro. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 12, 1926, p. 32.
Garofeanu et Ornstein, Réaction de la microglia dans l'inanition. C. R. Soc. Biol., T. 94, 1923, p. 1179.
Globus, Glia response in chronic vascular disease of the brain. Arch. Neurol. a. Psychiat., Vol. 20, 1923, p. 14.
Gozzano, Sulla origine delle cellule granulo-adipose nelle ferite cerebrali. Riv. Neurol., Vol. 1, 1928, p. 377.
Harrison, Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., Vol. 4, 1907, p. 140.
— Embryonic transplantation and development of the nervous system. Anat. Rec., Vol. 2, 1908, p. 385.
— The development of peripheral nerve fibers in altered surroundings. Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organ., Bd. 30, 1910, S. 15.
— The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movements. Journ. exp. Zool., Vol. 9, 1910, p. 787.
Ingebrigtsen, Studies of the degeneration and regeneration of the axis cilinders in vitro. Journ. exp. Med., Vol. 17, 1913, p. 182.
— A contribution to the biology of the peripheral nerves in transplantations. Journ. exp. Med., Vol. 23, 1916, p. 251.
Jiménez Asúa, Die Mikroglia (Hortegasche Zellen) und das retikuloendotheliale System. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 59, 1927, S. 354.
Levi, Sull' origine delle reti nervose nelle colture di tessuti. R. Acc. Lincei, Vol. 25, 1916, p. 663.
— Ricerche sperimentali sopra elementi nervosi sviluppati in vitro. Arch. f. exp. Zellforschung, Bd. 2, 1916, S. 244.
Linell, The histology of neuroglial changes following cerebral trauma. Arch. Neurol. a. Psychiat., Vol. 22, 1924, p. 926.
López Enríquez, Existencia de células de Hortega (microglía) en la retina y vías ópticas. Bol. Soc. esp. Hist. Nat., Vol. 26, 1926, p. 29.
— Las células de Hortega en los procesos patológicos de la retina y nervio óptico. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 12, 1927, p. 79.
Marinesco et Minea, Les phénomènes de croissance des nerfs in vitro. Bull. Acad. méd., T. 68, 1912, p. 78.
Metz und Spatz, Die Hortegaschen Zellen (das sogenannte „dritte Element") und über ihre funktionelle Bedeutung. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 89, 1924, S. 138.
Olivo, Migrazione di elementi nervosi cultivati in vitro. Arch. f. exp. Zellforsch., Bd. 4, 1927, S. 43.
Penfield, Microglia and the process of phagocytosis in gliomas. The Amer. Journ. of Pathol., Vol. 1, 1925, p. 77.
— Phagocytic activity of microglia in the central nervous system. Proc. of the New York Pathol. Soc., Vol. 25, 1925, p. 71.
Polderman, Die Entdeckung der Mikroglia und ihre Bedeutung für die Neurogliafrage. Nederlandsch. Tijdschr. v. Geneesk., Bd. 70, 1926, S. 537.
Pruijs, Ueber Mikroglia, ihre Herkunft, Funktion und ihr Verhältnis zu anderen Gliaelementen. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 108, 1927, S. 298.
Ramirez Corria, Réaction de la microglie dans la meningoéncéphalite tuberculeuse. C. R. Soc. Biol., T. 96, 1927, p. 902.
Rio Hortega, La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. Trab. Lab. Inv. Biol., Vol. 10, 1919, p. 1.

Rio Hortega, Poder fagocitario y movilidad de la microglía. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 9, 1919, p. 154.
Histogénesis y evolución normal de la microglía. Mem. Soc. esp. Hist. Nat., Vol. 11, 1921, p. 213.
— Lo que debe entenderse por „tercer elemento" de los centros nerviosos. Bol. Soc. esp. Biol., Vol. 11, 1924, p. 1.
— Innovaciones útiles en la técnica de coloración de la microglía. Bol. Soc. esp. Hist. Nat., Vol. 27, 1924, p. 305.
— Papel de la microglía en la formación de los cuerpos amiláceos del tejido nervioso. Bol. Soc. esp. Hist. Nat., Marzo 1925.
— Lesiones elementales de los centros nerviosos. Rev. med. de Barcelona, Vol. 8, 1927, p. 36.
Rio Hortega y Jiménez Asua, Sobre la fagocitosis en los tumores y en otros procesos patológicos. Arch. Hemat. y Cardiol., Vol. 2, 1921, p. 161.
— und Penfield, Cerebral cicatrix. Bull. J. Hopkins Hosp., Vol. 41, 1927, p. 278.
Schaffer, Ueber die Hortegasche Mikroglia. Zeitschr. f. d. ges. Anat. u. Entwicklungsgesch., Bd. 81, 1926, S. 715.
Spatz, Untersuchungen über Stoffspeicherung und Stofftransport im Nervensystem. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 100, 1926, S. 428.
— und Metz, Die drei Gliazellarten und der Eisenstoffwechsel. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 100, 1926, S. 437.
Struwe, Ueber die Fettspeicherung der drei Gliaarten. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 100, 1926, S. 450.
Testa, Le cellule di gluge, le cellule en bastoncello di Nissl e la mesoglía. Folia Med., Vol. 14, 1928, p. 725.
Timmer, Der Anteil der Mikroglia und Makroglia am Aufbau der senilen Plaques. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., Bd. 98, 1925, S. 43.
Urechia et Elekes, Contribution á l'étude de la microglie. Arch. intern. de Neurol., T. 45, 1926, p. 81.
Winkler-Junius, Die Bedeutung Rio del Hortegas Neuroglia-Untersuchung für die Histopathologie des Zentralnervensystems. Psychiat. an Neurolog. Blad., 1926, p. 91.
Yonesco, Mihaiesti et Tupa, Origine mésodermique et rôle physiologique de la microglie. C. R. Soc. Biol., T. 101, 1929, p. 1084.

Aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. W. Kolle).

III.

Wirkung der B.C.G.-Immunisierung bei Affen, Meerschweinchen und Kaninchen.

Von

Prof. Dr. **E. Küster** und Dr. **G. Elkes.**

(Mit 1 Abbildung im Text.)

Ausgehend von der Voraussetzung, daß eine dauerhafte, auch unter natürlichen Verhältnissen genügend Schutz gegen Tuberkulose verleihende Immunität an die Anwesenheit lebender Tuberkelbazillen gebunden ist — wobei es nicht ausschlaggebend sein soll, ob die Bazillen im Körper tuberkulöse Veränderungen hervorrufen oder nicht — stellten Calmette und Guérin durch 13jährige Fortzüchtung eines ursprünglich virulenten bovinen Tuberkelbazillenstammes auf einem Rindergalle-Glyzerinkartoffelnährboden einen Impfstoff, die B.C.G.-Kultur, dar.

Durch diese fortgesetzte Züchtung soll dieser Stamm vollkommen apathogen und avirulent geworden sein. Das Verhalten des B.C.G. im Organismus sei das eines obligaten Saprophyten, der nicht befähigt ist, seine Virulenz zu steigern, weshalb seine Ausscheidung aus dem Körper und seine Verstreuung keinerlei Gefahr mit sich bringe. Die einzige Impfreaktion bestehe in der Bildung einer nuß- bis hühnereigroßen Geschwulst an der Impfstelle, die nach 10—18 Monaten zurückgebildet ist. Irgendwelche tuberkulöse Veränderungen konnten von Calmette und Guérin nicht beobachtet werden; Rinder vertrugen 100 mg der B.C.G.-Kultur ohne zu erkranken.

Diese Behauptungen von Calmette und dessen Mitarbeiter erwiesen sich bei Nachprüfungen durch verschiedene Autoren als unrichtig.

Kraus und Gerlach gelang es, an großen Reihen von Kaninchen und Meerschweinchen durch intravenöse oder intraperitoneale Einverleibung von höheren Dosen (22—20 mg) der B.C.G.-Kultur pathologische Organveränderungen hervorzurufen, die schon makroskopisch als typische tuberkulöse Läsionen angesprochen werden mußten. Am häufigsten betrafen sie Netz, Leber, Milz, Lymphknoten und Lunge. Auch säurefeste Stäbchen ließen sich in diesen Herden leicht nachweisen. Histologisch handelte es sich um kleine Knötchen mit allen Kennzeichen typischer Tuberkel: mit epitheloiden Zellen, zentraler

Nekrose (Verkäsung) und Riesenzellen. Diese Veränderungen konnten bei Tieren, die 3—4 Wochen nach der B.C.G.-Impfung getötet wurden oder spontan zugrunde gingen, festgestellt werden. Wurden die Versuchstiere erst nach längerer Zeit getötet (nach 60 Tagen), so ließen sich nur noch an einzelnen Stellen des Netzes kleine Knötchen finden, die von derber, fibröser Beschaffenheit waren und keine Verkäsung zeigten. Erfolgte die Tötung der Tiere nach drei Monaten oder noch später, z. B. nach einem Jahre, so war makroskopisch keine Spur von tuberkulösen Veränderungen mehr zu sehen. Dieselben Resultate bekam Gerlach bei der B.C.G.Impfung von Kälbern. Eins der Impfkälber, dem sofort nach der Geburt subkutan und intravenös je 55 mg B.C.G. eingespritzt worden waren, bekam an der subkutanen Impfstelle einen Abzeß, der sich nahezu vollkommen zurückbildete. Bei der nach 7 Monaten erfolgten Tötung fanden sich keine tuberkulösen Veränderungen. Ebenso erwies sich das Kalb einer tuberkulösen Kuh, das sofort nach der Geburt 3mal je 50 mg B.C.G. per os erhalten hatte, bei der Sektion nach 5 Monaten als tuberkulosefrei.

Die Versuche von Selter und Blumenberg stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Kraus, nur konnten diese Autoren eine so rasche Rückbildung der Krankheitsherde nicht bemerken — auch noch später als 5½ Monate post infectionem waren tuberkulöse Veränderungen nachweisbar. Ebenso verliefen die Versuche von B. Lange und Lydtin bei Meerschweinchen, Kaninchen und Rindern. Bei diesen Tieren führte die Impfung mit B.C.G. zu einer tuberkulösen Infektion, die jedoch in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle klinisch gutartig verlief. L. Lange und Clauberg versuchten durch Resistenzschwächung der Tiere (Meerschweinchen) mittels Kälte, Staubinhalationen, Hunger, Vitaminmangel, Diphtherietoxin, Mischinfektion und Schwangerschaft die Pathogenität des B.C.G.-Stammes relativ zu steigern. Die Bemühungen verliefen negativ.

Mouriquand und Bertoye erzeugten bei Kaninchen Skorbut durch Vitaminmangel — einen Zustand, der zu ganz rapider Tuberkuloseausbreitung bei Einimpfung virulenter Stämme führte — die Infektion der Tiere mit B.C.G. verlief gutartig. Nasta ließ 2 Versuchsserien von Kaninchen 5 mg B.C.G. inhalieren. Die Tiere kamen zwischen dem 7. und 370. Tage zur Sektion. Es zeigte sich, daß die in den ersten Wochen nachweisbaren scharf abgegrenzten Herde weiterhin ohne Residuen bzw. bis auf spärliche Narben ausheilten; in dem einen oder anderen Falle fanden sich nach 340 Tagen noch ein oder zwei stecknadelkopfgroße, scharf abgegrenzte Abszesse. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen eine ganze Reihe anderer Autoren (Schuckmanns-Steekhoven, Tarassewitsch, Zechnowitzer, Korschun, Remlinger und Bailly, Elbert, Gelbert und Zouckermann und andere). Es geht somit aus diesen Versuchen hervor, daß der B.C.G.-Stamm dieselben Veränderungen im Organismus hervorzurufen imstande ist, wie sie auch andere TB. erzeugen. Nur sind diese Veränderungen gegenüber solchen, die von pathogenen TB. ausgelöst werden, gutartiger Natur — es kommt zum vollständigen Verschwinden des Prozesses — zur Ausheilung. Was die allgemeinen Störungen betrifft, so spielt, wie die Versuche verschiedener Autoren ergaben, die Art der Einverleibung eine wichtige Rolle. Die subkutane oder intraperitoneale Applikation wird besser als die intravenöse vertragen; die Tiere werden durch die B.C.G.-Impfung meist nur krank (Gerlach, Korschun u. a.); die Krankheit kann aber auch ungünstig verlaufen (Lange und Lydtin) und den Tod herbeiführen.

Großes Interesse riefen die Mitteilungen von Calmette, Guérin und ihrer Mitarbeiter über die günstigen Erfolge, die durch Vorbehandlung von Laboratoriumstieren und Jungrindern mit B.C.G. gegen nachträgliche Infektion

mit virulenter Tbc.-Kultur erzielt wurden, hervor. In verschiedenen Ländern ist das Calmettesche Schutzimpfverfahren von einer ganzen Reihe von Autoren nachgeprüft worden. Die Ergebnisse liegen jetzt in großer Zahl vor.

Ascoli konnte bei Ziegen und Kälbern nach Vorbehandlung mit B.C.G. einen Schutz gegen Reinfektion mit virulenten Bazillen erzielen. Gerlach hat zahlreiche Kälberimpfungen in tuberkulösen Beständen vorgenommen. Superinfektion mit virulenten TB. ließen einen gewissen Schutz der mit B.C.G. geimpften Tiere erkennen, da diese später und in geringerem Grade tuberkulöse Veränderungen als die Kontrollen aufwiesen. Nach den Versuchen von Agally, Obuchowski und Stepanenko zeigten die mit B.C.G. vakzinierten Kälber in einigen Versuchsreihen eine ausgesprochene Resistenz gegenüber der künstlichen Tb.-Infektion im Vergleich mit den Kontrollen; in anderen Versuchsreihen dagegen konnte auch bei den Kontrollen eine gewisse Resistenz nachgewiesen werden. Die Virulenz des zur Nachimpfung verwendeten Tb.-Stammes scheint daher nicht sehr groß gewesen zu sein. Eine ziemlich hohe Widerstandskraft gegen eine nachträgliche Infektion beobachtete Obuchowski und Paschkowski bei mit B.C.G. geimpften Kälbern. Die Kontrolltiere verendeten in kurzer Zeit an tuberkulöser Kachexie (dauerndes Fieber, ausgedehnte Miliartuberkulose der Lungen), die geimpften blieben bis zur Schlachtung am Leben, zeigten nach der Infektion normale Temperaturen und bei der Sektion nur geringfügige tuberkulöse Veränderungen. L. Lange und Clauberg immunisierten 10 Kälber mit 50—300 mg B.C.G. subkutan, und nach 65 Tagen infizierten sie die Tiere mit 10 mg virulenter Rindertuberkelbazillenkultur intravenös. 4 Tiere starben in 20—94 Tagen an Tbc., die übrigen 6 Tiere dagegen überlebten die Infektion. Sämtliche 10 Kontrollen gingen 17—27 Tage nach der Infektion an Tbc. zugrunde. Rankin infizierte intravenös mit 5 mg bovinen TB. (Stamm Vallée) 25 Kälber 1 Jahr nach der B.C.G.-Schutzimpfung zusammen mit 25 ungeimpften Kontrollen. Von den 25 Kontrollen starben 6 innerhalb 2 Monaten an allgemeiner Tbc., 16 wurden nach 2½ bzw. 3½ Monaten getötet und wiesen tuberkulöse Herde auf; ein Tier war zweifelhaft; 2 gingen interkurrent ein. Von den mit B.C.G. geimpften Tieren starb eines an allgemeiner Tbc., 4 wiesen bei der Tötung eine oder wenige abgeheilte Tuberkel auf; 19 zeigten bei der Tötung nach 105 Tagen nur mikroskopisch deutliche Prozesse in den Drüsen; 5 waren makro- und mikroskopisch frei. In einem weiteren Versuch wurden 25 mit B.C.G. geimpfte Kälber und 25 Kontrollen in Berührung mit einer tuberkulös durchseuchten Herde gebracht und mit tuberkelbazillenhaltiger Milch gefüttert; beides 3 Monate nach der Impfung für die Dauer von etwa 8 Monaten. Nach dieser Zeit wurden die überlebenden Tiere getötet. Von den Kontrollen wiesen 72 Proz. tuberkulöse Prozesse auf, 28 Proz. waren ma- und mikroskopisch frei. Von den mit B.C.G. geimpften Tieren waren 68 Proz. völlig frei, 32 Proz. wiesen minimale, nicht progressive Herde auf. Westenrijk immunisierte Hunde intrapleural mit B.C.G. (20 bis 50 mg) und infizierte sie einen Monat später endobronchial, intravenös, bzw. subkutan mit dem Stamme Vallée. Von 11 vorbehandelten Hunden blieben 7 gesund, 3 schienen TB.-verdächtig. Bei 2 von ihnen wurde durch Organweiterimpfung auf Meerschweinchen Tuberkulose erzeugt. Ein Hund zeigte geringe tuberkulöse Veränderungen der Lungen. Von 8 Kontrollen zeigten 5 mehr oder weniger ausgesprochene Lungentuberkulose. 1 Hund war verdächtig und 2 gesund.

Schimpansen und Cercopitheken vermochte Wilbert mittels einer einzigen subkutanen Impfung von 50 mg B.C.G. oder durch 5 Fütterungen von je 50 mg in 2tägigen Intervallen gegen tuberkulöse Spontaninfektion auf die Dauer eines

Jahres zu schützen. Während von den 20 Kontrollen 19 an Tbc. starben und nur eine vorzeitig an Pasteurellose, ohne tuberkulöse Veränderungen, einging, zeigte keiner der mit B.C.G. vorbehandelten Affen bei der Sektion tuberkulöse Herde. Die subkutane Impfung von 30 und 50 mg B.C.G. setzt bei Macacus rhesus nach Gerlach und Kraus eine Immunität gegen eine nachfolgende tuberkulöse Infektion, sowohl mit Typus humanus als auch mit Typus bov. Während die nichtvorbehandelten Kontrollaffen bereits nach 3—5 Wochen an der Infektionsstelle Primäraffekte mit heftiger entzündlicher Reaktion und fortschreitendem geschwürigen Zerfall aufwiesen, zeigten die mit B.C.G. subkutan vorbehandelten Affen keine Neigung zur Exulzeration und Fortschreiten des Prozesses; es kam nur zur Bildung eines stationären linsengroßen Infiltrates. Die Tötung der Tiere, 3 Monate nach der Infektion, ergab bei den Kontrollen schwere tuberkulöse Veränderungen in allen Organen, während bei den vakzinierten Affen eine Ausbreitung über die Impfstelle hinaus nicht festgestellt wurde. In den Versuchen von Kirchner und Schnieder zeigten subkutan mit hoher B.C.G.-Dosis vorbehandelte Affen (Mamadryas-Paviane) eine einwandfreie, aber zeitlich sehr begrenzte Resistenzerhöhung gegenüber einer intrakutanen Infektion mit mittlerer Dosis eines virulenten Stammes. Selter und Blumenberg konnten an 25 Meerschweinchen, die mit 5—30 mg B.C.G. subkutan vorbehandelt und nach 44 Tagen nebst 6 Kontrollen mit je 0,001 mg virulenten bovinen Tuberkelbazillen infiziert waren, eine immunisierende Wirkung des Calmetteschen Impfstoffes nicht verkennen. Sie hat allerdings in keinem Falle ausgereicht, um die Reinfektion vollkommen abzuwehren, da stets tuberkulöse Veränderungen an der Reinfektionsstelle und den zugehörigen Drüsen festzustellen waren. In den meisten Fällen (17 von 25) war eine Ausbreitung darüber hinaus festzustellen. In den Versuchen von Tarassewitsch erkrankten die vakzinierten Meerschweinchen und Kaninchen nach ihrer Infektion mit humanen Bazillen genau so wie die Kontrollen, jedoch war die Erkrankung der vakzinierten Tiere leichter als die der unbehandelten. Beide Gruppen gingen zugrunde. Kirchner und Newton konnten bei subkutan mit B.C.G. vorbehandelten Meerschweinchen einen deutlichen Schutz gegenüber einer Infektion, die virulent und groß genug war, um bei den Kontrollen eine völlig gleichmäßige und ziemlich rasch verlaufende Impftuberkulose zu sichern, wahrnehmen. Regionäre Drüsenerkrankung der vakzinierten Tiere trat zuweilen erst nach 3 Monaten auf. Buschmann infizierte 3 Monate nach Beendigung der B.C.G.-Schutzimpfung Meerschweinchen mit 10^{-5} mg eines humanen TB.-Stammes. Während von den 15 Kontrollen 10 Tiere der Infektion erlagen, kam es bei keinem der schutzgeimpften Tiere zur Ausbildung einer tödlich verlaufenden Tuberkulose. Es zeigte sich ferner, daß zwischen Infektion und den ersten Zeichen einer sicheren Erkrankung bei den schutzgeimpften Tieren gegenüber den Kontrollen ein wesentlicher Unterschied in der Zeit, Intensität und Uebergreifen auf den übrigen Organismus bestand.

Okell und Parish beobachteten bei subkutan mit B.C.G. vorbehandelten und mit virulenten humanen Bazillen in fallenden Dosen nachinfizierten Meerschweinchen stets ausgebreitete Tuberkulose, dabei aber besseren Ernährungszustand und längere Lebensdauer als bei den Kontrollen. B. Lange und Lydtin schließen aus ihren eigenen Versuchen, daß die Meerschweinchen insofern einen Schutz bekommen als eine intrakutane und aerogene Infektion milder verläuft als bei nicht vorbehandelten Tieren. Der erzielbare Schutz ist quantitativ und zeitlich begrenzt. Die Wirkung tritt am stärksten bei Verwendung kleinster Mengen eines nicht ganz vollvirulenten Tuberkelbazillenstammes zur Infektion hervor, erlischt aber auch unter dieser Bedingung nach einer gewissen Zeit. Beim Kaninchen dagegen war eine derartige Wirkung nur nach intravenöser

Vorimpfung mit B.C.G. zu erkennen. Schürmann stellte an Meerschweinchen fest, daß eine Änderung im Ablauf einer virulenten Infektion durch vorherige B.C.G.-Impfung erfolgen kann, wenn die Infektionsdosis virulenter Tuberkelbazillen höchstens 10mal größer ist als die Menge des betreffenden Stammes, die ein Meerschweinchen eben noch krank macht. Geht man über die angegebene Dosis hinaus, so werden die Unterschiede im Grade der Tuberkuloseausbildung immer geringer.

Diesen verhältnismäßig günstigen Erfolgen stehen Untersuchungen gegenüber, welche die immunisierende Wirkung der B.C.G.-Kultur nicht finden konnten. Bei 2 von B. Lange und Lydtin subkutan mit B.C.G. vorbehandelten Rindern war keine Änderung des Ablaufes der folgenden intravenösen Infektion mit virulenten TB. im Vergleich mit den Kontrollen festzustellen, nicht einmal gegenüber einer Infektion, die für die Kontrollen nicht in allen Fällen tödlich war. Ein intravenös mit B.C.G. geimpftes Tier zeigte gegen eine schwache Infektion offenbar einen „Schutz". In einer neueren Arbeit teilen B. Lange und Wethmar mit, daß es ihnen in einem Versuch an neugeborenen Kälbern und in einem andern an neugeborenen Schafen nicht einmal gegenüber einer relativ schwachen intravenösen Infektion gelang, einen hinreichend starken Schutz zu erzielen. Auch die Vorbehandlung auf subkutanem Wege versagte bei einem Teil der Tiere ganz, trotz Anwendung einer relativ schwachen Prüfungsinfektion. Bei der Mehrzahl der Tiere war sie aber in den mit solch schwacher Infektion angestellten 4 Versuchen von Erfolg: 2 von 3 Rindern, 4 von 6 Schafen überstanden die für die Kontrollen sicher tödliche intravenöse Infektion. Frei von Tuberkulose waren allerdings diese Tiere, als sie mehrere Monate nach der Infektion in gutem Gesundheitszustand geschlachtet wurden, auch nicht. 3 Schafe wiesen sogar eine mäßig ausgedehnte, aber „augenscheinlich" in Heilung begriffene Miliartuberkulose der Lungen auf. In den Schutzversuchen mit Anwendung einer stärkeren intravenösen Infektion trat eine Immunität der subkutan-schutzgeimpften Schafe ebensowenig hervor wie in dem Schutzversuch an Rindern. Korschun und Dwižkow haben 2 Kälbern per os und 2 subkutan 50 mg B.C.G.-Kultur eingeführt und sie dann intravenös mit dem Stamme Vallée infiziert. Es traten spezifische tuberkulöse Veränderungen auf, zuweilen recht intensiver Art. Chiari, Nobel und Solé konnten außer einer meist längeren Lebensdauer der B.C.G.-Tiere keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen feststellen. Auch bei Affen erwies sich nach Zechnowitzer die Vakzinierung als unwirksam. Ebenso konnten Kalbfleisch und Nohlen in Versuchen an 22 B.C.G.-vakzinierten Affen, die sie nach der von Wilbert angegebenen Anordnung in Käfige setzten, in denen sich mit humanen virulenten TB. geimpfte Affen und nichtgeimpfte Kontrollen befanden, keinen Unterschied im Ablauf der Spontantuberkulose zwischen B.C.G.-Affen und Kontrollen erkennen.

Igersheimer und Schlossberger konnten bei einer Reihe von Meerschweinchen, die mit 0,1 mg B.C.G. in die Vorderkammer des einen Auges geimpft wurden, einen gewissen Schutz am anderen Auge gegen eine Reinfektion mit 0,005 mg Bazillen des Typ. humanus, die 3½ Monate später erfolgte, feststellen. Der Prozeß bei den vorbehandelten Tieren war viel weniger schnell progredient und verhielt sich in den meisten Fällen auch im Endeffekt viel weniger maligne als bei den Kontrollen. Auch bei zwei weiteren Versuchsreihen von Tieren, die ein oder zweimal mit 20—25 mg B.C.G. stomachal vorbehandelt waren und einige Monate später mit 10^{-3} mg Tb. Typ. humanus in die Vorderkammer nachgeimpft wurden, war ein „sehr beachtenswerter Impfschutz zu verzeichnen". Während bei den Kontrolltieren der Prozeß ungemein progredient verlief und nach einem Monat bereits zur Perforation

der Hornhaut geführt hatte, während auch die inneren Organe bereits nach einem Monat erhebliche tuberkulöse Veränderungen aufwiesen, verlief bei den stomachal vorbehandelten Tieren die Erkrankung am Auge wie am sonstigen Körper sehr viel milder. Auch bei einer Versuchsreihe mit intraperitonealer B.C.G.-Vorbehandlung und Reinfektion am Auge war eine Schutzwirkung zu verzeichnen. Ausnahmsweise blieben auch vorbehandelte Tiere gegenüber der Nachimpfung ungeschützt.

J. Cantacuzène und seine Mitarbeiter berichten, daß bei ihren B.C.G.-Tierversuchen die allgemeine Sterblichkeit von Meerschweinchen durch B.C.G.-Impfung nicht erhöht wurde. Subkutane Einverleibung der B.C.G. führte häufig zur Abszeßbildung an der Impfstelle, zuweilen auch zur Verkäsung von Inguinal- und Leistendrüsen. Intraperitoneale Impfung verursachte gelegentlich Abszeßbildung am Netz. In dieser fanden sie einmal noch nach 7 Monaten gut säurefeste B.C.G., die aber im Kulturverfahren nicht anwuchsen. Bei Kaninchen ergab intraperitoneale B.C.G.-Impfung des öfteren Milzvergrößerung. Alle Impftiere wiesen Generalisation der Bazillen in den verschiedenen Körperorganen auf; oft fanden sich in den Organen Zellen, die mit Säurefesten vollgestopft waren, aber niemals Tuberkelbildung. Die Heiltendenz und mangelnde Progredienz der Impfschäden war unverkennbar. Es gelang auf keine Weise, die Impfherde zu aktivieren. Mit B.C.G. vorbehandelte Meerschweinchen zeigten gegenüber nachfolgender Impfung mit virulenten Tuberkelbazillen eine geringe Erhöhung der Resistenz; während z. B. die Kontrollen nach 5 Monaten an allgemeiner Tuberkulose eingingen, erreichten die vorbehandelten Tiere bei gleichstarker Infektion mit virulenten TB. eine Lebensdauer von 6 Monaten.

Ende März 1928 bezogen wir von der Tiergroßhandlung Ruhe in Alfeld 24 Rhesus-Affen, welche eben frisch importiert waren. Wir waren uns wohl bewußt, daß wir bei Bezug frisch importierter Affen einen größeren Verlust an Tieren, welche die Akklimatisierung nicht vertrugen, zu beklagen haben würden, hatten aber andererseits dabei den Vorteil, daß wir mit großer Wahrscheinlichkeit tuberkulosefreie Versuchstiere erhielten, da bei der Unterbringung in unserem Affenhaus eine Stallinfektion ausgeschlossen war. Nach 14tägiger Eingewöhnung der zunächst sehr ungebärdigen Ankömmlinge prüften wir durch intrakutane Tuberkulingabe auf Freisein von Tuberkuloseinfektion.

Da die Affen der Fesselung den größten Widerstand entgegensetzten und durch das gewaltsame Festhalten in größte, auch längere Zeit nachwirkende Aufregung gerieten, fanden wir in der Anwendung einer subkutanen bzw. intramuskulären Pernocton-Injektion ein sehr zweckmäßiges Hilfsmittel. Wir gingen in der Weise vor, daß wir mit dem Kescher das betreffende Tier zudeckten und mit der bereitgehaltenen gefüllten 1-ccm-Injektionsspritze durch eine Netzlücke hindurch an irgendeiner passenden gerade vorliegenden Stelle unter die Haut oder auch in den Muskel injizierten. Wir ließen das Tier dann sofort wieder springen, um an den übrigen in Betracht kommenden Versuchstieren die gleiche Impfung vorzunehmen. Wir injizierten anfangs 1,0, später nur noch 0,3 ccm, eine Menge, die auch schon ausreichte. Nach der Freigabe aus dem Kescher sprangen die Tiere ohne besondere Zeichen von Erregung — die ganze Impfung nimmt etwa ½ Minute in Anspruch — wieder auf ihren Kletterbaum, begannen aber schon nach etwa 10 Minuten einzunicken. Sie kämpften sichtlich mit dem Schlaf und waren dabei sehr friedlich; wenn man sie

nicht schleunigst — ohne besondere Schutzmaßregel, nur mit gewöhnlichem Lederhandschuh bekleidet — von ihrem Sitze herunterholte, so fielen sie in wenigen Minuten tief schlafend herunter und schliefen auf dem Boden des Käfigs weiter. Der tiefe Schlaf hielt ungefähr, je nach Dosis, ½—1 Stunde an und man konnte wie an einem narkotisierten Tier alle nötigen Eingriffe in Ruhe vornehmen. Nach der Impfung wurden die Tiere in ihren Käfig gelegt und zeigten beim Erwachen keinerlei Erregung.

Wir prüften mit Bovo-Tuberkulin, und zwar gaben wir von einer Verdünnung (1:1) 0,1 ccm intrakutan auf der einen Seite und an der korrespondierenden Stelle der anderen Körperhälfte 0,1 ccm Nährbouillon, die 1:10 eingedichtet war. Bei einer ersten Gruppe von 4 Tieren wählten wir als Impfstelle die Augenbrauengegend, nahmen dann aber bei den folgenden Tieren die Innenseite des Oberschenkels, weil hier die Haut weniger pigmentiert ist, Reaktionserscheinungen infolgedessen besser erkannt werden konnten und außerdem Kontusionen der Impfstelle durch Widerrennen oder durch die Kescher so gut wie ausgeschlossen waren. Alle 24 Affen zeigten keine Tuberkulinreaktion, und in Uebereinstimmung damit fanden wir auch späterhin bei den Sektionen keinen Affen tuberkulös, der nicht vorher von uns mit Tuberkulose infiziert war[1]). Leider ging uns eine ganze Anzahl der Tiere schon vor der Immunisierung mit B.C.G. (mit der wir am 30. IV. 28 einsetzten) spontan zugrunde.

Die so verendeten Tiere wiesen neben geringen Durchfallerscheinungen und mäßiger Abmagerung hämorrhagische Veränderungen der vergrößerten Darmdrüsen (alte Blutherde neben frischen Blutungen) auf. Die Körperorgane waren im übrigen makroskopisch gesund; in Blut und Drüsen keine pathogenen Bakterien; auch im Darminhalt insbesondere keine pathogenen Darmbakterien. Ein Tier ging an Peritonitis zugrunde; ausgedehnte Verwachsungen in der Bauchhöhle und durchgebrochener Eiterherd in der Blinddarmgegend.

Wir stellten Ende April für die B.C.G.-Immunisierung 3 Gruppen zu je 4 Immuntieren und je 1 Kontrolltier zusammen. Wie aus der tabellarischen Uebersicht zu ersehen, verendeten aber bis zum Tage der Infektion von Gruppe II zwei Immuntiere und die Kontrolle, von Gruppe III ein Immuntier und die Kontrolle, so daß tatsächlich nur 10 Tiere zur Tuberkuloseinfektion kamen, und Gruppe II und III ohne Kontrolltiere waren. Letzteres hatte, wie sich nachträglich herausstellte, nichts zu bedeuten, da nach dem Ausfall der Gesamtgruppe an der Wirksamkeit der Tbc.-Infektion kein Zweifel sein konnte. Zur Erläuterung der Uebersichtstabelle sei folgendes angeführt:

Unsere B.C.G.-Kultur war ein Originalstamm, den uns Herr Calmette gütigerweise überlassen hatte und wurde mit Einschaltung von Galle-Kartoffelpassage auf Glyzerinkartoffel gehalten.

Für die Immunisierung verwendeten wir Kulturmasse entweder von Glyzerin-Kartoffel oder von Bouillonkultur, nach Abpressen zwischen Fließpapier

1) Wir waren uns dabei wohl bewußt, daß bei Affen die Tuberkulinreaktion vielfach als unsicheres Diagnostikum angesehen wird.

gewogen. Die Verreibung der Kulturmasse erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung. Wir versuchten die B.C.G.-Immunisierung durch Eingeben der B.C.G.-Emulsion mittels Schlundsonde in den Magen. Die Einführung der halbweichen Sonde während des Pernocton-Schlafes hatte keinerlei Schwierigkeiten. Das Alter der wild eingefangenen Tiere ließ sich nur ungefähr schätzen, jedenfalls handelte es sich durchgehends um erwachsene Tiere.

Da der Darm von Säuglingen zweifellos eine größere Durchlässigkeit für geformte und ungeformte Stoffe besitzt als der Darm des erwachsenen Individuums, und da von Calmette die orale B.C.G.-Immunisierung für Säuglinge empfohlen ist, trugen wir der Unsicherheit bzgl. der Altersbestimmung unserer Versuchstiere dadurch Rechnung, daß wir eine Gruppe, unter Anlehnung an die Besredkasche Oralimmunisierung gegen Typhus, mit B.C.G. Bazillen-Emulsion und Rindergalle immunisierten. — Weiterhin infizierten wir diese Gruppe I mit einer verhältnismäßig kleinen Dosis (0,01 mg) boviner Tuberkelbazillen am 10. Tage nach Beendigung der Immunisierung. Es war eine 10 Wochen alte, gut gewachsene Kultur auf Eiernährböden, die nach 14tägiger Bebrütung unter Paraffinverschluß aufbewahrt war. Die Virulenz war keine sehr große, doch zeigte das Verenden der Kontrolle Nr. 5, daß unsere Impfdosis in 5½ Monaten ein gesundes Kontrolltier mit generalisierter Tuberkulose zu töten vermochte.

Bei den folgenden Gruppen, die keine Galle erhielten, erhöhten wir jedesmal die B.C.G.-Einzeldosis, die Gesamtmenge und die Dauer der Immunisierung. Zur Infektion wählten wir jeweils ½ mg einer Bovinus- und einer Humanus-Kultur, eine Dosis, die erfahrungsgemäß ein Meerschweinchen von 300 g in 6 Wochen tötete.

Da wir von der oralen B.C.G. Immunisierung zum mindesten eine Resistenzerhöhung erwarteten, die Versuchsaffen auch mindestens das 6fache Gewicht unserer Versuchsmeerschweinchen aufwiesen, so glaubten wir mit 0,5 mg eine schwache, aber doch ausreichende Infektion zu setzen (s. Tab. I).

Epikrise: In dem ersten Versuch (Tier 1—5) erzielten wir durch orale Eingabe von B.C.G. zusammen mit Galle bei Tier Nr. 3 höchstwahrscheinlich eine Resistenzerhöhung gegen Tuberkulose; wenngleich das Tier vor der Kontrolle zugrunde ging, so zeigte es doch 118 Tage nach der Infektion nur eine tuberkulöse Geschwürbildung an der Impfstelle und Tuberkulose der zugehörigen (axillaren) Lymphdrüsen, kein makroskopisches Uebergreifen der Erkrankung auf innere Organe. Bei Tier 2 kann ebenso eine Resistenzerhöhung angenommen werden. Das Tier verendete zwar am 218. Versuchstage an Tuberkulose, aber immerhin 50 Tage später (25 %) als das Kontrolltier, und zudem fanden wir im Gegensatz zu der ausgedehnten floriden Tuberkulose der Kontrolle weniger und kleinere Herde, die offenbar zum Teil in Vernarbung und Ausheilung begriffen waren. Das Tier 4 endlich blieb trotz subkutaner Tbc.-Infektion gesund; es wurde nach 500 Tagen getötet und zeigte keinen Tbc.-Herd an der Impfstelle und keine Tuberkulose der Drüsen oder inneren Organe. An den Lungen waren einige bindegewebige Herde, keine Verkäsung, keine Tuberkelbazillen.

Die Versuche II (Affe Nr. 6—8) und III (Affe Nr. 11—14) verliefen, wie gesagt, ohne Kontrolle, gleichwohl ist aus ihnen zu entnehmen, daß 6malige

Tabelle
B.C.G.-Immunisierung

Affe Nr.	Art der B.C.G.-Immunisierung	Gewicht 30. 4. 1928	Gewicht 16. 5. 1928	Infektion 16. 5. 1928, 17 Tage nach Beginn, 9 Tage nach Beendigung der Immunisierung	Gewicht 12. 6. 1928	Gewicht 18. 9. 1928	Gewicht 8. 11. 1928
1	30. 4. 1928 und 2. 5. 1928	2230	1900	0,01 mg Tbc. bovin.	—		
2	je 100 mg B.C.G. oral. —	2300	2150	in 1,0 NaCl-Lösg.	2490	2320	2475
3	Am 5. und 7. 5. jeweils	2350	2700	subkutan r. Brust-	1770	—	
4	150 mg zusammen mit je 6 ccm Rindergalle. Sa.: 0,5 g B.C.G.	2230	2750	seite	2900	3190	3375
5	Kontrolltier		2400	16. 5. 1928	2000	1910	—

Affe Nr.	Art der B.C.G.-Immunisierung	Gewicht 1. 5. 1928	Gewicht 1. 6. 1928	Gewicht 28. 6. 1928	Infektion 17. 7. 1928, 47 Tage nach Beginn, 17 Tage nach Beendigung der Immunisierung	Gewicht 17. 7. 1828	Gewicht 4. 8. 1929
6	1. 5. 1928 und 3. 5. 1928 je	2070	2170	—	0,5 mg Tbc. bovin.	—	—
7	150 mg B.C.G. oral; eben-	2010	2120	2050	in 1,0 NaCl-Lösg.	—	—
8	so am 1. 6. und 4. 6. 1928;	2050	2420	2450	subkutan l. innere	1950	1750
9	— ebenso am 28. 6. und 30. 6. 1928. Im ganzen: 0,9 g pro Tier	2050	2020	2230	Schenkelfläche; 0,1 ccm = 0,05 mg intrakut. r. innere Schenkelfläche	2350	2200
10	Kontrolltier	1950	2000	1950			

Affe Nr.	Art der B.C.G.-Immunisierung	Gewicht 2. 5. 1928	Gewicht 28. 6. 1928	Infektion 17. 7. 1928, 76 Tage nach Beginn, 14 Tage nach Beendigung der Immunisierung	Gewicht 17. 7. 1928	Gewicht 4. 8. 1928
11	2. 5. und 4. 5. 1928, ebenso am	2240	—	0,5 mg Tbc. human. in	—	—
12	1. 6. und 4. 6. 1928, ebenso	2240	1930	1,0 NaCl-Lösg. subkut.	1720	1850
13	am 30. 6., 3. 7. 1928 je 250 mg	2250	2930	linke innere Schenkel-	2770	2750
14	B.C.G. oral. Im ganzen: 1,5 g pro Tier	2280	2130	fläche: 0,05 mg intra- kutan innen rechts	1800	1930
15	Kontrolltier	2200	2150			

Zeichenerklärung: ++ sehr stark; + deutlich; ⊥ wenig deutlich; ⌞ wenig; ⊢ sehr

Fütterung mit je 150 mg B.C.G. und ebenso 6malige Fütterung mit je 250 mg B.C.G. keinen Schutz gegen nachträgliche Infektion mit bovinen oder humanen Bazillen verleiht und die Zeit, innerhalb der die Infektion zum Tode des Versuchstieres führte (spätestens 4 Monate) läßt mit Rücksicht auf Dosierung und Virulenz des Impfstoffes (cf. Versuch I) auch keine merkliche Resistenzerhöhung annehmen.

Um die immunisierende Wirkung einer B.C.G.-Vorbehandlung gegen nachträgliche Infektion mit virulenten Tuberkelbazillen weiterhin festzu-

I.
von Affen gegen Tbc.

Verendet am	Lebenstage nach der Infektion	Sektionsbefund	Tuberkulose
26. 5. 1928	10	Keine Tuberkulose. Tod durch Unfall	0
20. 12. 1928	218	Organtuberkulose mit stellenweiser Ausheilung	⌞
11. 9. 1928	118	Nur lokalisierte Tuberkulose der Impfstelle und r. Axilla	⊢
28. 9. 1929	500	Alte Lungenherde, keine Tuberkulose; getötet	0
30. 10. 1928	167	Ausgebreitete Tuberkulose	+

Verendet am	Lebenstage nach der Infektion	Sektionsbefund	
22. 6. 1928	—	—	0
16. 7. 1928	—	—	0
15. 8. 1928	29	Ausgebreitete Tuberkulose	+
6. 9. 1928	51	Ausgebreitete Tuberkulose	+
10. 7. 1928	—	Darmerkrankung	

Verendet am	Gewicht 8. 11. 1928	Lebenstage nach der Infektion	Sektionsbefund	
13. 7. 1928	—	—	—	0
5. 10. 1928	—	80	Ausgebreitete Tuberkulose	+
13. 11. 1928	2375	119	Ausgebreitete Tuberkulose	+
9. 10. 1928	—	84	Ausgebreitete Tuberkulose	+
7. 7. 1928			Darmerkrankung	

wenig; 0 oder — fehlend; A Ausstrich.

stellen, unternahmen wir sodann eine größere Reihe von Versuchen an Meerschweinchen. In einem ersten Versuche — siehe Tabelle II. — immunisierten wir 10 Meerschweinchen durch intraperitoneale und 9 durch subkutane einmalige Injektion von je 50 mg B.C.G. von 14tägiger Glyzerinkartoffelkultur. Die intraperitoneale Impfung wurde schlecht vertragen. Innerhalb der 10 Wochen, welche wir nach der B.C.G.-Vorbehandlung verstreichen ließen, ehe wir die Inhalationsinfektion mit virulenten bovinen

Tabelle II. B.C.G.-Meerschweinchenversuch.

Nr.	Immunisierung	Verluste während der Immunisierung	Gewichte am 31. 5. 1928	Gewichte am 3. 8. 1828	Inhalationsinfektion am 3. 8. 1928	Tod am	Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund	Bemerkungen zum Sektionsbefund
71			300	290		11. 8. 28	8	—	Abszeß in der Bauchhöhle mit zum Teil säurefestem Detritus; nicht tuberkulöse Bronchitis
72	31. 5. 28 50 mg B.C.G. in 0,3 ccm NaCl-Lösung intraperitoneal	† 20. 6. 28	290	—	33 mg Tbc. bov. in 50 NaCl-Lösung	get. 24. 9. 28	—	⊕	Peritoneale Adhäsionen; verkäste Darmdrüsen mit einzelnen (B.C.G.?) säurefesten Bazillen. Tod an unspezifischer hämorrhagischer Bronchitis
73			300	300		—	52	+	
74		† 4. 6. 28	250	—		14. 8. 28	—	⊕	
76			270	340			11	⊕	
77			270	290		11. 8. 28	8	⊕	
78		† 28. 6. 28	300	—		—	—	⊕	
79		† 10. 7. 28	250	—		—	—	⊕	
80		† 25. 7. 28	300	—		—	—	⊕	
81			280	220		4. 9. 28	32	+	Tbc.-Baz. in der vergrößerten Hilusdrüse; sonst wie Nr. 84
82			270	250	66 mg Tbc. bov. in 100 NaCl-Lösung	20. 8. 28	17	⊕	Bronchitis
83			300	390		get. 24. 9. 28	52	+	Hilusdrüse vergrößert mit ⊥ Tbc.- Baz. im Ausstrich. Hämorrhag. Bronchitis. Milz: klein, ohne Tbc.
84			280	250		20. 8. 28	17	+	
85	31. 5. 28 Dieselbe Impfung, aber subkutan		285	340		get. 24. 9. 28	52	+	
86			310	370		get. 24. 9. 28	52	+	
87			210	—		—		⊕	
88		† 13. 6. 28	300	440	Kontrollen ohne Infekt.	get. 13. 9. 28	41	⊕	Milz etwas vergrößert. A.: —
89			350	420		get. 13. 9. 28	41	⊕	
423	Kontrolltiere ohne Vorbehandlung			290	33 mg Tbc. bov. in 50 NaCl-Lösung	2. 9. 28	30	+	Lungen und Milz mit kleinsten Tuberkelknötchen. A.: +
424				270		3. 9. 28	31	+	
425				290		4. 9. 28	32	+	
427				270		1. 9. 28	29	+	
429				290		17. 8. 28	14	⊕	
421				320	66 mg Tbc. bov. in 100 NaCl-Lösung	3. 9. 28	31	+	Hilusdrüse: Tbc. +. An den Lungen ⊥ eben erkennbare Knötchen. Milz: klein — Tuberkulose der Hilusdrüse. Hämorrhag. Bronchitis. Milz: klein. An den Lungen tuberkelverdächtige Pünktchen. A: —
422				300		2. 9. 28	30	+	
426				300		10. 9. 28	38	+	
428				300		21. 8. 28	18	+	
430				290		20. 8. 28	17	+	

Tuberkelbazillen den erreichten Immunitätsgrad prüften, starben 50 Proz. der intraperitoneal vorbehandelten Tiere und zeigten bei der Sektion Verwachsungen und Abszedierungen in der Bauchhöhle, die zum Teil noch durch den mikroskopischen Nachweis von B.C.G. mit Sicherheit auf die Vorbehandlung zurückgeführt werden konnten. Von den subkutan mit B.C.G. vorbehandelten Versuchstieren starb dagegen nur 1 interkurrent. Die Inhalationsinfektion mit bovinen Bazillen wurde in der in Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Ther. zu Frankfurt a. M., H. 22, 1929, S. 49 beschriebenen Weise durchgeführt. Bezüglich Dosierung siehe Tabelle.

Epikrise: Aus der ersten Infektionsgruppe gingen 3 Tiere: Nr. 71, 76, 77 und von den Kontrollen Nr. 429 vorzeitig an interkurrenten Krankheiten zugrunde, ohne daß es zur Entwicklung einer echten Tuberkulose gekommen wäre. Da bei diesen Tieren höchstens 14 Tage nach der Infektion verstrichen waren, so läßt sich mit Sicherheit nicht sagen, ob hierbei die Schutzwirkung der B.C.G.-Vorbehandlung zum Ausdruck kam. Die beiden noch übrig gebliebenen vorbehandelten Versuchstiere dieser Gruppe, Nr. 73 und Nr. 81, sowie die 4 Kontrollen 423—427, die länger am Leben blieben, gingen mit zweifellos tuberkulösen Veränderungen zugrunde. Von der zweiten vorbehandelten Gruppe, No. 82—87, verendeten 2 Tiere 17 Tage nach der Inhalationsinfektion. Das eine davon, Nr. 84, war zweiffellos tuberkulös, während bei Nr. 82 kein tuberkulöser Erkrankungsherd nachweisbar war. Die restlichen 3 Tiere dieser Gruppe, Nr. 83, 85 und 86 wurden nach 52 Tagen getötet und zeigten starke Schwellung und tuberkulöse Veränderung der Hilusdrüse, disseminierte Tuberkelknötchen beider Lungen und vereinzelte Tb.-Herde der Milz. Die zu dieser Gruppe gehörenden Kontrollen Nr. 421—430 starben zwischen 17 und 38 Tagen sämtlich mit tuberkulösen Veränderungen; 2 Kontrollen, Nr. 88 und 89, waren nur mit B.C.G. subkutan vorbehandelt, wurden aber nicht mit Tuberkelbazillen infiziert, um feststellen zu können, ob die subkutane Vorbehandlung mit B.C.G. allein nicht schon imstande wäre, in einigen Monaten den Gesundheitszustand unserer Meerschweinchen zu schädigen. Diese beiden Vorbehandlungskontrollen wurden nach 15 Wochen getötet und erwiesen sich bei der Sektion als gesund. Berücksichtigt man die Zeit, um welche die Versuchstiere die Infektion überlebten, so starben die Kontrollen der ersten Gruppe nach ungefähr 30 Tagen, während das einzige zum Vergleich brauchbare vorbehandelte Versuchstier Gruppe I: Nr. 73 am 52. Tage zwar tuberkulös, aber noch durchaus lebensfrisch erschien. Die Kontrollen der zweiten Gruppe starben auch verhältnismäßig früh, spätestens nach 38 Tagen, während von den vorbehandelten Versuchstieren der zweiten Gruppe: Nr. 83, 85 und 86 am 52. Tage nach der Infektion noch sehr lebenskräftig waren. Man darf also wohl im allgemeinen sagen, daß die mit B.C.G. vorbehandelten Meerschweinchen die Inhalation mit virulenten Tuberkelbazillen wesentlich besser vertrugen als die Kontrolltiere. Ein Schutz gegen nachträgliche tuberkulöse Infektion durch B.C.G.-Vorbehandlung kam in diesen Versuchen — Tabelle II — jedoch nicht zum Ausdruck.

Bei einer weiteren Gruppe von Meerschweinchen versuchten wir die Wirkung der oralen B.C.G.-Vorbehandlung auf eine nachträgliche Tuberkelbazilleninfektion festzustellen; da bei dieser Art der Vorbehandlung eine Immunisierung von erwachsenen Tieren von vornherein für zweifelhaft erachtet werden mußte, wählten wir 30 Saugmeerschweinchen zu einem Gewicht von etwa 80 g und fütterten diese (mit der Schlundsonde) jedes einmal mit

Tabelle III.

B.C.G.-Meerschweinchen-Versuch.

Meerschweinchen Nr.	Gewicht am 17. 8. 1928	Art der Vorbehandlung	Infektion 17. 8. 1928	Tod am	Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund	Linke Axillardrüse	Hilusdrüse	Lungen	Leber	Milz	Milz
556	390	Am 4. 6. 28 je 2,0 ccm von 2 g B.C.G. in 60 ccm NaCl = 67 mg B.C.G. Kartoffelkultur oral!	Tbc. hum. Nr. 16 auf Eier-Nährb. v. 27. 7. 28. 0,5 mg in 0,5 ccm NaCl subkut. linke Brust	get. 8. 1. 29	140	+	+	+	±	—	+	4,5/2 cm
558	420			get. 8. 1. 29	140	+	+	+	+	++	++	8,0/3,0 „
559	400			18. 9. 29	32	+	+	+	+	—	+	3,0/1,5 „
560	340			12. 11. 28	85	+	±	±	+	++	++	6,0/3,0 „
561	440			23. 8. 28	6	—						
562	340			12. 11. 28	85	+	±	±	++	—	+	4,5/2,0 „
563	340			get. 8. 1. 28	140	+	+	±	±	—	±	2,8/1,5 „
					D. = 104							
573	340	Kontrollen		26. 9. 28	38	++	+	±	±	—	+	3,5/2,0 „
574	300			1. 11. 28	43	++	+	±	+	—	+	3,0/2,0 „
577	300			24. 9. 28	36	+	++	±	+	—	++	4,0/2,0 „
578	300			25. 9. 28	37	wie 577						
580	350			28. 11. 28	71	++	+	±	+	—	++	6,0/,0 „
581	340			24. 9. 28	36	+	++	±	—	—	±	
583	300			11. 10. 28	55	++	+	+	+	+	++	6,0/3,0 „
					D. = 45							

etwa 60 mg B.C.G. von einer 14tägigen gut gewachsenen Glyzerinkartoffelkultur am 4. Juni (s. Tabelle III).

Obwohl die Einführung der Kultur mit der Schlundsonde ohne Schwierigkeit von statten ging, und die Tiere bei täglicher Milchzufütterung sich im allgemeinen gut entwickelten, verendeten 13 von den Versuchstieren innerhalb 6 Wochen zu verschiedenen Zeiten. Bei 2 Tieren, welche schon 2 Tage nach der B.C.G.-Vorbehandlung eingingen, konnten wir im Blinddarm und ebenso in einer vergrößerten Lymphdrüse an der Einmündungsstelle des Dünndarms in den Dickdarm massenhaft gut färbbare B.C.G. nachweisen. Bei einem Tier, das 5 Tage nach der Fütterung verendete, wurden im Blinddarm keine B.C.G. mehr gefunden, wohl aber noch in der oben erwähnten Drüse. Ein Tier, welches die Vorbehandlung 30 Tage überlebte, wies in der Leber mehrere verkäste Knötchen mit reichlich B.C.G. auf. Dieser Befund wurde nur einmal unter 30 Tieren erhoben; man könnte zu der Ansicht neigen, daß hier durch einen besonderen Zufall, vielleicht durch eine Verletzung bei der Sondeneinführung oder durch eine Einwanderung von B.C.G. durch den Lebergallengang, eine Infektion der Leber stattgefunden hat. Bei Meerschweinchen, die später als 30 Tage nach der B.C.G.-Fütterung verendeten, wurden zwar noch wiederholt vergrößerte Darmlymphdrüsen, besonders in der Gegend des Blinddarmansatzes, in diesen auch angedeutete Herdbildung, niemals aber B.C.G. mikroskopisch gefunden.

Man darf also wohl daraus schließen, daß bei den Saugmeerschweinchen eine anfänglich-haftende B.C.G.-Infektion nach 30 Tagen bereits ausgeheilt war, und aus diesem Umstand erklärt sich wohl auch das Haften der nachträglichen Tuberkuloseinfektion. Von den überlebenden B.C.G.-gefütterten Tieren wurden 7 Stück zusammen mit 7 nicht vorbehandelten Kontrollmeerschweinchen am 17. Aug., also nach 53 Tagen, subkutan mit Tuberkelbazillen Typ. hum. an der linken Brustseite infiziert.

Ein Versuchstier 561 verendete schon nach 6 Tagen ohne Tuberkulose. Das nächste Versuchstier 559 starb nach 32 Tagen und wies bereits ausgedehnte Tuberkulose auf. Alle weiteren hier eingehenden Tiere, sowohl Kontrollen wie vorbehandelte Meerschweinchen, gingen mit zweifellos tuberkulösen Veränderungen der meisten Organe zugrunde, und zwar die Kontrollen nach durchschnittlich 45 Tagen. Von den vorbehandelten Tieren lebten 3 bis zum 140. Tage nach der Infektion und wurden dann an diesem Termin zur Beendigung des Versuches getötet. Auch diese 3 erwiesen sich zwar bei der Sektion als tuberkulös, aber gleichwohl, selbst wenn wir die absichtlich getöteten Tiere als tuberkulös spontan verendet nehmen, erreichten die vorbehandelten Tiere ein Durchschnittslebensalter von 104 Tagen, also mehr als die doppelte Lebenszeit der Kontrollen. Es läßt sich also aus diesem Versuch sagen, daß mit B.C.G.-Kultur in größerer Dosis einmal gefütterte Saugmeerschweinchen eine weit größere Widerstandsfähigkeit gegen eine 7 Wochen später erfolgende Infektion mit einer massiven Dosis virulenter humaner Tuberkulbazillen besaßen als die zugehörigen Kontrollen; diese erhöhte Resistenz reichte jedoch nicht aus, um die Impftuberkulose ganz hintan zu halten.

Die restlichen 10 Saugmeerschweinchen, welche am 4. Juni 1928 mit je 60 mg B.C.G. prophylaktisch gefüttert worden waren, wurden am 18. Aug. 1928 zusammen mit 10 Kontrollmeerschweinchen durch Inhalation mit einer Aufschwemmung von bovinen Tuberkelbazillen infiziert.

Wie aus der Tabelle IV ersichtlich, verendeten die Kontrollmeerschweinchen durchschnittlich in 45 Tagen mit fast durchgehends schwerer Tuberkulose, besonders der Lungen. Die B.C.G.-vorbehandelten Tiere zeigten zwar, wenn wir von der vorzeitig verendeten No. 572 absehen, zuweilen vielleicht ein etwas leichteres tuberkulöses Krankheitsbild, verendeten aber gleichwohl in durchschnittlich 43 Tagen an generalisierter Tuberkulose, vornehmlich der Lungen.

Man kann daher nicht wohl in diesem Versuch von einer immunisierenden Wirkung der oralen einmaligen Vorbehandlung mit B.C.G. gegen nachträgliche Tuberkuloseinfektion sprechen.

In einem folgenden Versuche wurden 20 Meerschweinchen am 9. Aug. 1928 mit je 12 mg B.C.G.-Aufschwemmung (von 14tägiger Glyzerinkartoffelkultur) in 0,5 Kochsalzlösung intrapleural, rechts, vorbehandelt. 3 Tiere verendeten unmittelbar nach der Impfung. Die Infektion der Versuchstiere

Tabelle IV.

B.C.G.-Meerschweinchenversuch.

Meerschweinchen Nr.	Gewicht am 18. 8. 1928	Art der Vorbehandlung	Infektion 18. 8. 1928	Tod am	Tage nach der Infektion	Abdominaldrüse	Hilusdrüse	Lungen	Leber	Milz	Tuberkulosebefund
557	290	Am 4. 6. 1928 oral je 2 ccm von 2 g B.C.G. in 60 ccm NaCl-Lösung = 67 mg B.C.G.-Kartoffelkultur	Inhalation mit 100 ccm einer Suspension von Tbc. bov.-Kultur vom 30. 7. 1928. 40 mg verrieben in 160 ccm NaCl-Lösung	18. 9. 28	31	—	⊢	±	—	—	±
564	340			13. 9. 28	26	—	+	++	—	+	++
565	350			1. 10. 28	43	—	+	++	—	±	++
566	340			24. 10. 28	67	—	±	+	—	+	+
567	290			19. 9. 28	32	—	+	++	—	—	++
568	270			9. 10. 28	52	—	+	++	—	++	++
569	300			10. 11. 28	84	+	++	++	++	++	++
570	220			6. 9. 28	19	—	⊢	±	—	—	±
571	200			19. 9. 28	32	—	⊢	++	—	—	++
572	200			22. 8. 28	4	⊢	—	—	—	—	0
575	270	Kontrollen		18. 9. 28	31	—	+	++	—	+	++
576	240			25. 9. 28	38	—	+	++	—	+	++
579	240			12. 10. 28	55	—	+	++	—	++	++
582	270			25. 9. 28	38	—	+	++	—	±	++
584	270			4 10. 28	47	+	+	++	++	++	++
585	350			1. 10. 28	43	—	+	++	—	±	++
586	270			28. 9. 28	41	—	+	++	—	+	++
587	290			24. 9. 28	37	—	+	++	—	+	++
588	350			20. 10. 28	63	⊢	+	+	+	+	+
589	290			16. 10. 28	59	—	+	++	—	++	++

Tabelle V.

B.C.G.-Meerschweinchenversuch.

Meerschweinchen Nr.	Vorbehandlung mit B.C.G.	Infektion 15. 11. 1928	Tod am	Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund
444	Am 9. 8. 1928 12,5 mg B.C.G. in 0,5 NaCl intrapleural rechts	Tbc. hum. vom 14. 9. 1928 0,5 ccm Verd. 1 : 10 000	29. 1. 29	75	++
446			12. 3. 29	117	++
448			2. 2. 29	79	++
449		0,5 ccm Verd. 1 : 100 000	14. 12. 28	29	++
453			14. 2. 29	91	++
454			2. 2. 29	79	++
457		0,5 ccm Verd. 1 : 1 000 000	get. 12. 3. 29	117	++
460			27. 12. 28	42	—
461			5. 1. 29	51	++
462			get. 12. 3. 29	117	+
93	Kontrollen.	0,5 ccm Verd. 1 : 10 000	27. 12. 28	42	+
94			29. 12. 28	44	+
95		0,5 ccm Verd. 1 : 100 000	17. 12. 28	30	+
96			20. 12. 28	35	±
97		0,5 ccm Verd. 1 : 1 000 000	14. 2. 29	91	++
98			15. 2. 29	92	++
		Alle intrapleural rechts!			

mit Tuberkulose zwecks Feststellung des Immunitätsgrades erfolgte nach 3 Monaten. Bis dahin waren noch 7 weitere Versuchstiere eingegangen. Bei der Sektion zeigte sich Vergrößerung der Hilusdrüsen und meist B.C.G.-Herde in der rechten Lunge. Die Milz war zuweilen vergrößert, aber nur bei den letzten am 9. Nov. 1928 eingegangenen Meerschweinchen waren in der vergrößerten Milz B.C.G. mikroskopisch nachweisbar. Am 15. Nov. 1928 wurden die überlebenden 10 Versuchstiere zusammen mit 6 Kontrollmeerschweinchen mit fallenden Dosen Tuberkelbazillen Typus humanus, intrapleural rechts, also an der Stelle der Vorbehandlung, infiziert (s. Tabelle V).

Alle Kontrollmeerschweinchen gingen innerhalb von spätestens 92 Tagen an allgemeiner Tuberkulose zugrunde.

Dabei ist bemerkenswert, daß die beiden Tiere Nr. 97 und 98, die nur 0,5 ccm einer Suspension $1:10^{-6}$ erhielten, sich bezüglich ihrer Lebensdauer nach der Infektion der verminderten Infektionsdosis entsprechend von den beiden Tieren 95 und 96, welche mit der 10fachen Dosis infiziert waren, unterschieden. Diese letzteren aber zeigten eine etwas kürzere Lebensdauer als die Kontrolltiere 93 und 94, die wiederum mit der 10fachen Dosis infiziert waren. Man darf hieraus vielleicht schließen, daß mit der Menge : 0,5 ccm $1:10^{-5}$ Tuberkelbazillen eine Infektionsdosis gewählt war, die eine gewisse Optimaldosis für die Virulenz des verwendeten Bazillenstammes insofern darstellte, als eine Vergrößerung der Infektionsdosis den Verlauf der Infektion nicht beschleunigte, eine Verringerung aber deutlich verzögerte. Von den vorbehandelten Tieren gingen 70 Proz. bis zum 91. Versuchstage an Tuberkulose zugrunde; 3 Tiere überlebten und wurden am 117. Versuchstage getötet. Alle 3 litten an generalisierter Tuberkulose beider Lungen; sie hätten nach der Ausdehnung des Krankheitsprozesses zu urteilen wohl noch einige Wochen leben können, doch war die Tuberkulose zweifellos im Fortschreiten, nicht in Rückbildung begriffen.

Man darf aus diesen Versuchen schließen, daß durch intrapleurale Vorbehandlung mit B.C.G. und nachräglicher Infektion mit virulenten menschlichen Tuberkelbazillen am Orte der Vorbehandlung bei 30 Proz. der Tiere eine Resistenzerhöhung gegen Tuberkulose, aber nur diese, gesetzt wurde.

In einem folgenden Versuche — Tabelle VI — versuchten wir durch wiederholte Inhalation mit B.C.G. bei Meerschweinchen einen Schutz gegen nachfolgende Inhalation mit virulenten Tuberkelbazillen, also gewissermaßen eine lokale Immunität, zu setzen. — 20 Meerschweinchen wurden vom 12. Nov. 1928 bis 29. Dez. 1928 in etwa 7tägigen Intervallen, im ganzen 6mal, der Inhalation mit B.C.G. ausgesetzt, und zwar wurde jeweils 1 g feucht B.C.G. in 100 ccm Kochsalzlösung verrieben, in dem Inhalationsraum versprayt, und die Versuchstiere in der gewohnten Weise 20 Minuten in dem Raum belassen. Alle Inhalationstiere, mit Ausnahme von einem Nr. 66, nahmen während der Vorbehandlungszeit an Gewicht zu. Die Minderwertigkeit von No. 66 kam nach der Infektion mit virulenten Bazillen auch in dem ausgesprochen frühzeitigen Verenden (31 Tage) zum Ausdruck. 2 Versuchstiere

Tabelle

B.C.G.-Meerschweinchen

Meerschweinchen Nr.	Gewicht 12. 11. 1928	B.C.G.-Inhalation, Vorbehandlung	Tod am	Gewicht 22. 3. 1929	Tbc. hum. Inhalationsinfektion 22. 3. 1929	Tod am
53	320	I. 12. 11. 1 g B.C.G. Sauton v. 21. 8. in 100 NaCl inhaliert. II. 27. 11. 2,5 g Sauton B.C.G. v. 27. 10. in 100 NaCl ihlt. III. 6. 12. 0,6 g B.C.G. Douglas v. 26. 11. in 100 NaCl inhaliert. IV. 15. 12. 1,0 g B.C.G. derselben Kultur in 100 NaCl inhaliert. V. 19. 12. B.C.G. Sauton vom 20. 11. 1 g auf 100 NaCl inhaliert. VI. 29. 12. 28 B.C.G. Sauton vom 13. 12. 1,0 in 100 NaCl inhaliert	22. 3. 29	—	St. 16. Kultur v. 30. 1. 1929	—
66	310			290	1 mg in 50 NaCl-Lösung	22. 4. 29
54	300			430		get. 2. 7. 29
55	330			380		13. 5. 29
56	300			400		1. 7. 29
57	320			350		19. 6. 29
58	310		27. 11. 28	—		—
59	280			390	2,5 mg in 50 NaCl-Lösung	6. 6. 29
60	320			370		22. 5. 29
61	300		get. 15. 1. 29	420		—
62	310			370		16. 5. 29
63	310			390		13. 6. 29
64	250		15. 2. 29	—		—
65	290			440		get. 10. 6. 29
67	330			430	5,0 mg in 50 NaCl-Lösung	29. 5. 29
68	320			400		27. 5. 29
69	260			350		22. 5. 29
70	310			420		get. 7. 6. 29
71	270			370		get. 7. 6. 29
72	300		19. 12. 28	—		—
909		Kontrollen		280	1 mg in 50 NaCl-Lösung	16. 5. 29
910				300		1. 6. 29
911						25. 3. 29
912						26. 3. 29
913				270		3. 5. 29
914				300	2,5 mg in 50 NaCl-Lösung	16. 5. 29
915				280		7. 5. 29
916				270		11. 5. 29
917				250		10. 5. 29
918				250		11. 5. 29
919				210	5,0 mg in 50 NaCl-Lösung	22. 4. 29
920				270		30. 4. 29
921				250		30. 4. 29
922				240		22. 5. 29
923				250		22. 4. 29

gingen bei der Inhalation an Erstickung zugrunde (Nr. 58 und 72), ein 3. Tier, Nr. 61, wurde 14 Tage nach Abschluß der B.C.G.-Inhalationsbehandlung getötet und zeigte makroskopisch sichtbare B.C.G.-haltige Herde in den leicht geschwellten Hilusdrüsen, die übrigen Körperorgane ohne sichtbare Veränderungen. Ein 4. Versuchstier, Nr. 64, verendete spontan am 15. Febr. 1929 = 95 Tage nach Beginn der B.C.G.-Behandlung. Es fanden sich vereinzelte B.C.G.-haltige Herde in den Lungen; Netz aufgerollt, ohne Bazillenbefund; sonst keine TB.-verdächtigen Veränderungen.

Rund 3 Monate nach Beendigung der Vorbehandlung wurden die überlebenden 16 Versuchstiere zusammen mit 15 nicht vorbehandelten Meer-

VI.
versuch.

Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund	Hilusdrüsen	Lungen	Milz	Netz	Inguinaldrüsen	Periportaldrüsen
—	—	—	—	—	—	—	—
31	+	+	+	—	—	—	—
102	++	++	++	—	—	—	—
52	+	++	+	4,0 : 2,0 diffus, ⌞ Herde.	aufgerollt		+
101	++	++	++ *)	3 : 2 mit gr. Herden	—	—	*) kavernös
89	++	++	++	5 : 2 diffus vergrößert		+	+
—	—	—	—	—	—	—	—
76	++	++	++	8 : 3 diffus vergr., wen. käs. Herde	aufgerollt	—	+
61	++	++	++	4 : 2 diffus. ⊢ verkäste Herde		—	+
—	—	—	—	—	—	—	—
55	++	+	++	5 : 3 diffus vergrößert		±	++
83	++	++	++	2 : 1,5 ⊢ Herde	aufgerollt	Lungenherde	kavern.
—	—	—	—	—	—	—	—
80	++	++	++	3 : 2 mit ⌞ verkästen Herden	—	⌞	+
68	++	++	++	3 : 1,5 diffus	—	—	+
66	++	++	++	4 : 1,5 diffus mit ⌞ Käseherden	± +	Kav.-Bild. d. Lungen	
61	++	++	++	4 : 2 diffus vergr. ⊢ Käseherde			
77	++	++	++	2,5 : 1,5, diffus, wenig verkäst	—	⌞	+
77	++	++	++	3 : 2 mit einigen gr. Käseherden	—	⌞	++
—	—	—	—	—	—	—	—
55	+	+	+	3 : 1,5 diffus vergr.	—	±	+
71	++	++	++	5 : 2 mit großen Käseherden	aufgerollt	+	++
2	0	—	—	—	—	—	—
3	0	—	—	—	—	—	—
42	+	++	+	3 : 2 diffus.	aufgerollt	—	—
55	+	+	+	2 : 1 —	—	±	—
46	+	+	++	wenig vergrößert, ohne Herde	aufgerollt	—	—
50	++	++	±	3 : 2 herdförmig	—	—	+
49	+	+	+	3 : 2 diffus	—	—	+
50	++	++	+	4 : 2 herdförmig	—	—	+
31	+	±	+	2 : 1 —	—	—	+
39	++	+	++	3 : 1,5 diffus	aufgerollt	+	+
39	++	+	++	—	aufgerollt	+	—
61	++	++	++	4 : 2 diffus. ⊢ verkäste Herde	—	—	—
61	+	±	+	2 : 1 —	—	—	±

schweinchen der Inhalationsinfektion mit virulenten menschlichen Tuberkelbazillen ausgesetzt, und zwar Versuchstiere und Kontrollen in 3 Gruppen, von denen die erste 5 mg Tbc.-Bazillen von Eiernährbodenkultur (30. Jan. 1929), die zweite 2,5 mg, die dritte 1 mg in 50 ccm Kochsalzlösung zerrieben inhalierte.

Alle Tiere dieses Versuches, vorbehandelte und Kontrollen, zeigten bei der Sektion ausgesprochene, im Stadium des Fortschreitens begriffene tuberkulöse Veränderungen, und zwar verendeten 26 Tiere spontan, 4 wurden getötet. Die vorbehandelten Tiere erreichten nach der Infektion eine durchschnittliche Lebensdauer von 72 Tagen, die Kontrollen eine solche von 50 Tagen.

Tabelle
B.C.G.-Meerschweinchen

Meerschweinchen Nr.	Gewicht am 7. 8. 1928	Vorbehandlung mit B.C.G.	Inhalationsinfektion mit Tbc. hum. St. Hö.	Tod am	Tage nach der Infektion
406	570	7. 8. 28 je 50 mg B.C.G. Kart.-Kult. v. 20. 7. in 1,0 NaCl subkutan links	28. 11. 1928 Inhalation 100 ccm Bazillenemulsion = 10 mg Bazillen. Im Gesichtsfeld 3—4 Tbc.-Bazillen	3. 12. 28	5
409	470			3. 3. 29	95
419	320	Die gleiche Dosis B.C.G. intraperitoneal		11. 2. 29	75
420	220			29. 11. 28	1
490	300	Die gleiche Dosis B.C.G. in 1,0 Ol. oliv. verrieben, intraperitoneal		get. 20. 8. 29	234
499	370			27. 12. 28	29
972	320	Kontrollen		get. 3. 3. 29	95
973	300			2. 4. 29	125
974	350			2. 6. 29	186

Tabelle
B.C.G.-Meerschweinchen

Meerschw. Nr.	Gewicht 9. 8. 1928	Vorbehandlung mit B.C.G.	Gewicht 30. 11. 1928	Infektion mit Tbc.-Bac. hum. Hö. am 30. 11. 1928	Tod am
405	270	7. 8. 28 je 50 mg B.C.G. Kartoffel-Kultur vom 20. 7. in 1,0 NaCl subkutan links	520	Eier-N.-Kult. v. 2. 11. 28 0,1 mg in 0,5 ccm NaCl subkutan linke Brust	get. 20. 8. 29
408	470		630		—
411	540	Die gleiche Dosis B.C.G. intraperitoneal	650	Die gleiche Dosis intraperitoneal	7. 12. 28
417	320		520		8. 1. 29
485	390	Die gleiche Dosis B.C.G. in 1,0 Ol. oliv. verrieben, subkutan	570	Die gleiche Dosis subkutan linke Brustseite	13. 12. 28
492	370		720		18. 2. 29
975		Kontrollen.	340	Ebenso subkutan linke Brust	get. 20. 8. 29
976			230		1. 4. 29
977			350		19. 1. 29

A: =

Die Vorbehandlung läßt demnach eine um etwa 44 Proz. längere Lebensdauer erreichen und darin eine Resistenzerhöhung zweifellos erkennen. Allerdings muß man dabei berücksichtigen, daß die Versuchstiere am Tage der Infektion die gleichzeitig infizierten Kontrollen um ungefähr 25 Proz. an Körpergewicht übertrafen. Einen nachhaltigen Schutz gegen Tuberkulose, also eine Immunität, haben wir aber auch durch 6malige schonende Vorbehandlung mit B.C.G. auch gegen eine kleine nachfolgende Infektionsdosis nicht auftreten sehen, obwohl doch durch die lokal gleichmäßige Vorbehandlung und Infektion

VII.
versuch.

Tuberkulosebefund	Rechte Leistendrüse	Hilusdrüsen	Lungen	Netz	Milz	
—	—	—	Bronchitis	—	—	
±	—	+	10 Tbc.-Herde; klein	aufgerollt	klein	
?	++ A: ±	⊢ A: —	Lobäre Pneumonie; keine Tbc.-Herde	aufgerollt, käs. Herde	klein	Netz —, A: +, B.C.G. ?
—	—	—	—	—	—	
—	—	A: — ++	⊢ indurierte Herde. A: —	—	bindegeweb. Herde. A: —	
—	—	—	Pneumonie. A: —	aufgerollt. A: —	klein	Neben d. Milz alte Verwachsung
±	—	+	3 Tbc.-Herde	—	—	
—	—	—	Mehrere kl. Herd. A: —	—	—	
—	—	+ A: —	Pneumonie. A: —	—	—	

VII b.
versuch.

Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund	Hilusdrüsen	Inguinaldrüsen	Beckendrüse	Linke Axillardrüse	Lungen	Leber	Milz	Netz	
233	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
8	—	⊢ A: —	—	—	—	Bronchitis haemorrhg.	—	—	—	
40	—	+ A: —	—	—	—	Bronchitis, Pneumonie	—	—	—	Seuche. Pol-Bakterien +
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
81	—	+ A: —	—	—	—	Pneumonie	*)	—	—	*) verfettet. Pol.-Bakterien +
233	±	+ A: —	+ A: +	—	+ A: +	—*)	—	vergrößert A: —*)	—	*) in Milz und Lunge narb. Einziehungen. A: —
122	++	++	—	+	—	++	—	++	—	
51	±	+	—	—	+ A: +	Pneumonie. A: —	—	—	aufgerollt	

Ausstrichpräparat.

die günstigsten Bedingungen für eine B.C.G.-Schutzwirkung gegeben sein mußten.

In Versuch VII versuchten wir an einer kleineren Anzahl Meerschweinchen (siehe Tabelle VII) verschiedenartige Vorbehandlung mit B.C.G. und infizierten dann nach 16 Wochen durch Inhalation mit einer schwach konzentrierten Emulsion von wenig virulenten Tuberkelbazillen. Leider wurde von den drei Kontrolltieren nur eines schwach tuberkulös; es war demnach

Tabelle VIII.
B.C.G.-Meerschweinchen versuch.

Meerschweinchen Nr.	Gewicht 22. 9.	Orale B.C.G.-Vorbehandlung	Gewicht am 7. 12. 1928	Inhalationsinfektion mit Tbc. hum. St. 16	Tod am	Tage nach der Infektion	Tuberkulosebefund	Hilusdrüsen	Lunge	Milz	Leber
978			330		7. 12. 28	—	—	—	—	—	—
979			290		24. 4. 29	138	++	++	Sehr viele Tuberkel	Groß, tuberkulös	Reichlich Tuberkel
980		Am 22. 9., 28. 9., 6. 10., 13. 10. und 20. 10.	350		12. 2. 29	67	++	++	++ Tbc.-Herde	4:2 herdförmig, tuberkulös	Verfettet, herdförmige Tbc.
981			300		18. 3. 29	101	++	++	++ Tbc.-Herde	Klein, mit 3 Tuberkeln	Fleckig, narbig, verfettet
982	50—70 g	je 1,0 ccm einer dichten B.C.G.-Aufschwemmung in NaCl-Lösung, 14tägige Kulturen von Sauton oder Glyzerinkartoffel mit Sonde oral	300		23. 4. 29	137	++	++	Total verkäst, mit Tbc.-Kavernen	++ tuberkulös	++ Tuberkulose
983			300		29. 4. 29	143	++	++	Reichliche Tuberkelbildung.	8:3, mit verkästen Herden	Verfettet, tuberkulös
984			300		10. 4. 29	124	++	+	± Tuberkel	Vergrößert, mit käsiger Tbc.	Tuberkulös
985			300	Douglas-Kultur vom 5. 11. 1929. 25 mg in 100 NaCl-Lösung, dann jede Gruppe (je 10 Stck.) 50 ccm inhaliert. 7. 12. 1928	20. 4. 29	135	—	—	Pneumonisch. A: —	Vergrößert. A: —	—
986			330		10. 4. 29	124	++	+	+ Tuberkel	Vergr. ++ Tuberkel	Tuberkulös
987			250		10. 4. 29	124	++	+	++ Tuberkelherdchen	Vergrößert, tuberkulös	Verfettet
988			240		1. 1. 29	24	+	+	⌞ Hirsegr. Tbc.-Herde	Klein	—
						D.: = 112 Tg.					
989			320		12. 2. 29	67	+	±	Wenige kleine Tbc.-Herde.	3:1,5 granuliert.	Einige Tuberkel, verfettet
990			270		9. 4. 29	123	++	++	++ Herde; im Ausstrich: ⌞ Tbc.-B.	8:3 verkäst	Vergrößert, verfettet. A: —
991			320		12. 2. 29	67	++	+	++ kleine Tuberkel	3:2 diffus vergrößert	—
992			370		19. 2. 29	74	++	++	Mit ++ Tb.-Knoten durchsetzt	5:2 diffus vergrößert	Stark tuberkulös verändert
993		Kontrollen	320		28. 2. 29	83	++	+	Sehr viele Tbc.-Herde	5:2 diffus.	Verfettet, narbig, tuberkulös
994			370		7. 12. 29	—	—	—	—	—	—
995			370		2. 4. 29	116	++	+	++ Tbc.-Herde	6:3 diffus vergrößert	Starke Tuberklose
996			300		15. 2. 29	70	+	+	Mittlere Zahl Tub.-Knötchen	3:2 mit Blutungen.	—
997			320		25. 1. 29	49	+	+	+ Tbc.-Herde	4:2 diffus	—
						D.: = 81 Tg.					

die Infektionsdosis zu klein, bzw. zu schwach gewählt, und aus dem Nichteintreten der Tuberkulose im Hauptversuch dürften Schlüsse kaum gezogen werden. Als Parallelversuch (Versuchstabelle VII b) wurden 2 Meerschweinchen, die mit 50 mg B.C.G-.Kartoffelkultur in 1 ccm Kochsalzlösung subkutan links an der Brust geimpft waren, 2 weitere, 411 und 417, die mit der gleichen B.C.G.-Dosis intraperitoneal vorbehandelt wurden, und endlich die Meerschweinchen 485 und 492, die mit einer Olivenölsuspension von je 50 mg B.C.G. in 1 ccm subkutan geimpft waren, zusammen mit 3 gesunden Meerschweinchen als Kontrollen mit je 0,1 mg derselben schwach virulenten Kultur wie in Versuch VI subkutan, bzw. intraperitoneal (nach 16 Wochen) infiziert. Von den vorbehandelten Meerschweinchen gingen 5 bis zum 18. Febr. 1929 spontan ein. Bei 411 und 485 war infolge zu kurzer Versuchsdauer eine makroskopisch sichtbare Tuberkulose nicht zu erwarten, dagegen hätten Meerschweinchen Nr. 417, 408 und 492, welche die Infektion 40—81 Tage überlebten, sehr wohl tuberkulöse Erscheinungen zeigen können; tatsächlich erwiesen sie sich aber frei von Tuberkulose und frei von Tuberkelbazillen im Ausstrichpräparat. Das letzte der vorbehandelten Meerschweinchen No. 405 wurde am 20. Aug. 1929, 233 Tage nach der Tbc-Infektion getötet und war frei von Tuberkulose. Von den Kontrollmeerschweinchen starb das erste nach 51 Tagen an Pneumonie; der Ausstrich aus den vergrößerten Axillar- und Hilusdrüsen enthielt Tuberkelbazillen. Das Netz war aufgerollt wie bei beginnender Tuberkulose; Milz und Leber zeigten noch keine makroskopischen Veränderungen. Die zweite Kontrolle starb nach 6 Monaten mit ausgedehnter Tuberkulose in Lunge und Milz. Die dritte Kontrolle endlich wurde nach einem Jahre getötet: die Milz war vergrößert, mit bindegewebigen Narbenzügen durchsetzt, in den Lungen fanden sich wenige, eben sichtbare graue Herde ohne Erweichung. Im Ausstrich dieser beiden Organe keine Tuberkelbazillen, ebensowenig gelang der Nachweis von Tuberkelbazillen in der vergrößerten Hilusdrüse, er war aber positiv in der linken Axillardrüse und in der linken Inguinaldrüse, die beide im Innern erweicht waren.

Tabelle
B.C.G.-Kaninchen

Kaninchen Nr.	Behandlung mit B.C.G.	Tod am	Infektion 26. 1. 1929	Tod am
637				10. 4. 29
375				30. 1. 29
371	10. 11. 28 je 0,1 mg B.C.G. Eier-N.-Kultur vom 19. 10. in 0,1 NaCl-Lösung intratracheal	18. 12. 29		
383			Jedes überlebende Kaninchen 0,1 mg Tbc. bov. Eier-N.-Kultur vom 19. 12. 1928 in 1 ccm NaCl-Lösung subkutan linke Brust	2. 4. 29
386				30. 4. 29
387	17. 11. 28 je 1 mg B.C.G. Eier-N.-Kultur vom 7. 11. ebenso	9. 1. 29		
379	27. 11. 28 je 1 mg B.C.G Sauton-Nährboden v. 27. 10. 28 27. 10. 28.	21. 12. 29		
357	5. 12. 28 3 mg B.C.G. von Eier-N.-Kultur vom 10. 11. 28	get. 15. 1. 29		
359				20. 2. 29
581	Kontrollen			get. 30. 4. 29
572				2. 4. 29

Der Ausgang bei den Kontrollen beweist, daß auch in diesem Versuch die Tuberkuloseinfektion recht schwach war; da sie aber gleichwohl bei allen 3 Kontrollen haftete und bei keinem der 6 vorbehandelten Meerschweinchen gefunden wurde, so muß hier eine Immunität der Vorbehandlung mit B.C.G. gegen nachfolgende schwache Tuberkuloseinfektion als bewiesen angenommen werden.

In einem weiteren Meerschweinchenversuch (Tab. VIII) fütterten wir 50—70 g schwere Saugmeerschweinchen 5mal in Abständen von je 7 Tagen mit 1 ccm einer dichten Aufschwemmung von B.C.G., die von 14tägigen Kulturen auf Sauton oder Glyzerinkartoffel gewonnen waren, unter Verwendung der Schlundsonde. Von 30 in Versuch genommenen Saugmeerschweinchen blieben 11 am Leben, nahmen an Gewicht während der Vorbehandlung vom 22. Sept. bis 7. Dez. 1928 auf durchschnittlich 300 g zu und wurden am letztgenannten Tage zusammen mit 9 Kontrolltieren einer schwachen Inhalationsinfektion mit Tuberkelbazillen, Typus humanus, Stamm 16, unterzogen. Ein vorbehandeltes Tier verendete bei der Inhalation, die übrigen 10 gingen zwischen 24 und 143 Tagen mit einer Ausnahme (Meerschweinchen Nr. 985) an Tuberkulose zugrunde. Nr. 985 verendete am 135. Versuchstage an Pneumonie; Tuberkelknötchen oder Tuberkelbazillen waren nicht nachweisbar. Durchschnittlich erreichten die Versuchstiere eine Lebensdauer von 112 Tagen, auch alle Kontrollmeerschweinchen, mit Ausnahme von einem (Nr. 994), welches bei der Inhalation zugrunde ging, verendeten spontan an Tuberkulose. Die Kontrollmeerschweinchen erreichten nach der Infektion eine durchschnittliche Lebensdauer von 81 Tagen, blieben also hinter den vorbehandelten Tieren um rund 28 Proz. zurück. Ein Leben-verlängernder, Resistenzerhöhender, bzw. relativ immunisierender Einfluß der wiederholten B.C.G.-

IX.
versuch.

Tage nach Beginn der Vorbehandlung	Schluß der Vorbehandlung	Tage nach der Infektion	Prätracheale Abszesse	Lungen	Hilusdrüsen	Linke Axillardrüse	Milz	Darm	Niere	
—		73	+	++ Herde	++	++	++	++	++	
—		4	++	± Herde	—	—	—	—	—	
38	13	—	++	— blutreich	—	—	—	—	—	
—		65	+	++	+	—	+	+	+	
—		93	+	++ Tbc.-Knoten	+	+	±	+	+	
60	35	—	++	+ Herde	±	—	—	—	—	Ausstrich aus den Lungen negativ; Kult.: B.C.G. +
41	16	—	++	+ Tbc.-Herde	±	—	—	—	—	
66	41	—	++	+ bes. kleinere Herde	±	—	—	—	—	Lungen: A: B.C.G. +
—		25	+	± alte B.C.G.-Herde	—	—	—	—	—	
—		93		++ große Tbc.-Knoten	++	++	—	±	—	
—		65		++ Tuberkelknoten	+	+	—	—	+	

Fütterung bei Saugmeerschweinchen ist in diesem Versuch sehr wohl zu erkennen, eine Vollimmunität wurde in keinen Falle erreicht.

Endlich immunisierten wir noch in einem letzten Versuch 9 Kaninchen (cf. Tabelle IX) durch wiederholte Injektion von B.C.G. in die Trachea, und

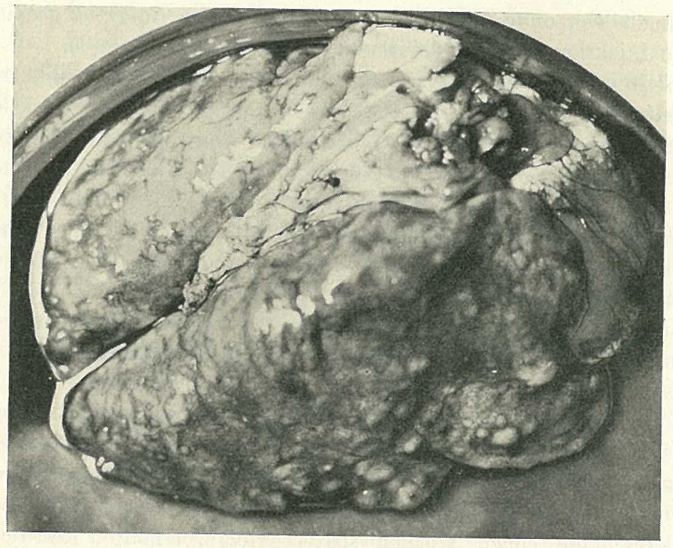


Fig. 1. B.C.G.-Kaninchen Nr. 387 am 10. 11.; 17. 11.; 29. 11. und 5. 12. mit 1—3 mg B.C.G. intratracheal geimpft; verendet am 9. 1. 1929. Lunge mit B.C.G.-Herden. Im Ausstrich sehr reichlich säurefeste Bazillen. Kulturverfahren +.

infizierten 7 Wochen nach der letzten Vorbehandlung die überlebenden 5 Tiere zusammen mit 2 Kontrollen durch Injektion von bovinen Tuberkelbazillen subkutan an der linken Brustseite. Alle vorbehandelten Tiere wiesen am Tage der Tbc.-Infektion größere oder kleinere Prätrachealabszesse mit B.C.G. als Folge der Vorbehandlung auf. Die beiden Kontrollen verendeten nach 65 bzw. 93 Tagen an Tuberkulose. Von den 5 vorbehandelten verendete Nr. 375 schon 4 Tage nach der Infektion, natürlich noch ohne Manifestation einer bovinen Tuberkulose, wohl aber waren neben dem Halsabszeß noch wenige B.C.G.-Herde mit Bazillenbefund in den Lungen nachweisbar. Die übrigen Tiere verendeten zwischen 25 und 93 Tagen. Bei den nach 25 Tagen verendeten Kaninchen waren nur alte in Ausheilung begriffene B.C.G.-Herde prätracheal und in den Lungen erkennbar. Die drei übrigen verendeten zweifellos an generalisierter boviner Tuberkulose; daneben waren noch alte B.C.G.-Herde mit größter Wahrscheinlichkeit zu erkennen.

Bei 3 von 5 geimpften Kaninchen ist also eine immunisierende Wirkung der B.C.G.-Vorbehandlung nicht nachweisbar, bei einem Nr. 359 darf man dieselbe wohl annehmen.

Zusammenfassung.

1. In Gruppe I wurde von drei frisch importierten Rhesusaffen unbekannten Alters durch viermalige B.C.G.-Kultur und Gallefütterung bei zwei Exemplaren eine gewisse Resistenzerhöhung und bei einem Immunität gegen nachfolgende schwache subkutane Infektion mit Bazillen des Typus bovinus erzielt. In Gruppe II und III erhöhte bei 5 Rhesusaffen wiederholte B.C.G.-Fütterung allein, ohne Zugabe von Galle, nicht die Resistenz gegen nachfolgende Infektion mit Warmblütertuberkelbazillen (cf. Tab. I).

2. Mit 50 mg B.C.G. peritoneal und ebenso mit 50 mg subkutan vorbehandelte Meerschweinchen erwiesen sich gegen Inhalationsinfektion mit TB. des Typ. bov. resistenter als unbehandelte Kontrollen, waren aber nicht immun (Tab. II). Intrapleurale Vorbehandlung von Meerschweinchen mit B.C.G. ergab bei intrapleuraler Nachimpfung mit TB.-Typ. hum. im gleichen Pleuraraum auch bei Verwendung von kleinsten Dosen humaner Tuberkelbazillen nur in einem kleinen Prozentsatz Verlängerung der Lebensdauer gegenüber den Kontrollen; in keinem Falle wurde ein nachhaltiger Schutz erzielt (cf. Tab. V). Gegen eine sehr schwache Infektion von Meerschweinchen mit TB. Typ. hum. und Typ. bov. scheint Vorbehandlung mit B.C.G. zuweilen auch schützen zu können (cf. Tab. VII und VIIb).

3. Bei im Saugalter stehenden Meerschweinchen haften verfütterte B.C.G. zunächst im Darmkanal und verschwinden wieder in etwa 30 Tagen. Derartige mit B.C.G.-Fütterung einmal vorbehandelte junge Meerschweinchen zeigen gegenüber einer subkutanen Nachimpfung mit TB. Typ. hum., die einige Wochen später erfolgt, erhöhte Resistenz (cf. Tab. III). Sie zeigen aber keine erhöhte Resistenz gegenüber einer nachfolgenden Inhalationsinfektion mit TB. Typ. hum. Sechsmalige Fütterung

von sehr jungen, noch säugenden Meerschweinchen mit B.C.G. ergibt bei der Mehrzahl der Impftiere auch eine Resistenzerhöhung gegen nachfolgende Inhalationsinfektion, aber keine ausreichende Immunität.

4) Bei Kaninchen wirkt eine B.C.G. Vorbehandlung gegen nachfolgende Tuberkuloseinfektion etwa ebenso wie bei Meerschweinchen.

Schlußbetrachtungen.

Auf Grund unserer Tierversuche gelangen wir zu der Ansicht, daß die B.C.G.-Schutzimpfung jedenfalls für etwa drei Monate — längere Zeiträume wurden nicht untersucht — eine gewissen Schutzwirkung gegen nachfolgende Infektion mit virulenten Tuberkelbazillen verleiht, aber meist nicht ausreicht, eine fortschreitende Tbc.-Erkrankung infolge experimenteller Tbc.-Infektion zu verhüten. Es erscheint deshalb nicht ausgeschlossen, daß die B.C.G.-Schutzimpfung bei den geprüften Tierarten gegen eine natürliche Tuberkuloseinfektion für eine begrenzte Zeit Schutz gewährt. Machen wir die gleiche Annahme für die B.C.G.-Schutzimpfung des Menschen, so ist damit wohl für die Verhinderung der juvenilen Tuberkuloseinfektion etwas zu erreichen. Der Mensch ist aber nicht nur während kurzer Zeiträume in der Jugend, sondern während seines ganzen Lebens mehr oder weniger der Tuberkuloseinfektion ausgesetzt. Nach der heute allgemein anerkannten Anschauung gibt es nur eine Infektionsimmunität gegen Tuberkulose. Die Immunität durch B.C.G.-Schutzimpfung hält, wenn man ganz optimistisch sein will, einige Jahre vor. Dann könnte ihre Durchführung bei Säuglingen aber auch den Erfolg haben, daß die juvenile Tbc.-Infektion derselben, welche zum Tode, zur chronischen Tuberkulose, in vielen Fällen aber auch zur latenten, nicht progredienten Infektion und damit zur sicheren Infektionsimmunität führt, zwar vermieden, aber die Wahrscheinlichkeit einer progredienten Tuberkuloseinfektion im vorgerückten Lebensalter, das normalerweise viele Tbc.-infektionsimmune Menschen erreichen, nunmehr vergrößert wird. Die Frage, ob darin ein Vorteil zu erblicken ist, muß daher für die mit B.C.G. vorbehandelten Personen offen gelassen werden. Man kann natürlich auch die Möglichkeit nicht von der Hand weisen, daß während des Abklingens des B.C.G.-Schutzes (durch Ausheilung der B.C.G.-Impfherde) die Bildung latent bleibender Tbc.-Herde und damit die Entwicklung einer bleibenden Infektionsimmunität begünstigt wird. Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß nur ein kleiner Prozentsatz der Menschen im jugendlichen Alter an Tuberkulose erkrankt, ist eine allgemeine Anwendung der Schutzimpfung mit B.C.G. ausgeschlossen. Nur in ganz bestimmten Ausnahmefällen, in denen z. B. Entfernung von Kindern aus tuberkuloseverseuchten Familien und damit aus erheblichen Infektionsgefahren nicht möglich ist, dürfte die B.C.G. Schutzimpfung in Frage kommen.

Es sei zum Schluß nochmals betont: bisher ist wissenschaftlich einwandfrei nur eine Infektionsimmunität gegen Tuberkulose festgestellt worden. Demnach hält auch eine Tuberkuloseimmunität durch B.C.G.-Schutzimpfung

nur so lange vor, als die eingeimpften B.C.G. im Körper leben. Heilt diese B.C.G.-Infektion, welche zum Schutz gegen natürliche Tuberkuloseansteckung gesetzt war, innerhalb von zwei bis vier Monaten ab, dann bleibt auch nur für diese Zeit oder wenig länger der Schutz gegen Tuberkuloseinfektion bestehen. Dauert der Schutz der B.C.G.-Impfung länger, dann muß für die gleiche Zeit auch ein Fortbestehen der B.C.G.-Infektion des Organismus angenommen werden und die Unschädlichkeit dieser, wenn auch latenten, Schutzinfektion müßte erst noch sichergestellt werden. Es wäre durch Beobachtung und Kontrolle der schutzgeimpften Kinder während längerer Zeiträume — bis zu 10 Jahren — zu verfolgen, ob sich nicht später schwerere Schädigungen, z. B. an den Mesenterialdrüsen, einstellen.

Literatur.

Ascoli, A., Ann. Inst. Pasteur, T. 41, 1927, p. 314—321. Wien. klin. Wochenschr., Nr. 41, 1928, S. 1357.
Agally, Obuchowski und Stepanenko, Deutsch.-russ. med. Zeitung, Nr. 12, 1928, S. 724—734.
Buschmann, H., Arch. f. Kinderheilkd., Bd. 88, 1929, S. 241—261.
Calmette, A., Die Schutzimpfung gegen Tuberkulose mit B.C.G., Leipzig (Vogel) 1928. Deutsche Uebersetzung.
— et Guérin, Ann. Inst. Pasteur, T. 38, 1924, p. 371—398.
Cantacuzène, J., Arch. roum. d. path. exp. et d. microbiol., T. 2, 1929, p. 131.
Chiari, Nobel und Solé, Zeitschr. f. Tuberk., Bd. 50, 1928, S. 24.
Elbert, Gelbert et Zouckermann, Ann. Inst. Pasteur, T. 42 1928, p. 76—101.
Guérin, A., Wien. klin. Wochenschr., Nr. 21, 1928, S. 731—735.
Gerlach, F., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 51, 1927, S. 256—275; Zentralbl. f. Bakt., Bd. 104, Orig., 1927, S. 61—65; Wien. klin. Wochenschr., Nr. 30, 1928, S. 1083—1084.
— und Kraus, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 59, H. 3/4, S. 306—318.
Igersheimer, J., und Schlossberger, H., Ber. d. Deutsch. Ophthalm. Gesellsch., 6. bis 8. Aug. 1928 in Heidelberg, 1929, S. 80—84.
Kalbfleisch und Nohlen, Beitr. z. Klin. d. Tuberk., Bd. 72, 1929, S. 121—146.
Kirchner und Schnieder, ebenda, S. 109—120.
— und Newton, ebenda, S. 97—108
Koršun, Deutsch-russ. med. Zeitschr., Nr. 4, 1928, S. 163.
Koršun und Dviškov, Vopr. Tuberk., Nr. 12, 1928, S. 7—12.
Kraus, R., Wien. klin. Wochenschr., Nr. 48, 1927, S. 1508—1510; Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 51, 1927, S. 230—256; Zentralbl. f. Bakt., Bd. 104, Orig., 1927, S. 65—71; Wien. klin. Wochenschr., Nr. 30, 1928, S. 1082—1083.
Lange, B., und Lydtin, Zeitschr. f. Tuberk., Bd. 50, 1928, S. 45—61; Zeitschr. f. Hyg., Bd. 108, 1928, S. 808—819.
— und Wethmar, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 110; 1929, S. 465—498.
Lange, L. und Clauberg, Beiträge klin. Tuberk., Bd. 70, 1928, S. 346—356.
Mouriquand et Bertoye, Bull. Acad. Méd. Paris, T. 101, 1929, p. 592—595.
Nasta, C. r. Soc. Biol., T. 101, 1929, p. 210—212.
Obuchowski und Paschkowski, Ber. 2. Kong. d. Wiss. und prakt. veterin. Arbeiten der U.S.S.R. Charkow 25.—29. 5. 1927.
Okell and Parish, Brit. Journ. of exp. Pathol., Vol. 9, 1928, p. 34—42.
Rankin, Ann. Inst. Pasteur, T. 43, 1929, p. 878—889.
Remlinger und Bailly, Ann. Inst. Pasteur, T. 41, 1927, p. 286—288.
Schuukmanns-Steekhoven, zit. von Kraus, Handb. d. path. Mikroorg., V, 2, S. 907, 913.
Schürmann, Verh. d. Deutsch. Pathol. Ges. Wiesbaden, 1928, S. 325.
Selter und Blumenberg, Klin. Wochenschr., Jahrg. 6, 1927, S. 1134—1136.
Tarassewitsch, Ber. 10. allruss. Metschnikow-Kongr. d. Bakt., Epidemiol. und Sanitärärzte. Deutsch-russ. med. Zeitschr., Nr. 4, 1928, S. 163.
Westenrijk, Rev. de la Tuberk., T. 10, 1929, p. 57—71.
Wilbert, Ann. Inst. Pasteur, T. 39, 1925, p. 641.
Zechnowitzer, Deutsch-russ. med. Zeitschr., Nr. 4, S. 163 und Nr. 12, 1928, S. 724—734.

Aus dem Staatlichen Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. W. Kolle).

IV.

Untersuchungen über Hämagglutination und Hämolyse bei Feldhasen, Feldkaninchen und Stallkaninchen.

II. Mitteilung.

Von

Dr. **Werner Fischer**,
wissenschaftlicher Oberassistent,

und

Gertraudis Klinkhart,
technische Assistentin.

(Mit 4 Abbildungen und 8 Tabellen im Text.)

In einer Fußnote unserer 1. Veröffentlichung über Isohämagglutination und Isohämolyse beim Kaninchen (1) wurde darauf aufmerksam gemacht, daß es im weiteren Verlauf der Untersuchungen gelang, mehrfach Isoagglutinine durch Immunisierung zu erzeugen. Um eine Darstellung dieser Befunde übersichtlich zu gestalten, sollen diese weiteren Ergebnisse erst im zweiten Teil dieser Veröffentlichung wiedergegeben werden; denn, wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, muß man Stallkaninchen und wilde Feldkaninchen blutgruppenserologisch als Individuen einer einzigen Rasse betrachten, bei denen sich zwar keine normalen Isoantikörper nachweisen lassen, dagegen die gleichen Isoantikörper durch kreuzweise Immunisierung hervorgerufen werden können. Im ersten Teil sollen die Resultate wiedergegeben werden, die die Prüfung der Serum- und Blutkörperchen-eigenschaften bei 10 Feldhasen ergab. In Ergänzung der in der ersten Mitteilung angeführten Literatur ist auf eine Arbeit von Gara's (2) aufmerksam zu machen, der neuerdings wieder beim Stallkaninchen vereinzelt normale Isoantikörper festgestellt haben will. Im Gegensatz zu dieser Veröffentlichung bestätigen Levine und Landsteiner (3) die von uns erhobenen Befunde, d. h. sie konnten bei normalen Tieren keine Isoantikörper nachweisen, sondern sie auch nur durch kreuzweise Immunisierung erzeugen. Für die Vervollständigung unserer Literaturangaben in der ersten Mitteilung sind wir Levine und Landsteiner sehr dankbar.

Bezüglich der angewandten Technik sei auf die Ausführungen in der ersten Mitteilung verwiesen.

I.
Blutkörperchen- und Serum-Eigenschaften beim Feldhasen.

Zunächst wurden die durch Herzpunktion gewonnenen Blutproben auf Isoantikörper untersucht, indem die Seren von 3 auf dem Transport gestorbenen Hasen (in inaktiviertem Zustand) und die Seren von 7 lebenden Hasen (aktiv) gegen die dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschenen Blutkörperchen der 7 lebenden Hasen in abgekürzten Versuchsreihen geprüft wurden (Serumverdünnungen 1/2, 1/10 und 1/50). Von den 70 Kombinationen waren lediglich 2 bei Ablesung nach der Zentrifugiertechnik in der Serumverdünnung 1/2 schwach positiv; die eine Agglutination ging nach ½stündigem Aufenthalt bei 37° vollständig zurück (Kälteagglutination), die andere schien bestehen zu bleiben, erwies sich aber bei mikroskopischer Untersuchung als Pseudoagglutination mit Geldrollenbildung. Bei Ablesung nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur zeigte keine einzige dieser 70 Kombinationen eine Isoagglutination oder eine Isohämolyse; normale Isoantikörper konnten beim Feldhasen demnach nicht nachgewiesen werden.

Die Seren der 7 überlebenden Hasen wurden dann auf ihren Gehalt an normalen Heterolysinen gegen Hammelblut geprüft. Zu je 1,0 ccm inaktivierten Hasenserums in fallenden Verdünnungen wurde 0,125 ccm 10proz. Hammelblutaufschwemmung und 0,125 ccm 1/5 verdünntes Meerschweinchenserum als Komplement zugegeben. Bei dieser Technik lassen sich am ehesten Hammelhämolysintiter und Agglutinationstiter vergleichen; nur ist zu beachten, daß der Titer der Hammelhämolysine 4mal größer ist, als er sich bei der gewöhnlichen Ambozeptorauswertung ergibt (0,25 ccm zu prüfendes Serum in fallenden Verdünnungen, 0,5 ccm phys. NaCl, 0,25 ccm 5proz. Hammelblutaufschwemmung, 0,25 ccm 1/10 verdünntes Meerschweinchenserum). In Verdünnungen 1/4 bis 1/40 ergaben diese Reihen eine komplette Hämolyse, in Verdünnungen 1/10 bis 1/100 eine schwache bis Spur von Hämolyse nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37°.

Weiter wurden die 7 Hasenseren (aktiv, ohne Komplementzusatz) auf ihren Heteroantikörpergehalt gegen menschliche Blutkörperchen der 4 Blutgruppen (O, A, B und AB) untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle Seren Agglutinine und Lysine gegen die 4 menschlichen Blutgruppen enthalten; alle 7 Seren enthielten in der Verdünnung 1/10 nach 24 Stunden deutlich nachweisbare Heterolysine gegen menschliche Blutkörperchen.

In größeren Reihen wurden sodann die Seren der 10 Feldhasen gegen die Erythrozyten von 9 Stallkaninchen auf Heteroagglutinine geprüft. In der Verdünnung 1/4 waren 64 dieser 90 Kombinationen nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt deutlich positiv, in der Zentrifugiertechnik waren alle 90 positiv, bei nachfolgendem Brutschrankaufenthalt ging keine der Agglutinationen völlig zurück, mikroskopisch waren alle Agglutinationen deutlich. Bei weiteren 54 Kombinationen war die Agglutination in der Verdünnung 1/2 in allen Fällen schon nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt positiv. Diese

Untersuchungen wurden mehrfach wiederholt und dabei festgestellt, daß der Heteroagglutinationstiter gegen Stallkaninchen 1/2 bis 1/20 bei makroskopischer Ablesung, 1/6 bis 1/80 bei Ablesung nach der Zentrifugiertechnik

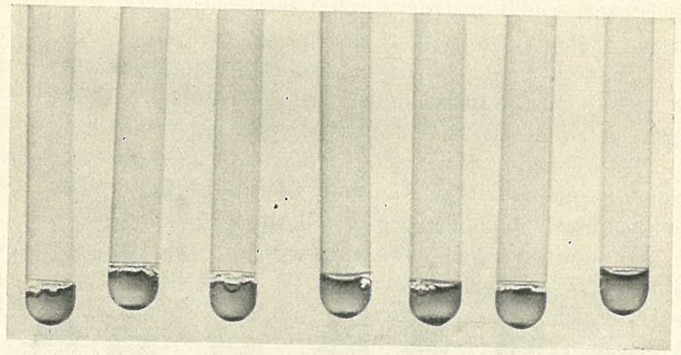


Fig. 1. Heteroagglutination der Blutkörperchen von 7 Kaninchen durch Hasenserum 6 Verdünnung 1/2) nach 1 Stunde Zimmertemperatur.

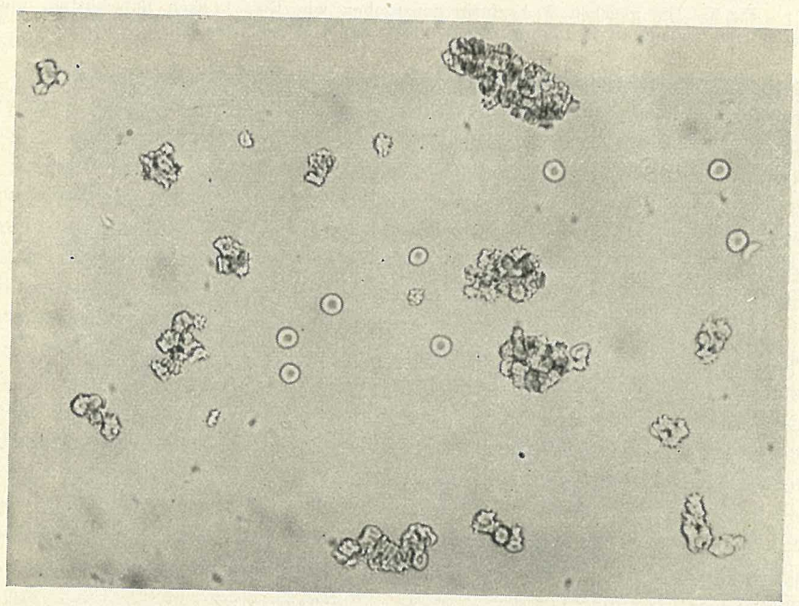


Fig. 2. Mikroskopisches Bild zu 1 nach Aufschütteln des Bodensatzes: neben echter Agglutination auch Geldrollenbildung.

betrug. Im ganzen wurden 181 Kombinationen wiederholt geprüft; die Wiederholungen wurden dadurch erforderlich, daß bei mikroskopischer Untersuchung neben echter Agglutination auch Geldrollen vorhanden waren. Am besten werden diese Befunde durch die nachfolgenden 4 Abbildungen demonstriert.

In der gleichen Weise wurden die Seren von 9 Feldhasen gegen die Blutkörperchen mehrerer wilder Feldkaninchen geprüft. Bei 75 Kombinationen waren in der Verdünnung 1/2 in allen Röhrchen bei 1stündigem Brutschrank-

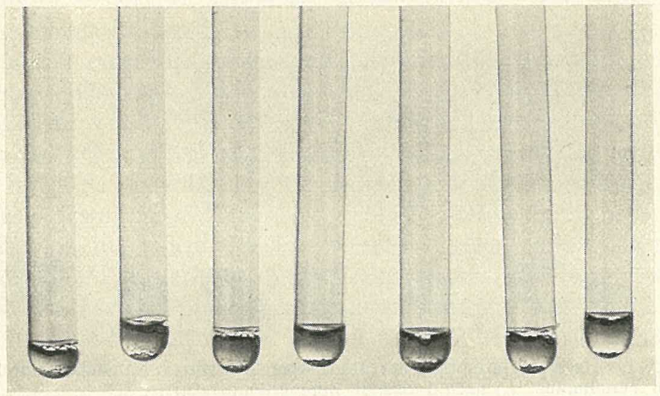


Fig 3. Die gleichen 7 Agglutinationsproben wie Fig. 1 nach aufschütteln und 4stündigen Aufenthalt bei Zimmertemperatur: Agglutination wesentlich deutlicher.

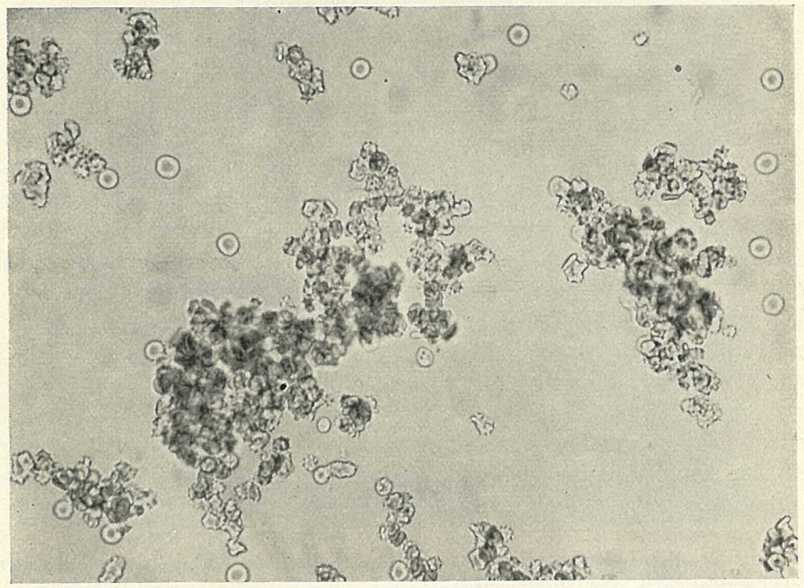


Fig. 4. Mikroskopisches Bild zu 3: Verklumpung der Blutkörperchen sehr stark, vereinzelt Andeutung von Geldrollenbildung.

aufenthalt Agglutinationen makroskopisch ablesbar, in der Verdünnung 1/4 48 von 75 und in der Verdünnung 1/10 13 von 75. Bei Anwendung der Zentrifugiertechnik wurden einzelne Blutkörperchenproben bis zur Serum-

verdünnung 1/50 agglutiniert. Die Erythrozyten der wilden Feldkaninchen (in den späteren Protokollen mit F bezeichnet) und der Stallkaninchen (mit K bezeichnet) verhalten sich bezüglich ihrer Agglutinabilität durch Hasenseren gleich; die makroskopischen und mikroskopischen Bilder entsprechen den im vorigen Absatz reproduzierten. Im ganzen wurden 117 verschiedene Kombinationen mehrfach untersucht.

Die Rezeptoreigenschaften der Hasenblutkörperchen wurden geprüft gegenüber menschlichen Seren, gegenüber Stallkaninchenseren und gegenüber Feldkaninchenseren.

Menschliche Seren der 4 Blutgruppen hämolysierten ohne Komplementzusatz in der Verdünnung 1/5 die Blutkörperchen von 6 Hasen fast komplett bis komplett nach 1 Stunde Brutschrankaufenthalt.

Die Seren von Stallkaninchen enthalten schwache Normalantikörper gegen Hasenblutkörperchen; es wurden im ganzen 78 Kombinationen geprüft; der Agglutinationstiter beträgt bei makroskopischer Ablesung nach 4stünd. Brutschrankaufenthalt 1/2 bis 1/6, bei Ablesung mit der Zentrifugiertechnik nach 1stündigem Aufenthalt im Brutschrank 1/4 bis 1/20. Ein Hämolysingehalt gegen Hasenblutkörperchen ist nach 24 Stunden in der Verdünnung 1/4 stets nachweisbar.

Die Seren von Feldkaninchen enthalten Heteroagglutinine und Heterolysine gegen Hasenerythrozyten der gleichen Art und Stärke wie die Seren von Stallkaninchen; geprüft wurden im ganzen 50 Kombinationen.

Nach diesen Untersuchungen über den Gehalt an Normal-Antikörpern begannen die Immunisierungen: Hase 10 wurde mit einem Gemisch ausgewaschener Blutkörperchen von 4 Feldkaninchen immunisiert und erhielt am 5. März, 8. März und 12. März 1928 je 3,5 bis 5,0 ccm sedimentierte Erythrozyten intravenös; Hase 7 wurde in der gleichen Weise mit einem Gemisch von Stallkaninchen- und Feldkaninchenerythrozyten immunisiert.

Hase 10, dessen Serum vor der Immunisierung bei makroskopischer Ablesung die Blutkörperchen keines Feldkaninchens oder Stallkaninchens über die Serumverdünnung 1/4 hinaus agglutinierte und nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt, selbst unverdünnt, die geprüften Blutkörperchenaufschwemmungen nie hämolysierte, kam am Tage nach der 3. Injektion ad exitum. Obwohl das Versuchstier aller Wahrscheinlichkeit nach in der negativen Phase war, agglutinierte das von ihm gewonnene Serum die Blutkörperchen von 7 Feldkaninchen und 6 Stallkaninchen bis zur Verdünnung 1/150 bis 1/400 bei makroskopischer Ablesung; der Hämolysintiter, der aus Mangel an geeignetem Komplement[1]) nur im sogenannten „Blankwert" (ohne

1) Als Komplement wäre nur das Serum unbehandelter Hasen in Betracht gekommen; von den 10 Versuchstieren lebte an jenem Tage nur noch Hase 7, der selbst immunisiert war. Meerschweinchenserum ließ sich als Komplement nicht verwenden, da es zu starke Hämolysine gegen Kaninchenblut enthielt; Stallkaninchen- oder Feldkaninchenseren waren gleichfalls unbrauchbar, da sie nicht im stande waren, das Hasenserum zu reaktivieren (Antilysinwirkung?).

Zusatz von Komplement) bestimmt werden konnte, betrug nach der Immunisierung 1/4 bis 1/6 für komplette Hämolyse, 1/10 bis 1/15 für schwache bis Spur von Hämolyse nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37°. Es ist besonders zu beachten, daß das Versuchstier nur Blutkörperchen von Feldkaninchen injiziert bekommen hatte und daß die infolge der Immunisierung entstandenen Antikörper sich in gleicher Weise und gleicher Stärke gegen die Erythrozyten der Feldkaninchen wie der Stallkaninchen richteten.

Hase 7 war mit einem Gemisch von Stallkaninchen- und Feldkaninchenblutkörperchen immunisiert worden und bildete Antikörper, die ebenso wie die des Hasen 10 gegen Stallkaninchen und Feldkaninchen gerichtet waren.

Zur gleichen Zeit wie diese Untersuchungen fanden die entsprechenden Umkehrungen statt, d. h. es wurden 3 Stallkaninchen und 3 Feldkaninchen mit einem Blutkörperchengemisch der Hasen 7 bis 10 immunisiert.

Die Versuchstiere K. 250, K. 458 und K. 461 hatten 2 intravenöse Injektionen von Hasenblut erhalten, ihre Seren agglutinierten 3 Tage nach der letzten Injektion Hasenblutkörperchen bis zu einem Titer von 1/3000, 1/400 und 1/1500 bei makroskopischer Ablesung. Die Lysine gegen Hasenblut waren durch Zusatz eines geeigneten Komplements (Serum eines unbehandelten Kaninchens) reaktivierbar; die Lysintiter betrugen 1/100, 1/2 und 1/10, waren also erheblich niedriger als die entsprechenden Agglutinationstiter. Ob der Lysintiter längere Zeit (etwa 8—10 Tage) nach der 2. Injektion stärker angestiegen wäre, konnte leider nicht geprüft werden, da der letzte Hase zu früh ad exitum kam.

Die Versuchstiere F. 10, F. 11 und F. 12 hatten 3 intravenöse Injektionen von Hasenblut erhalten und mußten gleichfalls bereits am 3. Tage nach der letzten Injektion untersucht werden. Die Seren agglutinierten Hasenblut bis zur Verdünnung 1/500, 1/1500 und 1/1500; sie hämolysierten unter Zusatz von Feldkaninchenserum als Komplement bis zu einem Titer von 1/10 bis 1/100.

Am Schlusse dieses Abschnitts sei hervorgehoben, daß bei den Tieren K. 250, K. 458, K. 461, F. 10, F. 11 und F. 12 weder vor noch nach der Immunisierung mit Hasenblut keinerlei gegen Stallkaninchen oder Feldkaninchen gerichtete Antikörper gefunden werden konnten.

II.
Hämagglutination und Hämolyse bei Stallkaninchen und Feldkaninchen.

Die in diesem Abschnitt wiedergegebenen Befunde fallen zeitlich mit den unter I. erwähnten Untersuchungen über Antikörper- und Rezeptor-Eigenschaften des Hasenblutes zusammen; die erste, noch zu beschreibende Immunisierungsreihe wurde zur gleichen Zeit ausgeführt, wie die oben beschriebenen Immunisierungen der Stallkaninchen und Feldkaninchen mit Hasenblut und der Hasen mit Stallkaninchen- und Feldkaninchenblut. Die Ergebnisse wurden von den oben dargestellten Befunden abgetrennt, einmal

um eine klare Uebersicht zu gewährleisten, vor allem aber, um zum Ausdruck zu bringen, daß Stallkaninchen und Feldkaninchen blutgruppenserologisch ein und derselben Rasse angehören.

Da sich die weiteren 5 Immunisierungsreihen unmittelbar an die unserer I. Veröffentlichung anschließen, sei es gestattet, kurz das wesentlichste Resultat dieser Mitteilung zu wiederholen: in 3 verschiedenen Versuchsreihen, 20 gegen 20 Kaninchen, 16 gegen 16 Kaninchen und 21 gegen 12 Kaninchen konnten niemals normale oder durch Immunisierung erzeugbare Isoantikörper nachgewiesen werden.

Diese negativen Ergebnisse finden ihre Erklärung in folgendem: die Immunisierung war nicht intensiv genug (nur 2 Versuchstiere hatten 6 intravenöse Injektionen artgleicher Erythrozyten erhalten, alle übrigen nur 3); über 70 Proz. der Kaninchen weisen Rezeptoreigenschaften der Blutkörperchen auf, die keine Immunantikörperbildung zulassen.

In orientierenden Vorversuchen wurde zunächst geprüft, ob bei den Feldkaninchen Isoantikörper nachzuweisen waren; die Technik war die gleiche wie bei den vorhergehenden Versuchen: Röhrchenmethode mit 0,25 ccm absteigender Serumverdünnungen und 0,05 ccm 5proz. Aufschwemmung von dreimal gewaschenen Blutkörperchen. Ablesung: 1. nach 1stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37° wurde makroskopisch abgelesen; 2. nach 1 wurde vermittels der Zentrifugiertechnik abgelesen; 3. nach dem Aufschütteln in 2 wurden die Röhrchen wieder für 30 Minuten in den Brutschrank gebracht und dann die einzelnen Gemische mikroskopisch untersucht; 4. nach 24 Stunden wurden die mit aktivem Serum angesetzten Proben auf Hämolyse, die mit inaktivem Serum angesetzten Proben nochmals auf Agglutination geprüft.

Bei im ganzen 158 Kombinationen Feldkaninchenseren gegen Feldkaninchenblutkörperchen konnte niemals eine echte Agglutination oder eine Hämolyse festgestellt werden; einzelne Kälteagglutinationen (5) und mehrere Pseudoagglutinationen (7) konnten als Fehlerquelle ausgeschaltet werden, die zu irrigen Schlußfolgerungen hätten führen können.

In der gleichen Weise wurden Stallkaninchenseren gegen Feldkaninchenerythrozyten (172 Kombinationen) und Feldkaninchenseren gegen Stallkaninchenblutkörperchen (124 Kombinationen) geprüft; diese Untersuchungen auf Agglutinine und Lysine — hier müßte man eigentlich von Heteroantikörpern sprechen — ergaben, abgesehen von mehreren Kälte- und Pseudoagglutinationen, ebenfalls ein vollständig negatives Resultat. Infolgedessen können wir, unter gleichzeitiger Berücksichtigung der oben erwähnten Tatsache, daß der mit Feldkaninchenblut immunisierte Hase 7 in gleicher Weise und gleicher Stärke Heteroantikörper gegen Feldkaninchen und Stallkaninchen gebildet hatte, schließen, daß die Rezeptoreigenschaften der Feldkaninchen- und Stallkaninchen-Blutkörperchen identisch sind, daß also bei diesen Versuchstieren von

Immun-Isoantikörpern zu sprechen ist. Diese Schlußfolgerung wurde durch die Immunisierungsversuche aller 5 Reihen, vor allem der 2., 3. und 5. Reihe, bestätigt; bildete ein Stallkaninchen Antikörper gegen Feldkaninchenblut, so waren diese Serumeigenschaften gleichzeitig gegen mehrere Stallkaninchen gerichtet und umgekehrt.

In der ersten Immunisierungsreihe wurden 2 Stallkaninchen mit einem Blutkörperchengemisch von mehreren Feldkaninchen und 3 Feldkaninchen anfangs mit den Erythrozyten eines einzelnen Stallkaninchens, später gleichfalls mit einem Erythrozytengemisch mehrerer Stallkaninchen, immunisiert. Diese erste Reihe wurde, als die ersten Injektionen gegeben worden waren, durch 5 weitere Stallkaninchen ergänzt, die gleichfalls ein Gemisch von Blutkörperchen mehrerer Feldkaninchen erhielten. Es ist selbstverständlich, daß die Seren der zu immunisierenden Tiere (Empfänger) vor der Immunisierung stets gegen die Erythrozyten der für sie in Betracht kommenden Spendertiere geprüft wurden; infolgedessen erhöht sich die auf Seite 71 angegebene Anzahl untersuchter Kombinationen auf ein Vielfaches.

Die Einzelheiten des ersten Reihenversuches, Zahl der intravenösen Injektionen, Art der Immunisierung, Erfolg der Immunisierung, gehen am übersichtlichsten aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 1.

Empfänger		Spender		Zahl der Injektionen		Ergebnis des Versuches
No.	Rasse	No.	Rasse			
457	Widder	5, 6, 13	Feldkaninch.	1	8. 3. 1928	Ohne Antikörperbildung gg. F. oder K.
		5, 6, 7	,,	1	12. 3. 1928	
462	w. Riese	6, 10, 11, 12	,,	1	14. 3. 1928	14. 3. interkurrent † ohne Antikörperbildung
13	Feldkan.	459	w. Riese	3	8. 3.—15. 3.	Ohne Antikörperbildung gg. F. u. K.
14	,,	250 287	Schwl. Herm.	3	20. 3.—27. 3.	Mit Antikörperbildung gg. F. u. K.
16	,,	458 461	Widder w. Riese	3	4. 4.—11. 4.	Ohne Antikörperbildung gg. F. u. K.
447	Schwl.	5	Feldkaninch.	3	17.—24. 3.	Ohne Antikörperb. gg. F. u. K.
459	w. Riese	10	,,	4	8.—17. 4.	17. 4. interk. † ohne Antik.
464	Widder	12	,,	3	8.—14. 5.	Ohne Antikörperb. gg. F. u. K.
465	,,			1	24. 5.	Mit Antikörperb. gg. F. u. K.
466	Russe					20. 3. interk. † ohne Antik.

Von den 10 Versuchstieren bildeten F. 14 und K. 465 Antikörper. Feldkaninchen 14 hatte zunächst 3 intravenöse Injektionen Erythrozyten von K. 459 (weißer Riese) erhalten, ohne Agglutinine oder Lysine zu bilden; im weiteren Verlauf wurde das Tier mit einem Gemisch von Blutkörperchen K. 250, K. 287, K. 458 und K. 461 immunisiert mit dem Erfolg, daß das Serum F. 14 gegen K. 287 und K. 461 am 3. April 1928, 7 Tage nach der

6. intravenösen Injektion, Agglutinine enthielt; die Erythrozyten des K. 458 wurden dagegen nicht von ihm agglutiniert; K. 250 war inzwischen interkurrent gestorben, die Agglutinabilität seiner Blutkörperchen konnte infolgedessen nicht geprüft werden. Der Agglutinationstiter des Serums F. 14 betrug bei makroskopischer Ablesung 1/60 bis 1/80, bei Ablesung nach der Zentrifugiertechnik 1/150 bis 1/200; um seinen Titer weiter zu steigern, erhielt das Tier noch 3 weitere Injektionen. Eine wesentliche Steigerung konnte nicht mehr erzielt werden (makr. 1/80, Zentrifugiertechnik 1/300); infolgedessen wurde F. 14 am 19. April 1928 entblutet.

Mit dem so gewonnenen isoagglutinierenden ersten Testserum wurden die Blutkörperchen der noch im Versuch befindlichen Tiere und zahlreicher anderer Kaninchen untersucht; als Resultat ergaben sich Unterschiede in der Agglutinabilität, ähnlich wie sie schon zwischen den 3 überlebenden Spendertieren festgestellt wurden. Die Untersuchungen mußten auf dem Objektträger vorgenommen werden, um eine möglichst große Anzahl von Tieren in bezug auf die Rezeptoreigenschaft ihrer Blutkörperchen einreihen zu können. Außer den Rubriken „agglutiniert" und „nicht agglutiniert' findet sich in Tabelle 2 eine Spalte, die mit ± bezeichnet ist; das soll lediglich besagen, daß bei ihnen das Fehlen der durch F. S. 14 nachweisbaren Rezeptoreigenschaft nicht ganz zweifelsfrei erschien.

Tabelle 2.

Durch das Serum des Feldkaninchens 14, gewonnen durch Immunisierung mit Stallkaninchenblut, wurden von den Blutkörperchenaufschwemmungen

von 10	Hermelinkaninchen	5	agglutiniert,	3 ±,	2	nicht agglutiniert
,, 1	Russenkaninchen	1	,,			
,, 3	belg. Riesenkaninchen	3	,,			
,, 12	Widderkaninchen	10	,,		2	,, ,,
,, 15	silbergrauen Kaninchen	7	,,	5 ±,	3	,, ,,
,, 7	Chinchillakaninchen	4	,,		3	,, ,,
,, 12	blauen Wien. Kaninchen	6	,,	2 ±,	4	,, ,,
,, 13	weißen Riesenkaninchen	5	,,	2 ±,	6	,, ,,
,, 16	Schwarzlohkaninchen	7	,,	1 ±,	8	,, ,,
,, 12	braunen Kaninchen	4	,,	3 ±,	5	,, ,,
,, 5	Silberkaninchen	2	,,		3	,, ,,
,, 7	schwarzen Kaninchen	6	,,	1 ±		
,, 10	grauen Kaninchen	7	,,	2 ±,	1	,, ,,
,, 3	Scheckenkaninchen	2	,,		1	,, ,,
,, 8	Feldkaninchen	1	,,		7	,, ,,
Von 134	Kaninchen	70	agglutiniert,	10 ±,	45	nicht agglutiniert.

Von den übrigen Versuchstieren der ersten Immunisierungsreihe (s. Tab. 1, S. 72) hatte nur noch K. 465 Antikörper gebildet, die erst nach der 10. Injektion nachweisbar waren. Durch eine weitere Injektion konnte der Agglutinationstiter nicht über 1/6 gesteigert werden, doch wurde dadurch die lysierende Wirkung dieses Serums deutlich verstärkt. Das Tier K. 465 wurde 8 Tage nach der 11. Injektion entblutet; sein Serum wurde wegen des geringen Titers nicht als Testserum verwendet, trotzdem wurde es zu mehreren Untersuchungen in aktivem Zustande benutzt. Dabei stellte sich heraus, daß die Blutkörperchen von Kaninchen, die durch F. S. 14 agglutinabel

waren [K. 487, K. 488[1])], durch K. S. 465 weder agglutiniert noch hämolysiert wurden; eine Tatsache, die ohne weiteres durch den niedrigen Titer erklärt werden müßte, wenn nicht auch die Umkehrung stattgefunden hätte, d. h. die durch F. S. 14 nicht agglutinablen Blutkörperchen des K. 494[1]) durch K. S. 465 hämolysiert worden wären. Obgleich diese Befunde die Annahme mehrerer Rezeptoren zugelassen hätten, wurde bei der Aufstellung des zweiten Immurisierungsplanes lediglich von den Agglutinabilitätsunterschieden ausgegangen, die unter Benutzung des F. S. 14 (s. Tab. 2) festgestellt worden waren. Das ganze Tiermaterial der 2.—5. Immunisierungsreihe, soweit es zur Klarheit der Darstellung erforderlich ist, findet sich in der großen Uebersichtstabelle S. 81 zusammengestellt.

Tabelle 3.

Empfänger		Spender		Injektionen		Ergebnis der Immunisierung
Nr.	Rasse	Nr.	Rasse			
490	Hermelin	483	bl Wiener	7	23. 5.—28. 6.	
		916	Chinchilla	3	2. 7.— 9. 7.	ohne Antikörperbildg. gg. F. u. K.
491	weißer Riese	482	weißer Riese	5	23. 5.— 4. 6.	
		481	Hermelin	3	7. 6.— 2. 7.	
		469	Silbergrauer	2	5. 7.— 9. 7.	ohne Antikörperbildg. gg. F. u. K.
492	Brauner	484	belg. Riese	2	23. 5.—26. 5.	
		469	Silbergrauer	8	29. 5.— 9. 7.	mit Antikörperbildg. gg. F. u. K.
499	Chinchilla	489	Chinchilla	10	23. 5.— 9. 7.	ohne Antikörperbildg. gg. F .u. K.
F. **5**	Feldkaninch.	486	Widder	13	24. 5.— 7. 8.	mit Antikörperbildg. gg. F. u. K.
F. 10	„	494	Scheck	2	23. 5.—26. 5.	26. 5. interkurrent †
F. **12**	„	487	Schwarzloh	8	24. 5.— 2. 7.	mit Antikörperbildg. gg. F. u. K.
493	Chinchilla	489	Silbergrauer	10	23. 5.— 9. 7.	mit „
496	Silbergrauer	481	Hermelin	13	23. 5.— 7. 8.	mit „
	„	485	Gelbrot			
497	„	488	Silbergrauer	10	23. 5.— 9. 7.	ohne Antikörperbildg. gg. F. u. K.
500	„	494	Scheck	10	23. 5.— 9. 7.	„ „ „ „
501	„			3	23. 5.—29. 5.	30. 5. interkurrent †

In der zweiten Immunisierungsreihe wurden 12 Kaninchen, deren Blutkörperchen durch F. S. 14 nicht agglutiniert wurden, mit Blutkörperchen oder Blutkörperchengemischen solcher Kaninchen immunisiert, in deren Blut der mit dem F. S. 14 nachweisbare Rezeptor festgestellt worden war. Die Einzelheiten der Immunisierung gehen aus Tabelle 3 hervor.

Die Versuchstiere (F. 10 und K. 501 starben interkurrent) erhielten vom 23. Mai bis 7. Juni 6 intravenöse Injektionen der aus der Tabelle ersichtlichen Spenderblutkörperchen. Am 7. Tage nach der 6. Injektion hatten von 10 überlebenden Empfängern 4 Immunantikörper gebildet: K. 492 schwach, Titer 1/2 bis 1/4; F. 12 deutlich, Titer 1/40; K. 493 stark, Titer 1/200; K. 496 schwach, Titer 1/2 bis 1/4. Bis zum 11. Tage war noch eine geringe Zunahme des Titer festzustellen; am 15. Tage nahm die agglutinierende

1) Das mit K.S. 465 geprüfte Material findet sich in der großen Übersichtstabelle S. 81, zum Teil auch schon in Tabelle 5, S. 76.

Wirkung der Seren bereits wieder ab und war am 21. Tage stark abgeschwächt. Nach diesen 3 Wochen Pause erhielten die Versuchstiere weitere 4 Injektionen der Spenderblutkörperchen mit dem Erfolg, daß die Agglutinationstiter wieder anstiegen und außerdem F. 5 nach zusammen 8 Injektionen auch noch deutliche Antikörperbildung zeigte. Nach 10 Injektionen betrugen die Agglutinationstiter K. 492 1/600 bis 1/800 (Zentrifugiertechnik: 1/1500 bis 1/2000), K. 493 1/400 (Zentrifugiertechnik: 1/800 bis 1/1500), K. 496 1/100 (Zentrifugiertechnik: 1/300 bis 1/400) und F. 5 1/6 bis 1/10 (Zentrifugiertechnik: 1/20 bis 1/30). Die Agglutinationstiter von F. 5 und K. 496 sanken sehr schnell wieder ab, infolgedessen erhielten diese Tiere 3 weitere Injektionen. Nachdem die Versuchstiere hohe Titer erreicht hatten, wurden sie mit Ausnahme von K. 496 entblutet. Mit den von ihnen gewonnenen Immunseren erfolgten die Einreihungen der bisherigen und weiterer neuer Versuchstiere; denn es ergab sich aus deutlichen Titerunterschieden des K. S. 492, K. S. 493 und K. S. 496 gegen 2 auf diese Weise trennbare Kaninchengruppen und aus Bindungs- und Absprengungsversuchen, daß bei Kaninchen mit verschieden stark ausgebildeten Rezeptoreigenschaften zu rechnen war. Die Untersuchungsbefunde, die mit diesen Seren erhoben wurden, sind einmal aus der Uebersichtstabelle S. 81 ersichtlich und werden bezüglich der 5 Kaninchen, die trotz 10 intravenöser Injektionen keine Immunantikörper gebildet hatten, in folgendem besonders dargestellt.

Die isoagglutinierenden Immunseren K. 493 und K. 496 agglutinierten die Blutkörperchen, die den durch F. S. 14 nachweisbaren Rezeptor enthielten, stark, bis zur Verdünnung 1/150 bis 1/800; außerdem enthielten sie aber Agglutinine gegen die Erythrozyten der 5 nicht immunisierbaren Versuchstiere K. 490, K. 491, K. 497, K. 499 und K. 500 von einem Titer 1/15 bis 1/30. Am deutlichsten demonstriert diese Unterschiede eine kurze Tabelle.

Tabelle 4.
Blutkörperchenagglutinabilität verschiedener Kaninchen durch das isoagglutinierende Immunserum K. 493.

Kaninchen Nr.	469	485	486	487	488	489	916	490	491	497	499	500
Agglutinationstiter	1/800	1/600	1/150	1/200	1/300	1/300	1/200	1/15	1/15	1/15	1/30	1/20

Demnach müssen wir 1. eine stark agglutinable Gruppe und 2. eine schwach agglutinable Gruppe unterscheiden.

In Bindungs- und Absprengungsversuchen mit dem Immunserum F. 14 war bei K. 481, K. 483, K. 485 und K. 487, 4 Tieren der ersten Gruppe, nachgewiesen worden, daß ihre Rezeptoren für F. S. 14 identisch waren. Mit dem Immunserum K. 493 wurden nunmehr ähnliche Untersuchungen mit Kaninchen der beiden Gruppen vorgenommen. Es ergab sich dabei, daß das K. S. 493 durch Bindung an Blutkörperchen der stark agglutinablen Gruppe seinen Agglutiningehalt gegen beide Gruppen der Tabelle 4 verlor; daß es dagegen durch Bindung an Erythrozyten der schwach agglutinablen Gruppe nur die Agglutinine gegen die Blutkörperchen dieser zweiten, schwach agglutinablen

Gruppe verlor, dagegen immer noch die Blutkörperchen der ersten, stark agglutinablen Gruppe deutlich zusammenballte. Es war daraus zu folgern, daß in beiden Gruppen identische Rezeptoren, wenn auch verschieden stark ausgebildet, vorhanden waren.

Eine weitere Klärung ließen Untersuchungen mit dem Immunserum K. 492 zu. Abgesehen davon, daß es die gleichen Unterschiede im Agglutinationstiter gegenüber den beiden oben gekennzeichneten Gruppen wie K. S. 493 und K. S. 496 aufwies, zeigte es eine deutliche einwandfreie Agglutination der Blutkörperchen von K. 493 und K. 496. Um die daraus zu ziehenden Schlußfolgerungen klar darstellen zu können, werden in der nächsten Tabelle die charakteristischen Agglutinationen der bisher erhaltenen Immunseren mit Kaninchenerythrozyten der stark agglutinablen Gruppe, der schwach agglutinablen Gruppe und K. 493 und K. 496 aus der Uebersichtstabelle herausgezogen.

Tabelle 5.

Immunserum	Erythrozyten										
	F. 14	K. 465	K. 469	K. 485	K. 487	K. 494	K. 497	K. 500	K. 492	K. 493	K. 496
F. 14	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
K. 465		—	+	+	—	+					
F. 12			+	+	+	—	—	—	—	—	—
F. 5			+	+	—	+	—	—			+
K. 493			+++	+++	+++	+	+	+	—	—	—
K. 496			+++	+++	+++	+	+	+	—	÷	—
K. 492			+++	+++	+++	+	+	+	—	+	+

Aus dieser Tabelle ist hervorzuheben, daß F. S. 14 und F. S. 12 mit den nämlichen Blutkörperchen in der gleichen Weise reagierten; K. S. 493 und K. S. 496 agglutinierten die durch F. 14 und F. 12 erfaßbaren Erythrozyten stark, die der nicht immunisierbaren K. 494, K. 497 und K. 500 schwach und die der immunisierten Tiere K. 492, K. 493 und K. 496 nicht. K. S. 492 agglutinierte außerdem die Blutkörperchen von K. 493 und K. 496; daraus (doppelt umrandeter Teil der Tabelle 5) mußte geschlossen werden, daß das Immunserum K 492 einen gegen ein zweites Agglutinogen gerichteten Immun-Antikörper enthielt. Diese Tatsache bestätigte unsere S. 74 bereits geäußerte Vermutung und veranlaßte die Aufstellung des dritten Immunisierungsplanes.

In der dritten Versuchsreihe wurden infolgedessen solche Tiere, deren Blutkörperchen starke Rezeptoreigenschaften aufwiesen, gegen Erythrozyten mit schwach ausgebildeten Rezeptoreigenschaften immunisiert und umgekehrt. Die Einzelheiten der Vorbehandlung (Anzahl Injektionen, Spendertiere) sind aus der Uebersichtstabelle ersichtlich. In der Tat brachte dieser Versuch das Resultat, daß K. 487, dessen Blutkörperchen stark agglutinabel waren, Immunantikörper gegen Erythrozyten bildete, die die schwachen Rezeptoren aufwiesen. Nach 9 intravenösen Injektionen enthielt das Serum

von K. 485 am 24. Okt. 1928 Immunisoagglutinine, die gegen das zweite Agglutinogen gerichtet waren; der Agglutinationstiter betrug 1/60 bis 1/150 bei makroskopischer Ablesung. Bevor das Fehlschlagen der übrigen Immunisierungsversuche dieser Reihe erklärt werden kann, sind die charakteristischen Agglutinationen der Tabelle 5 zu ergänzen.

Bisher wurden 4 isoagglutinierende Immunseren (F. 14, F. 12, K. 493 und K. 496) erwähnt, deren Antikörper gegen das zuerst gefundene Antigen, das im folgenden mit A bezeichnet werden soll, gerichtet waren. Außerdem wurde über die Ergebnisse berichtet, die mit dem Immunserum K. 492 gefunden wurden; dieses Serum enthielt außer dem gegen A gerichteten Isoantikörper α ein weiteres Isoagglutinin, das entsprechend der Nomenklatur bei den menschlichen Blutgruppen mit β bezeichnet werden soll und den Rezeptor B erfaßte. Bei K. 487, dessen Rezeptor nach dem Vorhergehenden mit A zu bezeichnen ist, gelang es, den Isoantikörper β allein (nicht mit α vergesellschaftet, wie bei K. S. 492) zu erzeugen. Die mit K. S. 487 erhaltenen Agglutinationen klärten gleichzeitig die in Tabelle 5 wiedergegebenen, aber bisher nicht besprochenen Agglutinationsbefunde mit den Immunseren K. 465 und F. 5 auf. Diese beiden letzteren Seren erweisen sich demnach als schwach isoagglutinierende Seren der Gruppe Aβ (,die den gleichen Antikörper β wie K. S. 487 enthalten).

In einfachster Form dargestellt, ergibt sich jetzt folgendes Isoagglutinationsschema:

Tabelle 6.

	K. Er. 492	K. Er. 496	K. Er. 487	K. Er. 469
Immunserum K. 492 (O$\alpha\beta$)	—	+	+	+
Immunserum K. 496 (F. 14; F. 12; K. 493) (Bα)	—	—	+	+
Immunserum K. 487 (K. 465; F. 5) (Aβ)	—	+	—	+
Normalserum K. 469 (nicht immunisierbar) (AB)	—	—	—	—

Mit Hilfe der 3, durch Immunisierung gewonnenen, isoagglutinierenden Testseren K. 492, K. 496 und K. 487 wurden jetzt sämtliche noch im Versuch befindlichen Tiere und weitere neue Tiere auf Gruppenzugehörigkeit geprüft; dabei stellte sich heraus, warum bei 6 von den übrigen 10 überlebenden Versuchstieren der dritten Reihe keine Immunantikörper entstanden waren. Die Tiere sollten Antikörper bilden gegen Isoagglutinogene, die in ihren eigenen Blutkörperchen nachzuweisen waren; sie gehörten alle 6 der Blutgruppe AB an und durften infolgedessen nicht imstande sein, Antikörper gegen A oder B zu bilden. K. 496 hatte bereits in der 2. Versuchsreihe Immunisoagglutinine gebildet, sein abgesunkener Titer war nur wieder hochgetrieben worden. Bei den übrigen drei nicht immunisierbaren Tieren K. 902, K. 907 und K. 924 ist zu bemerken, daß ihre Blutkörperchen bei der Prüfung mit dem Immunserum K. 496 nicht agglutiniert wurden. Nachdem jedoch der Titer des isoagglutinierenden Immunserums K. 496 in der dritten Versuchs-

reihe infolge von 6 neuen Injektionen wieder eine ansehnliche Höhe erreicht hatte, agglutinierte dieses Serum die Blutkörperchen aller drei Tiere. Infolgedessen hätten diese Empfängertiere nach der ersten Prüfung als zur Blutgruppe B gehörig angesehen werden müssen; während sie, wie sich erst jetzt herausstellte, die Blutgruppe AB aufwiesen[1]). Unwillkürlich drängt sich einem der Vergleich mit der menschlichen Blutgruppe AB auf, bei der sich manchmal der Rezeptor A ebenfalls nur sehr schwer oder gar nicht nachweisen läßt (4).

Die Blutgruppenbestimmungen mit den 3 Seren K. 492, O$\alpha\beta$, K. 496, Bα und K. 487 Aβ, bei 38 noch im Versuch befindlichen Tieren und 8 bisher immunisierten Tieren ergaben, daß nur 1 Tier, K. 492, die Eigenschaft O hatte,

9 Tiere (darunter 3 immunisierte) die Eigenschaft A hatten,

10 Tiere (darunter 4 immunisierte) die Eigenschaft B hatten,

und 26 Tiere die Eigenschaft AB hatten.

Da die im Versuch befindlichen und immunisierten Tiere eine von bestimmten Gesichtspunkten geleitete Auswahl darstellten, wurden bei weiteren 74 Stallkaninchen und 36 Feldkaninchen mit Hilfe der 3 Seren die Blutgruppen bestimmt. Das Resultat der Untersuchung zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 7.

	O	A	B	AB
Stallkaninchen	—	8	4	62
Feldkaninchen	—	8	3	23

Bei 2 Feldkaninchen (F. 45 und F. 49) wurde ein bisher bei keinem Tier erhobener Befund festgestellt. Das Serum K. 492 agglutinierte die Blutkörperchen dieser Feldkaninchen nicht, während sie von den beiden anderen Seren K. 496 und K. 487 deutlich zusammengeballt wurden. Eine Einreihung in das S. 77 wiedergegebene Agglutinationsschema war infolgedessen nicht möglich. Ob dieser Befund die Annahme eines dritten Isoagglutinogens[2]) erforderlich macht, konnte leider nicht geklärt werden; denn beide Tiere starben sehr bald nach der zweiten Untersuchung, die das gleiche Ergebnis hatte.

Die Einreihung der übrigen neuen Tiere zeigte, daß die Blutgruppe O sehr selten, dagegen die Blutgruppe AB sehr häufig ist; das Häufigkeitsverhältnis von A zu B ist bei Stallkaninchen und Feldkaninchen fast gleich, die Blutgruppe AB dagegen ist bei Stallkaninchen wesentlich häufiger. Diese

1) Die Ergebnisse der Einreihungen sind in der Übersichtstabelle enthalten.

2) Man könnte an ein drittes Agglutinogen R und einen gegen R gerichteten Antikörper ρ denken. Dann würde dem K. 496 die Blutgruppenformel B$\alpha\rho$ und K. 487 die Formel A$\beta\rho$ zukommen. Da aber K. Er. 492 nicht durch das Serum von K. 496 agglutiniert wurden, ist dieser Gedanke irrig, und es liegt näher, an eine Abschwächung der Testseren oder an eine Schädigung des Rezeptorenapparates bei den in Frage stehenden Feldkaninchen zu glauben, die 3 und 1 Tag ante exitum untersucht wurden.

Zahlenverhältnisse lassen es erklärlich erscheinen, daß die Zahl der immunisierbaren Kaninchen bisher so gering war; denn kein AB-Tier darf die Fähigkeit haben, gegen A oder B Antikörper zu bilden; die A-Tiere können nur gegen B oder AB, die B-Tiere nur gegen A oder AB Agglutinine erzeugen.

Um diese Verhältnisse und die Richtigkeit der Blutgruppeneinreihung zu bestätigen, wurde noch eine vierte und fünfte Immunisierungsreihe angesetzt. Die Einzelheiten dieser beiden letzten Reihen gehen aus der Uebersichtstabelle hervor.

Von 17 Empfängertieren der vierten Reihe konnten K. 469, K. 485, K. 902 und K. 907 keine Antikörper bilden, bei K. 937 war diese Fähigkeit strittig, da die Agglutinabilität seiner Blutkörperchen durch K. S. 487 (Aβ) zweifelhaft gewesen war. Von den übrigen 12 Tieren starb eines, F. 34, interkurrent nach 4 Injektionen, 5 bildeten Antikörper nach 10 Injektionen (K. 931, K. 935, K. 938, K. 939, F. 30), zwei weitere (K. 942, K. 943) nach 16 Injektionen und 4 Tiere (K. 927, K. 940, F. 29 und F. 32) auch dann noch nicht.

Von der Betrachtung ausgehend, daß die Agglutinabilität der Blutkörperchen eines Tieres mit der antigenen Eigenschaft des durch die Agglutination nachgewiesenen Rezeptors nicht parallel zu gehen braucht, wurden drei dieser in der vierten Reihe nicht immunisierbaren Tiere in die fünfte Versuchsreihe übernommen und mit Blutkörperchen, die die gleichen Rezeptoreigenschaften aufwiesen wie die, die sie bisher erhalten hatten, aber von einem anderen Spenderindividuum stammten, immunisiert. Alle drei Tiere (K. 940, F. 29 und F. 32) zeigten bereits nach 8 Injektionen in der fünften Reihe typisch gerichtete Immunisoantikörper.

Außer diesen drei Tieren wurden in der fünften Reihe noch 12 Empfänger intensiv immunisiert; vier der Tiere starben interkurrent. Nach 8 Injektionen waren bei 6 von 8 überlebenden die zu erwartenden Isoagglutinine erzeugt worden; F. 36, dessen Rezeptoreigenschaft B zweifelhaft war, bildete auch nach weiteren 23 Injektionen keine Immunantikörper, mußte also wohl der Blutgruppe AB angehört haben. K. 961 starb nach der zweiten Prüfung nach dem ersten Immunisierungsschlag von 8 Injektionen, ohne Agglutinine gebildet zu haben.

Von der vierten und fünften Reihe läßt sich also zusammenfassend sagen:

Sieht man von 6 der Blutgruppe AB zuzurechnenden Tieren ab und schaltet man die zu früh gestorbenen Tiere aus, so haben von 17 lange genug immunisierten überlebenden Versuchstieren 15 die nach der Blutgruppeneinreihung zu erwartenden isoagglutinierenden Immunantikörper gebildet.

Zusammenfassung.

1) Normale Isoantikörper konnten beim Feldhasen nicht nachgewiesen werden.

2) Im Hasenserum sind normale Heterohämolysine gegen Hammelblut in etwa der gleichen Stärke vorhanden wie bei unbehandelten Stallkaninchen.

3) Hasenseren enthalten normalerweise Heteroagglutinine und Heterolysine gegen menschliche Blutkörperchen der vier Blutgruppen.

4) Hasenseren weisen schwache Normalantikörper gegen Stallkaninchen und Feldkaninchen auf.

5) Hasenblutkörperchen werden durch menschliche Seren der vier Blutgruppen, durch Stallkaninchenseren und Feldkaninchenseren lysiert und agglutiniert.

6) Das Serum eines Hasen, der mit Feldkaninchenblutkörperchen immunisiert wurde, enthielt vermehrte Agglutinine und Lysine, die gegen Stallkaninchen und Feldkaninchen in gleicher Stärke gerichtet waren.

7) Stallkaninchen und Feldkaninchen bilden schnell und intensiv Immunheteroantikörper gegen Hasenblut.

8) Normale Isoantikörper konnten ebensowenig beim Feldkaninchen wie beim Stallkaninchen nachgewiesen werden.

9) In Seren von Stallkaninchen konnten keine normalen Antikörper gegen Feldkaninchen, in Feldkaninchenseren keine normalen Antikörper gegen Stallkaninchen gefunden werden.

10) Durch wechselseitige Immunisierung sowohl von Stallkaninchen wie von Feldkaninchen wurden Immunisoantikörper erzeugt, die zwei, bei Stallkaninchen und Feldkaninchen identische Rezeptoren erfassen.

11) Das getrennte oder gemeinsame Vorkommen dieser zwei, durch isoagglutinierende Immunseren nachweisbaren Rezeptoren läßt bei Stallkaninchen und Feldkaninchen eine Einteilung in vier Blutgruppen zu.

12) Da die mit Immunisoantikörpern bei Stallkaninchen und Feldkaninchen nachgewiesenen Rezeptoren identisch sind, gehören Stallkaninchen und Feldkaninchen blutgruppenserologisch einer Rasse an.

Literatur.

1) Fischer und Klinkhart, diese Zeitschrift, 1929, H. 22, S. 31.
2) v. Gara, Klin. Wochenschr. 1930, Bd. 9, S. 209. — Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1930. Bd. 65, S. 167
3) Levine und Landsteiner, Journ. of Immunology, Vol. 17, 1929, p. 559.
4) Lauer, Dtsch. Zeitschr. f. d. ges. ger. Medizin, 1928, Bd. 11, S. 264. — Klin. Wochenschr., 1930, Bd. 9. S. 398.
Thomsen, Klin. Wochenschr., 1929, Bd. 8, S. 1075. — und Mitarbeiter Klin. Wochenschrift, 1930, Bd. 9, S. 67.
Landsteiner and Witt, Jorn. of Immunol., 1926, Vol. 11, p. 221. — and Levine, Jorn. of. Immunol., 1926, Vol. 12, H. 6.
Aronsohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1929, Bd. 64, S. 418.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5998

Rassenzugehörigkeit	Feldkaninchen						Widder	Silbergrau	Hermelin	Weiß. Riese	Bl. Wiener	Belg. Riese	Gelbrot	Widder	Schwarzloh	Silbergrau	Chinchilla	Hermelin	Weiß. Riese	Braun	Chinchilla	Scheck	Silbergrau	Silbergrau	Chinchilla	Silbergrau	Silbergrau	Braun	Braun	Widder	Schwarzloh	Bl. Wiener	Schwarzloh	Braun	Widder
Tier No.[1])	5	10	12	13	14	15	465	469	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	496	497	499	500	501	902	903	904	906	907	908	909	912
Agglutination durch F.S. 14	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
„ „ K.S. 465	.	.	.	.	.	.	—	+	+	+	+	.	+	+	—	—	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	+	+	+	+	+	—	—
2. Reihe siehe Tab. S. 74: Anzahl intravenöser Injektionen	13	2	8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	10	10	10	.	13	10	10	10	3	.	.	.	.	.	.	.	.
Spendertiere[1])	486	494	487	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	483	482	484	489	.	Gemisch	Gemisch	489	Gemisch	Gemisch	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	916	481	469	.	.	Tab. 3	Tab. 3	.	Tab. 3	Tab. 3	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	469	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Antikörperbildung	ja	†	ja	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	nein	nein	ja	ja	.	ja	nein	nein	nein	†	.	.	.	.	.	.	.	.
Agglutination durch F.S. 12	—	.	—	.	.	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
„ „ F.S. 5	—	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	—	—	+	.	+	.	.	+	+	—	.	—	.	—	+	+	+	—	—	+	+
„ „ K.S. 493	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	.	—	+	—	+	+	+	.	±	.	.	.	.	.	.	.
„ „ K.S. 492	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+
„ „ K.S. 496	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	+	+	+	.	+	—	.	+	—	+	+	+	.	—(+)[2])	+	—	—	—(+)[2])	—	+	+
3. Reihe siehe S. 76/78: Anzahl intravenöser Injektionen	.	.	.	.	.	.	.	10	.	.	.	.	12	12	9	.	.	.	.	.	.	12	6	12	6	6	.	9	.	.	.	12	.	.	.
Spendertiere[1])	.	.	.	.	.	.	.	908	.	.	.	.	922	921	904	.	.	.	.	.	.	489	488	912	913	914	.	909	.	.	.	917	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	931	.	.	.	.	.	929	906	.	.	.	.	.	.	920	.	919	.	.	.	488	.	.	.	919	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	930	.	.	.	.	.	.	.
Antikörperbildung	.	.	.	.	.	.	.	nein	.	.	.	.	nein	nein	ja	.	.	.	.	.	.	nein	ja	nein	†	†	.	nein	.	.	.	nein	.	.	.
Agglutination durch K.S. 487	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	—	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	+	+	.	.	+	.	.	+
Blutgruppenbezeichnung (siehe Tabelle 6)	Aβ	.	Bα	.	Bα	.	Aβ	AB	.	.	.	.	AB	AB	Aβ	.	.	.	.	Oαβ	Bα	AB	Bα	AB	.	.	.	B?AB	AB	.	.	B?AB	.	.	AB
4. Reihe siehe S. 79: Anzahl intravenöser Injektionen	.	.	.	.	.	.	.	16	.	.	.	.	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	.	.	.	1	.	.	.
Spendertiere[1])	.	.	.	.	.	.	.	932	.	.	.	.	933	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	919	.	.	.	944	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Antikörperbildung	.	.	.	.	.	.	.	nein	.	.	.	.	†	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	†	.	.	.	†	.	.	.
5. Reihe siehe S. 79: Anzahl intravenöser Injektionen	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Spendertiertypus[1])	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Antikörperbildung	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

1) Alle Versuchstiere mit dreistelligen Nummern sind Stallkaninchen, mit weniger als dreistelligen Nummern Feldkaninchen.

2) K. 902, K. 907 und K. 924 wurden von K.S. 496, dessen Titer am Ende der Prüfungen für die dritte Reihe abgesunken war, nicht agglutiniert; nachdem der Agglutinationstiter von K. 496 wieder

Tabelle 8.
Uebersichtstabelle.

	Chinchilla	Scheck	Bl. Wiener	Chinchilla	Chinchilla	Braun	Schwarz	Bl. Wiener	Bl. Wiener	Weiß. Riese	Weiß. Riese	Schwarzloh	Grau	Braun	Braun	Widder	Braun		Widder	Widder	Widder	Widder	Widder	Braun	Braun	Braun	Braun	Scheck	Scheck	Widder	Schwarzloh		Silbergrau	Schwarzloh	Braun	Scheck	Widder	Hermelin	Schwarz	Silbergrau	Gelbrot	Hermelin	Schwarz	Schwarzloh	Schwarzloh	Scheck	Schwarzloh		Feldkaninchen														
	913	914	915	916	917	919	920	921	922	923	924	925	927	928	929	930	931		932	933	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	946		948	949	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963		22	24	26	27	28	29	30	31	32	34	35	36	37	38	45	49
	+	+	+	+	+	+	+	—	—	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	±	±	±	—	—	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	+	±	—	—	+	+	+	±	—	+	+	+	+	+	+	+	+		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—(+)[2]	+	—	—	±	+	—		+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+		—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
	.	.	12	.	.	.	.	.	.	.	12	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	923	.	.	.	.	.	.	.	903	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	nein	.	.	.	.	.	.	.	nein	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	+	+	.	.	+	.	.	+	+	+	+	+	.	.	+	+		+	+	+	+	±	—	—	+	—	—	—	+	+		+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—		+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	±	+	+	+	+
	.	AB	AB	.	.	AB	.	.	AB	B	B?AB	AB	B	B	.	AB	B		AB	AB	B	AB	AB?	A	A	B	A	A	A	AB	AB		B	AB	AB	AB	AB	A	A	B	A	A	B	A	A	A	A		AB	AB	AB	AB	AB	A	A	A	B	B	AB	AB?	B	AB	!	!
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	16	.	.	.	16		.	.	16	.	10	16	16	16	.	10	16	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	16	10	.	16	4	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27	.	.	.	941		.	.	936	.	936	28	928	31	.	932	26	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	22	923	.	24	942	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	933	35	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	nein	.	.	.	ja		.	.	ja	.	nein	ja	ja	nein	.	ja	fraglich	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	nein	ja	.	nein	†	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	8, 4, 3	8, 4, 3	.	8, 4, 3	.	.		8, 4, 3	.	.	.	.	8, 4, 3	8, 4, 3	.	.	8, 4, 3	2	6	8	3	5		.	.	.	.	.	8, 4, 3	.	.	8, 4, 3	.	.	8, 4, 3	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	946	946	.	925	.	.		957	.	.	.	.	956	951	.	.	469	957	956	469	952	949		.	.	.	.	.	36	.	.	38	.	.	24, 38	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	ja	ja	.	ja	.	.		ja	.	.	.	.	ja	ja	.	.	ja	†	†	nein	†	†		.	.	.	.	.	ja	.	.	ja	.	.	nein weitere 16 : nein	.	.	.	.

hochgetrieben worden war, wurden die Er. aller 3 Kaninchen agglutiniert. Daher die Blutgruppenbezeichnung: B ? AB.