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**,
FORTGEFÜHRT VON **WILHELM KOLLE**

HERAUSGEGEBEN VON

DR. **R. OTTO**
k. DIREKTOR DES STAATSINST. FÜR EXP. THERAPIE UND DES GEORG SPEYER-HAUSES
HONORARPROFESSOR AN DER UNIVERSITÄT BERLIN

Heft 32

Die Wertbemessung der Diphtherie-Impfstoffe

1. Prigge, R., Die Staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen. Mit 3 Abbildungen im Text. (S. 1—50.)
2. Schäfer, W., Variationsstatistische Untersuchungen zur Wertbestimmung von Diphtherieimpfstoffen. Mit 25 Abbildungen im Text. (S. 51—112.)

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1935

Alle Rechte vorbehalten
Printed in Germany

Paul Ehrlich-
Institut
Bibliothek
Frankfurt a. Main

X
9 (32-36.1

Aus der experimentell-therapeutischen Abteilung des Staatlichen Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Stellv. Direktor: Prof. Dr. H. Hetsch.)

I.

Die Staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen.

Von

R. Prigge.

Mit 6 Abbildungen im Text.

Der Wertbemessung der Diphtherieimpfstoffe mittels des Tierversuchs standen von vornherein erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Es erschien anfangs nicht möglich, die gewonnenen Ergebnisse mit einer den theoretischen und praktischen Anforderungen entsprechenden Genauigkeit zu reproduzieren, und das Verhältnis des Immunisierungswertes verschiedener Impfstoffe eindeutig festzulegen. Die Ueberwindung der ungewöhnlich großen Schwierigkeiten gelang nur durch die konsequente Verfolgung dreier, von einander unabhängiger Prinzipien.

I.

Wenn sich das bei der Messung von Antikörpern seit etwa 35 Jahren verfolgte Grundprinzip ohne Aenderung auf die Messung von Diphtherieimpfstoffen hätte übertragen lassen, so hätte man etwa in folgender Weise vorgehen können: Man ermittelt diejenige Dosis Toxin, gegen die eine bestimmte willkürlich gewählte Menge eines „Standard"-Impfstoffes geeigneten Versuchstieren Schutz verleiht. Die Einverleibung dieser Prüfungsdosis des Testgiftes darf also Tiere, die mit der erwähnten Impfstoffmenge immunisiert sind, nicht töten. Zur Ermittlung des Immunisierungswertes eines beliebigen anderen Impfstoffes immunisiert man nun Versuchstiere mit wechselnden Mengen dieses Impfstoffes und vergiftet sie später mit der Prüfungsdosis des Testgiftes. Diejenige Impfstoffmenge, die eben ausgereicht hat, um Schutz gegen die Toxindosis zu erzeugen, besitzt den gleichen Immunisierungswert wie die als Maßstab dienende Menge des „Standard"-Impfstoffes.

Eine zuverlässige Messung nach diesem Verfahren wäre ohne weiteres möglich, wenn die Impfstoffmenge, die Schutz gegen eine bestimmte Gift-

dosis verleiht, eine mit hinreichender Genauigkeit reproduzierbare Größe wäre. Voraussetzung hierfür wäre, daß die Dosis, die alle Tiere am Leben erhält, und die Dosis, die kein Tier schützt, nur um einen geringfügigen Betrag verschieden sind. Nur wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, liefert der einfache Reihenversuch, bei dem jede Dosis nur mit einem Tier besetzt wird, Werte, welche sich mit genügender Genauigkeit reproduzieren lassen.

Aber auch im günstigsten Falle — wie er z. B. bei der Wertbemessung des antitoxischen Diphtherieserums verwirklicht ist — erfolgt der Uebergang von der einen Grenzdosis zur anderen nicht schlagartig, sondern man kann stets Zwischendosen ermitteln, welche einen Teil der Tiere am Leben erhalten, einen anderen Teil dagegen nicht zu schützen vermögen. Für das einzelne Tier, welches eine solche Dosis erhalten hat, läßt sich also nie voraussagen, ob es sterben oder am Leben bleiben wird. Nur spielt dieser Umstand praktisch keine Rolle, wenn die beiden Grenzwerte etwa nur um 10 Proz. auseinanderliegen. Wenn die Dosen bei der Titration so abgestuft werden, daß sie sich ebenfalls jeweils um 10 Proz. unterscheiden, so beträgt der Fehler des normalen Reihenversuches, wie Prigge u. Hartoch gezeigt haben, höchstens + 11 Proz. bzw. — 10 Proz. des wahren Wertes.

Prigge u. Hartoch (1) haben aber nachgewiesen, daß der Fehler des einfachen Reihenversuches außerordentlich groß wird, wenn die Spanne zwischen den erwähnten Grenzdosen zunimmt. Wenn die für alle Tiere wirksame Dosis z. B. viermal so groß ist wie die für alle Tiere unwirksame Menge, so kann der Fehler + 300 Proz. bzw. — 75 Proz. des wahren Wertes ausmachen. Man kann unter diesen Umständen Ueberleben oder Tod des einzelnen Versuchstieres nicht mehr als Indikator für einen bestimmten Wert verwenden! Dagegen ist es auch bei derartigen Voraussetzungen möglich, reproduzierbare Werte zu erhalten, wenn man ein den Pharmakologen seit langem geläufiges und auch in der Immunbiologie schon verschiedentlich angewandtes Verfahren befolgt, nämlich nicht das Verhalten des Einzeltieres, sondern das Verhalten von Tierkollektiven studiert. Denn da der prozentuale Anteil der bei allmählicher Erhöhung der Dosis geschützten Tiere nach und nach zunimmt und alle Zwischenwerte zwischen 0 und 100 Proz. in gesetzmäßiger Weise durchschreitet, besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dosis und dem Prozentsatz der durch sie geschützten Tiere.

Kolle, Prigge u. Fischer (2) konnten nun berichten, daß bei der Wertbemessung der Diphtherieimpfstoffe, die Antigendosis, welche alle Tiere gegen eine bestimmte Giftmenge zu immunisieren vermag, noch viel mehr als das Vierfache, ja sogar weit mehr als das Zwanzigfache der bei allen Tieren unwirksamen Dosis beträgt! Dies bedeutet, daß die Antigenmenge, welche bei den reaktionsfähigsten Tieren zur Erzielung des Schutzes ausreicht, mehr als verzwanzigfacht werden muß, wenn auch die am schwächsten reagierenden Tiere geschützt werden

sollen. Die Immunisierbarkeit der einzelnen Individuen ist also außerordentlich verschieden. Es hängt von unkontrollierbaren individuellen Faktoren ab, ob ein Tier, das mit einer zwischen den Grenzwerten liegenden Dosis immunisiert wird, stirbt oder am Leben bleibt. Versuche, die unter den vorhin angegebenen Bedingungen angestellt würden, würden also nicht nur völlig „unregelmäßige“ Reihen ergeben, sondern würden bei Wiederholung auch jedesmal ein ganz anderes Resultat liefern (Prigge u. Hartoch, 1). Es ist also nicht angängig, den Tod oder das Ueberleben des einzelnen Versuchstieres als Indikator zu verwenden, wie dies bei den klassischen Methoden der Antikörpermessung, vor allem bei der Messung des Diphtherieantitoxins der Fall ist. Da aber der prozentuale Anteil der bei allmählicher Erhöhung der Impfstoffdosis geschützten Tiere nach und nach zunimmt und alle Zwischenwerte zwischen 0 und 100 Proz. durchschreitet, ist es möglich, auch bei der Messung des Immunisierungswertes von Impfstoffen zu reproduzierbaren Werten zu gelangen, wenn man dazu übergeht, nicht mehr das Verhalten des Einzeltieres, sondern das Verhalten von Tier-Kollektiven zu studieren.

Bei der Ermittlung des Prozentsatzes der durch eine bestimmte Impfstoffmenge geschützten Tiere war es allerdings notwendig, zunächst die experimentellen Bedingungen herzustellen, welche eine klare Deutung der Versuchsergebnisse ermöglichten. Es stellte sich nämlich, wie Kolle u. Prigge (3) mitteilten, heraus, daß das Verhalten der mit Diphtherieimpfstoffen vorbehandelten Tiere gegenüber der Intoxikation mit Diphtheriegift keinen völlig eindeutigen Schluß auf den Grad der durch die Antigeneinverleibung „erworbenen Immunität“ gestattete. Dies ergab sich aus der Analyse des Verhaltens von normalen, d. h. nicht immunisierten Tieren gegenüber Diphtherietoxin, insbesondere gegenüber dem Toxin T 172 (= „Februar 1931 B“, gefällt), das zu den Immunitätsprüfungen verwandt wurde. Die Mindestmenge T 172, die man benötigt, um Meerschweinchen regelmäßig zu töten, beträgt 0,15 mg. Dieser Grenzwert erfährt zwar mit dem Wechsel der Jahreszeiten gewisse Schwankungen, auf die bereits von Ehrlich, Arrhenius, Glenny u. Sudmersen, Madsen u. Schmidt und anderen Autoren hingewiesen worden ist; jedoch sind sie bei dem Frankfurter Tiermaterial ziemlich geringfügig. Außerdem haben die Schwankungen im Zusammenhang mit den hier vorgetragenen Fragen keine Bedeutung. Wenn man nun annimmt, die Giftempfindlichkeit aller Tiere wäre absolut gleich, so würden Dosen bis herab zu dem Grenzwert 0,15 mg — bei völlig gleichen äußeren Umständen — stets tödlich wirken; Dosen, welche noch kleiner wären, würden dagegen nicht mehr ausreichen, um Versuchstiere zu töten. In Wirklichkeit trifft man jedoch ganz andere Verhältnisse an. Die „natürliche Resistenz“ der verschiedenen Tiere gegen das Diphtherietoxin ist nämlich ganz verschieden. Und während manche Meerschweinchen schon bei geringfügiger Verringerung der Giftdosis unter den Grenzwert tatsächlich am Leben bleiben, gehen andere

noch an sehr viel kleineren Dosen zugrunde. Dabei nimmt der Anteil der getöteten Tiere mit dem Sinken der Giftdosis allmählich ab; z. B. werden durch 0,09 mg durchschnittlich 75 Proz. der Versuchstiere getötet. Aber erst eine Menge von 0,03 mg wird von allen Tieren vertragen. Diese Menge stellt somit einen zweiten, unteren Grenzwert dar. Die Unterschiede in der natürlichen Giftresistenz kommen also darin zum Ausdruck, daß manche Tiere nicht über 0,03 mg vertragen, andere mehr, und einige wenige sogar Dosen, welche nahe dem oberen Grenzwert von 0,15 mg liegen (Prigge, 15). —

Die Untersuchungen über die Immunisierungskraft der Diphtherieantigene wurden zunächst in der Weise ausgeführt, daß Meerschweinchen vier Wochen nach der Immunisierung mit 0,45 mg T 172 vergiftet wurden. Nimmt man nun wieder an, daß die Meerschweinchen nur hinsichtlich ihrer „Immunisierbarkeit" verschieden wären, jedoch sämtlich die gleiche „natürliche Giftresistenz" besäßen, sodaß Dosen von 0,15 mg und mehr bei nichtimmunisierten Tieren stets zum Tode führten, während Dosen unter 0,15 mg stets vertragen würden, so ergäbe sich folgendes: Eine bestimmte Antigendosis möge so wirken, daß 50 Proz. der Versuchstiere die Fähigkeit gewinnen, 0,3 mg Toxin oder weniger unschädlich zu machen, während die andere Hälfte mehr als 0,3 mg Toxin zu entgiften vermöchte. Bei Vergiftung mit 0,45 mg Toxin würden dann alle Tiere sterben, welche nicht mehr als 0,3 mg zu entgiften vermöchten; denn bei allen diesen Tieren kämen noch 0,15 mg Toxin oder mehr zur Wirkung. Dagegen würden sämtliche Tiere, welche mehr als 0,3 mg Toxin unwirksam zu machen vermöchten, am Leben bleiben, weil weniger als 0,15 mg Toxin, d. h. weniger als die Grenzdosis zur Wirkung käme, welche den Tod der Tiere herbeiführen könnte. Es würden somit 50 Proz. der Versuchstiere sterben. Und umgekehrt dürfte man unter den geschilderten Voraussetzungen aus dem Tod von 50 Proz. der Versuchstiere den Schluß ziehen, daß alle gestorbenen Tiere weniger, alle überlebenden Tiere mehr als einen bestimmten Immunitätsgrad erworben hätten, im gedachten Fall also weniger oder mehr als 0,3 mg Toxin zu entgiften vermöchten. Die überlebenden Tiere wären also in allen Fällen Tiere, welche einen höheren Grad von Schutz gewonnen hätten als die gestorbenen.

Tatsächlich liegen aber die Dinge so, daß auch von den Tieren, welche mehr als 0,3 mg, aber weniger als 0,42 mg zu entgiften vermögen, noch ein gewisser Anteil sterben muß. Denn bei diesen Tieren kommen mehr als 0,03 mg Toxin zur Wirkung, also Giftmengen, die nur von einem bestimmten, je nach der Dosis verschiedenen Anteil der Tiere vertragen werden. Mit anderen Worten: ein Tier, welches nahezu 0,15 mg Toxin verträgt, wird bereits am Leben bleiben, wenn es die Eigenschaft erwirbt, etwas mehr als 0,3 mg, also 67 Proz. der gesamten Toxinmenge (0,45 mg) zu entgiften, während ein Tier, das nur 0,03 mg verträgt, erst dann geschützt ist, wenn es die Fähigkeit gewinnt, 0,3 + 0,12 mg Toxin, also 93 Proz., d. h. 26 Proz. der Gesamtmenge mehr zu entgiften. Hieraus ergibt sich, daß in dem gewählten Beispiel nicht 50 Proz. der Versuchstiere sterben würden, sondern ein höherer Prozentsatz.

Wenn also im konkreten Fall ein bestimmter Anteil der Versuchstiere stirbt, ein anderer überlebt, so darf aus diesem Verhalten nicht gefolgert werden, daß alle gestorbenen Tiere weniger, alle überlebenden Tiere mehr als einen bestimmten Immunitätsgrad erworben hätten. Zwar ist es richtig, daß alle überlebenden Tiere mehr als 0,3 mg entgiften konnten. Jedoch trifft es keineswegs für alle gestorbenen Tiere zu, daß sie weniger als 0,3 mg hätten entgiften können. Vielmehr befinden sich unter den gestorbenen Tieren auch die, welche die Fähigkeit erworben hatten, mehr als 0,3 mg Toxin, nämlich Mengen zwischen 0,3 und 0,42 mg zu entgiften, jedoch die restlichen noch zur Wirkung gelangenden Mengen von 0,03 bis 0,15 mg nicht vertragen konnten.

Aus dem Gesagten geht eindeutig hervor, daß es nicht gelingt, den Grad der „erworbenen Immunität" bei einem Tierkollektiv in eine völlig eindeutige Relation zu dem effektiv beobachteten Schutz zu setzen. Der Prozentsatz der sterbenden oder überlebenden Tiere ist etwas anderes als der Prozentsatz der Tiere, bei denen der erworbene Immunitätsgrad unterhalb oder oberhalb eines scharfen Grenzwertes liegt. Die Vergiftung mit 0,45 mg Toxin trennt die Tiere in solche, die weniger als 0,45 mg Toxin „ertragen" und solche, die 0,45 mg und mehr „ertragen". Dabei kommt es im Versuchsausfall in keiner Weise zum Ausdruck, ob ein Tier 0,15 mg Toxin auf Grund seiner „natürlichen Giftresistenz" und 0,3 mg auf Grund der „erworbenen Immunität" erträgt, oder ob es von Hause aus nur 0,03 mg verträgt und 0,42 mg infolge der Vorbehandlung unschädlich zu machen vermag.

Die schematische Darstellung in Tabelle 1 wird diesen Zusammenhang am besten veranschaulichen. In ganz willkürlicher Weise sind hier die Giftmengen, die die einzelnen Tiere ertragen, als Maß für ihre natürliche Resistenz und für ihre erworbene Immunität eingetragen. Das stehende Rechteck in Fig. 1 stellt die Gesamtheit der in einem Versuch mit 0,45 mg vergifteten Tiere dar. Dabei ist angenommen, daß die Hälfte der Tiere die Fähigkeit gewonnen habe, 0,3 mg oder weniger unschädlich zu machen, während die andere Hälfte mehr als 0,3 mg zu entgiften vermag. Die schräg verlaufende Linie, die das Rechteck teilt, stellt die Tiere dar, bei denen die Summe der natürlichen Resistenz und der erworbenen Immunität so groß ist, daß sie gerade 0,45 mg Toxin ertragen. Diese Linie trennt den Teil des Rechtecks, welcher die getöteten Tiere darstellt, von dem Teil, der die geschützten veranschaulicht, und zeigt, daß mehr als die Hälfte von ihnen der Vergiftung erliegt. Nur wenn alle Individuen primär die gleiche Toxinmenge vertrügen, würde die Teilungslinie in Fig. 1 waagrecht verlaufen. Selbstverständlich hat die schematische Darstellung lediglich die Aufgabe, eine Vorstellung davon zu vermitteln, wieso eine Einteilung der Versuchs-

tiere nach dem Grade der „erworbenen Immunität“ nicht ohne weiteres entsprechend ihrem Verhalten bei der Vergiftung vorgenommen werden kann.

Da es nun gerade darauf ankommt, Feststellungen über den Grad der „erworbenen Immunität“ in einem Tierkollektiv zu machen, nicht aber über die „natürliche Resistenz“ oder über die für das Verhalten des Einzeltieres tatsächlich ausschlaggebende „Summe“ der beiden Eigenschaften, so mußte dem geschilderten Sachverhalt Rechnung getragen werden.

Es sei aber zunächst ausdrücklich festgestellt, daß die gegebenen Darlegungen nicht das geringste über das Wesen der „natürlichen Resistenz“ und der „erworbenen Immunität“ postulieren und die Frage, ob letztere nur als Steigerung der ersteren anzusehen oder von ihr grundsätzlich verschieden ist, in keiner Weise berühren. Es handelt sich nur um das quantitativ verschiedene Verhalten der verschiedenen Individuen gegenüber dem Toxin. Und es genügt im augenblicklichen Zusammenhang vollauf, die „erworbene Immunität“ im Gegensatz zur „natürlichen Resistenz“ als den „Zuwachs“ an Giftresistenz zu definieren, den die Versuchstiere infolge der Vorbehandlung mit geeigneten Antigenen erfahren.

Tabelle 1.

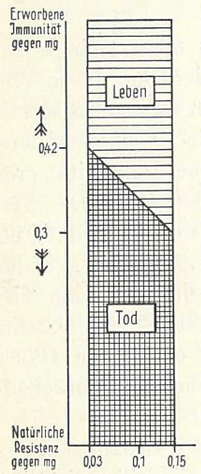


Fig. 1. Vergiftung mit 0,45 mg Toxin.

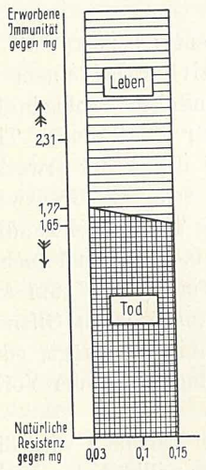


Fig. 2. Vergiftung mit 1,8 mg Toxin.

Durch eine sehr einfache Aenderung der Versuchsanordnung ist es nun gelungen, die eben geschilderte grundsätzliche Schwierigkeit zu umgehen und die Verhältnisse praktisch so zu gestalten, als ob die „natürliche Resistenz“ bei allen Individuen gleich groß wäre. Dies ließ sich erreichen, indem die zur Immunisierung der Versuchstiere verwandten Antigenmengen und die zur Intoxikation benützten Toxindosen wesentlich gesteigert wurden. Anstelle von 0,45 mg Toxin wurden bei der Prüfung der Immunität Giftmengen von 1,8 mg verwandt. Tiere, welche primär nahezu 0,15 mg vertrugen, blieben also am Leben, wenn sie die Eigenschaft erworben hatten, etwas mehr als 1,65 mg, also 92 Proz. der gesamten Toxinmenge (1,8 mg) zu entgiften. Und Tiere, die primär nur 0,03 mg vertrugen, waren geschützt, wenn sie die Fähigkeit gewannen, 1,65 + 0,12 mg Toxin, also 98 Proz., d. h. 6 Proz. der Gesamtmenge mehr zu entgiften. Während die entsprechende Differenz bei Verwendung von 0,45 mg Toxin 26 Proz. betragen hatte, spielt ein

Unterschied von 6 Proz. nur eine ganz untergeordnete Rolle, zumal das bisher vorliegende experimentelle Material dafür spricht, daß die Mengen Toxin, die die einzelnen Individuen nach Immunisierung mit gleichen Antigenmengen zu entgiften vermögen, innerhalb außerordentlich weiter Grenzen schwanken.

Fig. 2 vermag in anschaulicher Weise zu zeigen, in welcher Hinsicht die Verhältnisse bei Verwendung höherer Toxindosen geändert sind. In der Senkrechten findet man die Toxinmengen eingezeichnet (1,65 und 2,31 mg) welche den in Fig. 1 eingetragenen Dosen (0,3 und 0,42 mg) proportional sind, ferner die Dosis (1,77 mg), bei deren Entgiftung auch die Tiere geschützt sind, welche über den geringsten Grad an natürlicher Resistenz verfügen. Wie man sieht, nähert sich die Trennungslinie, welche die Tiere darstellt, die gerade 1,8 mg Toxin ertragen, annähernd der Waagerechten. Hierin kommt zum Ausdruck, daß die „natürliche Resistenz“ der Versuchstiere unter den gewählten Bedingungen einen praktisch nicht mehr ins Gewicht fallenden Einfluß auf den Versuchsausfall besitzt. Denn die Toxinmenge, die die Tiere auf Grund ihrer natürlichen Resistenz vertragen, stellt jetzt — statt 7—33 Proz. (vgl. S. 4) — nur noch 2—8 Proz. der zur Intoxikation verwandten Giftdosis dar. Der Versuchsausfall hängt also im wesentlichen nur noch von der „erworbenen Immunität“ ab. Wenn nach Vergiftung mit 1,8 mg Toxin z. B. 50 Proz. der Versuchstiere geschützt sind, so läßt sich dieses Resultat mit einer nur geringfügigen Ungenauigkeit so interpretieren, daß alle Tiere, die am Leben bleiben, die Fähigkeit „erworben“ haben, 1,65—1,77 mg Toxin oder mehr zu entgiften, während alle Tiere, die zugrunde gehen, weniger als diese Toxinmenge zu entgiften vermögen. Ein solcher Grad von Genauigkeit kann nur dadurch erzielt werden, daß bei Untersuchungen über die Immunisierungskraft von Diphtherie-Impfstoffen mit Antigendosen gearbeitet wird, welche die Verwendung von Toxin-Multipla gestatten, deren Größe in keinem vergleichbaren Verhältnis zu den bei normalen Tieren tödlich wirkenden Dosen steht[1]). —

Die beiden Untersuchungsreihen, über die zunächst berichtet werden soll (Tabelle 2 und 3) und in denen zur Prüfung der Immunität der Versuchstiere stets 0,45 mg (= 5 dl_{75} = 3 dl_{100})[2]) T 172 verwandt wurden, sind nach einem gemeinsamen, von Statens Seruminstitut (Kopenhagen), vom National Institute for Medical Research

1) Wahrscheinlich vermögen gleichartig immunisierte Tierserien bei Vergiftung mit frischen, toxoidarmen Giften höhere Multipla der „sicher tödlichen Dosis“ zu entgiften als bei Vergiftung mit toxoidreichen gealterten Giften. Daher können Giftmengen, die in einer geeigneten Proportion zur „tödlichen Dosis“ stehen, vielleicht auch nach Vorbehandlung mit verhältnismäßig kleinen Antigenmengen angewandt werden, falls die Immunitätsprüfung mit toxoidarmen Giften durchgeführt wird. Die hier angedeuteten Zusammenhänge müssen freilich durch experimentelle Untersuchungen noch weiter geklärt werden.

2) Als dl_{100}, dl_{75}, dl_{50} usw. werden nach dem Vorschlag von Trevan (8) Giftmengen bezeichnet, die 100, 75, 50 Proz. usw. der Versuchstiere töten.

(London-Hampstead) und vom Staatlichen Institut für experimentelle Therapie (Frankfurt a. M.) entworfenen Arbeitsplan (17) durchgeführt worden. Größere Mengen des in Frankfurt hergestellten Trockentoxins T 172 wurden den an den Arbeiten beteiligten Instituten zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe der vereinbarten Methodik (s. Tab. 2 und 3) sollte einerseits ermittelt werden, ob von verschiedenen Formoltoxoiden solche Mengen, welche die gleiche Anzahl von Flockungseinheiten[1]) enthalten, gleiche oder verschiedene antigene Wirksamkeit besitzen. Andererseits sollte geprüft werden, ob die Immunisierbarkeit der Versuchstiere stets die gleiche ist oder jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt.

Tabelle 2.

(Versuch vom 19. Mai 1932 [2]).)

Zur Immunisierung verwandte Impfstoffmenge	Zahl der gegen 0,45 mg/250 g (= 5 dl_{75} = 3 dl_{100}) Diphtherie-Trockentoxin T 172 geschützten Meerschweinchen				
	Formoltoxoid F 50 (Frankf. M.)	Formoltoxoid F 47 (Frankf. M.)	Anatoxine 38772 (Inst. Past.)	Toxoid 859 (Hampstead)	Anatoksin L 31 (Kopenhagen)
40 L_f	13/21 = **62** %	16/25 = **64** %	16/23 = **70** %	19/23 = **83** %	15/24 = **63** %
10 L_f	16/23 = **70** %	15/25 = **60** %	11/22 = **50** %	18/21 = **86** %	8/23 = **35** %
2,5 L_f	4/23 = **17** %	4/21 = **19** %	12/23 = **52** %	6/21 = **29** %	3/25 = **12** %

Das Ergebnis des in Tabelle 2 dargestellten Experimentes erlaubte keine Entscheidung über die Frage nach der antigenen Wirksamkeit der verschiedenen Impfstoffe. Während in den mit 40 L_f und 10 L_f durchgeführten Versuchsreihen der englische Impfstoff bei weitem die höchste Wirksamkeit zu besitzen schien, hob sich in der mit 2,5 L_f angesetzten Reihe der französische Impfstoff sehr deutlich heraus. Dabei war es aber noch besonders auffällig, daß 10 L_f des deutschen Impfstoffes F 50 und des englischen Impfstoffes 859 besser schützten als die vierfache Menge (40 L_f), ferner daß 2,5 L_f des französischen Impfstoffes 38772 wirksamer als 10 L_f waren. Das Gesamtergebnis war also unregelmäßig und widerspruchsvoll.

Auch die Versuche, jahreszeitliche Schwankungen in der Immunisierbarkeit der Versuchstiere nachzuweisen, fielen völlig unregelmäßig aus und hatten kein überzeugendes Resultat, wie die in Tabelle 3 enthaltene Zusammenstellung zeigt. Aus Tabelle 3 geht auch hervor, daß es trotz zahlreicher Versuche nicht gelungen ist, das Wertverhältnis der beiden Impfstoffe F 50 und F 47 besser zu klären, als es durch die in Tabelle 2 wiedergegebene Reihe gelungen war. Unter diesen Umständen schien eine weitere Einhaltung des verabredeten Arbeitsplanes keinen Erfolg zu versprechen. Es wurde daher versucht, mit anderen als den vereinbarten Methoden zu einer Beantwortung der aufgeworfenen Fragen zu gelangen, ferner ein allgemeines Verfahren zur Wertbestimmung der Diphtherieimpfstoffe zu entwickeln.

Wie oben auseinandergesetzt wurde, erwies es sich als notwendig, die zur Prüfung der Immunität anfänglich verwandte Giftdosis stark zu erhöhen. Diesem Erfordernis sollte Rechnung getragen werden, bevor es unternommen wurde, die in allen bisherigen Experimenten beobachteten

1) Ramon (9) hat gezeigt, daß in Gemischen von Diphtherie-Toxin oder -Toxoid und -Antitoxin bei bestimmten Mengenverhältnissen nach längerer oder kürzerer Erwärmung eine sehr charakteristische Präzipitation („Flockung") auftritt. Diejenige Toxin- oder Toxoidmenge, die mit 1 Antitoxin-Einheit optimale Flockung ergibt, wird als „Flockungs-Einheit" (Fl.E.) oder „Limes Flockung" (L_f) bezeichnet.

2) Als Datum ist in der vorliegenden Arbeit stets der Beginn der Versuche, also der Zeitpunkt der Immunisierung angegeben.

Tabelle 3.

Zeit der Immunisierung	Zahl der gegen 0,45 mg/250 g (= 5 dl_{75} = 3 dl_{100}) Diphtherie-Trockentoxin T 172 geschützten Meerschweinchen													
	Formoltoxoid F 50 [3])							Formoltoxoid F 47 [4])						
	80 L_f	40 L_f	20 L_f	10 L_f	5 L_f	2,5 L_f	1,25 L_f	80 L_f	40 L_f	20 L_f	10 L_f	5 L_f	2,5 L_f	1,25 L_f
29. 1. 32	.	.	.	16/23 =**70**%	.	.	.	.	18/23 =**78**%	.	16/25 =**64**%	.	3/25 =**12**%	.
10. 2. 32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	15/21 =**71**%	14/22 =**64**%	6/22 =**27**%	.	.
12. 2. 32	.	.	14/20 =**70**%	11/21 =**52**%	11/19 =**58**%	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18. 2. 32 [1])	.	.	.	8/22 =**36**%	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23. 2. 32 [1])	.	.	9/17 =**53**%	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30. 3. 32	.	14/22 =**64**%	10/17 =**59**%	7/18 =**39**%	4/22 =**18**%	3/24 =**13**%	.	.	18/22 =**82**%	.	14/23 =**61**%	.	5/24 =**21**%	.
30. 3. 32 [1])	.	14/18 =**78**%	14/23 =**61**%	9/16 =**56**%	.	.	.	.	12/18 =**67**%	.	15/23 =**65**%	.	4/22 =**18**%	.
19. 5. 32 [2])	.	13/21 =**62**%	.	16/23 =**70**%	.	4/23 =**17**%	.	.	16/25 =**64**%	.	15/25 =**60**%	.	4/21 =**19**%	.
7. 6. 32	.	.	.	.	.	.	.	.	20/22 =**91**%	10/17 =**59**%	12/22 =**55**%	7/23 =**30**%	5/19 =**26**%	.
7. 6. 32 [1])	.	.	.	.	.	.	.	.	16/22 =**73**%	15/20 =**75**%	8/13 =**62**%	7/22 =**32**%	2/23 =9%	.
30. 7. 32	.	21/23 =**91**%	20/23 =**87**%	20/25 =**80**%	15/23 =**65**%	17/25 =**68**%	13/25 =**52**%	23/24 =**96**%	19/23 =**83**%	22/25 =**88**%	18/23 =**78**%	14/25 =**56**%	11/24 =**46**%	.

Unregelmäßigkeiten aufzuklären und durch ein geeignetes, später (s. Abschnitt II) eingehend zu begründendes Verfahren zu beseitigen. Durch eine Reihe von Vorversuchen, die in anderem Zusammenhang (s. Tabelle 10, S. 25) näher erörtert werden sollen, wurde zunächst ermittelt, was für Veränderungen sich im Prozentsatz der geschützten Tiere ergeben, wenn Antigen- und Toxindosen proportional verändert werden. Es ergab sich, daß hierbei wesentliche Verschiebungen nicht eintreten. Nachdem so ein brauchbarer Hinweis auf die Größenordnung der erforderlichen Antigenmengen gewonnen war, wurde eingehender geprüft, welche Antigendosen man anzuwenden hatte, um bei einem angemessenen Prozentsatz von Versuchstieren Schutz gegen 1,8 mg (= 20 dl_{75} = 12 dl_{100}) T 172 zu er-

1) Der Versuch wurde mit einem durch Trocknung und Pulverisierung des Formoltoxoids F 50 bzw. F 47 gewonnenen Präparat in der Weise ausgeführt, daß für je 1 Flockungseinheit das aus dem entsprechenden Volumen gewonnene Trockengut verwandt wurde.

2) In dieser Horizontalreihe sind die gleichen Versuche wie in den beiden ersten Vertikalreihen der Tabelle 2 wiedergegeben.

3) 1 ccm F 50 = 4,7 L_f.

4) 1 ccm F 47 = 8,7 L_f.

zeugen. Zu diesen Untersuchungen wurde neben dem bereits früher vielfach untersuchten Impfstoff F 47 ein von Statens Seruminstitut (Kopenhagen) in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestelltes Formoltoxoid L 31 herangezogen. Auf Grund des in Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisses wurden die nächsten Versuche jeweils mit Impfstoffmengen durchgeführt, in denen 20 L_f enthalten waren.

Tabelle 4.

Zeit der Immunisierung	Impfstoff	Zahl der gegen 1,8 mg/250 g (= 20 dl_{75} = 12 dl_{100}) Diphtherietoxin T 172 geschützten Meerschweinchen				
		100 L_f	50 L_f	20 L_f	10 L_f	5 L_f
28. 9. 1932	L 31	19/22 = **86** %	18/21 = **86** %	11/24 = **46** %	9/25 = **36** %	1/23 = **4** %
	F 47	17/23 = **74** %	18/23 = **78** %	18/24 = **75** %	10/24 = **42** %	6/24 = **25** %
21. 11. 1932	L 31	22/23 = **96** %	36/48 = **75** %	18/25 = **72** %	12/25 = **48** %	7/25 = **28** %
	F 47	29/30 = **97** %	37/49 = **75** %	14/22 = **64** %	16/25 = **64** %	3/24 = **13** %

II.

Bei der Fortführung der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die zahlreichen Unregelmäßigkeiten im Ausfall der Versuche in erster Linie auf der Verwendung einer zu geringen Anzahl von Versuchstieren beruhten. Selbst dann, wenn ein und derselbe Versuch mehrmals unter völlig gleichen Bedingungen und zur gleichen Zeit je mit etwa 20 Tieren wiederholt wurde, waren die gewonnenen Resultate von der größten Verschiedenheit. In 2 Serien von je 21 Meerschweinchen, die gleichzeitig mit der gleichen Impfstoffmenge vorbehandelt waren, erwiesen sich bei der 4 Wochen später vorgenommenen Immunitätsprüfung nur 8 Tiere in der I. Serie, dagegen 17 Tiere in der II. Serie gegen die Intoxikation mit Diphtherietoxin als geschützt. Trotzdem es sich um Meerschweinchen handelte, die bei der Immunisierung praktisch gleiches Körpergewicht (240—260 g) besaßen, ergab sich also in einem Fall ein Schutz bei 38 Proz., im anderen Fall bei 81 Proz. der Versuchstiere (s. Tabelle 5, Mai-Versuch mit L 31, Serie II, 2 und 4)!

Wenn derartige Divergenzen schon bei Verwendung eines und desselben Impfstoffes auftreten, so war es selbstverständlich nicht möglich, den Unterschieden irgendwelche objektive Bedeutung beizumessen, wenn verschiedene Impfstoffe zur Immunisierung der Versuchstiere verwandt worden waren. Dieser Sachverhalt fand denn auch seinen Ausdruck darin, daß zwei Impfstoffe L 31 und F 47, die wiederholt in Paralleluntersuchungen miteinander verglichen wurden, sich in verschiedenen, zur gleichen Zeit ausgeführten Versuchen ganz widerspruchsvoll verhielten. Z. B. schützte L 31 in einem derartigen Versuch 73 Proz. der Versuchstiere, dagegen F 47 nur 50 Proz. (s. Tabelle 5, Mai-Versuch, Serie II, 1); L 31 erschien somit als wirksamer. Im nächsten Versuch wurden 65 Proz. und 62 Proz. durch L 31 und F 47 geschützt (Serie II, 3) und in einem dritten Versuch 48 Proz. und 60 Proz. (Serie II, 5), sodaß also F 47 gleichwertig mit L 31 oder sogar wirksamer zu sein schien!

Aehnliche und stärkere Streuungen im Versuchsausfall konnten mit Regelmäßigkeit beobachtet werden, obwohl alle Ermittlungen unter gleichen experimentellen Bedingungen vorgenommen wurden. Nur durch Einführung wesentlich größerer Versuchsreihen wurde es möglich, die auf den individuellen Unterschieden in der Immunisierbarkeit der verschiedenen Tiere beruhenden Schwankungen im Versuchsausfall zu beherrschen und zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen.

Die unregelmäßige Verteilung der durch eine bestimmte Impfstoffdosis bei einer einzigen Injektion immunisierbaren und der nicht immunisierbaren Individuen auf die verschiedenen Serien, die in der „Streuung" der Versuchsergebnisse ihren Ausdruck findet, hängt lediglich vom Zufall ab. Der Einfluß des Zufalls auf die Verteilung der Versuchstiere und die Streuung der Versuchsergebnisse wird erst dann genügend klein, wenn größere Tierserien untersucht werden. Nur durch Berücksichtigung dieses Sachverhaltes wurde es möglich, dahin zu gelangen, daß die in Paralleluntersuchungen gewonnenen Resultate in Hinsicht auf das angestrebte Resultat hinreichend genau übereinstimmten. Z. B. waren in zwei Serien von 107 und 110 Meerschweinchen, die in gleicher Weise und zur gleichen Zeit immunisiert waren, einmal 65 Tiere, das andere Mal 67 Tiere geschützt (s. Tabelle 5, Mai-Versuch, Serie I und II). Der Prozentsatz der geschützten Tiere war also in beiden Serien nahezu gleich groß (61 Proz.). Allerdings kann die Uebereinstimmung nicht immer eine derartig weitgehende sein wie in diesem besonders günstigen Falle; aber es läßt sich mit dieser Anzahl der Versuchstiere doch erreichen, daß die Streuung im Ausfall der Versuche im allgemeinen ganz erheblich eingeschränkt wird und die Erzielung verwertbarer, d. h. reproduzierbarer Resultate nicht verhindert.

Nachdem es gelungen war, reproduzierbare Resultate zu erzielen, machte es keine Schwierigkeiten mehr, auch das Verhältnis der Wirksamkeit von verschiedenen Impfstoffen eindeutig festzulegen. Das Immunisierungsvermögen der eben erwähnten beiden Impfstoffe L 31 und F 47 wurde wiederholt miteinander verglichen, und es wurde bei sechsmaliger Durchführung dieses Vergleiches, der mit den früheren Methoden zu völlig widersprechenden Resultaten geführt hatte, ein durchaus eindeutiges Resultat gewonnen. Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, wich der Prozentsatz der durch die beiden Impfstoffe geschützten Tiere in keinem Falle um mehr als $\pm$ 5,5 vom Mittelwert ab, in zwei Fällen sogar nur um $\pm$ 1. Und zwar entfiel der höhere Wert zweimal auf L 31, viermal auf F 47. Die beiden Impfstoffe waren also ungefähr gleichwertig.

Wenn man das Verhalten von gleichartigen Tierkollektiven gegenüber verschiedenen Dosen des gleichen Impfstoffes graphisch darstellt und die jedem Tier eines Kollektivs injizierte Dosis als Abszisse, den Prozentsatz der durch die betreffende Dosis geschützten Tiere als Ordinate einträgt, so gewinnt man ganz bestimmte Kennlinien, die als „Wirkungskurven"

Tabelle 5.

Zeit der Immunisierung	Tierserie	Zahl der gegen 1,8 mg/250 g (= 20 dl_{75} = 12 dl_{100}) Diphtherie-Trockentoxin T 172 geschützten Meerschweinchen: Formoltoxoid L 31[1]), 20 L_f		Formoltoxoid F 47[2]), 20 L_f	
26. 1. 1933	1	5/16 = 31 %	**29/107 = 27 %**	6/18 = 33 %	**37/102 = 36 %**
	2	4/22 = 18 %		9/23 = 39 %	
	3	9/24 = 38 %		6/19 = 32 %	
	4	5/21 = 24 %		10/22 = 46 %	
	5	6/24 = 25 %		6/20 = 30 %	
30. 3. 1933	1	9/23 = 39 %	**43/113 = 38 %**	10/23 = 43 %	**58/118 = 49 %**
	2	8/22 = 36 %		11/24 = 46 %	
	3	6/22 = 27 %		12/24 = 50 %	
	4	9/24 = 38 %		14/24 = 58 %	
	5	11/22 = 50 %		11/23 = 48 %	
24. 5. 1933	I 1	8/16 = 50 %	**65/107 = 61 %**	.	
	2	15/22 = 68 %		.	
	3	13/22 = 59 %		.	
	4	11/23 = 48 %		.	
	5	18/24 = 75 %		.	
	II 1	16/22 = 73 %	**67/110 = 61 %**	9/18 = 50 %	**57/103 = 55 %**
	2	8/21 = 38 %		9/20 = 45 %	
	3	15/23 = 65 %		13/21 = 62 %	
	4	17/21 = 81 %		14/24 = 58 %	
	5	11/23 = 48 %		12/20 = 60 %	
19. 7. 1933	1	17/24 = 71 %	**80/120 = 67 %**	16/25 = 64 %	**84/121 = 69 %** [3])
	2	20/25 = 80 %		14/24 = 58 %	
	3	13/23 = 57 %		16/23 = 70 %	
	4	14/23 = 61 %		22/25 = 88 %	
	5	16/25 = 64 %		16/24 = 67 %	
27. 9. 1933	1	15/23 = 65 %	**81/119 = 68 %**	14/25 = 56 %	**81/122 = 66 %**
	2	15/23 = 65 %		18/23 = 78 %	
	3	20/25 = 80 %		16/24 = 67 %	
	4	13/24 = 54 %		17/25 = 68 %	
	5	18/24 = 75 %		16/25 = 64 %	
20. 11. 1933	1	16/25 = 64 %	**72/123 = 59 %**	16/25 = 64 %	**86/124 = 69 %**
	2	18/24 = 75 %		20/24 = 83 %	
	3	14/25 = 56 %		18/25 = 72 %	
	4	13/25 = 52 %		17/25 = 68 %	
	5	11/24 = 46 %		15/25 = 60 %	
25. 1. 1934	1	.	.	14/22 = 64 %	**51/109 = 47 %**
	2	.	.	10/23 = 43 %	
	3	.	.	5/22 = 23 %	
	4	.	.	12/22 = 55 %	
	5	.	.	10/20 = 50 %	

bezeichnet werden können. Die „Wirkungskurven“ sind um so „flacher“, je größer der Unterschied zwischen der für alle Tiere wirksamen und der für alle Tiere unwirksamen Dosis ist, um so „steiler“, je kleiner dieser Unterschied ist. Der Steilheitsgrad der Wirkungskurven hängt nicht nur von dem untersuchten Präparat (Droge, Toxin, Antigen, Serum usw.), sondern auch von der zu den Untersuchungen verwandten Tierart ab. Die

1) 1 ccm L 31 = 11 L_f.
2) 1 ccm F 47 = 8,7 L_f.
3) Auf Grund der in Tabelle 7 und 8 mitgeteilten Resultate ergäbe sich als korrigierter Wert: 76 %; vgl. Tabelle 11.

Schwankungen im Prozentsatz der geschützten Tiere, d. h. die Unsicherheit, mit der sich der „wahre“ Prozentsatz ermitteln läßt, wird nun bei der Ermittlung des Unterschiedes zwischen verschiedenen Dosen des gleichen Präparates bzw. zwischen verschiedenen Präparaten der gleichen Impfstoffart um so bedeutungsvoller, je „flacher“ die Wirkungskurven sind.

Angenommen durch die Antigendosen 0,8, 1,0 und 1,25 würden theoretisch 40, 50 und 60 Proz. der Versuchstiere geschützt. Findet man nun, daß die Antigendosis 1,0 in einem praktisch ausgeführten Einzelversuch 60 Proz. der Tiere schützt, so wird der Wert der geprüften Antigendosis nicht mit 1,0, sondern mit 1,25 angegeben. Findet man 40 Proz., so wird ebenfalls nicht 1,0, sondern 0,8 gefunden. Der Fehler der ermittelten Werte beträgt im angeführten Fall + 25 Proz. bzw. — 20 Proz. des wahren Wertes.

Wenn nun aber die Wirkungskurven so „flach“ verlaufen, daß 40, 50 und 60 Proz. der Versuchstiere durch die Antigendosen 0,5, 1,0 und 2,0 geschützt werden, so ergibt sich folgendes: Findet man, daß die Antigendosis 1,0 im Einzelversuch 60 Proz. bzw. 40 Proz. (statt 50 Proz.) der Versuchstiere schützt, so wird als Wert der geprüften Antigendosis 2,0 bzw. 0,5 gefunden. Der Fehler der ermittelten Werte beträgt nunmehr + 100 Proz. bzw. — 50 Proz. des wahren Wertes, ist somit wesentlich größer als im ersten Fall!

Falls ein bestimmter Grad von Genauigkeit verlangt wird, müssen also die Schwankungen der Prozentsätze um so kleiner gehalten, also desto mehr Tiere zu ihrer Bestimmung angewendet werden, je flacher die Wirkungskurven sind. Wird dagegen die Zahl der untersuchten Tiere konstant gehalten, so wird die Genauigkeit der ermittelten Resultate um so geringer, je flacher die Wirkungskurven verlaufen.

III.

Man könnte nach diesen Darlegungen annehmen, eine Wertbemessung der Diphtherieimpfstoffe ließe sich etwa durch Ermittlung derjenigen Antigenmenge erreichen, welche einen bestimmten Prozentsatz der Versuchstiere gegen die Prüfungsdosis eines stabilen, mit Hilfe eines Standardimpfstoffes geeichten Testgiftes zu schützen vermöchte. Aber die in Tabelle 5 mitgeteilten Untersuchungen lassen bei genauerer Prüfung erkennen, daß dies nicht möglich ist, weil neben den individuellen auch sehr erhebliche zeitliche Schwankungen in der Immunisierbarkeit der Meerschweinchen bestehen. Periodische Schwankungen im Verhalten der Versuchstiere waren auf Grund früherer Untersuchungen von Madsen u. Schmidt (4) von vornherein vermutet worden, hatten sich jedoch mit der von den beteiligten Instituten verabredeten Arbeitsweise (s. S. 8) nicht nachweisen lassen. Die Tabelle 5 bietet dagegen eine Uebersicht über derartige Schwankungen, wie sie mit Hilfe einer größeren Tierzahl im Verlauf von 14 Monaten mit den Impfstoffen L 31 und F 47 ermittelt wurden. Hieraus ergibt sich eindeutig, daß eine unmittelbare Beziehung zwischen dem objektiven Immunisierungswert und der aktuellen, d. h. bei der jeweiligen Anwendung feststellbaren Wirksamkeit eines

Impfstoffes nicht besteht. Denn gegenüber der gleichen Toxindosis wirkt eine und dieselbe Impfstoffmenge zu verschiedenen Zeiten sehr verschieden, und zur Erzielung eines und desselben Effektes benötigt man zu verschiedenen Zeiten sehr verschiedene Impfstoffmengen. Worauf die beobachteten zeitlichen Schwankungen zurückzuführen sind, ist noch nicht völlig geklärt. Da die Schwankungen aber nach den bisher gemachten Erfahrungen periodischen Charakter zu tragen scheinen, ist es am wahrscheinlichsten, daß sie entsprechend der Auffassung von Madsen u. Schmidt durch Saisoneinflüsse zu erklären sind. Jedoch dürften neben diesen Einflüssen noch andere Faktoren wirksam sein; denn wie das Verhalten des Impfstoffes F 47 im Januar 1933 und im Januar 1934 zeigt, scheint eine bestimmte Impfstoffmenge auch zu gleichen Jahreszeiten in verschiedenen Jahren nicht gleich zu wirken.

Die durch die zeitlichen Schwankungen in der Immunisierbarkeit der Versuchstiere bedingten Schwierigkeiten ließen sich nun durch Anwendung des von Ehrlich für die Wertbestimmung der Antitoxine eingeführten Standardprinzips überwinden. Ein unter zahlreichen Impfstoffen ausgesuchtes Formoltoxoid von mittlerer Immunisierungskraft (F 47) wurde als Standardpräparat eingeführt, und als Schutzeinheit (SE) wurde — ähnlich wie bei der Einführung der Diphtherie-Antitoxineinheit durch Ehrlich (10) — willkürlich eine „rein empirische Größe" definiert, und zwar 1 ccm des Standardpräparates. Zur Gewährleistung absoluter Stabilität des Standardpräparates erwies es sich später als notwendig, an Stelle des flüssigen Präparates ein durch Natriumsulfat gefälltes, durch tertiäres Natriumphosphat stabilisiertes, getrocknetes und im Vakuum aufbewahrtes Formoltoxoid (F 191) zu verwenden, welches so gelöst wird[1]), daß es mit dem „Urstandard" übereinstimmt. Ueber die bei der Eichung dieses Präparates angewandte Methode wird weiter unten (s. S. 26f.) berichtet.

Bei der Wertbemessung der Diphtherieimpfstoffe muß die Wirksamkeit einer Dosis des Standardantigens gegenüber dem Testgift für jede Untersuchung stets von neuem festgestellt werden. Die Titration eines Impfstoffes kann dann so durchgeführt werden, daß man diejenige Dosis ermittelt, welche die gleiche Wirksamkeit besitzt wie die zum Vergleich dienende Dosis des Standardantigens. Wie groß die absolute Wirksamkeit im konkreten Fall ist, ist hierbei von untergeordneter Bedeutung. Wichtig ist nur, daß die Wirkung mit derjenigen des Standardpräparates übereinstimmt. Findet man etwa, daß 0,5 ccm des Formoltoxoids X den gleichen Prozentsatz von Meerschweinchen schützen wie 2,0 ccm des Standardpräparates, so ergibt sich hieraus, daß 0,25 ccm des geprüften Formoltoxoids das Aequivalent von 1 Schutzeinheit bzw. 1 ccm das Aequivalent von 4 Schutzeinheiten darstellt. Das „allgemeine" Standardprinzip[1]) findet hier zum erstenmal Anwendung für die Wertbestimmung von Antigenen.

1) Eine Lösung von 1,9 mg/ccm F 191 enthält 1 SE im Kubikzentimeter.

Die Frage, ob die zeitlichen Schwankungen in dem Verhalten von immunisierten Tieren gegenüber dem Diphtherietoxin als tatsächliche Schwankungen der „Immunisierbarkeit" anzusehen sind oder ob sie lediglich der Ausdruck von Schwankungen der „natürlichen Resistenz" sind, ist in theoretischer und praktischer Hinsicht von erheblicher Bedeutung, weil sich hier enge Zusammenhänge mit wichtigen epidemiologischen Problemen ergeben. Jedoch dürfte es kaum einem Zweifel unterliegen, daß in erster Linie echte, von Resistenzveränderungen unabhängige Schwankungen in der Immunisierbarkeit für das wechselnde Verhalten der Tiere maßgebend sind.

Hierfür spricht zunächst der Umstand, daß das Maximum der Giftempfindlichkeit und das Minimum der Immunisierbarkeit zeitlich nicht zusammenzufallen scheinen. Noch aufschlußreicher sind Vergleiche zwischen dem Verhalten von normalen und immunisierten Tieren, zu denen zwei in verschiedenen Jahreszeiten durchgeführte Untersuchungsreihen die Unterlagen lieferten. Im ersten Versuch, im Februar 1932, waren drei Serien von Meerschweinchen mit dem Standardimpfstoff F 47, und zwar mit 0,58, 1,15 und 2,3 SE immunisiert und mit 0,45 mg Toxin T 172 vergiftet worden; und im zweiten Versuch, im September 1932, waren 3 Tierserien mit den gleichen Antigenmengen vorbehandelt, jedoch mit 1,8 mg Toxin vergiftet worden. Das Verhalten der Tiere ist aus Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6.

Schutzeinheiten	Zahl der durch den Impfstoff F 47 geschützten Tiere	
	Februar 1932: Vergiftung mit 3 dl_{100} T 172 (0,45 mg/250 g) [2])	September 1932: Vergiftung mit 12 dl_{100} T 172 (1,8 mg/250 g) [3])
2,3	15/21 = 71 %	18/24 = 75 %
1,15	14/22 = 64 %	10/24 = 42 %
0,58	6/22 = 27 %	6/24 = 25 %
insgesamt	35/65 = 54 %	34/72 = 47 %

Wie man sieht, waren sowohl im Februar als auch im September etwa die Hälfte der Tiere geschützt, obwohl im September zur Intoxikation viermal so viel Gift verwandt wurde wie im Februar. Die Tiere ertrugen

1) Als „spezielles Standardprinzip" wird die Eichung von Testgiften mit Hilfe von stabilen Maßpräparaten bezeichnet; die Wertbemessung wird hiernach mit Hilfe der einmalig geeichten Testgifte durchgeführt. Als „allgemeines Standardprinzip" bezeichnet man die bei jeder einzelnen Wertbemessung zur Ausschaltung von unvermeidlichen Schwankungen der Versuchsbedingungen durchgeführte Eichung der Testgifte, der Testkulturen, des Tiermaterials usw.

2) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 3 in der zweiten Horizontalreihe wiedergegebenen Serie (20, 10, 5 L_f) identisch.

3) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 4 in der zweiten Horizontalreihe wiedergegebenen Serie (20, 10, 5 L_f) identisch.

also im September sehr viel mehr Toxin als im Februar. Wie ist dieser Sachverhalt nun zu deuten? Wie oben auseinandergesetzt wurde, bedeutet das Ergebnis des Februarversuches, daß alle Tiere am Leben blieben, bei denen die „Summe“ der natürlichen Resistenz und der erworbenen Immunität ausreichte, um sie 0,45 mg Toxin oder mehr ertragen zu lassen. Dabei blieben von den Tieren, die von Hause aus 0,15 mg vertrugen, bereits diejenigen am Leben, welche die Eigenschaft erworben hatten, 0,3 mg zu entgiften, während von den empfindlichsten Tieren, die primär nicht mehr als 0,03 mg vertrugen, erst diejenigen durchkamen, die 0,42 mg zu entgiften vermochten.

Im September blieben alle Tiere am Leben, die 1,8 mg Toxin ertrugen. Wollte man nun annehmen, daß die Immunisierbarkeit der Septembertiere die gleiche wäre wie diejenige der Februartiere und daß z. B. eine zehnfache Steigerung der primär vorhandenen „natürlichen Resistenz“ bei ihnen eingetreten wäre, so würden von den resistentesten, d. h. gegen 1,5 mg unempfindlichen Tieren zwar wieder diejenigen durchkommen, welche mindestens 0,3 mg zu entgiften vermöchten; von den empfindlichsten Tieren, welche nur 0,3 mg vertrügen, würden dagegen erst solche durchkommen, die wesentlich mehr als 0,42 mg, und zwar mindestens 1,5 mg zu entgiften vermöchten. Falls die Immunisierbarkeit im September die gleiche wäre wie im Februar, würden also trotz zehnfacher Steigerung der „natürlichen Resistenz“ im September weniger Tiere am Leben bleiben als im Februar. Noch viel weniger Tiere würden durchkommen, wenn nur eine fünffache oder doppelte Steigerung der „natürlichen Resistenz“ einträte, zumal auch von den resistentesten Tieren alsdann weniger am Leben bleiben würden als im Februar.

In der Tat nimmt aber, wie das Verhalten von nicht immunisierten Tieren zeigt, bei dem in Frankfurt gebrauchten Tiermaterial die „natürliche Resistenz“ vom Winter zum Sommer noch viel weniger zu. Die Grenzwerte, zwischen denen die sicher tödliche Dosis im Laufe der verschiedenen Jahreszeiten schwankt, unterscheiden sich nur um etwa 10 Proz. (Prigge, 16)! Auch in anderen Laboratorien ist für einen bestimmten Giftwert niemals eine Zunahme um mehr als höchstens 50 Proz. festgestellt worden. Daß im September gegen 1,8 mg Toxin ein gleicher Prozentsatz von Tieren geschützt war wie im Februar gegen 0,45 mg, läßt sich also nicht durch die sommerliche Steigerung der „natürlichen Resistenz“ erklären. Die bei den immunisierten Tieren beobachtete Zunahme der Giftfestigkeit muß vielmehr als Erhöhung der durch die Antigen-Einverleibung erworbenen Immunität aufgefaßt und auf eine Steigerung der „Immunisierbarkeit“ zurückgeführt werden.. —

Zu besonders aufschlußreichen Ergebnissen über den Zusammenhang zwischen Impfstoffdosis und Immunisierungswirkung führten Paralleluntersuchungen, in denen jeweils zur gleichen Zeit mehrere große

Tierserien mit dem gleichen Impfstoff, aber mit verschiedenen Dosen immunisiert wurden. Tabelle 7 gibt eine Uebersicht über zwei derartige

Tabelle 7.

Zur Immunisierung verwandte Impfstoffmenge (Schutz-Einheiten)	Tier-Serie	Zahl der durch den Standardimpfstoff F 47 gegen 1,8 mg/250 g (= 20 dl_{75} = 12 dl_{100}) Diphtherie-Trockentoxin T 172 geschützten Meerschweinchen			
		19. Juli 1933		25. Januar 1934	
11,5 SE	1	.	.	15/19 = 79 %	**99/126 = 79 %**
	2	.	.	20/23 = 87 %	
	3	.	.	13/15 = 87 %	
	4	.	.	16/22 = 73 %	
	5	.	.	16/23 = 70 %	
	6	.	.	19/24 = 79 %	
5,8 SE	1	.	.	16/25 = 64 %	**82/116 = 71 %**
	2	.	.	14/22 = 64 %	
	3	.	.	18/24 = 75 %	
	4	.	.	15/21 = 71 %	
	5	.	.	19/24 = 79 %	
2,3 SE	1	16/25 = 64 %	**84/121 = 69 %** [1]	14/22 = 64 %	**51/109 = 47 %** [2]
	2	14/24 = 58 %		10/23 = 43 %	
	3	16/23 = 70 %		5/22 = 23 %	
	4	22/25 = 88 %		12/22 = 55 %	
	5	16/24 = 67 %		10/20 = 50 %	
1,15 SE	1	18/25 = 72 %	**82/125 = 66 %**	9/24 = 38 %	**55/118 = 47 %**
	2	15/25 = 60 %		7/24 = 29 %	
	3	16/25 = 64 %		12/23 = 52 %	
	4	17/25 = 68 %		15/24 = 63 %	
	5	16/25 = 64 %		12/23 = 52 %	
0,58 SE	1	11/25 = 44 %	**59/122 = 48 %**	0/23 = 0 %	**14/112 = 13 %**
	2	11/24 = 46 %		3/20 = 15 %	
	3	14/24 = 58 %		2/23 = 9 %	
	4	12/25 = 48 %		7/22 = 32 %	
	5	11/24 = 46 %		2/24 = 8 %	
0,29 SE	1	10/24 = 42 %	**40/120 = 33 %**	1/23 = 4 %	**10/115 = 9 %**
	2	6/23 = 26 %		1/23 = 4 %	
	3	9/25 = 36 %		3/24 = 13 %	
	4	10/24 = 42 %		1/23 = 4 %	
	5	5/24 = 21 %		4/22 = 18 %	

Versuchsreihen, die zur Klärung dieses Zusammenhanges durchgeführt wurden. Die Tabelle zeigt zunächst nochmals den erheblichen Unterschied zwischen der Immunisierungswirkung gleicher Mengen ein und desselben Impfstoffes im Sommer und im Winter. Zur Erzielung eines bestimmten Effektes benötigt man im Sommer wesentlich kleinere Mengen Impfstoff als im Winter, und umgekehrt leistet eine bestimmte Impfstoffmenge im Sommer wesentlich mehr als im Winter. Sodann läßt sowohl die im Sommer wie die im Winter durchgeführte Ver-

1) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 5 in der vierten Horizontalreihe (rechts) wiedergegebenen Serie identisch.

2) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 5 in der siebenten Horizontalreihe (rechts) wiedergegebenen Serie identisch.

suchsreihe sehr deutlich erkennen, wie außerordentlich langsam die Immunisierungswirkung bei Erhöhung der Impfstoffdosis steigt.

Die Wirkungskurven, die man gewinnt, wenn man den Prozentsatz der auf ein biologisch wirksames Präparat reagierenden Tiere als Funktion der angewandten Dosis graphisch darstellt, lassen zwar erkennen, wie hoch der Prozentsatz sämtlicher auf eine beliebige Dosis reagierenden Tiere ist; dagegen zeigen sie nicht an, wie der Prozentsatz derjenigen Tiere ist, bei denen gerade die angewandte Dosis — nicht mehr, aber auch nicht weniger — zur Erzielung der charakteristischen Reaktion nötig ist. Dies läßt sich jedoch ohne weiteres feststellen, indem man von dem Prozentsatz der auf irgendeine Dosis reagierenden Tiere den Prozentsatz der auf die nächstkleinere Dosis reagierenden Tiere abzieht. Man erfährt so, wieviel Tiere gerade eben auf Dosen reagieren, die innerhalb eines bestimmten Intervalles liegen [Kisskalt (13); Shackell und Mitarbeiter (5); Wiechowski (6); Trevan (7)]. Es läßt sich ohne weiteres erkennen, daß man auf diese Weise Kurven gewinnt, die in jeder Weise den Verteilungskurven der Erblichkeitslehre entsprechen[1]). Für die graphische Darstellung ist es natürlich ganz gleichgültig, ob man feststellt, wieviel Prozent Bohnen einen Durchmesser von 23—24 mm haben, oder wieviel Prozent Tiere auf Giftdosen von 23—24 mg gerade eine bestimmte Reaktion zeigen. Der englische Pharmakologe J. W. Trevan (7) hat nun gezeigt, daß die Wirkungskurven zahlreicher Präparate die Form von normalen Aufzählungskurven annehmen, wenn man nicht die Dosen selbst, sondern ihre Logarithmen als Abszissen einträgt[2]). Zu ähnlichen Ergebnissen war kurze Zeit vor Trevan auch der verstorbene Prager Pharmakologe Wiechowski (6) gelangt. Dementsprechend lassen sich aus den Wirkungskurven auch normale Verteilungskurven, die bekannten binomialen Variabilitätskurven ableiten.

Wenn man nun an Stelle der Antigendosen deren Logarithmen als Verteilungsargument verwendet, so nehmen auch die bei der Bearbeitung des in Tabelle 7 wiedergegebenen Materials sich ergebenden Wirkungskurven die Form von normalen Aufzählungskurven an. Die experimentell bestimmten Werte erscheinen dabei als normale Streuungen der theoretisch geforderten Punkte. Wie man aus Tabelle 8 ersieht, verläuft die Sommer- und die Winterkurve bei dieser Darstellungsweise parallel. Es stellt wohl keine zu weitgehende Behauptung dar, daß Kurven, welche in den Uebergangszeiten, also im Frühjahr oder im Herbst aufgenommen werden, den gleichen Verlauf zeigen müßten wie die Extreme.

Von vorneherein war dieses Resultat gar nicht vorauszusehen und konnte nur auf experimentellem Wege festgestellt werden. Es ergibt sich

1) Die Wirkungskurven selbst sind als Aufzählungskurven aufzufassen.

2) Eine eingehende Darstellung dieses Sachverhaltes findet man in einer Monographie von J. H. Gaddum (19).

nun hierdurch die Möglichkeit, ein von Trevan (7) für die Auswertung des Dysenterie-Antitoxins angegebenes Verfahren in Anwendung zu bringen und ohne eigentliche „Titration“ den Schutzwert eines Diphtherieimpfstoffes zu bestimmen. Da sich bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabes aus parallel verlaufenden Kennlinien als Quotient der zu einem

Tabelle 8.

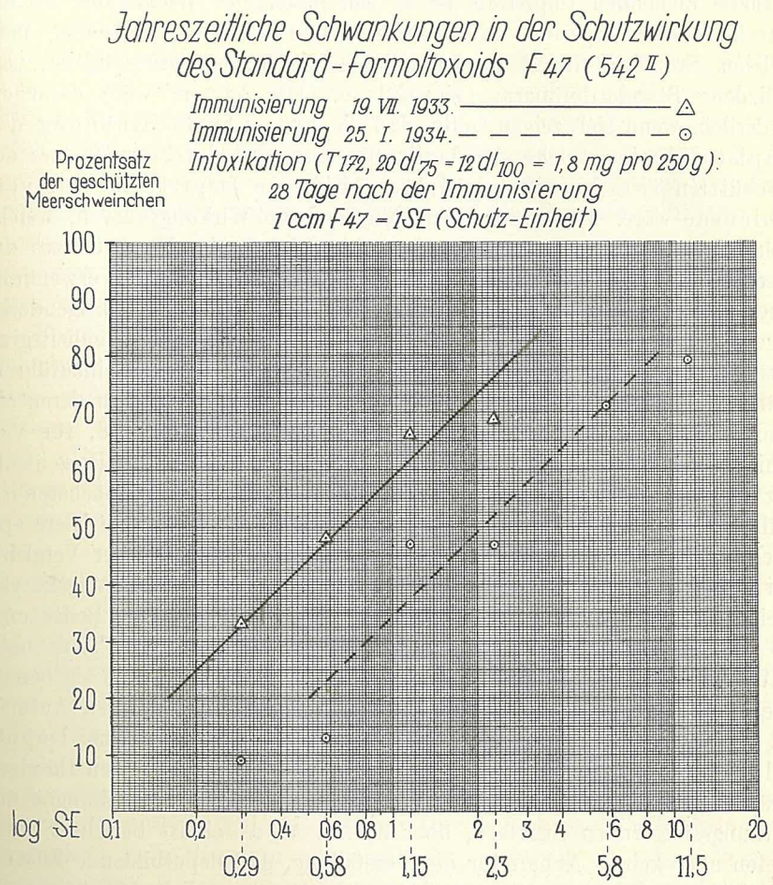


Fig. 3.

Ordinatenpaar gehörigen Abszissen stets der gleiche Wert ergibt, genügt es, den Schutzwert einer einzigen Dosis des Standardpräparates und der gleichen Dosis des unbekannten Präparates zu ermitteln. Man hat dann lediglich das Zahlenverhältnis der zugehörigen Fußpunkte aus irgendeiner der parallel verlaufenden Kennlinien abzulesen, um zugleich das Wertverhältnis der beiden Impfstoffe zu ermitteln. Es ist allerdings notwendig,

eine so große Anzahl von Tieren zu benützen, daß die individuellen Unterschiede der Tiere und die bei ihrer Verteilung auf die verschiedenen Versuchsserien waltenden Zufälligkeiten nicht mehr ins Gewicht fallen können. Trotzdem gewährleistet das Verfahren, da insgesamt nur zwei Dosen geprüft werden, gegenüber einer „Titration" eine sehr beträchtliche Tierersparnis.

Für die Standardisierung der zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie dienenden Impfstoffe ist es von besonderer Wichtigkeit, ob die verschiedenen Präparate und Impfstoffarten sämtlich gegenüber dem gleichen Standard titriert werden können oder ob es notwendig ist, verschiedene Standardpräparate einzuführen. Das letztere wäre dann erforderlich, wenn sich zeigen sollte, daß die prozentuale Erhöhung der Impfstoffdosis, welche eine bestimmte Zunahme des Prozentsatzes der geschützten Tiere herbeiführt, für verschiedene Impfstoffe eine verschiedene wäre. Dies würde bedeuten, daß die Wirkungskurven, welche sich bei graphischer Darstellung der Abhängigkeit des Prozentsatzes der geschützten Tiere von der angewandten Antigendosis unter Verwendung eines logarithmischen Maßstabes für die Eintragung der Antigendosen ergeben, für verschiedene Impfstoffe einen verschiedenen Steilheitsgrad besäßen. Die Notwendigkeit, mehr als ein Standardpräparat einzuführen, würde sich auch dann ergeben, wenn die Zeitspanne, innerhalb deren ein Tierkollektiv auf das Immunitätsmaximum gebracht wird, für verschiedene Impfstoffe nicht die gleiche wäre. Falls z. B. der Prozentsatz der durch das Antigen A geschützten Tiere nach 4 Wochen am höchsten ist, während der Prozentsatz der durch das Antigen B geschützten Tiere erst nach 8 Wochen sein Maximum erreicht, wäre ein unmittelbarer Vergleich der beiden Antigenarten selbst dann unzulässig, wenn ihre Wirkungskurven gleiche Steilheit hätten. Dabei wäre es von untergeordneter Bedeutung, ob die Immunität der mit dem Antigen A immunisierten Tiere nach 8 Wochen noch ebenso hoch wäre wie nach 4 Wochen oder ob sie bereits wieder abgenommen hätte. Von H. Schmidt (18) und anderen Autoren ist die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Wirkung der zur Depotbildung führenden Impfstoffe (TAF usw.) im Vergleich zu den flüssigen Präparaten (Formoltoxoid, TA usw.) verzögert sei. Untersuchungen mit wirkungssteigernden Zusätzen, über die im V. Abschnitt berichtet wird, bieten aber keinen Anhalt für die Vorstellung, daß depotbildende Zusätze (Kali-Alaun) die Immunitätsentwicklung verzögerten. Jedenfalls waren die Tiere, die den mit Kali-Alaun versetzten Impfstoff erhalten hatten, nach 4 Wochen wesentlich besser immunisiert als die Kontrolltiere (s. Tab. 13). Die Annahme, daß sich die verschiedenen Impfstoffarten, zwischen denen in quantitativer Beziehung zweifellos große Unterschiede bestehen, auch in qualitativer Hinsicht nicht vertreten könnten, scheint also bis jetzt nicht hinreichend gestützt zu sein. Es genügt daher zunächst, ein einziges Standardpräparat einzuführen, wobei es im Prinzip völlig gleichgültig ist, welche Art von Impfstoff hierfür gewählt wird. —

Als normale Aufzählungskurven verlaufen die Wirkungskurven der Diphtherieantigene — bei Verwendung eines logarithmischen Dosenmaßstabes — innerhalb eines Bereiches, welcher den Ordinaten von 20—80 entspricht, nahezu linear (vgl. Tab. 8). Dies bedeutet, daß innerhalb dieses Bereiches die Aenderungen des Prozentsatzes der geschützten Tiere proportional den Aenderungen des Logarithmus der Antigendosis sind. Diese Tatsache könnte Anlaß zu Vergleichen mit dem Weber-Fechnerschen Gesetz geben.

Einen Hinweis auf die Gültigkeit des psychophysischen Grundgesetzes (Weber-Fechnerschen Gesetzes) bei pharmakologischen Reaktionen, insbesondere bei der Einwirkung von Adrenalin auf den Blutdruck hatte bereits Lyon (8) gegeben. Aber erst Wiechowski (6) hat darauf aufmerksam gemacht, daß bei der Messung pharmakologischer Wirksamkeit am lebenden Tier mit Rücksicht auf die allgemeine Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes eine geometrische Abstufung der angewandten Dosen[1]) erfolgen müsse, wenn eine normale Verteilung zustande kommen solle.

Für die Anwendung des Weber-Fechnerschen Gesetzes auf immunbiologische Vorgänge ist nun folgendes zu berücksichtigen: Aus der Tatsache, daß die Aenderungen des Prozentsatzes der geschützten Tiere proportional den Aenderungen des Logarithmus der Antigendosis sind, darf noch nicht der Schluß gezogen werden, die Differenzen der Immunitätsgrade beim Einzelindividuum müßten ebenfalls den Aenderungen des Logarithmus der Antigendosis proportional sein! Es muß nachdrücklich betont werden, daß zunächst nur in der Formulierung der beiden Gesetze eine Uebereinstimmung festzustellen ist. Die Tatsache der linearen Zunahme des Ueberlebensprozentsatzes gestattet jedenfalls — für sich allein — keineswegs den Schluß auf eine logarithmische Beziehung zwischen den Antigendosen („Reizen") und den durch sie bei einem bestimmten Tier zu erzeugenden Immunitätsgraden („Reaktionen").

Abgesehen davon, daß die Zunahme der Ueberlebensprozentsätze bei Verwendung eines logarithmischen Dosenmaßstabes auch im Idealfall gar nicht als eigentlich linear zu denken ist, sondern in Wirklichkeit einer „normalen Aufzählungskurve" entspricht, während ein dem Weber-Fechnerschen Gesetz entsprechender Nexus zwischen Antigendosis und Immunitätsgrad bei gleicher Darstellungsweise tatsächlich durch eine Gerade wiedergegeben wird, ist zu beachten, daß die bisher besprochenen Relationen zwischen Antigendosis und Schutzwirkung das Gesamtverhalten von Tierkollektiven betreffen. Diese Relationen sind abhängig von den individuellen Unterschieden in der Immunisierbarkeit der Tiere und

1) Eine normale Verteilung resultiert selbstverständlich auch bei arithmetischer Abstufung der Dosen, sofern man für die tatsächlich gewählten Dosen nur einen zweckentsprechenden, also logarithmischen Maßstab wählt.

von der „Verteilung“, d. h. von der relativen Anzahl der auf die einzelnen Immunisierbarkeitsklassen entfallenden Individuen. Beim WEBER-FECHNERschen Gesetz handelt es sich dagegen um die Beziehung zwischen Reizgröße und Reaktion beim Einzelindividuum, hier also um die Beziehung zwischen Antigendosis und Immunitätsgrad. Das ist etwas prinzipiell anderes. Im ersten Fall wird etwas über die Einteilung der Tiere nach der Größe der zur Erzielung eines bestimmten Immunitätsgrades bei den verschiedenen Individuen erforderlichen Antigendosen bzw. über die Prozentsätze der durch verschiedene Antigendosen geschützten Tiere, im zweiten Fall über die bei einem einzelnen Tier durch verschiedene Antigendosen erzielbaren Immunitätsgrade ausgesagt.

HEMMINGSEN (14) hat aus der Tatsache, daß die Kennlinien der Insulinwirkung bei Verwendung eines logarithmischen Dosenmaßstabes die Gestalt von normalen Aufzählungskurven annehmen, wenigstens auf die Gültigkeit des WEBERschen Gesetzes schließen wollen.

Dieses sagt nur aus, daß der Reizzuwachs, welcher den geringsten feststellbaren Empfindungszuwachs bewirkt, proportional dem Reiz ist. Nach dem WEBERschen Gesetz müssen also die in Betracht kommenden Empfindungsänderungen nur in qualitativer Hinsicht übereinstimmen: sie müssen „gerade noch feststellbar“ sein. Damit ist aber an sich nicht gesagt, daß sie auch in quantitativer Hinsicht übereinstimmen, d. h. gleich groß erscheinen müßten. FECHNER hat nun zusätzlich die Annahme gemacht, daß der gerade noch feststellbare Empfindungszuwachs einen ganz bestimmten, immer gleichbleibenden Empfindungswert repräsentieren müsse, und hat dadurch erst die Möglichkeit gefunden, über den Zusammenhang zwischen Reiz und Empfindungs-Größe eine Aussage zu machen.

Hieraus geht hervor, daß eine Uebertragung des WEBERschen Gesetzes auf physiologische oder pharmakologische Phänomene gar keinen angebbaren Sinn hätte. Denn die Feststellung, daß jedem Reizzuwachs, welcher in einer bestimmten Proportion zu dem Reiz steht, irgendwelche Aenderungen der Reaktion entsprechen, die untereinander nicht übereinzustimmen brauchen, über deren Größenverhältnis aber keine Angaben gemacht werden können, besagt höchstens, daß eine Beziehung zwischen Reiz und Reaktion besteht, aber nicht, welcher Art diese Beziehung ist. Die Feststellung ist somit inhaltslos. Die Darlegungen von HEMMINGSEN, die sich mit den Unterschieden in der Reaktion eines Versuchstieres gegenüber verschiedenen Dosen eines biologisch wirksamen Präparates (Insulin), d. h. mit prinzipiell meßbaren Größen beschäftigen, erhalten also erst dann einen angebbaren Inhalt, wenn sie nicht auf das WEBERsche, sondern auf das WEBER-FECHNERsche Gesetz bezogen werden, d. h. auf ein Gesetz, welches tatsächlich Aussagen über die Beziehung zwischen Reiz und Reaktionsgröße macht.

In durchaus berechtigter Weise setzt HEMMINGSEN die Insulinkrämpfe, also eine ihrer Stärke nach hinreichend definierte Reaktion, für einen bestimmten Empfindungsgrad und verwendet als Maß für die Resistenz bzw. Empfindlichkeit eines Individuums die Insulindosis, die gerade ausreicht, um Krämpfe zu erzeugen. Den Beweis für die Gültigkeit des WEBERschen Gesetzes sucht er nun zu führen, indem er eine Reihe von Annahmen über die Resistenz und das Reaktionsvermögen der Versuchstiere gegenüber Insulin macht. Er hält es für selbstverständlich, daß der kleinste bestimmbare Unterschied in der Empfindlichkeit verschiedener Versuchstiere, die „Einheit der Empfindlichkeit“ in engem Zusammenhang mit dem kleinsten bestimmbaren Unterschied in der Reaktion eines einzelnen Tieres gegenüber verschiedenen Reizen, der „Einheit der Empfindung“ stehen müsse („must be closely dependent“).

Dies würde bedeuten, daß zwischen dem Reaktionsvermögen des einzelnen Tieres und dem Unterschied, den es hinsichtlich der Resistenz gegenüber der nächsthöheren oder nächsttieferen Variante zeigt, ein innerer Zusammenhang bestünde. Geht man nun von der Gültigkeit des WEBERschen Gesetzes bzw. von der Annahme aus, daß der Dosenzuwachs, der nötig ist, um einen bestimmbaren Unterschied in der Reaktion hervorzurufen, proportional der Dosis ist, so würde sich — falls der von HEMMINGSEN angenommene enge Zusammenhang wirklich bestünde — ergeben, daß auch der kleinste bestimmbare Unterschied in der individuell wirksamen Insulindosis der Dosis proportional wäre, d. h. daß sich eine schiefe, nach rechts abgeflachte Verteilung ergäbe, welche durch Einführung eines logarithmischen Dosenmaßstabes normal würde. Und umgekehrt könnte aus der Tatsache, daß sich für die Insulinresistenz (gemessen durch die individuell wirksame Dosis) eine derartige schiefe Verteilung ergibt, der Schluß gezogen werden, daß das WEBERsche Gesetz für die Reaktivität des Einzelindividuums maßgebend sein müsse.

Dies sind die Schlußfolgerungen, mit deren Hilfe HEMMINGSEN die Gültigkeit des WEBERschen Gesetzes nachweisen zu können glaubt. Sie müssen jedoch als durchaus unzulässig angesehen werden, weil der von HEMMINGSEN unterstellte Zusammenhang zwischen dem Verhalten des Einzeltieres und dem Resistenzunterschied verschiedener Tiere in keiner Weise bewiesen ist. Und gerade auf diesem unbewiesenen Zusammenhang sind die Schlußfolgerungen von HEMMINGSEN aufgebaut!

Man könnte nun einwenden, daß sich die charakteristische Schiefheit der Verteilung der individuell wirksamen Dosen im Falle der Nichtgültigkeit des WEBER-FECHNERschen Gesetzes vielleicht nur für einen bestimmten Reaktionsgrad ergeben könne, während diejenigen Dosen, welche einen höheren Reaktionsgrad bewirken, eine andere Verteilung erkennen ließen (Tab. 9, Fig. 4), und könnte in der Unwahrscheinlichkeit solcher Verhältnisse ein Argument zugunsten des WEBER-FECHNERschen Gesetzes erblicken.

Es kann jedoch gezeigt werden, daß die für einen bestimmten Reaktionsgrad gültige Verteilung der individuell wirksamen Dosen bei allen anderen Reaktionsstärken erhalten bleiben kann, auch wenn die Reaktivität der Einzeltiere nicht dem WEBER-FECHNERschen Gesetz entspricht. Fig. 5 (Tab. 9) möge die individuellen Reaktionskurven von vier aufeinanderfolgenden Varianten darstellen. Der Unterschied in der „Resistenz“, d. h. in der individuell wirksamen Dosis, die zur Erzielung des Effektes „1“ (es möge sich z. B. um „leichte Insulinkrämpfe“ handeln) gerade ausreicht, möge der individuell wirksamen Dosis proportional sein. Das gleiche gilt für die Dosen, die den Effekt „2“ („schwere Insulinkrämpfe“) bewirken usw. Der Dosenzuwachs, welchem eine gewisse Zunahme des Effektes (3—2 = 2—1 usw. = 1) bei ein und demselben Tier entspricht, ist dagegen der Dosis keineswegs proportional, sondern stellt einen — von Tier zu Tier verschiedenen — konstanten Wert dar. Es ist lediglich festzustellen, daß das Verhältnis der Dosen, welche ein und demselben Wirkungszuwachs, z. B. dem „kleinsten bestimmbaren Wirkungszuwachs“ (2—1 = 1) entsprechen, bei verschiedenen Tieren stets das gleiche ist.

Fig. 6 (Tab. 9) gibt die gleichen Verhältnisse wie Fig. 5 unter Verwendung eines logarithmischen Dosenmaßstabes wieder; den Unterschieden zwischen den einzelnen Varianten entsprechen hier gleich große Abstände. Diese Darstellung macht ohne weiteres anschaulich, daß der Unterschied in der individuell wirksamen Insulindosis der Dosis auch dann proportional sein kann, wenn die Reaktivität der Einzeltiere dem WEBRschen bzw. dem WEBER-FECHNERschen Gesetz nicht entspricht[1]).

1) Auf HEMMINGSENS Versuch, die Verteilungsasymmetrie der Insulinresistenz auf Grund der bekannten KAPTEYNschen Vorstellungen über das Zustandekommen schiefer Verteilungen durch die Annahme zu erklären, daß die Wirkungen der variations-

Ob trotz dieser Ausführungen die besondersartige Verknüpfung der Antigendosis mit dem Prozentsatz der geschützten Tiere einen Hinweis auf eine dem WEBER-FECHNERschen Gesetz entsprechende Beziehung zwischen Antigendosis und Immunitätsgrad des Einzelindividuums enthält, wird in der nachfolgenden Arbeit erörtert werden.

Tabelle 9.

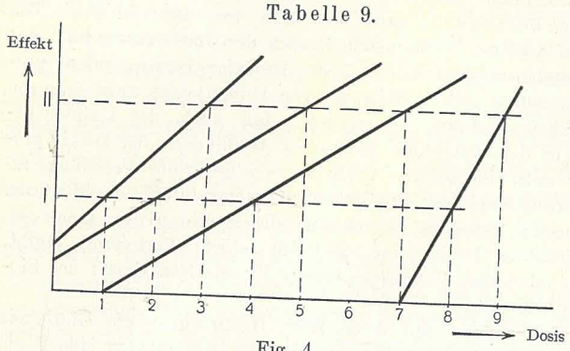


Fig. 4.
Schiefheit der Verteilung bei Effekt I
Normalität „ „ „ „ II

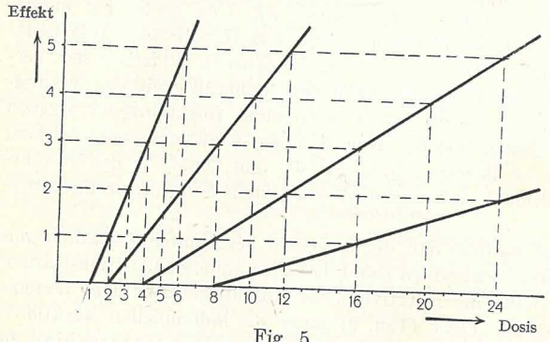


Fig. 5.

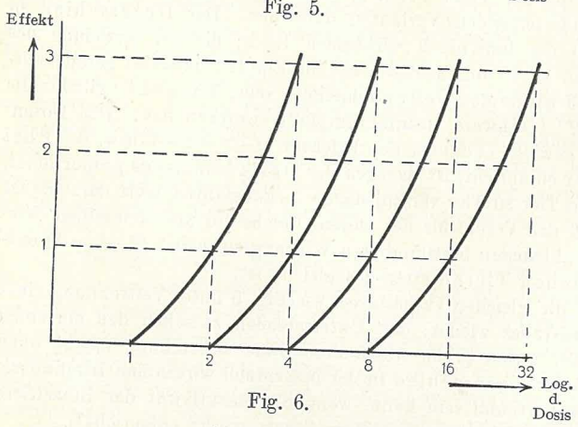


Fig. 6.

Wesentliche Bedeutung beansprucht in diesem Zusammenhang auch die oben schon kurz gestreifte Frage, wie sich die Fähigkeit des Einzelindividuums, Toxin zu entgiften, mit der Antigendosis verändert. Die in Tabelle 10 wiedergegebenen, in mancher Hinsicht ergänzungsbedürftigen Untersuchungen gewähren einen gewissen Einblick in diese Zusammenhänge.

bedingenden Faktoren proportional der Größe der bereits entwickelten Varianten seien, braucht in diesem Zusammenhang nicht eingegangen zu werden. Die von HEMMINGSEN für die Gültigkeit des WEBERschen Gesetzes angeführten Argumente gewinnen durch die Verknüpfung mit dem KAPTEYNschen Theorem nicht an Beweiskraft. Die Frage, ob sich dieses Theorem zur Erklärung der schiefen Verteilung der individuell wirksamen Dosen eignet, wird jedoch durch diese Kritik nicht berührt (vgl. die nachfolgende Arbeit, Abschn. 5).

Tabelle 10.

Giftdosis T 172	Zahl der durch den Impfstoff F 47 geschützten Tiere							
	1. Versuch (7. Juni 1932)		2. Versuch (7. Juni 1932)		3. Versuch (30. Juli 1932)		4. Versuch (30. Juli 1932)	
	Schutzeinheiten	Anzahl der geschützten Tiere	Schutzeinheiten	Anzahl der geschützten Tiere	Schutzeinheiten	Anzahl der geschützten Tiere	Schutzeinheiten	Anzahl der geschützten Tiere
12 dl_{100} [1]) = 1,8 mg/250 g	—	—	4,6	16/24 = 67 %	9,2	22/24 = 92 %	2,3	21/25 = 84 %
6 dl_{100} = 0,9 mg/250 g	4,6	16/19 = 84 %	2,3	9/16 = 56 %	—	—	1,15	19/25 = 76 %
3 dl_{100} = 0,45 mg/250 g [2])	2,3	10/17 = 59 %	1,15	12/22 = 55 %	2,3	22/25 = 88 %	0,58	14/25 = 56 %

Das Ergebnis, das diese Untersuchungen für die jetzt erörterte Frage gebracht haben, läßt sich kurz so zusammenfassen, daß der Prozentsatz der geschützten Tiere bei proportionaler Vermehrung von Antigendosis und Toxindosis zumindest konstant zu bleiben, also jedenfalls nicht abzunehmen scheint. Soweit aus diesen Beobachtungen Schlüsse gezogen werden dürfen, deuten sie darauf hin, daß die Fähigkeit des Einzelindividuums, Toxin zu entgiften, mit der Antigendosis selbst oder vielleicht noch stärker wächst. Die Frage, ob dieser Sachverhalt etwas gegen die logarithmische Verknüpfung von Antigendosis und Immunitätsgrad des Einzelindividuums besagt, wird ebenfalls in der nachfolgenden Arbeit untersucht werden.

IV.

Auf den drei Prinzipien der Verwendung hoher Toxinmultipla für die Prüfung der Immunität, der Anwendung großer Tierreihen zu den Versuchen und der Einführung eines Standardantigens beruht die neue Methodik der Wertbestimmung der Impfstoffe. Mit dieser Methodik konnte zunächst das Wertverhältnis zwischen dem dänischen Formoltoxoid L 31 und dem deutschen Standardimpfstoff F 47, ferner der Schutzwert des Trocken-Standardpräparates F 191 genau festgelegt werden.

Die Anzahl der auf 1 Kubikzentimeter, 1 Milligramm oder 1 Flockungs-Einheit eines geprüften Impfstoffes entfallenden Schutz-Einheiten (SE/ccm, SE/mg bzw. SE/L_f) errechnet sich folgendermaßen. Bezeichnet man mit

m : eine bestimmte Menge (ccm, mg, L_f) des geprüften Impfstoffes,
x : die Anzahl der in m enthaltenen Schutzeinheiten,
r : die Anzahl der in der Vergleichsdosis des Standardpräparates enthaltenen Schutzeinheiten,

1) „dl_{100}" = sicher tödliche Dosis.

2) Die in dieser Horizontalreihe enthaltenen Zahlen sind identisch mit Resultaten, die in der 9. Horizontalreihe (20, 10 L_f) und in der 11. Horizontalreihe (20, 5 L_f) von Tabelle 3 bereits mitgeteilt wurden.

A_x: die Abszisse, welche dem Prozentsatz der durch x geschützten Tiere in einer beliebigen der in Tabelle 8 reproduzierten parallelen Kennlinien zugeordnet ist,

A_r: die Abszisse, welche dem Prozentsatz der durch r geschützten Tiere in der gleichen Kennlinie zugeordnet ist,

dann ergibt sich

(a) $x : r = A_x : A_r$;

denn bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabes ergibt sich aus parallel verlaufenden Kennlinien als Quotient der zu einem Ordinatenpaar gehörigen Abszissen stets der gleiche Wert. Es ist also

(b) $x = r \cdot \frac{Ax}{Ar}$;

(c) $SE/ccm\ (SE/mg,\ SE/L_f) = \frac{x}{m} = \frac{r}{m} \cdot \frac{Ax}{Ar}$.

Die Dosen, deren Wirksamkeit durch die in Tabelle 5 wiedergegebenen Versuche geprüft und miteinander verglichen wurden, waren jedesmal die gleichen, und zwar

für L 31 : 1,82 ccm = 20 L_f,
für F 47 : 2,3 ccm = 2,3 SE = 20 L_f.

Tabelle 11 gibt eine Uebersicht über die für den Gehalt des Impfstoffes L 31 an Schutz-Einheiten ermittelten Werte. Wie hieraus hervorgeht, waren die beiden Impfstoffe L 31 und F 47, auf die Volumeinheit berechnet, völlig gleichwertig; auf die Flockungseinheit berechnet, besaß der Impfstoff L 31 etwa achtzig Prozent der Wirksamkeit von F 47. —

Tabelle 11.

Zeit der Immunisierung	Gehalt des Impfstoffes L 31 an Schutzeinheiten	
	in 1 ccm (SE/ccm)	in 1 L_f (SE/L_f)
26. 1. 33	0,82	0,075
30. 3. 33	0,75	0,068
24. 5. 33	1,69	0,154
19. 7. 33	0,82 [1])	0,075
27. 9. 33	1,33	0,121
20. 11. 33	0,79	0,072
geometrisches Mittel	0,977	0,091
Wertverhältnis von L 31 und F 47	SE/ccm L 31 : SE/ccm F 47 = 0,977 : 1 = 0,977	SE/L_f L 31 : SE/L_f F 47 = 0,091 : 0,115 [2]) = 0,79

Die Ergebnisse der zur Ermittlung des Schutzwertes des Trocken-Standard-Präparates F 191 durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Bei ihrer Bewertung ist zu berücksichtigen, daß zwei Untersuchungen nur mit je etwa 65 Tieren durchgeführt wurden, während zu den übrigen je 125 Tiere benützt wurden. Faßt man die Ergebnisse der erwähnten

1) Dieser Wert wurde durch direkte Entnahme aus der zur gleichen Zeit ermittelten Gesamt-Kennlinie (vgl. Tab. 7 u. 8) gefunden: dem Prozentsatz der durch 1,82 ccm L 31 geschützten Tiere (67 Proz.) entsprechen dort 1,49 SE; auf 1 ccm L 31 entfallen also 0,82 SE.

2) 1 ccm F 47 = 1 SE = 8,7 L_f; auf 1 L_f F 47 entfallen also 0,115 SE.

Tabelle 12.

Zeit der Immunisierung	F 47		F 191			Schutzwert von F 191
	Zur Immunisierung verwandte Menge	Zahl der gegen 1,8 mg/250 g T 172 geschützten Meerschweinchen	Lösung	Zur Immunisierung verwandte Menge	Zahl der gegen 1,8 mg/250 g T 172 geschützten Meerschweinchen	
21. 8. 34	1,5 ccm = 1,5 SE	62/124 = 50 %	10 mg/ccm	1,5 ccm = 15 mg	103/124 = 83 %	1 SE = 2,06 mg
26. 9. 34	2,0 ccm = 2,0 SE	58/124 = 47 %	4 mg/ccm	2,0 ccm = 8 mg	80/123 = 65 %	1 SE = 1,67 mg
7. 11. 34	3,0 ccm = 3,0 SE [1])	85/124 = 68,6 %	8 mg/ccm	3,0 ccm = 24 mg	55/62 = 88,7 %	1 SE = 3,12 mg
			2 mg/ccm	3,0 ccm = 6 mg	96/125 = 76,8 %	1 SE = 1,37 mg
			0,5 mg/ccm	3,0 ccm = 1,5 mg	16/65 = 24,6 %	1 SE = 4,1 mg

beiden Versuchsreihen in der Weise zusammen, daß man ihr geometrisches Mittel ($1\ SE = \sqrt{3{,}12 \cdot 4{,}1} = 3{,}58$ mg) einsetzt, so lassen sie sich mit den übrigen Resultaten leicht vereinigen. Als geometrisches Mittel der vier Hauptresultate wird dann $1\ SE = \sqrt[4]{2{,}06 \cdot 1{,}67 \cdot 1{,}37 \cdot 3{,}58} = 2{,}0$ mg [2]) gefunden. Daß eine 2 mg/ccm enthaltende Lösung des Trockenformoltoxoids F 191 die antigene Wirksamkeit von 1 SE besitzt, geht ohne weiteres auch aus der direkten Gegenüberstellung des Prozentsatzes der durch diese Lösung geschützten Tiere (76,8 Proz.) und des Prozentsatzes der durch das Vergleichspräparat geschützten Tiere (68,6 Proz.) hervor; die beiden Werte weichen nur um ± 4,1 vom Mittelwert ab.

V.

Nach Festlegung der methodischen Prinzipien wurde auch eingehend geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem mit Hilfe des Tierversuches ermittelten, in Schutzeinheiten ausdrückbaren Immunisierungswert der Diphtherieimpfstoffe, insbesondere der Formoltoxoide und ihrem mit Hilfe der Ramonschen Flockung nachweisbaren Gehalt an Flockungseinheiten besteht. Die in Tabelle 13 zusammengestellten Versuche erbringen zunächst den sicheren Nachweis, daß ein „Parallelismus" zwischen der Immunisierungskraft der Diphtherieformoltoxoide und ihrem Gehalt an Flockungseinheiten nicht besteht. Es gibt z. B. Zusätze, die die Wirkung der Impfstoffe erheblich steigern können, z. B. Kali-Alaun (Glenny) oder Tapioka (Ramon). Von 50 Tieren,

1) In diesem Versuch wurde an Stelle des Formoltoxoids F 47 das wirkungsgleiche Formoltoxoid L 31 verwandt.

2) Der genaue Wert ist 1,89 mg. Die Methode zur Berechnung dieses Wertes ist in der nachfolgenden Arbeit in Abschn. 2d entwickelt.

Tabelle 13.

Zeit der Immunisierung	Impfstoff	L_f/ccm	Injizierte Dosis	Zahl der gegen 1,8 mg/250 g (= 20 dl_{75} = 12 dl_{100}) Diphtherie-Trockentoxin T 172 geschützten Meerschweinchen
22. 12. 1932	F 47	8,7	5 L_f	**8/50 = 16 %**
	F 47 + 2 % Kalialaun	8,7	,,	**48/50 = 96 %**
27. 9. 1933	L 31	11	20 L_f	15/23 = 65 % 15/23 = 65 % 20/25 = 80 % 13/24 = 54 % 18/24 = 75 % } **81/119 = 68 %** [1]
	F 89	42	,,	8/24 = 33 % 10/22 = 46 % 14/25 = 56 % 12/24 = 50 % 13/23 = 57 % } **57/118 = 48 %**
20. 11. 1933	L 31	11	20 L_f	16/25 = 64 % 18/24 = 75 % 14/25 = 56 % 13/25 = 52 % 11/24 = 46 % } **72/123 = 59 %** [2]
	F 72	3	,,	18/25 = 72 % 16/25 = 64 % 23/25 = 92 % 20/25 = 80 % 15/25 = 60 % } **92/125 = 74 %**
19. 12. 1934	F 191 [3]	3,8	3,5 ccm = 13,3 L_f	**85/122 = 70 %**
	S 1	3,6	3,5 ccm = 12,6 L_f	**0/118 = 0 %**
24. 1. 1935	F 191 [3]	3,8	4 ccm = 15,2 L_f	**84/116 = 72 %**
	B 8	14	4 ccm = 56 L_f	**46/116 = 40 %**

die im Dezember 1932 mit 5 Flockungseinheiten F 47 immunisiert worden waren, besaßen 8 einen Schutz gegen 1,8 mg T 172, also **16** Proz.; von 50 Tieren, zu deren Immunisierung eine gleiche, aber mit 2 Proz. Kali-Alaun versetzte Menge des gleichen Impfstoffes, also auch die gleiche Anzahl von Flockungseinheiten verwandt worden war, waren dagegen 48 geschützt, also **96** Proz.! Aber auch ohne derartige Zusätze zeigen die Formoltoxoide, auf Flockungseinheiten berechnet, die erheblichsten Unterschiede. In einem im September 1933 ausgeführten Versuch waren von 119 Tieren, die mit 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes L 31 immunisiert waren, 81 gegen 12 sicher tödliche Dosen T 172 (1,8 mg) geschützt, d. h. **68** Proz. Von 118 Tieren, die mit 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes F 89 immunisiert

1) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 5 in der fünften Horizontalreihe wiedergegebenen Serie identisch.

2) Diese Versuchsserie ist mit der in Tabelle 5 in der sechsten Horizontalreihe wiedergegebenen Serie identisch.

3) Eine 1,9 mg/ccm enthaltende Lösung des Trocken-Formoltoxoids F 191.

waren, besaßen nur 57 einen Schutz, d. h. **48** Proz. In einem ganz ähnlichen Versuche wurde im November 1933 der Impfstoff F 72 mit L 31 verglichen. Von 123 mit 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes L 31 immunisierten Tieren waren diesmal 72 geschützt, also **59** Proz., während von 125 mit 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes F 72 vorbehandelten Tieren 92, also **74** Proz. geschützt waren. Der Immunisierungswert von 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes F 89 war also geringer als der Immunisierungswert von 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes L 31. Dagegen war der Immunisierungswert von 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes F 72 höher als der Immunisierungswert von 20 Flockungseinheiten des Impfstoffes L 31.

Besonders aufschlußreich war das im Dezember 1934 bei der Prüfung des Formoltoxoids S 1 im Vergleich mit dem Standardpräparat F 191 erzielte Ergebnis. Während 13,3 Flockungseinheiten F 191 von 122 Tieren 85, also **70** Proz. zu schützen vermochten, waren von 118 Tieren, die mit 12,6, also ungefähr der gleichen Anzahl Flockungseinheiten S 1 vorbehandelt waren, **0** Proz. geschützt! Die Tiere zeigten nicht einmal eine Verlängerung der Absterbezeiten, sondern verhielten sich wie unbehandelte Kontrolltiere. Es wäre nach derartigen Erfahrungen nicht mehr zu verantworten, wenn man Impfstoffe zum Gebrauch beim Menschen zulassen wollte, deren antigene Eigenschaften lediglich im Reagensglasversuch geprüft sind. Schließlich sei noch ein Formoltoxoid B 8 erwähnt, das in Mengen von 56 Flockungseinheiten nur 46 von 116 Tieren, d. h. **40** Proz. zu schützen vermochte, während 15,2 Flockungseinheiten F 191 (also ungefähr nur ein Viertel der bei B 8 angewandten Anzahl) von 116 Tieren 84, d. h. **72** Proz. schützten. Die mitgeteilten Untersuchungsergebnisse zeigen, daß sich Impfstoffmengen, die in ihrem Gehalt an Flockungseinheiten übereinstimmen, hinsichtlich ihrer antigenen Wirksamkeit ganz verschieden verhalten können.

Trotzdem ist wohl nicht daran zu zweifeln, daß zwischen einer so eminent spezifischen Reaktion wie der Ramonschen Flockung und dem Immunisierungsvermögen der Formoltoxoide ein Zusammenhang bestehen muß. Soweit das bisher vorliegende Material Schlüsse zuläßt, läßt sich dieser Zusammenhang so formulieren, daß bei Impfstoffen gleicher oder ähnlicher Herstellungsart die Zahl der in 1 ccm enthaltenen Schutzeinheiten proportional der Quadratwurzel aus der Zahl der in 1 ccm enthaltenen Flockungseinheiten ist. Bezeichnet man die im Kubikzentimeter enthaltenen Flockungseinheiten mit L_f/ccm, die im Kubikzentimeter enthaltenen Schutzeinheiten mit SE/ccm, so ergibt sich die Gleichung

$$SE/ccm = K \cdot \sqrt{L_f/ccm},$$

wobei der Koeffizient K je nach der Herstellungsweise der Impfstoffe verschiedene Werte annimmt. Die Verhältnisse liegen also so, daß der Schutz-

wert der Impfstoffe zwar mit der Zunahme des Flockungswertes steigt, aber in viel geringerer Progression.

Wenn z. B. von zwei gleichartig hergestellten Impfstoffen der eine (A) 8,7 L_f/ccm, der andere (B) 34,8 L_f/ccm, also das Vierfache enthält, ist der Gehalt an Schutzeinheiten bei A = 1, bei B = 2, also nur doppelt so hoch. Und der Schutzwert von 17,4 L_f des Impfstoffes B ist nicht höher als der Schutzwert von 8,7 L_f des Impfstoffes A. Umgekehrt besitzen solche Mengen der Impfstoffe A und B, die in ihrem Gehalt an Flockungseinheiten übereinstimmen, ganz verschiedene antigene Wirksamkeit; z. B. entfällt bei A auf 8,7 L_f 1 SE, bei B dagegen nur 0,5 SE.

Trotzdem ist der Wert des Impfstoffes B, auf die Volumeinheit berechnet, höher als derjenige des Impfstoffes A. Nur der Wert des Quotienten SE/L_f, d. h. die Menge der auf 1 L_f entfallenden Schutzeinheiten ist bei A = 1/8,7, bei B = 1/17,4, also bei B geringer.

Die Verhältnisse entsprechen somit der Ramonschen Hypothese nur insofern, als der Schutzwert der Formoltoxoide bei gleichartiger Herstellung mit ihrem Flockungswert zunimmt. Dagegen können gleiche Mengen von Flockungseinheiten verschiedene antigene Wirksamkeit besitzen. Dies ist der Fall bei gleichartig hergestellten Impfstoffen mit verschiedenem Flockungstiter (L_f/ccm), kann aber auch bei Impfstoffen mit übereinstimmendem Flockungstiter festgestellt werden, wenn der Koeffizient K infolge größerer Unterschiede in der Herstellung verschiedenen Wert hat. Unter diesen Umständen wird es sogar vorkommen, daß Impfstoffe mit geringem Flockungstiter besseren Schutzwert haben als Impfstoffe mit höherem Flockungstiter.

Als Beispiel für diesen Zusammenhang möge hier der Gehalt an Schutzeinheiten und an Flockungseinheiten angeführt werden, der bei zwei Gruppen von Impfstoffen verschiedener Herstellungsart gefunden wurde (Tab. 14).

Aus der Gleichung $SE/ccm = K \cdot \sqrt{L_f/ccm}$ ergibt sich durch einfache Umformung (Division durch L_f/ccm) die Beziehung

$$SE/L_f = \frac{K}{\sqrt{L_f/ccm}}$$

Diese Formulierung führt zu den folgenden Ueberlegungen:

1. Für zwei Impfstoffe, bei denen die Werte für K gleich, für L_f/ccm jedoch verschieden sind, ergibt sich, daß der Quotient SE/L_f, also der „Immunisierungswert von 1 Flockungseinheit" bei demjenigen Impfstoff kleiner ist, der den höheren L_f/ccm-Wert aufweist.

2. Wenn ein Impfstoff verdünnt wird, nehmen SE/ccm und L_f/ccm proportional ab[1]); der Wert des Quotienten $\frac{SE/ccm}{L_f/ccm} = SE/L_f$ bleibt also unverändert, während K entsprechend der Veränderung von L_f/ccm abnimmt. Bei dem durch Verdünnung

1) Es hat sich keinerlei experimenteller Anhalt dafür gefunden, daß das Immunisierungsvermögen einer Impfstoffmenge durch Verdünnung mit indifferenten Flüssigkeiten (physiol. NaCl-Lösung) irgendwie verändert würde; auch Einengung bis zur völligen Trocknung und nachfolgende Wiederauflösung ist ohne erkennbaren Einfluß.

hergestellten Impfstoff findet man somit für den Quotienten SE/L_f einen kleineren Wert als bei einem nicht verdünnten Impfstoff gleichen L_f/ccm-Wertes.

Tabelle 14.

Impfstoff	K[1])	Flockungseinheiten pro ccm	Schutzeinheiten pro ccm	
			berechnet	gefunden[2])
F 72	$\frac{1}{\sqrt{8,7}} = 0,34$	3	0,6	0,4
F 47	„	8,7	1,0	1,0
L 31	„	11	1,1	1,0
B 1	„	13	1,2	0,9
B 4	„	16,5	1,4	0,8
B 2	„	19	1,5	2,1
F 89	„	42	2,2	2,0
B 8	$\frac{1}{\sqrt{134}} = 0,086$	14	0,32	0,21
B 6	„	14	0,32	0,33
B 5	„	16	0,35	0,4
B 7	„	20,5	0,39	0,51

3. Da anzunehmen ist, daß Impfstoffe gleicher Herstellungsart hinsichtlich ihres Gehaltes an unspezifischen, das Immunisierungsvermögen des spezifischen Antigens beeinflussenden Substanzen ziemlich übereinstimmen, dürfte die auf 1 L_f entfallende Menge an unspezifischer Substanz um so geringer sein, je mehr Flockungseinheiten im Kubikzentimeter enthalten sind. Die auf 1 L_f entfallende Menge an unspezifischer Substanz wäre auch in einem durch Verdünnung hergestellten Impfstoff kleiner als in einem unverdünnten Impfstoff gleichen L_f/ccm-Wertes. Man darf also vermuten, daß der Wert des Koeffizienten K bzw. des Quotienten SE/L_f neben anderem von der Konzentration bzw. von der auf 1 Flockungseinheit entfallenden Menge der erwähnten unspezifischen Substanzen abhängig sind.

Für die Richtigkeit dieser Vermutung spricht, daß es gelungen ist, den Immunisierungswert eines Formoltoxoids durch Zusatz des durch Sättigung mit Natriumsulfat gewonnenen Präzipitats von Leerbouillon (Pope-Bouillon) erheblich zu steigern. Es gelang so, aus Formoltoxoiden mit einem Flockungswert von rund 50 L_f/ccm, bei denen für den Quotienten SE/L_f nur ein verhältnismäßig niedriger Wert (etwa $^1/_{20}$) zu erwarten war, ein Trockenpräparat (F 191) herzustellen, bei dem SE/L_f = $^1/_{3,8}$[3]) war, also etwa das Fünffache der Wertes betrug,

1) Der Unterschied zwischen den beiden Impfstoffgruppen beruht nach Auskunft der Hersteller auf dem verschiedenen Phenolgehalt.

2) Alle Abweichungen vom berechneten Wert liegen innerhalb der Fehlergrenzen der Wertbestimmungsmethode; vgl. die nachfolgende Arbeit.

3) Eine Lösung von 1,9 mg/ccm dieses Präparates (1 mg = 2 L_f) enthält 3,8 L_f/ccm und 1 SE/ccm. Der Koeffizient K, der bei dieser Lösung den Wert $\frac{1}{\sqrt{3,8}} = 0,51$ hat, ändert sich mit der Konzentration des Trockenpräparates. Z. B. wird K für eine 0,95 mg/ccm (1,9 L_f/ccm) enthaltende Lösung $\frac{1}{\sqrt{7,6}} = 0,36$. Der Quotient SE/$L_f$ behält dagegen, unabhängig von der Verdünnung, den Wert 1/3,8 (proportionale Veränderung von K und $\sqrt{L_f/ccm}$!)

den man ohne den Zusatz erwarten konnte. Bei einer Ausbeute von 60 Proz. der vorhandenen Flockungseinheiten[1]) wurden somit aus jedem Kubikzentimeter Rohmaterial an Stelle von 1,5 SE etwa 8 SE gewonnen.

Die mitgeteilten, mit leicht löslichen Bouillonpräzipitaten erzielten Ergebnisse lassen es als fraglich erscheinen, ob die durch Kali-Alaun, Aluminiumhydroxyd, Tapioka usw. erzielbare Steigerung des Immunisierungswertes der Diphtherieimpfstoffe lediglich durch die resorptionsverzögernde Wirkung dieser Zusätze erzielt wird. Umgekehrt kann wohl auch die schlechte Wirksamkeit der gereinigten Formoltoxoide, in denen die Konzentration der unspezifischen Begleitstoffe beträchtlich reduziert ist, nicht nur durch Resorptionserleichterung erklärt werden, zumal ein sehr erheblicher Unterschied in der Resorbierbarkeit zwischen Rohtoxoiden und gereinigten Präparaten kaum bestehen dürfte.

VI.

Da die statistische Auswertung des experimentellen Materials und die Meßgenauigkeit der neu entwickelten Methode zur Wertbestimmung von Diphtherieimpfstoffen in der nachfolgenden Arbeit eingehender behandelt werden, genügt es, im vorliegenden Zusammenhang einige Fragen von prinzipieller Bedeutung kurz zu erörtern.

1. Eine Verbesserung der bis jetzt erreichten Meßgenauigkeit wird voraussichtlich durch Verwendung besonderen Tiermaterials zu erreichen sein. Zu allen Untersuchungen über Diphtherieimmunität, die in den verschiedenen Laboratorien durchgeführt worden sind, ist bisher Tiermaterial verwandt worden, welches in genetischer Hinsicht mehr oder weniger inhomogen war. Infolgedessen war man gezwungen, Tiere zu verwenden, deren Immunisierbarkeit außerordentlich verschieden war: auf der einen Seite kamen Tiere in den Versuch, die schon mit extrem kleinen Antigenmengen gegen eine bestimmte Toxindosis geschützt werden konnten, während bei anderen Tieren extrem hohe Antigenmengen zur Erreichung des gleichen Zweckes nötig waren. Ein Fortschritt wird sich hier erst erzielen lassen, wenn es sich ermöglichen läßt, alle Untersuchungen mit sogenannten „reinen Linien", also mit Inzuchttieren durchzuführen. Man hat hierdurch den Vorteil, daß nur solche Meerschweinchen verwandt zu werden brauchen, die hinsichtlich ihrer Immunisierbarkeit größere Gleichförmigkeit aufweisen; dies kommt darin zum Ausdruck, daß der Unterschied zwischen den Antigenmengen, die zur Immunisierung der am besten und der am schwächsten reagierenden Tiere nötig sind, geringer wird. Im Gange befindliche Untersuchungen sprechen dafür, daß die Wirkungskurven, deren ungewöhnlich flacher Verlauf (s. Tab. 8) besonders hohe Anforderungen an die Genauigkeit stellt, mit der der Prozentsatz

1) Die zur Herstellung von F 191 verwandten Rohtoxoide waren vor der Trocknung ebenfalls mit Natriumsulfat präzipitiert worden.

der geschützten Tiere in jedem Versuch bestimmt wird, bei Verwendung von Inzuchttieren in der Tat wesentlich steiler werden. Man gewinnt so die Möglichkeit, bei gleichbleibender Tierzahl die Meßgenauigkeit erheblich steigern oder bei wesentlich herabgesetzter Tierzahl die bisherige Meßgenauigkeit erzielen zu können. Aus Versuchen, die Madsen, Schmidt u. Jensen (12) veröffentlicht haben, darf entnommen werden, daß wahrscheinlich auch Kaninchen steilere Kurven geben als Meerschweinchen.

Es hat sich nämlich gezeigt, daß die beiden Impfstoffe L 31 und F 47, deren Wirksamkeit bei der in Frankfurt vorgenommenen Prüfung an Meerschweinchen nur wenig verschieden war, in Kopenhagen bei der Prüfung an Kaninchen größere Unterschiede aufwiesen. Diese Divergenzen dürften sich auf die angedeutete einfache Weise erklären lassen.

Während bei der Wertbestimmung der Antitoxine eine erhöhte Steilheit der Wirkungskurven durch Veränderung der äußeren Versuchsbedingungen erzielt werden kann (Blake u. Okell), scheint es derartige Möglichkeiten bei der Wertbemessung von Antigenen nicht zu geben.

2. Während die zur Wertbestimmung der Diphtherieimpfstoffe verwandten Tiere so ausgewählt werden können, daß sie bei der Immunisierung gleiches Gewicht haben, nehmen sie während der bis zur Vornahme der Intoxikation verstreichenden Zeit in recht verschiedener Weise zu. Man hatte nun die Wahl, allen Tieren trotz der Verschiedenheit der Gewichtszunahme die gleiche Toxinmenge zu injizieren oder die Toxindosis nach dem Körpergewicht abzustufen. In allen hier besprochenen Versuchen wurde der letztere Weg gewählt und eine dem Körpergewicht proportionale Toxindosis eingespritzt. Wenn sich die Immunität unabhängig von der Gewichtszunahme entwickelte, müßte man bei den schwereren, mit größeren Toxinmengen geprüften Tieren eine höhere Sterblichkeit feststellen als bei den leichteren Tieren. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es wurde vielmehr regelmäßig festgestellt, daß die Sterblichkeit bei den schwereren Tieren trotz der höheren Toxindosis etwas geringer war als bei den leichteren Tieren. Es wäre also falsch gewesen, allen Tieren ohne Rücksicht auf ihre Gewichtszunahme die gleiche Toxinmenge zu injizieren.

3. Mit besonderer Sorgfalt wurden die Tiere stets auf die einzelnen Versuchsserien verteilt. Es sollte unter allen Umständen vermieden werden, daß Tiere, zwischen denen ein näherer genetischer Zusammenhang bestehen konnte, geschlossen in ein und dieselbe Versuchsreihe hineingelangten. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Mischung wurden die am Versuchstag zur Verfügung stehenden Meerschweinchen, dem Gewicht nach getrennt, zunächst in drei großen Laufkästen untergebracht, im ersten die Tiere von 240 ± 5 g, im zweiten die Tiere von 250 ± 5 g und im dritten die Tiere von 260 ± 5 g. Aus den Laufkästen, in denen sich die Tiere frei durcheinander bewegten, wurden die Meerschweinchen nach dem Zufall herausgefangen und so auf die Einzelserien (je 25 Tiere) verteilt, daß das Verhältnis der drei Gewichtsklassen in allen Serien das gleiche war. Hierbei

wurde so vorgegangen, daß immer erst eine Serie komplettiert wurde, bevor mit der Auswahl der für die folgende Serie bestimmten Tiere begonnen wurde. Diese Verteilungsweise wurde auch dann noch beibehalten, als größere Serien (125 Tiere) zu den Versuchen verwandt wurden; diese Hauptserien bestanden also jeweils aus fünf gleichartigen Unterserien von 25 Tieren.

Erst in den späteren Versuchen (Tab. 13) wurde die Verteilung so gehandhabt, daß eine Einteilung in 25er Serien nicht mehr stattfand, sondern nur noch die Hauptserien (125 Tiere) berücksichtigt wurden; diese mußten hinsichtlich des Verhältnisses der Gewichtsklassen selbstverständlich übereinstimmen. Auf Grund von statistischen Erwägungen, die in der nachfolgenden Arbeit besprochen werden, wurde aber noch eine zweite Aenderung durchgeführt. Die Tiere wurden so verteilt, daß immer eine Serie nach der anderen je ein Tier erhielt und daß auch die Reihenfolge der Zuteilung jedesmal wieder umgekehrt wurde, wenn alle Serien um ein Tier vermehrt waren.

4. Zum ersten Male ist es jetzt gelungen, die Wertbestimmung und Standardisierung eines Antigens nach den exakten Prinzipien durchzuführen, die für die Messung von Antikörpern, insbesondere Antitoxinen seit 35 Jahren maßgebend sind. Eine neue Gruppe von biologisch wirksamen Stoffen ist damit der objektiven Messung zugänglich gemacht worden. Von grundsätzlicher Bedeutung ist es daher, sich klarzumachen, was das eigentliche Ziel ist, das bei der Wertbemessung der Diphtherieantigene verfolgt wird. Wie schon der Ausdruck „Wertbemessung" anzeigt, genügt es nicht, die in den verschiedenen Impfstoffen enthaltenen „Mengen" des spezifischen Substrates quantitativ zu bestimmen. Die Ramonsche Flockung würde diese Aufgabe in den meisten Fällen viel leichter lösen als der Tierversuch. Aber wie oben gezeigt wurde, können gleiche Mengen von Flockungseinheiten, also gleiche Substratmengen außerordentlich verschieden wirken. Gleiche Substratmengen können somit ganz differente Antigenmengen repräsentieren! Es kommt also darauf an, über den „Zustand" der Impfstoffe, und zwar über ihre antigene Wirksamkeit bestimmte Aussagen zu machen. Was der Arzt benötigt, ist ein Werturteil über die Impfstoffe, und zwar über ihre Fähigkeit, Immunität zu erzeugen. Aufgabe der biologischen Standardisierung muß es sein, die Grundlage für derartige Werturteile zu schaffen und einen zahlenmäßigen Ausdruck für sie zu finden. Deshalb ist auch jeder Streit, ob die Flockungsmethode oder der Tierversuch das bessere Verfahren zur Standardisierung der Diphtherieimpfstoffe sei, gänzlich sinnlos. Denn beide Methoden messen etwas ganz verschiedenes; die Flockung mißt ein Substrat, der Tierversuch mißt eine Eigenschaft.

Die „Fähigkeit, Immunität zu erzeugen", soll also durch den Tierversuch ermittelt werden. „Immunität" bedeutet im vorliegenden

Zusammenhang nichts anderes als das durch Antigeneinverleibung erworbene Vermögen der Tiere, mit dem Gift des Diphtheriebazillus fertig zu werden. Um über die Impfstoffe etwas aussagen zu können, ist es daher notwendig, die durch sie erzeugte Immunität zu messen und den gemessenen Immunitätsgrad in Relation zur Impfstoffdosis zu bringen. Da die einzelnen Individuen auf gleiche Antigendosen außerordentlich verschieden reagieren, war es nötig, das Verhalten von Tierkollektiven zum Ausgangspunkt für alle Untersuchungen zu wählen und aus den Unterschieden in dem Verhalten von gleichartigen Tierkollektiven die Unterschiede zwischen den zu ihrer Immunisierung angewandten Impfstoffen zu ergründen.

Wenn man etwas über das Vermögen eines Tieres, mit Gift fertig zu werden, zu erfahren wünscht, so bedeutet dies selbstverständlich nichts anderes, als daß man die Reaktion des Gesamtorganismus kennen lernen will. Es ist aber nicht erlaubt, das Gift-Neutralisierungsvermögen einzelner Organe, z. B. des Blutes oder der Haut, zu prüfen und die gefundenen Werte als Maß für die Gesamtimmunität, d. h. für die Reaktionsfähigkeit des lebenden Organismus zu verwenden. Ein solches Verfahren wäre nur dann statthaft, wenn der Nachweis gelänge, daß ein strenger Parallelismus zwischen der Immunität des gesamten Organismus und bestimmter Organe besteht. Der Beweis hierfür ist in befriedigender Weise bisher nicht erbracht worden. Die bisher festgestellten Tatsachen sprechen sogar mehr gegen als für die Zulässigkeit einer solchen Annahme. So geht aus Untersuchungen von Hartley (11) hervor, daß die Giftfestigkeit der Haut nur im groben Durchschnitt mit dem Antitoxingehalt des Blutes zunimmt. Offenbar ist sie aber noch von anderen Faktoren abhängig: z. B. schwankte bei Tieren, deren Serum 0,02 AE/ccm enthielt, die von der Haut neutralisierte Giftmenge zwischen 2 und 25 Schickdosen, also um mindestens 1000 Proz. Von einem „Parallelismus" der Immunitätsreaktionen kann also nicht die Rede sein. Daß auch die Gesamtimmunität des Organismus vom Antitoxintiter weitgehend beeinflußt wird, unterliegt selbstverständlich gar keinem Zweifel. Aber die Annahme eines strengen Parallelismus könnte doch erst dann gemacht werden, wenn die nach Vergiftung mit Diphtherietoxin sterbenden und überlebenden Tiere durch einen scharfen Grenzwert des Antitoxintiters geschieden wären. Jedoch ist der experimentelle Nachweis hierfür noch keineswegs gelungen. Es darf auch nicht außer acht gelassen werden, daß der Antitoxintiter von immunisierten Individuen rasch wieder absinkt, während die Immunität des Gesamtorganismus lange Zeit erhalten bleibt. Bevor eine eindeutige Klärung der aufgeworfenen Fragen erfolgt ist, ist es jedenfalls nicht statthaft, einen vollen Parallelismus zwischen Organimmunität und Gesamtimmunität zu unterstellen.

Selbstverständlich darf aus diesen Feststellungen nicht der Schluß gezogen werden, als sei eine Standardisierung der

Diphtherieantigene nicht auch möglich, indem man die bei Versuchstieren infolge der Immunisierung gebildeten Antitoxinmengen mißt.

Es war in Kopenhagen aufgefallen, daß die mit dem Impfstoff F 47 immunisierten Tiere mehr Antitoxin gebildet hatten, als die mit L 31 vorbehandelten Individuen. Da andererseits der Schutzwert der beiden Impfstoffe in Frankfurt zunächst ungefähr gleich groß zu sein schien, konnte der Anschein entstehen, als ob das Vermögen, die Antitoxinbildung anzuregen und die Widerstandsfähigkeit der Körperzellen gegen das Toxin zu steigern, getrennte Funktionen der Impfstoffe darstellten.

Man hätte hiernach dem Impfstoff L 31 stärkere zelluläre, dem Impfstoff F 47 stärkere humorale Wirkungen zuschreiben und annehmen müssen, daß beide Wirkungen im Gesamtergebnis zum Ausgleich gekommen wären. Es wäre so zu verstehen gewesen, warum der Schutzwert der beiden Impfstoffe trotz des Unterschiedes in ihrem Antitoxinbildungsvermögen der gleiche gewesen wäre. Nachdem aber jetzt festgestellt ist, daß sich die beiden Impfstoffe[1]) hinsichtlich ihres Schutzvermögens wie 4 : 5 verhalten (s. Tabelle 11, S. 26), darf erwartet werden, daß sich kein Anlaß finden wird, solche komplizierten Hilfsvorstellungen zur Erklärung der beobachteten Tatsachen heranzuziehen und an der Identität der zellulären und humoralen Wirkungsfähigkeit der Diphtherieantigene zu zweifeln.

Damit ist aber nicht gesagt, daß auch bei allen Tieren das Verhältnis der humoralen und der zellulären Reaktion immer das gleiche sein müßte. Wie bereits dargelegt wurde, sprechen im Gegenteil manche Gründe für die Annahme, daß zwischen dem Antitoxintiter und der Gesamtimmunität schutzgeimpfter Individuen kein strenger Parallelismus, sondern nur eine Korrelation besteht. Unter der Voraussetzung, daß die zellulären und humoralen Reaktionen tatsächlich durch eine einheitliche äußere Ursache ausgelöst werden, dürfte es aber trotzdem möglich sein, eine Standardisierung der Diphtherieimpfstoffe auch auf Grund des Antitoxinnachweises bei den immunisierten Tieren durchzuführen und hierbei im Prinzip die gleichen Ergebnisse zu gewinnen, wie durch Prüfung der Gesamtimmunität. Nur ist es unerläßlich, zunächst die Relation zwischen verschiedenen Dosen des gleichen Impfstoffes und den zugehörigen mittleren Antitoxinwerten zu ermitteln, bevor ein für Messungen brauchbarer Vergleich zwischen verschiedenen Impfstoffen möglich wird. Es müßten also für diese Methode Wirkungskurven geschaffen werden, die für jeden Punkt den Antigenwert (Abszisse) und den zugehörigen mittleren Antitoxintiter (Ordinate) angeben. Dabei ist zu berücksichtigen, daß derartige Kurven nicht als Aufzählungskurven[2]) gedeutet werden könnten!

Prinzipiell neue Möglichkeiten für die Wertbemessung der Impfstoffe ergeben sich aus diesem Verfahren jedoch nicht. Das geht aus folgenden

1) auf L_f berechnet!
2) vgl. S. 18.

Ueberlegungen hervor. Zur Erzielung einer Immunität gegen eine bestimmte Toxinmenge, z. B. gegen 12 sicher tödliche Dosen, benötigt man bei manchen Individuen sehr kleine Antigenmengen, bei anderen Tieren etwas größere, wieder bei anderen sind mittlere, große, sehr große Dosen erforderlich. Hierin drücken sich die Unterschiede in der „Immunisierbarkeit“ der Tiere aus. Bei der Intoxikation mit der erwähnten Giftmenge kommt es nur darauf an, ein Tierkollektiv, dessen Individuen sämtlich mit der gleichen Antigendosis vorbehandelt sind, in zwei große Klassen einzuteilen. Die Tiere, welche gegen die injizierte Toxindosis durch die tatsächlich angewandte Antigenmenge oder durch kleinere Mengen hätten immunisiert werden können, bleiben am Leben. Die Tiere, deren Immunisierung mehr als die angewandte Antigenmenge erforderlich gemacht haben würde, gehen zugrunde. Unterschiede im Prozentsatz der geschützten Tiere, d. h. Unterschiede im Verhalten gleichartiger Tierkollektive, zeigen also Unterschiede in der angewandten Antigenmenge an. Bei der Intoxikation der immunisierten Tiere bleibt der Immunitätsgrad des einzelnen Individuums zwar unberücksichtigt; jedoch kommt es hierauf auch gar nicht an, wenn es sich darum handelt, Unterschiede zwischen den Impfstoffen nachzuweisen. Denn nicht die individuellen Unterschiede im Verhalten der ein Kollektiv zusammensetzenden, gleichartig behandelten Einzeltiere, sondern die Unterschiede im Verhalten von gleichartigen Tierkollektiven machen die Unterschiede zwischen den verschiedenen zu ihrer Immunisierung verwandten Antigenen erkennbar.

Feststellungen über den immunbiologischen Zustand einzelner Organe, vor allem des Blutes, bieten von vornherein die Möglichkeit, Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen zu studieren. Selbstverständlich beanspruchen derartige Studien über die Verschiedenheit des individuellen Immunitätsgrades der Tiere größtes biologisches Interesse. Untersuchungen über die Verschiedenheit der Impfstoffe und über deren Wertbemessung verfolgen aber ein prinzipiell ganz anderes Ziel.

Diesem Ziel kann man durch die Analyse der individuellen Unterschiede nicht wesentlich näher kommen. Das Studium der individuellen Unterschiede würde lediglich eine Einteilung der Versuchstiere in kleinere Klassen ermöglichen. Dagegen müssen die Werte, die sich in jedem der mit verschiedenen Antigendosen immunisierten Kollektive vorfinden, erst wieder zusammengefaßt werden, wenn die Wirksamkeit der Antigendosen verglichen werden soll! Auf diese Weise ergibt sich also für jedes Kollektiv doch nur ein einziger für die Antigenmessung verwendbarer Wert, genau wie bei der Einteilung in zwei Klassen! Es wäre also lediglich zu erwägen, ob sich Vorteile für den Fehlerausgleich ergeben, wenn man den Immunitätsgrad der Einzeltiere ermittelt und die so gefundenen Werte zusammenfaßt oder wenn man die Möglichkeit aus-

nützt, die „Einteilung in zwei Klassen“ mehrmals durchzuführen, d. h. den Prozentsatz immunisierter Tiere nicht nur mit Bezug auf einen, sondern auf mehrere Immunitätsgrade zu ermitteln und den Vergleich zwischen den verschiedenen Antigendosen mehrmals durchzuführen.

5. Ein für die Analyse der Immunitätsvorgänge wichtiges Phänomen soll in diesem Zusammenhang noch kurz gestreift werden. Als „einfach tödliche Dosis“ bezeichnet man nach Ehrlich die kleinste Giftmenge, welche normale (d. h. nicht immunisierte) Meerschweinchen von 250 g Gewicht bei subkutaner Injektion mit Sicherheit innerhalb der ersten 5 Tage nach der Injektion tötet[1]). Diese Dosis tötet also „100 Prozent“ der Tiere; sie wird daher nach dem Vorschlag von Trevan auch als „dl_{100}“ bezeichnet. Die Absterbezeit beträgt bei den mit dieser Dosis vergifteten Tieren 36—120 Stunden (Ehrlich, 10). Größere Giftdosen führen noch früher zum Tod; z. B. tötet eine Toxinmenge von 12 dl_{100} sämtliche Tiere nach 12—30 Stunden, und zwar die überwiegende Mehrzahl von ihnen 18—24 Stunden nach der Vergiftung. Nach Injektion eines Bruchteiles der dl_{100}, z. B. einer nur für 75 Proz. der Tiere tödlichen Dosis („dl_{75}“) bleiben 25 Proz. der Tiere über den für alle Berechnungen maßgebenden Stichtag, also über den 5. Tag hinaus am Leben. Aber alle diese Tiere sind stark geschädigt; sie zeigen nicht nur schwere örtliche und allgemeine Krankheitserscheinungen, sondern gehen auch nach und nach zugrunde. Der Krankheitsverlauf ist bei den einzelnen Tieren symptomatisch und zeitlich zwar sehr verschieden, zeigt aber dem auf diesem Gebiet erfahrenen Experimentator im ganzen ein charakteristisches Bild; dabei verteilen sich die Sterbezeiten über 4, in manchen Fällen sogar über 5, höchstens 6 Wochen (Prigge, 16). Auch nach Injektion noch kleinerer Dosen, bis herab zur „dl_{50}“ kommt es nur außerordentlich selten vor, daß ein Tier wieder ganz gesund wird und „definitiv“ am Leben bleibt. Der Anteil der definitiv überlebenden Tiere nimmt erst zu, wenn die Giftdosis unter dem erwähnten Wert liegt, z. B. nach Vergiftung mit einer dl_{25}; aber schwerere oder leichtere, zumindest örtliche Erkrankungen machen auch die überlebenden Tiere immer durch. Erst Giftmengen, welche kleiner als die dl_0 sind, also kein Tier mehr vor Ablauf des 5. Tages zu töten vermögen, sind für eine bestimmte Anzahl von Individuen unwirksam (Prigge, 16). Aus all dem geht hervor, daß die unter natürlichen Verhältnissen bestehenden Resistenzunterschiede ein im großen und ganzen noch recht ähnliches Verhalten der Tiere bedingen. Es kommt nicht vor, daß in einer und derselben Versuchsserie manche Tiere sehr früh sterben und andere überhaupt nicht geschädigt werden. Und in Kollektiven, die mit einer zwischen der dl_{100} und der dl_0 gelegenen Toxindosis vergiftet sind, in denen also der eine Teil der Tiere vor dem Ende des Stichtages stirbt, während der andere Teil diesen Zeitpunkt überlebt, wird weder

1) Diese Dosis wird häufig auch als „sicher tödliche Dosis“ bezeichnet.

das eine noch das andere beobachtet: hier fehlen also beide Extreme, und es kommt nur eine mittlere Skala der Reaktionen zur Beobachtung.

Ganz anders liegen die Dinge bei immunisierten Tieren. Mit der größten Regelmäßigkeit hat sich bei monatelanger Beobachtung der einzelnen Versuchsserien immer wieder gezeigt, daß von den Individuen, welche das Ende des Stichtages überlebten, ein recht großer Anteil „definitiv“ gerettet war — ja, viele Tiere wurden nicht einmal krank oder zeigten sogar keine Veränderungen an der Injektionsstelle des Giftes! Dieses Verhalten ist auch dann zu beobachten, wenn nur ein kleiner Anteil der Tiere — 25 Proz. oder weniger — den Stichtag überlebt. Selbstverständlich werden auch bei immunisierten und vergifteten Tieren chronisch verlaufende Krankheitsfälle und Spättode beobachtet, aber viel seltener als bei den nicht immunisierten Tieren. Dagegen sind frühe Tode, 18—36 Stunden nach der Injektion, wieder sehr häufig. In vielen Fällen entscheidet sich das Schicksal der Tiere innerhalb der ersten beiden Tage: viele Tiere, die dann nicht gestorben sind, kommen ganz durch.

Man kann sich diese Verhältnisse in schematischer Weise erklären, wenn man sich vorstellt, daß die verschiedenen Tiere je nach ihrem Immunitätsgrad kleinere oder größere Bruchteile der injizierten Toxindosis zu entgiften vermögen und daß die Tiere eines bestimmten Immunitätsgrades auf den nichtentgifteten Rest entsprechend ihrer natürlichen Toxinresistenz reagieren. Demgemäß verteilen sich die Absterbezeiten der Individuen, die sich am schlechtesten immunisiert haben, ungefähr über den gleichen Zeitraum wie die Absterbezeiten von normalen (d. h. nicht mit Antigen vorbehandelten) Tieren, welche mit der zur Immunitätsprüfung benützten Toxindosis, z. B. bei Verwendung des Giftes T 172 mit 1,8 mg = 12 dl_{100} vergiftet werden; derartige Tiere sterben also innerhalb der ersten 30 Stunden. Erst bei Tieren, die besser immunisiert sind, verlängern sich die Absterbezeiten. Tiere, welche die Prüfungsdosis soweit zu entgiften vermögen, daß gerade 1 dl_{100} zur Wirkung gelangt, werden also 36—120 Stunden nach der Vergiftung zugrunde gehen. Bei Tieren, welche noch höhere Immunitätsgrade besitzen, kommen noch kleinere Mengen (z. B. die dl_{50}, dl_{25} usw.), schließlich bei den am besten immunisierten Tieren nur solche Dosen, welche unter der dl_0 liegen, zur Wirkung. Viele von diesen Tieren sind „definitiv“ gerettet oder bleiben sogar vor Erkrankung geschützt. Es ist also ohne weiteres verständlich, warum der Sterbetypus, welcher bei normalen, mit einer zwischen der dl_{100} und der dl_0 gelegenen Dosis vergifteten Tieren die Regel ist, bei immunisierten Tieren verhältnismäßig selten zur Beobachtung gelangt und warum hier gerade die extremen Fälle, Frühtod und völliges Gesundbleiben, so häufig sind. Die Skala der Reaktionen, die sich bei normalen (nichtimmunisierten) Tieren z. B. nach Injektion einer dl_{50} ergeben, läßt sich nicht mit der Skala der Reaktionen vergleichen, die bei einem immunisierten Kollektiv beobachtet werden, in welchem 50 Proz. der Tiere über das Ende des

Stichtages hinaus am Leben bleiben. Der Reaktionstypus, der im ersten Fall im Vordergrund steht, beherrscht im zweiten Fall nur einen gewissen mittleren Teil der Skala und tritt dementsprechend nicht mehr auffällig in Erscheinung.

VII.

Für die staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe gilt erstens der Grundsatz, daß sie genügend entgiftet sein müssen. Dies wird festgestellt, indem Meerschweinchen das Fünffache der Höchstgebrauchsdosis injiziert wird. Die Tiere müssen dauernd frei von Lähmungen bleiben und müssen 8 Wochen beobachtet werden; denn Spätlähmungen, die das Vorhandensein kleiner Giftreste in den Impfstoffen beweisen, treten bisweilen erst nach Verlauf mehrerer Wochen auf. Impfstoffe, die in der genannten Dosis bei Tieren noch Lähmungen hervorrufen, werden unter allen Umständen zurückgewiesen. Die Impfstoffe müssen ferner steril sein. Und endlich müssen sie in bezug auf ihre Immunisierungskraft mindestens dem Standardpräparat[1]) entsprechen bzw. 1 Schutzeinheit im Kubikzentimeter enthalten.

Wie eben angedeutet wurde, muß von jedem Impfstoff das Fünffache der Menge, welche als Höchstgebrauchsdosis beim Menschen Anwendung finden darf, von Meerschweinchen ohne Schädigungen vertragen werden. Allerdings sehen die Prüfungsvorschriften vor, daß nur solche Impfstoffe zum Verbrauch zugelassen werden, von denen mindestens 5 ccm für Meerschweinchen verträglich sind. Es ergibt sich hieraus, daß nur Impfstoffe zugelassen werden, von denen dem Menschen mindestens 1 ccm eingespritzt werden kann. Andererseits müssen die Diphtherieimpfstoffe hinsichtlich ihrer Immunisierungskraft wenigstens den gleichen Wert wie das Standardpräparat besitzen; d. h. die Menge, welche das Aequivalent von 1 Schutzeinheit darstellt, darf höchstens 1 ccm betragen. Durch die Erfüllung dieser beiden Forderungen ist gleichzeitig ein bestimmter Mindestwert für den „immunisatorischen Index“ der in den Handel kommenden Impfstoffe festgelegt.

Als „immunisatorischer Index“ soll der Quotient bezeichnet werden, der sich ergibt, wenn die Höchstgebrauchsdosis durch das Aequivalent von 1 Schutzeinheit dividiert wird. Für einen Impfstoff A, der in Dosen von 5 ccm für Meerschweinchen unschädlich ist und der in 1 ccm 1 Schutzeinheit enthält, ergibt sich

$$\frac{\text{Höchstgebrauchsdosis}}{\text{Aequivalent von 1 Schutzeinheit}} = \frac{1}{1} = 1.$$

Der immunisatorische Index eines Diphtherieimpfstoffes steigt nun einerseits, wenn er in größeren Dosen als 5 ccm von Meerschweinchen vertragen wird, andererseits, wenn er mehr als 1 Schutzeinheit in 1 ccm enthält. Dies möge am Beispiel von drei Impfstoffen B, C und D erläutert werden.

1) Das seit 1934 im Gebrauch befindliche Standardpräparat F 191 wird zur Durchführung der Prüfungen so gelöst, daß auf 1 ccm 1,9 mg = 1 SE entfallen.

Impfstoff B: Dosis tolerata für Meerschweinchen: 5 ccm; Höchstgebrauchsdosis für den Menschen: 1 ccm; Schutzeinheiten in 1 ccm: 2; Aequivalent von 1 Schutzeinheit: 0,5 ccm.

Impfstoff C: Dosis tolerata für Meerschweinchen: 7,5 ccm; Höchstgebrauchsdosis für den Menschen: 1,5 ccm; Schutzeinheiten in 1 ccm: 1; Aequivalent von 1 Schutzeinheit: 1 ccm.

Impfstoff D: Dosis tolerata für Meerschweinchen: 7,5 ccm; Höchstgebrauchsdosis für den Menschen: 1,5 ccm; Schutzeinheiten in 1 ccm: 2; Aequivalent von 1 Schutzeinheit: 0,5 ccm.

Für den Impfstoff B ergibt sich:

$$\frac{\text{Höchstgebrauchsdosis}}{\text{Aequivalent von 1 Schutzeinheit}} = \frac{1}{0{,}5} = 2.$$

Für den Impfstoff C ergibt sich:

$$\frac{\text{Höchstgebrauchsdosis}}{\text{Aequivalent von 1 Schutzeinheit}} = \frac{1{,}5}{1} = 1{,}5.$$

Für den Impfstoff D ergibt sich:

$$\frac{\text{Höchstgebrauchsdosis}}{\text{Aequivalent von 1 Schutzeinheit}} = \frac{1{,}5}{0{,}5} = 3.$$

Impfstoffe, von denen weniger als 5 ccm vertragen werden oder die das Aequivalent von 1 Schutzeinheit in höheren Dosen als 1 ccm enthalten, d. h. Impfstoffe mit einem immunisatorischen Index unter 1 sind durch die Prüfungsvorschriften von der Anwendung beim Menschen ausgeschlossen. Die Einhaltung eines Mindestwertes von 1 für den immunisatorischen Index gewährleistet die Möglichkeit, eine Mindestmenge Antigen (1 Schutzeinheit) einverleiben zu können, obwohl nicht mehr als der fünfte Teil der für Meerschweinchen sicher verträglichen Impfstoffdosis injiziert werden darf.

Man könnte vielleicht die Frage stellen, warum die Prüfungsvorschriften sich nicht darauf beschränken, einen Mindestwert für den immunisatorischen Index vorzuschreiben, sondern auch gewisse Grenzwerte für Ungiftigkeit und Wirksamkeit fordern. Für einen Impfstoff E, der nur in Dosen von 2,5 ccm von Meerschweinchen vertragen wird, aber 2 Schutzeinheiten im Kubikzentimeter enthält, und für einen anderen Impfstoff F, der in Dosen von 10 ccm vertragen wird, aber nur ½ Schutzeinheit im Kubikzentimeter enthält, ergäbe sich ja gleichfalls ein immunisatorischer Index von 1 wie für den Impfstoff A. Die tatsächlich getroffene Regelung hat demgegenüber jedoch erhebliche Vorteile. Einerseits ist dafür gesorgt, daß man, um eine Mindestmenge Antigen (1 Schutzeinheit) einzuverleiben, in keinem Falle mehr als 1 ccm zu injizieren hat. Bei dem Impfstoff F würde dies nicht zutreffen, weil hier 2 ccm das Aequivalent von 1 Schutzeinheit darstellen. Andererseits wird verhindert, daß z. B. der Impfstoff E, der zwar 2 Schutzeinheiten im Kubikzentimeter enthält, aber nur in Dosen von 0,5 ccm angewendet

werden darf und infolgedessen dem Impfstoff A nicht überlegen ist, in den Handel gelangt; der höhere Antigengehalt eines solchen Impfstoffes könnte die irrtümliche Vorstellung begünstigen, daß er dem Impfstoff A überlegen ist. Darüber hinaus muß es aber auch als Vorteil gelten, daß alle in den Handel gelangenden Impfstoffe bis zu einer gewissen Dosis (1 ccm) angewandt werden können. Diese Grenzdosis darf zwar bei manchen Impfstoffen (z. B. C und D) überschritten werden; aber bei keinem Impfstoff ist es erforderlich, die Dosierung noch weiter einzuschränken, d. h. eine unter 1 ccm liegende Dosis als Grenze einzuhalten. Die praktische Anwendung der Impfstoffe wird hierdurch erleichtert und die Gefahr der unbeabsichtigten Ueberdosierung vermieden.

Anhang.

Staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe.

RdErl. d. MdI. v. 24. 10. 1934 — IIIa III 1971/34[1]).

(1) Die mit RdErl. d. MfV. v. 22. 7. 1927 — I M III 1977/27 (VMBl. S. 788) veröffentlichten „Prüfungsvorschriften für Diphtherie-Toxin-Antitoxingemische" behalten bis auf weiteres nur noch für die Prüfung des TAF ihre Gültigkeit. Im übrigen werden sie mit sofortiger Wirkung durch die nachstehend bekanntgegebenen „Vorschriften für die staatliche Prüfung der zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie dienenden Impfstoffe" ersetzt. Da noch weitere Untersuchungen im Gange sind, die unter Umständen in absehbarer Zeit eine Vereinfachung der Vorschriften gestatten und ihre Abänderung notwendig machen, erstreckt sich die Gültigkeit der neuen Vorschriften zunächst auf die Zeit bis Ende Oktober 1935.

(2) Ich ersuche, das Weitere zu veranlassen, insbesondere alle mit den Aufgaben von Medizinaluntersuchungsämtern betrauten medizinischen Institute durch Hinweis auf diese Veröffentlichung nebst Bezugsquelle in Kenntnis zu setzen.

An die Reg.-Präs., den Pol.-Präs. in Berlin, die staatl. Medizinaluntersuchungsämter sowie die mit deren Aufgaben betrauten medizinischen Institute und die Kreisärzte.

— MBliV. S. 1427.

Anlage.

Vorschriften für die staatliche Prüfung der zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie dienenden Impfstoffe.

§ 1.

Die zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie dienenden Impfstoffe unterliegen, bevor sie in den Handel gebracht werden, der staatlichen Prüfung im Staatlichen Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. Dieser staatlichen

1) Sonderabdrucke dieses RdErl. nebst Anlage können bei umgehender Bestellung von Carl Heymanns Verlag, Berlin W 8, Mauerstraße 44, bezogen werden. Sammelbestellungen erwünscht.

Prüfung hat eine Vorprüfung in der Herstellungsstätte vorauszugehen. Die Mindestmenge Diphtherieimpfstoff, welche zur Vorprüfung und zur Prüfung anzumelden ist, soll hundert Liter betragen; wenn kleinere Mengen zur Prüfung gestellt werden, sind die auf hundert Liter entfallenden Prüfungsgebühren zu entrichten.

Vorprüfung in der Herstellungsstätte.

§ 2.

Der Kontrollbeamte nimmt den zur Vorprüfung bestimmten mit einer Kontrollnummer versehenen Impfstoff gegen Quittung in Empfang und macht darüber in seinem Dienstbuch die nötigen Eintragungen. Vor Ausführung der Vorprüfung muß der Impfstoff mindestens während der Dauer von drei Monaten unter Verschluß des Kontrollbeamten bei Zimmertemperatur lagern.

§ 3.

Wird ein Impfstoff aus verschiedenen Einzelportionen in der Weise hergestellt, daß in mehreren Gefäßen gleichartig zusammengesetzte Mischungen bereitet werden, so muß der staatliche Kontrollbeamte die Herstellung der Mischungen überwachen und sich von ihrer völligen Uebereinstimmung überzeugen, wenn sie die gleiche Komtrollnummer erhalten sollen. Der Kontrollbeamte hat in diesem Falle die Operationsnummern der Einzelportionen in seinem Dienstbuch zu vermerken und über die Zusammensetzung der in seiner Gegenwart hergestellten Mischungen Aufzeichnungen zu machen. Wenn eine größere Impfstoffmenge in verschiedene Gefäße verteilt wird, muß die Verteilung ebenfalls unter der Aufsicht des staatlichen Kontrollbeamten erfolgen, falls die abgeteilten Mengen gleiche Kontrollnummer erhalten sollen. Der Kontrollbeamte hat Aufzeichnungen über die in seiner Gegenwart vorgenommene Verteilung zu machen.

§ 4.

Zur Ausführung der Vorprüfung sind Probemengen in Gegenwart des Kontrollbeamten aus den Originalbehältern zu entnehmen. Wird Impfstoff einer Kontrollnummer in verschiedenen Gefäßen aufbewahrt, so muß die Vorprüfung auf Proben aller Einzelgefäße ausgedehnt werden. Die Vorprüfung ist unmittelbar nach Entnahme der Probemengen und bei Anwesenheit des Kontrollbeamten in der Weise einzuleiten, daß 10 Meerschweinchen von 240—260 g Gewicht das Fünffache der größten Impfstoffmenge, die als Gebrauchsdosis in der Anwendungsvorschrift angegeben werden soll, mindestens aber eine Menge von 5 ccm subkutan injiziert wird. Die Nummern der Versuchstiere sind dem Kontrollbeamten sofort nach der Injektion bekanntzugeben.

§ 5.

Wenn der Impfstoff ohne stärkere Allgemeinschädigungen vertragen wird, so daß innerhalb von 8 Wochen keines der Versuchstiere durch die Wirkungen des Impfstoffes getötet wird und bei keinem von ihnen diphtherische Lähmungen beobachtet werden, kann die Gewinnungsstätte bei dem Kontrollbeamten die Einleitung der staatlichen Prüfung beantragen. Ueber die Vorprüfungen sind Aufzeichnungen zu führen, aus denen die Untersuchungsanordnung und das Ergebnis der Untersuchung zu erkennen ist. Die Aufzeichnungen sind dem staatlichen Kontrollbeamten nach Abschluß der Vorprüfung vorzulegen. Die Aufzeichnungen und die zur Vorprüfung verwandten Tiere sind dem Kontrollbeamten, dem von der Landesregierung mit der Ueberwachung der Herstellungsstätte beauftragten Medizinalbeamten oder dem Vertreter des Prüfungsinstitutes auf Verlangen jederzeit vorzulegen. Aus den Aufzeichnungen muß auch das Alter der zur Herstellung der Impfstoffe verwandten Gifte und Sera und das Ergebnis ihrer Auswertung ersichtlich sein. Proben der zur Herstellung der Impfstoffe benützten Gifte, Giftprodukte und Sera sind aufzubewahren und dem Prüfungsinstitut auf Anfordern einzusenden.

§ 6.

Der Zusatz von 0,5 v. H. Phenol oder 0,4 v. H. Trikresol oder weniger zu den Diphtherieimpfstoffen ist erlaubt. Ferner dürfen die zur Gewinnung von Formoltoxoiden bestimmten Diphtherietoxine mit 1,25 v. H. Formol (0,475 Volum-Prozent Formaldehyd entsprechend) oder weniger versetzt werden. Alle Zusätze müssen vor Uebergabe der Impfstoffmengen an den Kontrollbeamten erfolgt sein.

Einsendung zur staatlichen Prüfung.

§ 7.

Auf Antrag der Herstellungsstätte hat der Kontrollbeamte nach Abschluß der Vorprüfung die staatliche Prüfung der Impfstoffe einzuleiten.

§ 8.

Zur staatlichen Prüfung dürfen nur solche Präparate eingesandt werden, die nach Abschluß der Vorprüfung ohne Unterbrechung unter Verschluß des Kontrollbeamten geblieben sind.

§ 9.

Für die staatliche Prüfung sind von jedem Präparat

1. 10 Proben zu je 5 ccm
2. 3 Proben zu 150 ccm
3. 1 Probe zu 1000 ccm

in Gegenwart des Kontrollbeamten zu entnehmen und in sterilisierte Gefäße abzufüllen. Wenn ein Impfstoff dem Kontrollbeamten in mehreren Originalbehältern übergeben wurde, sind die unter 1. und 2. genannten Proben aus jedem einzelnen Behälter zu entnehmen und entsprechend zu kennzeichnen. Wird von einer größeren Impfstoffmenge zunächst nur ein Teil zur Prüfung gestellt, so sind die unter 1. und 2. erwähnten Proben nur von denjenigen Behältern einzusenden, auf welche sich die Prüfung erstrecken soll. Werden später weitere Impfstoffmengen zur Prüfung gestellt, so sind dem Prüfungsinstitut Proben aus den entsprechenden Behältern einzusenden.

Die unter 3. genannte Probe ist nur einmal zu entnehmen, soll jedoch aus Portionen, die den verschiedenen Einzelbehältern entstammen, gleichmäßig gemischt sein. An Stelle einer Probe von 1000 ccm, welche dem Antrag zur Prüfung von einfachen Impfstoffen beizufügen ist, sind 500 ccm (100 ccm usw.) einzusenden, wenn der Impfstoff als 2fach (10fach usw.) bezeichnet wird.

§ 10.

Die Probefläschchen sind vor der Einsendung an die Prüfungsstelle in Gegenwart des Kontrollbeamten zu plombieren, mit einer Aufschrift zu versehen, aus der die genaue Bezeichnung des Präparates nebst Kontrollnummer, bei Aufbewahrung des Vorrats in verschiedenen Originalbehältern die nähere Bezeichnung des Aufbewahrungsgefäßes und der Tag der Einfüllung der für das Prüfungsinstitut bestimmten Proben ersichtlich sind.

§ 11.

Die Herstellungsstätte hat der Sendung ein Begleitschreiben nach Muster A beizufügen, in dem die erforderlichen Angaben über die Zusammensetzung des Impfstoffs (Art und Mischungsverhältnis der Bestandteile der Toxin-Antitoxin-Gemische bzw. Toxoide und Toxoid-Antitoxin-Gemische sowie deren Operationsnummern, Gehalt an Konservierungsmitteln und Chemikalien) und auch das Ergebnis der in § 2—4 vorgeschriebenen Vorprüfungen mitzuteilen ist. Aus dem Begleitschreiben muß auch

die Anzahl, der Inhalt und die Bezeichnung der Aufbewahrungsgefäße hervorgehen. Das Begleitschreiben ist von dem Kontrollbeamten auf seine Richtigkeit zu prüfen und gegenzuzeichnen.

§ 12.

Nach Entnahme der Probemengen (§ 9) sind die Originalbehälter in Gegenwart des Kontrollbeamten unter Plombenverschluß zu nehmen und bei Zimmertemperatur in einem Raume abzustellen, der von dem Kontrollbeamten unter Mitverschluß zu halten ist.

Staatliche Prüfung.

§ 13.

Die staatliche Prüfung erstreckt sich auf die Feststellung der Keimfreiheit, der Unschädlichkeit bzw. der Ungiftigkeit, sowie des Immunisierungswertes der Impfstoffe.

§ 14.

Die Prüfung auf Keimfreiheit erfolgt nach den gebräuchlichen bakteriologischen Methoden. Es sind mindestens ein Agarröhrchen, ein Traubenzuckeragarröhrchen und zwei Nährbrüheröhrchen jeweils im Verhältnis von 0,25 auf 10 ccm Nährboden zu beimpfen. Das Agarröhrchen ist zu einer Platte auszugießen, von dem Traubenzuckeragarröhrchen wird eine Schüttelkultur in hoher Schicht angelegt.

Das Ergebnis der Prüfung ist nach sechstägiger Beobachtung der Kulturen bei 37° C festzustellen.

§ 15.

Bei der Prüfung auf Unschädlichkeit wird zunächst festgestellt, ob der etwaige Phenol-, Trikresol- oder Formaldehydgehalt (§ 6) das zulässige Maß überschreitet. Wenn zwei weiße Mäuse von etwa 20 g Gewicht, denen 0,5 ccm des Impfstoffes unter die Haut gespritzt wurde, nach 24 Stunden keine oder nur unwesentliche Vergiftungserscheinungen zeigen, ist anzunehmen, daß der Gehalt an Konservierungsmitteln das zulässige Maß nicht überschreitet.

§ 16.

Zwecks Feststellung der Ungiftigkeit werden zwei Prüfungen ausgeführt.

1. Zwei Meerschweinchen von 240—260 g Gewicht werden je 10 ccm des zur Prüfung gestellten Impfstoffes subkutan injiziert. Zwei weitere Tiere der gleichen Gewichtsklasse erhalten die gleiche Dosis des Impfstoffes gemischt mit einer Menge Diphtherieserum, welche Antitoxin im Ueberschuß enthält; die Mischung ist nach einstündiger Aufbewahrung bei 37° C zu injizieren. Wenn sich während einer Beobachtungsdauer von 5 Tagen bei den Tieren der ersten Gruppe wesentlich stärkere Veränderungen an der Injektionsstelle entwickeln oder wenn der Allgemeinbefund bei ihnen wesentlich schwerer ist als bei den Tieren der zweiten Gruppe, kann der Impfstoff nicht als hinreichend entgiftet gelten.

2. An zehn Meerschweinchen von 240—260 g Gewicht wird eine Prüfung vorgenommen, aus der sich ergeben muß, daß die Tiere das Fünffache der größten Impfstoffmenge, die als Gebrauchsdosis in der Anwendungsvorschrift angegeben werden soll, mindestens aber die Menge von 5 ccm bei subkutaner Verimpfung ohne schwere Allgemeinschädigungen vertragen, so daß von 10 Tieren innerhalb von 8 Wochen keines durch die Wirkungen des Impfstoffes getötet wird und bei keinem von ihnen diphtherische Lähmungen erzeugt werden.

Bei der Prüfung der Immunisierungskraft dient als Maßstab ein getrockneter und in Vakuumröhrchen eingeschmolzener Standardimpfstoff von genau bekannter Wirkung, der im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.

aufbewahrt wird. Das in den Vakuumröhrchen enthaltene Pulver wird unmittelbar vor der Prüfung gemäß der auf dem Etikett gegebenen Vorschrift in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Mit der hierdurch gewonnenen Lösung werden 125 Meerschweinchen von 240—260 g Gewicht immunisiert, und zwar durch subkutane Injektion einer in den verschiedenen Jahreszeiten verschieden zu wählenden Dosis, welche erfahrungsgemäß etwa 50 v. H. der Versuchstiere gegen die vier Wochen später vorzunehmende Intoxikation mit der Prüfungsdosis des Testtoxins zu schützen vermag.

Aus dem zur Prüfung gestellten Impfstoff wird entsprechend der Wertangabe der Fabrik mit physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnung hergestellt, welche der Lösung des Standardimpfstoffes gleichwertig sein müßte. Ein als zweifach (zehnfach usw.) bezeichneter Impfstoff wird somit auf die Hälfte (ein Zehntel usw.) verdünnt; ein als einfach bezeichneter Impfstoff bleibt unverdünnt.

Mit der nach dieser Vorschrift hergestellten Verdünnung des zu prüfenden Impfstoffes werden ebenfalls 125 Meerschweinchen von 240—260 g immunisiert. Die jedem Tier zu injizierende Dosis muß ebenso groß sein wie die bei der Immunisierung der ersten Tierserie verwandte Dosis der Lösung des Standardimpfstoffes.

Als Testtoxin dient ein getrocknetes und in Vakuumröhrchen eingeschmolzenes Diphtherietoxin von genau bekannter Wirkung, das im Institut für experimentelle Therapie aufbewahrt wird. Das in den Vakuumröhrchen enthaltene Pulver wird unmittelbar vor der Intoxikation der immunisierten Tiere gemäß der auf dem Etikett gegebenen Vorschrift in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst[1]). Von dieser Lösung werden jedem der vorbehandelten Tiere 28 Tage nach der Immunisierung 2,5 ccm auf 250 g Körpergewicht injiziert. Zugleich ist die Wirksamkeit des Testtoxins an 12 normalen Meerschweinchen von 250 g Gewicht zu prüfen. Und zwar werden sechs Tieren 2,5 ccm der zur Intoxikation der immunisierten Meerschweinchen verwandten Lösung subkutan injiziert. Aus dieser Lösung ist eine Verdünnung herzustellen, welche in 2,5 ccm die einer dl_{100} entsprechende Toxinmenge enthält; von dieser Verdünnung werden sechs weiteren Tieren 2,5 ccm subkutan injiziert.

Die Beobachtungsdauer nach der Intoxikation beträgt 5 Tage. Wenn der geprüfte Impfstoff bis zum Ablauf dieser Zeit den gleichen oder einen höheren Prozentsatz von Tieren am Leben erhält wie der Standardimpfstoff, ist er mit der von der Fabrik gemachten Wertangabe zuzulassen. Wenn der geprüfte Impfstoff einen wesentlich geringeren Prozentsatz von Tieren am Leben erhält als der Standardimpfstoff, ist er zurückzuweisen. Bei der Beurteilung des Ergebnisses ist die Streuung des Versuchsausfalles, die in zwei Tierserien auch bei völliger Gleichheit der zu ihrer Immunisierung verwandten Impfstoffe zu erwarten ist, entsprechend der Zahl der zur Prüfung verwandten Tiere zu berücksichtigen.

§ 17.

Wenn ein Impfstoff in mehreren Originalbehältern aufbewahrt wird, sind die in §§ 14 und 15 vorgeschriebenen Prüfungen mit Proben aus jedem Behälter auszuführen, der zur Prüfung angemeldet wird (vgl. § 9). Das gleiche gilt für die beiden in § 16 vorgeschriebenen Prüfungen zur Feststellung der Ungiftigkeit. Die in § 16

1) Da die Prüfungsdosis des Testtoxins eine ursprünglich willkürlich gewählte Größe ist, ist bei der Einführung eines neuen Testtoxins diejenige Menge als Prüfungsdosis zu wählen, welche von gleichartig und gleichzeitig immunisierten Tieren den gleichen Prozentsatz tötet wie die Prüfungsdosis des noch im Gebrauch befindlichen Testtoxins; jedoch dürfen nur solche Gifte als Testtoxine eingeführt werden, deren Prüfungsdosis mindestens das Zehnfache der dl_{100} darstellt.

vorgeschriebene Prüfung der Immunisierungskraft wird für einen in mehreren Behältern aufbewahrten Impfstoff nur einmal, und zwar mit der in § 9 unter 3. genannten Probe ausgeführt.

Die in § 16 vorgeschriebenen Prüfungen zur Feststellung der Ungiftigkeit werden unter Verwendung der in § 9 erwähnten Proben, die in dem Prüfungsinstitute bei Zimmertemperatur aufzubewahren sind, nach einem Jahr wiederholt.

§ 18.

Wenn sich die Angaben der Fabrik über Ungiftigkeit und Wirksamkeit der Impfstoffe als unzutreffend erweisen, kann das Prüfungsinstitut Proben der nach § 5 aufzubewahrenden Bestandteile anfordern und eine Prüfung darauf vornehmen, ob die auf diese Bestandteile bezüglichen Angaben der Herstellungsstätte zutreffen.

Freigabe der Impfstoffe.

§ 19.

Von dem Ergebnis der staatlichen Prüfung wird der Hersteller durch Rücksendung des Befundscheines nach Muster B unverzüglich in Kenntnis gesetzt.

§ 20.

Der Kontrollbeamte ist dafür verantwortlich, daß die der staatlichen Prüfung unterstellten Diphtherieimpfstoffe von der Herstellungsstätte nur dann in den Handel gebracht werden, wenn es nach dem Ergebnis der Prüfung zulässig ist.

Die Entfernung der Plomben von den Originalbehältern (§ 12), die Abfüllung in die Versandgefäße und deren Plombierung darf nur unter seiner dauernden Aufsicht und nach den Bestimmungen seiner Dienstanweisung erfolgen.

§ 21.

Aus den Aufschriften der Versandgefäße muß ersichtlich sein

1. die Herstellungsstätte,
2. die genaue Bezeichnung des Präparates,
3. die Kontrollnummer,
4. die Bezeichnung „Staatlich geprüft“ sowie Ort und Tag der Prüfung,
5. der späteste Zeitpunkt der Verwendbarkeit des Präparates.

§ 22.

Wird ein Impfstoff auf Grund der staatlichen Prüfung als den Anforderungen nicht entsprechend zurückgewiesen, so hat der Kontrollbeamte den Vorrat dem Hersteller wieder zur Verfügung zu stellen und in seinem Dienstbuch einen Vermerk darüber aufzunehmen.

§ 23.

Führen Nachprüfungen (§ 17) eines zugelassenen Impfstoffes zu einem Ergebnis, nach dem seine weitere Verwendung nicht zulässig ist, so hat das Prüfungsinstitut sofort bei der zuständigen Behörde zu beantragen, daß die betreffende Kontrollnummer aus dem Verkehr gezogen wird.

§ 24.

5 Jahre nach der Freigabe (Zulassung) werden sämtliche Impfstoffe wegen Ablaufs der Gewährsdauer auf Antrag des Prüfungsinstituts durch die zuständigen Behörden serienweise eingezogen.

Muster A.

Begleitschein Nr. ___

für die staatliche Prüfungsstelle

zu dem von _____

in _____

eingesandten Diphtherieimpfstoff.

_____

Art des Impfstoffes: _____

Kontroll- (Hauptbuch-) Nr.: _____

(Entsprechend der Aufschrift auf den Probefläschchen.)

Menge des Impfstoffes: _____

Zusammensetzung des Impfstoffes:

Bezeichnung und Inhalt der Einzelgefäße: _____

_____

Der Inhalt der folgenden Einzelgefäße wurde bereits früher zur Prüfung gestellt: _____

Der Inhalt der folgenden Gefäße wird jetzt zur Prüfung gestellt: _____

_____

Menge der zugesetzten Chemikalien: _____

Für den Gebrauch beim Menschen vorgesehene Höchstdosis: _____

Prüfungsergebnis in der Fabrik:

Ungiftigkeit (Ergebnis der unter Aufsicht des Kontrollbeamten ausgeführten Prüfung): _____

Wertangabe: _____ fach (1 ccm = _____ Schutzeinheiten)

Keimgehalt: _____

Tag der amtlichen Einfüllung der für das Prüfungsinstitut bestimmten Proben: _____

Datum der Einsendung zur Kontrollstation: _____

Bemerkungen:

Unterschriften

des staatlichen Kontrollbeamten: _____ und des Vertreters der Herstellungsstätte: _____

_____

Muster B.

Bescheinigung

über das Ergebnis der im Staatlichen Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt am Main ausgeführten Prüfung des von _____

mit Begleitschein Nr. _____

am _____

eingesandten Diphtherieimpfstoffes (Menge _____ Liter)

eingetroffen am _____ Vorm. / Nachm.

Art des Impfstoffes: _____

Kontroll- (Hauptbuch-) Nr.: _____

Bezeichnung der Einzelgefäße, auf deren Inhalt sich die Prüfung erstreckte: _____

I. Der Impfstoff entspricht den gesetzlichen Anforderungen; er hat den angegebenen Wert von _____ Schutzeinheiten und kann in Dosen bis _____ ccm beim Menschen angewandt werden.

II. Der Impfstoff wird beanstandet, weil _____

_____

Der Kontrollstation sind demnach an Untersuchungsgebühren gutzuschreiben

_____

Bemerkungen: _____

Frankfurt a. M., den _____

(L. S.)

Unterschrift des Kontrollarztes.

_____

Literatur.

1) Prigge, R., u. Hartoch, O., Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Therapie u. d. Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M., Heft 23, S. 1, 1930.

2) Kolle, W., Prigge, R., u. Fischer, W., Med. Klin., 1930, Nr. 49/50; 1932, Nr. 2.

3) Kolle, W., u. Prigge, R., Dtsch. med. Wochenschr., 1934, Nr. 33, S. 1227; Wissensch. Woche zu Frankfurt a. M., Bd. 3, S. 62, 1935.

4) Madsen, Th., u. Schmidt, Sv., Acta Soc. Med. Fennicae „Duodecim", Ser. A., Bd. 15, 1932.

5) Shackell, L. F., Williamson, W., Deitschmann, M. M., Katzmann, G. M., a. Kleinman, B. S., Journ. of Pharm. a. exp. Ther., Vol. 24, p. 53, 1925.

6) Wiechowski, W., Verhandl. d. dtsch. pharmak. Gesellschaft 7. Tagung 21.—23. 9. 27, Würzburg. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Vol. 128, p. 135, 1928.

7) Trevan, J. W., Proc. of the Royal Soc., B, Vol. 101, p. 483, 1927; Vol. 108, p. 54, 1931; Journ. of Path. a. Bact., Vol. 32, p. 127, 1929.

8) Lyon, D. M., Journ. Pharm. a. exp. Ther., Vol. 21, p. 229, 1923.

9) Ramon, G., C. r. Soc. de Biol., T. 89, p. 2, 1923 und C. r. de l'Acad. des Sciences, T. 177, p. 1338, 1923.

10) Ehrlich, P., Klin. Jahrbuch, Bd. VI, S. 299, 1898.

11) Hartley, P., Wissenschaftl. Woche zu Frankfurt a. M., Bd. 3, S. 81. Leipzig, Georg Thieme, 1935.

12) Madsen, Th., Schmidt, Sv., u. Jensen, Cl., Wissenschaftl. Woche zu Frankfurt a. M., Bd. III, S. 89, 1935.

13) Kisskalt, K., Ztschr. f. Hyg., Bd. 81, S. 42, 1915.

14) Hemmingsen, A. M., Quarterly Journ. of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 6, p. 70, 1933.

15) Prigge, R., Ztschr. f. Immunitätsf., Bd. 77, S. 421, 1933.

16) — Ebenda, Bd. 81, S. 185, 1934.

17) Rapport de la Commission permanente de Standardisation biologique. Société des Nations, Organisation d'hygiène C. H. 1056 (1), S. 8—10, 1931.

18) Schmidt, H., Klinische Fortbildung (Neue Dtsch. Klinik) Ergänzungsband II, S. 130, 1934.

19) Gaddum, J. H., Medical Research Council, Special Report Series No. 183, 1933.

Aus der experimentell-therapeutischen Abteilung (Abteilungsleiter: Prof. Dr. R. Prigge) des Staatlichen Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Stellv. Direktor: Prof. Dr. H. Hetsch).

II.

Variationsstatistische Untersuchungen zur Wertbestimmung von Diphtherieimpfstoffen.

Von

W. Schäfer.

Mit 25 Abbildungen im Text.

Mehr und mehr scheint sich die Auffassung durchzusetzen, daß auch der biologischen Forschung durch Anwendung mathematischer Methoden neue Wege des Erkennens eröffnet werden. Wenn auch biologische Erkenntnisse im allgemeinen ohne Hilfe der Mathematik gewonnen werden, ja biologische Probleme einer mathematischen Behandlung häufig nicht zugänglich sind, so hat sich doch in vielen Fällen eine mathematische Durchdringung als fruchtbar erwiesen. Es sei nur an die moderne Erblichkeitslehre erinnert. Ein Neuland in dieser Hinsicht ist das Gebiet der Immunitätsforschung. Hier hat sich die mathematische Behandlungsweise erst in den letzten Jahren von der Pharmakologie her Eingang verschafft.

In der vorliegenden Abhandlung, die sich eng an die vorangehende Arbeit über die staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen anschließt, soll der Versuch gemacht werden, die bei der Wertbemessung der Diphtherieantigene gewonnenen Ergebnisse einer Behandlung mit variationsstatistischen Methoden zuzuführen.

1. Ueber die Anwendbarkeit des Bernoullischen Theorems zur statistischen Auswertung von Tierversuchen.

Der Vergleich zwischen den beiden Impfstoffen L 31 und F 47 (S. 10f. der vorangehenden Arbeit) sollte feststellen, ob solche Mengen von verschiedenen Formoltoxoiden, welche hinsichtlich ihres Gehaltes an Flockungseinheiten (vgl. vorangehende Arbeit, S. 8) übereinstimmen, gleiche oder verschiedene antigene Wirksamkeit besitzen. Die Tatsache, daß äquivalente Mengen der untersuchten Impfstoffe in ihrer Wirksamkeit keinen nachweisbaren Unterschied zeigten, besagt selbstverständlich nur, daß gleiche

Mengen von Flockungseinheiten der Formoltoxoide L 31 und F 47 von etwa gleicher Wirksamkeit sind und darf nicht verallgemeinert werden. Dieses Resultat gestattet also keine Entscheidung über die Frage, zu deren Klärung die Vergleichsuntersuchungen ausgeführt wurden, und besitzt somit in biologischer Hinsicht nur untergeordnete Bedeutung, zumal da eine eindeutige Klärung durch die mit den Formoltoxoiden S 1, B 8, L 31, F 72, F 89 und F 191 angestellten Versuche (s. S. 28f.) ermöglicht wurde, in denen sich sehr beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Impfstoffen nachweisen ließen. Die Feststellung, daß zwischen L 31 und F 47, auf Flockungseinheiten berechnet, kein erheblicher Unterschied besteht, ist jedoch in theoretischer Hinsicht von großer Bedeutung.

Obwohl eine ganze Reihe von Vergleichsversuchen mit den beiden Impfstoffen L 31 und F 47 mit Kollektiven von je 100—125 Meerschweinchen ausgeführt wurden, ließ sich ein Unterschied zwischen den Impfstoffen nicht einwandfrei feststellen. Die Tabelle 5 auf Seite 12 zeigt, daß die Differenzen der Prozentsätze der durch die gleiche Anzahl L_f (Flockungseinheiten) von beiden Impfstoffen geschützten Tiere stets innerhalb der Grenzen des auf Grund des Theorems von Bernoulli berechneten dreifachen mittleren Fehlers liegen. Wenn trotz der hohen Tierzahlen, mit denen die Versuche angestellt wurden, keine statistisch gesicherten Unterschiede erzielt wurden, so kann das verschiedene Gründe haben:

1. Der Unterschied in der antigenen Wirksamkeit zwischen beiden Impfstoffen ist sehr gering oder gar nicht vorhanden.

2. Die Streuung (Variabilität) des Versuchsmaterials ist so groß, daß auch ein beträchtlicher Unterschied den Prozentsatz der geschützten Tiere nur unwesentlich verändert.

3. Die statistische Auswertung auf Grund des Bernoullischen Theorems ist nicht zulässig.

Der Zusammenhang zwischen der Streuung (Variabilität) des Tiermaterials und der Genauigkeit der Bestimmung der antigenen Wirksamkeit (des „Schutzwertes") wird in dem Abschnitt 2e („Der Einfluß des Tiermaterials auf die Genauigkeit der Dosenbestimmung" S. 81) eingehend behandelt.

Zunächst muß die Frage untersucht werden, ob das Theorem von Bernoulli zur Auswertung der Versuche angewendet werden darf, oder ob die Auswertung auf anderem Wege zu erfolgen hat.

Ein objektiver Unterschied könnte nur dann verdeckt werden, wenn die auf Grund des Bernoullischen Theorems berechneten mittleren Fehler größer wären als die tatsächlich vorhandenen Abweichungen der Versuchsergebnisse vom theoretischen Wert, d. h. wenn die Streuung der Versuchsergebnisse „unternormal" wäre (3, 4, 5). Tatsächlich scheint jedoch das Gegenteil der Fall zu sein, die Streuung der Versuchsergebnisse erscheint ungewöhnlich groß.

Welche Ursachen könnten für das Vorhandensein einer abnormen, d. h. von dem nach dem Bernoullischen Theorem berechneten Wert abweichenden Streuung der Versuchsresultate verantwortlich gemacht werden?

In einem „Bericht" des Kopenhagener Seruminstitutes (1) heißt es auf Seite 2:

„. . . il est possible, d'une part, que les animaux soient si uniformes que la détermination des pourcentages de survie est bien plus conforme aux lois que le résultat d'une loterie, de sorte que l'erreur moyenne par exemple est beaucoup plus petite que $\sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$. Cela veut dire qu'il s'est produit une situation présentant une dispersion sous-normale au sens de Lexis, la matière étant ainsi estimée au-dessous de sa valeur réelle par le critérium mentionné. De l'autre côté, il n'est pas impossible que les variations individuelles des animaux utilisés dans ces expériences aient un effet si dérangeant que l'erreur moyenne devient maintes fois plus grande que $\sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$, c'est-à-dire, il est question d'une dispersion hyper-normale, de façon que le critérium surestime de beaucoup la matière. . . ."

Danach wäre die Verminderung der Streuung nur eine Frage der Beschaffung von genügend einheitlichem Versuchsmaterial. Es ist aber zunächst einmal zu prüfen, wie weit durch Verwendung von einheitlichem Versuchsmaterial die Streuung vermindert werden kann, insbesondere, ob es wirklich möglich ist, den mittleren Fehler der Versuchsergebnisse kleiner zu machen, als ihn die auf Grund des Bernoullischen Urnenschemas abgeleitete Formel $\sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$ [1]) angibt, oder, mit anderen Worten, ob es möglich ist, durch Verwendung von einheitlichem Versuchsmaterial zu einer unternormalen Streuung zu kommen.

Es wird von biologischer Seite aus immer wieder auf die Notwendigkeit der Verwendung reiner Linien für variationsstatistische Untersuchungen hingewiesen, teilweise ohne genügend klare Vorstellung darüber, in welcher Weise die Versuchsergebnisse durch die mehr oder minder große Heterogenität des Versuchsmaterials beeinflußt werden. Sehr oft wird übersehen, daß die Streuung der Versuchsresultate etwas ganz anderes ist als die Streuung des Tiermaterials. Die Streuung der Versuchsergebnisse braucht überhaupt nicht von der Streuung des Tiermaterials beeinflußt zu werden [2]). Ein Beispiel mag das erläutern:

Es soll die Wirksamkeit einer Giftdosis an einem bestimmten Tiermaterial ermittelt werden. Dabei interessieren natürlich nur solche Giftmengen, die nicht von allen Tieren glatt vertragen werden oder auf alle Tiere tödlich wirken. Bei einem genügend großen Tiermaterial werden sich die Tiere nach ihrer natürlichen Giftresistenz in Klassen ordnen lassen,

1) Es bedeutet $p = 100 - q$ den Prozentsatz der überlebenden und n die Anzahl der Versuchstiere.

2) Daß die Genauigkeit der Auswertung der Versuchsresultate von der Streuung des Tiermaterials abhängig ist, hat hiermit nichts zu tun. Darüber s. S. 81 f.

die sich, nach ihrer Größe geordnet, in gesetzmäßiger Weise um einen Mittelwert herumgruppieren. Nach welchem Gesetz das geschieht, ob nach dem Gaussschen Fehlergesetz oder nach irgendeinem andern, das mag zunächst gleichgültig sein. Nehmen wir weiter an, wir entnehmen die für einen Versuch erforderliche Anzahl Tiere einem unerschöpflichen Reservoir, und für jedes Tier wäre die Wahrscheinlichkeit, herausgegriffen zu werden, gleich groß.

Es ist nun offenbar, wenn man von äußeren Einflüssen absieht, für jedes Tier a priori durch die ihm eigene Giftresistenz festgelegt, ob es nach Injektion einer bestimmten Giftdosis am Leben bleiben oder sterben wird, sofern nur für jedes Tier die gleichen Versuchsbedingungen gelten. Dabei ist ganz belanglos, wie groß die Giftresistenz eines Tieres tatsächlich ist, d. h. zu welcher Klasse der Häufigkeitsverteilung nach der Giftresistenz das betreffende Tier gehört. Wenn die Giftresistenz einen bestimmten Wert überschreitet, dann bleibt das Tier am Leben; wenn sie unter diesem Wert bleibt, stirbt es. Es wird sich also eine ideale reine Linie, wie sie durch die Kurve a der Figur 1 dargestellt ist, genau so

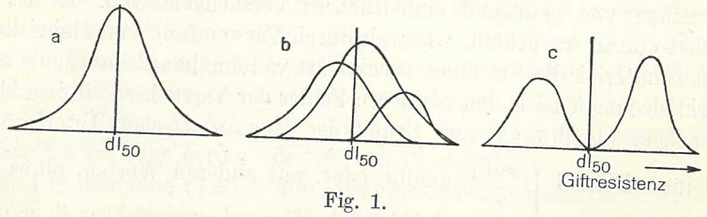


Fig. 1.

verhalten, wie ein Gemisch aus mehreren Rassen (Fig. 1b) oder gar wie zwei Rassen, von denen die Tiere der einen Rasse bei Injektion der betreffenden Giftdosis alle am Leben bleiben, die der anderen alle sterben (Fig. 1c).

Wenn beispielsweise $p = q = 50$ Proz., also die eingespritzte Giftdosis für genau die Hälfte des gesamten Tiermaterials tödlich wäre — eine solche Dosis pflegt man nach Trevan (9) mit dem Symbol dl_{50}, d. h. dosis letalis für 50 Proz. zu bezeichnen —, dann werden, unabhängig von der Gestalt der Verteilungskurve, alle Tiere links von der durch den Punkt dl_{50} gelegten Ordinate sterben, alle Tiere rechts davon am Leben bleiben[1]).

Das gilt sogar für den Fall, daß die Streuung einer reinen Linie außerordentlich klein wäre. Dann werden bei einer Dosis, die ein klein wenig schwächer als die dl_{50} ist, alle Tiere am Leben bleiben, während eine Dosis, die etwas stärker als die dl_{50} ist, alle Tiere tötet. Nur wenn wir uns alle Tiere vollkommen gleich denken, wenn also überhaupt keine Streuung vorhanden ist, dann hat es keinen Sinn mehr, von einer dl_{50} zu

1) Ob die Verteilung nach der Giftresistenz oder nach der gerade tödlich wirkenden Dosis vorgenommen wird, bleibt sich gleich; denn die gerade tödlich wirkende Dosis wird ja als Maß für die Giftresistenz benützt.

sprechen. Es gäbe dann einen Grenzwert $dl\frac{100}{0}$, bis zu dem alle Tiere am Leben bleiben, über den hinaus alle Tiere sterben[1]).

Könnte man den Tieren vorher ansehen, ob sie die betreffende Giftdosis vertragen oder ob sie daran zugrunde gehen werden, dann könnte man, soweit es auf die statistische Beurteilung der Versuche ankommt, statt der Tiere auch weiße und schwarze Kugeln nehmen. Die sich ergebende Streuung wird genau dieselbe sein.

Es sei das Verhältnis der weißen Kugeln (= überlebenden Tiere) zu der Gesamtzahl der vorhandenen: p'[2]), das der schwarzen Kugeln (= sterbenden Tiere) zur Gesamtzahl: q'. Je größer die für einen Versuch herausgegriffene Anzahl n ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Verhältnis der weißen Kugeln zur Gesamtzahl n den Wert p', das Verhältnis der schwarzen Kugeln zur Zahl n den Wert q' annimmt. Die tatsächlich gefundenen Werte seien p'_1 und q'_1. Wird der Versuch mit genau derselben Giftdosis unter genau denselben Bedingungen — das unerschöpfliche Reservoir garantiert dafür, daß p' und q' konstant bleiben —, wiederholt, dann möge man nacheinander die Ergebnisse p'_2, q'_2; p'_3, q'_3 p'_4, q'_4 usw. erhalten. Es sind also alle Voraussetzungen gegeben, unter denen das Theorem von Bernoulli abgeleitet ist. Bei einer genügend großen Anzahl s der Versuche mit je n Ziehungen werden sich somit die Werte $p'_1, p'_2, p'_3 \ldots p'_s$ nach dem Gaussschen Fehlergesetz um den wahren Wert p' als Mittel gruppieren[3]). Damit ist gezeigt, daß unter den gemachten Voraussetzungen die Streuung der Versuchsergebnisse unabhängig von dem benützten Tiermaterial ist.

Als erstes Ergebnis unserer Untersuchungen stellen wir mithin fest: Eine unternormale Streuung kann auch durch ein noch so einheitliches Versuchsmaterial niemals verursacht werden. Damit ist auch bewiesen, daß die in dem „Bericht" (1) empfohlene Versuchsauswertung nach Gewichtszunahmeklassen keinen Vorteil bieten kann. Durch diese Methode sollte es möglich gemacht werden, ein so einheitliches

1) Selbstverständlich würden dann die bei normaler Streuung als konstant anzusetzenden Umweltsbedingungen variierend wirken, so daß doch wieder eine Streuung resultiert. Da anzunehmen ist, daß gerade so viel günstige wie ungünstige Einflüsse stattfinden, so haben wir bei dem Grenzwert $dl\frac{100}{0}$ denselben Fall wie bei der auf der Kante stehenden Münze: Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Todes ist $\frac{1}{2}$, also werden durchschnittlich 50 Proz. der Tiere sterben. Es ergäbe sich also wieder eine, wenn auch anders definierte, dl_{50}!

2) Es wird im folgenden mit p stets der Prozentsatz, mit $p' = p/100$ das Verhältnis der Ueberlebenden zur Gesamtmenge ($p' + q' = 1$) bezeichnet.

3) Das gibt natürlich auch eine Verteilung, und zwar eine echte Gauss-Verteilung, die aber nicht verwechselt werden darf mit der Häufigkeitsverteilung der Tiere nach der Giftresistenz. Es handelt sich hier um die Verteilung der Versuchsfehler um den wahren Wert. Diese Verteilung soll im folgenden deshalb stets als „Fehlerverteilung" und ihre Streuung als „Fehlerstreuung" bezeichnet werden. Um Verwechselungen zu vermeiden, wird im folgenden stets die Standardabweichung der Fehlerverteilung mit σ, die Standardabweichung der Häufigkeitsverteilung der Tiere mit μ bezeichnet.

Versuchsmaterial zu gewinnen, „daß die Bestimmung der Ueberlebensprozentsätze mehr mit den Gesetzen übereinstimmt als das Ergebnis einer Lotterie, so daß z. B. der mittlere Fehler viel kleiner ist als $\sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$“ (vgl. Zitat auf S. 53), d. h. daß eine unternormale Streuung die Folge wäre. In Wahrheit wird die Fehlerstreuung infolge der Kleinheit der vorgeschlagenen Gewichtszunahmeklassen so stark vergrößert, daß eine statistische Auswertung gar nicht mehr möglich ist. Die Methode der Gewichtszunahmeklassen geht also von irrigen Voraussetzungen aus und muß zwangsläufig zu fehlerhaften Resultaten führen. So läßt sich z. B. zeigen, daß der Impfstoff F 47 zwei- bis viermal so wirksam ist wie der Impfstoff L 31; bei Berücksichtigung anderer Gewichtszunahmeklassen kommt man dagegen zu dem Ergebnis, daß L 31 wirksamer ist als F 47. Die Unhaltbarkeit der Methode geht am besten daraus hervor, daß man aus einer Versuchsreihe sogar schließen kann, daß eine kleinere Antigendosis eine bessere Schutzwirkung hat als eine größere.

Eine unternormale Streuung könnte nur zustande kommen, wenn man ein anderes Urnenschema zugrundelegte, etwa das von Poisson (2, 4, 5). Es ist nun zu untersuchen, ob für das Vorhandensein einer übernormalen Streuung der Versuchsergebnisse die Heterogenität des Tiermaterials verantwortlich gemacht werden kann.

Zunächst ist zu bemerken, daß der Prozentsatz p der Tiere, die bei Injektion einer bestimmten Toxindosis am Leben bleiben würden, auch für ein sehr großes Tiermaterial nicht konstant bleibt, und zwar deshalb nicht, weil die Giftresistenz bzw. die Immunisierbarkeit der Tiere gewissen Schwankungen unterworfen ist (s. Abschnitt 4: Jahreszeitliche Schwankungen). Die Bernoullische Fehlerrechnung liefert jedoch nur die Abweichung von dem für einen bestimmten Zeitpunkt gegebenen Wert p eines genügend großen Tiermaterials.

Wenn sich der Wert p von Versuch zu Versuch ändert, während er — wie das bei der Annahme eines unerschöpflichen Tiermaterials der Fall ist — von Ziehung zu Ziehung konstant bleibt, dann tritt an die Stelle des Bernoulli-Schemas das Urnenschema von Lexis (3, 4, 5), bei dem nach jeder Ziehung die gezogene Kugel wieder zurückgelegt wird, also p von Ziehung zu Ziehung konstant bleibt, während nach jedem Versuch das Verhältnis zwischen weißen und schwarzen Kugeln geändert wird. Die bei den Wahrscheinlichkeiten $p_1, p_2, p_3, \ldots p_i \ldots$ (in Prozent) zu erwartende mittlere Abweichung der Versuchsergebnisse vom arithmetischen Mittel p_o dieser Wahrscheinlichkeiten (d. h. der mittlere Fehler des einzelnen Versuches) ist gegeben durch den Ausdruck

$$\sigma_L = \sqrt{\frac{p_o \cdot q_o}{n} + (n-1)\,\sigma_p^2}\,,$$

worin $\sigma_p = \sqrt{\frac{\Sigma[p_i - p_o]^2}{s}}$ die Standardabweichung der Werte p_i, s die Anzahl der Versuche und n die Anzahl der Ziehungen jedes Versuches ist. Die „Lexis-Streuung“ ist also, wie zu erwarten, größer als die „Bernoulli-Streuung“, und zwar um so größer, je stärker die Wahrscheinlichkeiten p_i schwanken.

Denkt man sich die von der Beschaffenheit des Tiermaterials unabhängige Fehlerstreuung, also die Abweichung der Versuchsergebnisse von den Werten p_i des Tiermaterials, ganz ausgeschaltet, etwa dadurch, daß man sich jeden Versuch mit einer unbegrenzt großen Tierzahl ausgeführt vorstellt, dann sieht man sofort, daß jeder Aenderung von p ein anderes Versuchsergebnis entsprechen muß. Man wird also mit ein und derselben Toxindosis bei zeitlich getrennten Versuchen mit dem gleichen Tiermaterial verschiedene Ergebnisse erhalten.

Um die Ergebnisse zweier zu verschiedenen Zeiten ausgeführter Versuche vergleichen zu können, bedient man sich des von Ehrlich (6) in die messende Immunbiologie eingeführten Standardprinzips, d. h. man ermittelt die Dosis des zu messenden Präparates, die mit einer als Vergleichsmaß dienenden Dosis eines Standardpräparates wirkungsgleich ist. Praktisch kann das so durchgeführt werden, daß gleichzeitig eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Dosen des zu messenden Präparates und ein Versuch mit der Vergleichsdosis des Standardpräparates ausgeführt wird. Die Dosis des Versuches, dessen Ergebnis mit dem des Standardversuches übereinstimmt, wird als wirkungsgleich mit der Dosis des Standardpräparates angesehen.

Durch die Anwendung des Ehrlichschen Standardprinzips werden zwar alle durch die Veränderlichkeit des Versuchsmaterials bedingten Fehlerquellen beseitigt; aber das Verfahren besitzt einen schwerwiegenden Nachteil: Es erfordert für jede Messung eine ganze Reihe von Versuchen und eine entsprechend hohe Zahl von Versuchstieren. Für die Messung von Antigenen, die sehr große Kollektive erfordert, kommt daher das ursprüngliche Standardverfahren kaum in Betracht. In den letzten Jahren hat nun das Standardprinzip durch die Arbeiten von Trevan und anderen eine Erweiterung erfahren, die es erlaubt, die Anzahl der für jede Messung erforderlichen Versuche auf zwei zu reduzieren: den Standardversuch und einen Versuch mit dem damit zu vergleichenden Präparat. Dieses erweiterte Standardprinzip bedient sich zur Auswertung der Versuche einer Eichkurve, deren Gestalt für eine bestimmte wirksame Substanz und für ein bestimmtes Versuchsmaterial unabhängig von zeitlichen Schwankungen nach Trevan stets die gleiche ist. Das ist aber nur möglich, wenn das Versuchsmaterial stets die gleiche Zusammensetzung hat. Aendert sich dagegen, wie das bei Verwendung von uneinheitlichem Tiermaterial der Fall ist, die Zusammensetzung des Versuchsmaterials, dann ist, wie im folgenden Abschnitt (S. 71) gezeigt werden wird, eine übernormale Streuung der Versuchsergebnisse zu erwarten.

Wird zu den Messungen stets das gleiche, d. h. aus der gleichen Zucht stammende, Versuchsmaterial verwandt, dann wird sich auch ein genotypisch heterogenes Material nur wenig in seiner Zusammensetzung ändern. Anders aber ist es, wenn das Versuchsmaterial von verschiedenen Züchtern stammt, wie sich das bei großen Meerschweinchenkollektiven oft nicht

vermeiden läßt. Selbstverständlich muß vor allem dafür gesorgt werden, daß bei den zur gleichen Zeit auszuführenden Parallelversuchen das Tiermaterial möglichst gleichmäßig auf die einzelnen Kollektive verteilt wird. Ein von verschiedenen Züchtern stammendes Tiermaterial muß vor der Aufteilung in Kollektive gründlich gemischt werden; es könnte sonst vorkommen, daß Tiere, zwischen denen ein näherer genetischer Zusammenhang besteht, geschlossen in dieselbe Versuchsreihe hineingelangen, während die nächste Versuchsreihe andersartige Tiere enthält. Durch die Mischung wird also erreicht, daß alle Kollektive aus ein und demselben Tiermaterial zusammengesetzt werden. —

Eine übernormale Streuung kann aber auch noch eine ganz andere Ursache haben: Für die Anwendbarkeit des BERNOULLIschen Theorems wird vorausgesetzt, daß die Wahrscheinlichkeiten des Versuchsmaterials für jede Ziehung dieselben sind. Das wird beim Urnenschema dadurch erreicht, daß nach jeder Ziehung die gezogene Kugel wieder in die Urne zurückgelegt wird, oder es wird ein unerschöpfliches Reservoir angenommen, dessen Zusammensetzung durch die Ziehung einer begrenzten Anzahl von Kugeln ungeändert bleibt. In Wirklichkeit aber sind die Reservoire, denen die Tiere bei der Zusammenstellung der Kollektive entnommen werden, nicht unerschöpflich. Die Wahrscheinlichkeiten werden sich infolgedessen von Ziehung zu Ziehung merklich ändern, und sie werden von Versuch zu Versuch erheblich verschieden sein können. Um zu dem unter diesen Voraussetzungen gültigen Streuungsgesetz zu kommen, hat man das BERNOULLI-Schema so abzuändern, daß nach jeder Ziehung die gezogene Kugel nicht wieder in die Urne zurückgelegt wird. Die Frage lautet dann: Wie groß ist der mittlere Fehler eines Versuches, wenn aus einem Vorrat von N vorhandenen Kugeln n Kugeln nacheinander herausgenommen werden, und zwar $p' \cdot n$, also p % weiße und $q' \cdot n$, also q % schwarze? Es ist von vornherein klar, daß, je größer N im Vergleich zu n ist, um so mehr das BERNOULLI-Schema gilt. Der mittlere Fehler ist um so größer, je kleiner der Vorrat N ist, denn je weniger Kugeln in der Urne sind, um so stärker wird sich die Wahrscheinlichkeit eine weiße Kugel zu ziehen von Ziehung zu Ziehung ändern.

Der aus diesem Urnenschema berechnete mittlere Fehler [CZUBER (2), Nr. 39 (S. 55) und Nr. 113 (S. 183)] ist für genügend große Werte von N und N—n gegeben durch den Ausdruck

$$\sigma = \sqrt{\frac{p \cdot q}{\frac{N-n}{N} \cdot n}} = \sqrt{\frac{N-n}{N-1} \cdot \frac{pq}{n}}$$

(s. auch Nachtrag bei der Korrektur)

In diesen Ausdruck geht die BERNOULLI-Formel

$$\sigma_B = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

$\frac{N-1}{N-n} \cdot n$

über, wenn man für n das Produkt $\frac{N-n}{N} \cdot n$ einsetzt. Man sieht, daß mit wachsendem N dieser Wert beliebig nahe an n herankommt.

Wenn also bei einer solchen Versuchsanordnung eine übernormale Streuung festgestellt wird, dann ist nicht die Heterogenität des Versuchsmaterials dafür verantwortlich zu machen, sondern das zugrunde liegende Urnenschema, falls die Wahrscheinlichkeit, aus dem Reservoir herausgegriffen zu werden, für alle Tiere die gleiche ist.

Argumentation ist hinfällig, da obige Streuung unternormal ist

Eine Erhöhung der Uebernormalität ergäbe sich allerdings, wenn dies nicht der Fall wäre. Diese Möglichkeit wurde an einem großen Material geprüft. Es hatte verschiedentlich den Anschein, als ob die Tiere, die zuerst aus dem Behälter, in dem das Material vor der Verteilung auf die einzelnen Versuchsserien gemischt wurde, herausgefangen wurden, einen geringeren Immunitätsgrad erreichten als die zuletzt herausgegriffenen; in den betreffenden Versuchen sind von der zuerst herausgefangenen Hälfte mehr Tiere gestorben als von der zweiten Hälfte. Die Resultate sind jedoch statistisch nicht gesichert. Das mit der größten Wahrscheinlichkeit dafür sprechende Ergebnis ist eine Differenz von $8{,}6 \pm 5\%$. Das zufällige Auftreten einer solchen Differenz ist unter 100 Fällen etwa 9mal zu erwarten.

Wenn ein derartiger Unterschied tatsächlich bestünde, dann läge die Vermutung nahe, daß er geschlechtsbedingt ist. Da bei den früheren Versuchen das Geschlecht der Tiere nicht in die Protokolle aufgenommen worden war, konnte diese Frage erst an neuem Versuchsmaterial geprüft werden. Nach einem Versuch vom 21. 8. 1934[1]) schien es, als ob sich die Weibchen besser immunisieren ließen als die Männchen. Ferner waren mehr Männchen als Weibchen bei der ersten Hälfte der herausgefangenen Tiere, die weniger gut geschützt war als die zweite Hälfte. Man könnte sich also vorstellen, daß die Männchen einerseits weniger gut immunisierbar wären als die Weibchen und andererseits leichter aus einer großen Tierzahl herausgefangen werden könnten als die Weibchen. Aber auch dieses Ergebnis ist nicht statistisch gesichert, und bei späteren Versuchen waren Männchen und Weibchen stets mehr oder weniger gleichmäßig auf beide Hälften verteilt.

Die Frage des Unterschiedes in der Immunisierbarkeit zwischen beiden Geschlechtern wird sich erst entscheiden lassen, wenn genügend einheitliches Tiermaterial zur Verfügung steht; denn es wäre denkbar, daß auch in dieser Beziehung Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Rassen bestehen.

Auf eine gleichmäßige Verteilung des Tiermaterials auf die Parallelversuche mit den zu vergleichenden Impfstoffen wurde aus den auf S. 33f. angeführten Gründen im Frankfurter Institut besondere Sorgfalt verwendet. Die Tiere wurden vor dem Versuch gewogen und in drei Gewichtsklassen eingeteilt: 235—245 g, 245—255 g, 255—265 g. Tiere, die weniger als 235 oder mehr als 265 g wogen, wurden ausgeschieden. Darauf wurde jede der drei Klassen in einen besonderen Behälter gebracht, in dem die Tiere sorgfältig gemischt und dann auf die verschiedenen Kollektive verteilt wurden, so daß alle Kollektive die gleiche Zahl von Tieren aus jeder Gewichtsklasse erhielten. Auf diese Weise wurde verhindert, daß Unterschiede in der Immunisierbarkeit zwischen schweren und leichten Tieren das Resultat beeinflußten.

Aus Kopenhagener Versuchen, bei denen die Anfangsgewichte der Tiere zwischen 190 und 360 g schwankten, geht hervor, daß schwere Tiere durchschnittlich einen etwas höheren Immunitätsgrad erreichen als leichte. Eine gleichmäßige Verteilung der Gewichtsklassen bedeutet daher, in das Urnenschema übersetzt, eine gleichmäßigere Verteilung der weißen und schwarzen Kugeln auf die zu vergleichenden Ver-

1) Tabelle 12 der vorangehenden Arbeit (S. 27).

suche, die eine Verringerung der Streuung zur Folge haben muß. Es könnte also auf diese Weise eine unternormale Streuung herbeigeführt werden; jedoch dürfte sich die Unternormalität in den Frankfurter Versuchen kaum bemerkbar machen wegen der außerordentlich geringen Unterschiede in den Anfangsgewichten.

Die sorgfältigste Mischung des Versuchsmaterials verhindert natürlich nicht, daß bei der Verteilung der Tiere auf die einzelnen Kollektive das a priori bestehende Verhältnis zwischen Ueberlebenden und Sterbenden (weißen und schwarzen Kugeln) von Ziehung zu Ziehung geändert wird. Die Berechnung der Streuung hat also nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{p \cdot q}{\frac{N-n}{N} \cdot n}} = \sqrt{\frac{N-n}{N-1} \cdot \frac{p \cdot q}{n}}$$

zu erfolgen, d. h. man hat die Bernoulli-Streuung mit dem Faktor $\sqrt{\frac{N-n}{N-1}}$ ≤ 1 zu multiplizieren.

Da die Anzahl N der vor der Zusammenstellung der Kollektive in den Mischungsbehältern befindlichen Tiere nicht in die Versuchsprotokolle aufgenommen ist, so ist eine genaue Bestimmung des Korrektionsfaktors $\sqrt{\frac{N-n}{N-1}}$ für den einzelnen Fall nicht möglich. Der größte mögliche Wert für die Streuung, d. h. für den mittleren Fehler des einzelnen Versuches ergibt sich in dem Falle, in dem die N Tiere restlos auf zwei Versuche ($n = N/2$) verteilt sind. Man erhält dann für beide Versuche als Korrektionsfaktor des mittleren Fehlers den Wert $\sqrt{2}$. Eigentlich gilt der Wert $\sqrt{2}$ nur für die aus den Behältern herausgegriffenen Tiere des ersten Versuches. Ist p der Prozentsatz der Ueberlebenden von sämtlichen N Tieren beider Versuche, p_1 der Ueberlebensprozentsatz des ersten, p_2 der des zweiten Versuches, dann ist, da $p = \frac{1}{2}(p_1 + p_2)$, die Abweichung $p - p_1$ genau entgegengesetzt der Abweichung $p - p_2$.

falsch s. oben

In den meisten Fällen wird der Korrektionsfaktor kleiner sein als $\sqrt{2}$; denn in der Regel befanden sich in den Mischungsbehältern mehr Tiere, als für die Versuche erforderlich waren. Auch wurden oft mehr als zwei Versuche gleichzeitig ausgeführt.

Zur Prüfung des Versuchsmaterials auf übernormale Streuung, die durch die Besonderheit des zugrunde liegenden Urnenschemas bedingt ist, bleibt nur der Weg, die Streuung der Teilergebnisse kleinerer Gruppen innerhalb der Versuche empirisch zu ermitteln und mit den aus der Bernoulli-Formel errechneten Werten zu vergleichen.

Die von Jan./Febr. 1933 an in Frankfurt a. M. ausgeführten Versuche (Tabelle 5 der vorangehenden Arbeit) setzen sich alle aus je 5 Gruppen zu je 20—25 Tieren zusammen. Prüft man die Abweichungen der Resultate dieser Teilversuche von dem Ergebnis des jeweiligen Gesamtversuches, dann muß man feststellen, daß eine abnorm große Abweichung nur zweimal aufgetreten ist, und zwar beidemal in dem gleichen Versuch vom 24. 5./21. 6. 33; und da nun die eine dieser Abweichungen nach der + -Seite, die andere nach der — -Seite geht, so ergibt sich die ungewöhnlich große Differenz 81—38 = 43 % bei einem Gesamtergebnis des Versuches von 61 % Ueberlebenden. Diese Differenz ist 3,16mal so groß wie ihr mittlerer (Bernoulli-) Fehler. Nach dem Bernoullischen Theorem darf eine solche Differenz in 630 Fällen durchschnittlich nur einmal auf-

treten. Keineswegs folgt daraus, daß das zufällige Auftreten einer solchen Differenz erst nach 630 tatsächlich ausgeführten Versuchen zum ersten Male zu erwarten ist. In den weit über 100 bis jetzt vorliegenden derartigen Teilversuchen zu 20—25 Tieren ist innerhalb der Gesamtserie von 100 bis 125 Tieren eine Differenz, die ihren dreifachen Mittelfehler erreicht oder übertrifft, nur ein einziges Mal aufgetreten, und sie würde vielleicht auch in 630 Fällen nur ein einziges Mal aufgetreten sein. Jedenfalls darf man aus einem derartigen Einzelfall nicht auf das Vorhandensein einer übernormalen Streuung schließen. Auch wenn man in dem Versuch vom 24. 5./21. 6., der die beiden starken Abweichungen enthält, die tatsächlichen Abweichungen von p = 61 % mit den nach der Bernoulli-Formel errechneten Werten vergleicht, dann muß man feststellen, daß keine der gefundenen Abweichungen das Dreifache des berechneten mittleren Fehlers erreicht (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Serie	Zahl der Ueberlebenden	Prozentsatz der Ueberlebenden	Mittlerer Fehler (Bernoulli)	Gefundene Abweichung von 61 %
II_1	16/22	73 %	± ~~9,5~~ 10,4	+ 12
II_2	8/21	38 %	± 10,6	— 23
II_3	15/23	65 %	± ~~10,0~~ 10,2	+ 4
II_4	17/21	81 %	± ~~8,6~~ 10,6	+ 20
II_5	11/23	48 %	± ~~10,4~~ 10,2	— 13

Der mittlere Fehler muß mittels p = 61% berechnet werden.

Der Versuch umfaßt 10 Teilserien zu je 20—25 (zusammen 217) Tiere. Von dem Gesamtversuch blieben 61 % der Tiere am Leben. Es sind in Tabelle 1 nur die Werte für die aus den fünf letzten Teilserien bestehende Gruppe von 110 Tieren angegeben, die die beiden besonders starken Abweichungen enthält. Der Ueberlebensprozentsatz für diese Gruppe ist ebenfalls 61.

Von den 10 Teilserien des ganzen Versuches (eigentlich sind es zwei Versuche zu je fünf Teilversuchen) liegen 6 Ergebnisse außerhalb der Grenzen des berechneten mittleren (Bernoulli-) Fehlers. Von 101 Teilversuchen zu je 20—25 Tieren[1]) der Frankfurter Versuche von Mai/Juni 1933 bis Jan./Febr. 1934[2]) befinden sich jedoch nur 31 Ergebnisse außerhalb der Grenzen des mittleren Fehlers. Auf Grund des Bernoullischen Theorems sind durchschnittlich 31,7 Proz. zu erwarten.

Die Größe der Streuung innerhalb eines Versuches ist durch den Ausdruck

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma[D^2]}{s}}$$

besser s-1

gegeben, worin D die Abweichung der Resultate der Teilversuche vom Ergebnis des ganzen Versuches und s die Anzahl der Teilversuche bedeutet. Berechnet man nach dieser Formel die Streuung der Ergebnisse der Teilversuche von Mai/Juni 1933 bis Jan./Febr. 1934 — von den 101 Teilversuchen wurde einer[3]) wegen zu geringer Tierzahl (es waren von den

1) Es saßen aber stets nur 5 Tiere in einem Käfig!

2) 19 Hauptversuche mit 5 Teilversuchen, 1 Hauptversuch mit 6 Teilversuchen (s. Tab. 5, 7 u. 13, S. 12, 17 u. 28 der vorangehenden Arbeit).

3) Tabelle 7 der vorangehenden Arbeit (S. 17), Versuch vom 25. I. 34 mit 11,5 SE, Teilserie 3.

25 Tieren nicht weniger als 10 interkurrent, d. h. vor der Toxininjektion, gestorben) ausgeschieden —, dann erhält man

$$\sigma = \sqrt{\frac{8700}{100}} = 9{,}3 \pm 0{,}7$$

Es werden nicht die Streuungen selbst, sondern deren Quadrate gemittelt!

Eigentlich hätte man für jeden der 20 Versuche die Streuung einzeln ermitteln müssen und hätte dann für sämtliche Versuche die Streuung als „gewogenes Mittel" zu berechnen gehabt. Da aber die „Gewichte" der einzelnen Streuungen praktisch als gleich angesehen werden können — die Zahl der Tiere ist in jedem Teilversuch ungefähr gleich groß und der Einfluß der Ueberlebensprozentsätze auf die Streuung und damit auf das „Gewicht" der einzelnen Ergebnisse ist relativ gering —, so läßt sich die Rechnung in der angegebenen Weise vereinfachen. Für die Berechnung des mittleren Fehlers gilt die Formel

$$m_\sigma = \frac{\sigma}{\sqrt{2s}} = \frac{9{,}3}{\sqrt{200}} = 0{,}66. \quad *)$$

Die Berechnung der Streuung auf Grund des BERNOULLIschen Theorems ergibt

$$\sigma_B = 9{,}21 \pm 0{,}14.$$

Der mittlere Fehler eines Teilversuches, und das ist ja die Standardabweichung oder Streuung, wenn die Ergebnisse der Teilversuche als Varianten aufgefaßt werden, ist

$$\sigma_{B_i} = \sqrt{\frac{p_i\, q_i}{n_i}},$$

wenn p_i der Ueberlebensprozentsatz des Teilversuches und n_i die Zahl der Versuchstiere ist. Die Gewichte der einzelnen Streuungen σ_{B_i} können wieder wie oben als gleich groß angesehen werden. Dann berechnet sich die Streuung für sämtliche 100 Teilversuche einfach als arithmetisches Mittel aller Einzelstreuungen. Der mittlere Fehler der Einzelstreuung ist

s. oben!

$$m_{\sigma_{B_i}} = \frac{\sigma_{B_i}}{\sqrt{2\, n_i}}$$

Aus der Formel für den mittleren Fehler eines Mittelwertes (vgl. S. 73) ergibt sich als mittlerer Fehler der mittleren Streuung 9,2:

$$m_{\sigma_B} = \frac{1}{\sqrt{\Sigma\left[\frac{1}{m^2_{\sigma_{B_i}}}\right]}} = \frac{1}{\sqrt{\Sigma\left[\frac{2\, n_i}{\sigma^2_{B_i}}\right]}} \approx \frac{\sigma_B}{\sqrt{2 \cdot \Sigma[n_i]}} = \frac{9{,}21}{\sqrt{4680}} = 0{,}135.$$

Die auf Grund des BERNOULLIschen Theorems berechnete Streuung stimmt also aufs beste überein mit der tatsächlich vorhandenen Streuung. Von einer übernormalen Streuung der Teilversuche kann keine Rede sein.

Gerade die angeblich abnorm hohen Streuungen der Resultate der Teilversuche werden in dem dänischen „Bericht" [(1), S. 5] mit als wichtigstes Argument gegen die Anwendbarkeit des BERNOULLIschen Theorems angeführt. Die Tatsache, daß die mehrfach erwähnte große Differenz der beiden Teilergebnisse mit den Prozentsätzen 81 und 38 mehr als dreimal so groß ist wie ihr mittlerer Fehler (Diff. = 43 ± 13,6 %), wird als Beweis für das Vorhandensein einer übernormalen Streuung angeführt. Außerdem wird noch auf eine andere Weise eine übernormale Streuung der Versuchsresultate nachzuweisen gesucht (S. 5f.). Obwohl keinerlei Anhalt für die Annahme vorliegt, daß die verschiedenen Teilserien unter verschiedenen Bedingungen gestanden hätten, werden aus einzelnen Versuchen willkürlich Gruppen von Tieren herausgegriffen und neu gruppiert, andere weniger günstig erscheinende Gruppen ganz oder teilweise

*) Näherungsformel für großes s, denn $(2\chi^2_{[s-1]})^{1/2} - (2s-3)^{1/2}$ ist asymptotisch normal verteilt mit Mittel 0 und Streuung 1.

ausgelassen und auf diese Weise abnorm hohe Unterschiede der Ueberlebensprozentsätze zwischen den willkürlich geschaffenen Gruppen konstruiert. Daß ein solches Verfahren nicht zulässig ist, ist leicht einzusehen, wenn man bedenkt, daß man dann schließlich auch alle Ueberlebenden der einen Versuchsreihe für sich zu einer Gruppe zusammenfassen und sie den gestorbenen Tieren der anderen Versuchsreihe gegenüberstellen dürfte. Das gäbe eine Differenz von 100 Proz. mit einem mittleren Fehler 0! Ein solches Verfahren widerspricht natürlich dem Sinne der Wahrscheinlichkeitsrechnung.

Es pflegt allgemein bei statistischen Auswertungen viel zu wenig beachtet zu werden, daß auch geringe Wahrscheinlichkeiten nicht als Unmöglichkeiten angesehen werden dürfen, wenigstens solange es sich nicht um sehr große Zahlen handelt, wie das für viele exakten, aber doch letzten Endes statistischen Gesetze der Physik gilt. Während bei allen Versuchen seither die Ueberlebensprozentsätze den erwähnten normalen Schwankungen unterworfen waren, zeigten plötzlich einige Versuche — es handelt sich um die Versuche vom 21. 8./18. 9. 34[1]) — auffallend geringe Streuungen (Tabelle 2). Bei diesen Versuchen liegen sämtliche Teilergebnisse innerhalb der Grenzen des mittleren (BERNOULLI-) Fehlers für 25 Tiere. Die tatsächliche Streuung um den Mittelwert ist nur halb so groß wie die berechnete. Selbstverständlich können solche scheinbar unternormalen Streuungen nur als Zufall gedeutet werden, ebenso wie die beiden wiederholt erwähnten starken Abweichungen.

Tabelle 2.

Serie	Impfstoff F 47			Impfstoff F 191		
	Überlebende	D	D^2	Überlebende	D	D^2
1	10/ 24 = 42 %	− 8	64	21/ 25 = 84 %	+ 1	1
2	14/ 25 = 56 %	+ 6	36	21/ 24 = 88 %	+ 5	25
3	12/ 25 = 48 %	− 2	4	20/ 25 = 80 %	− 3	9
4	14/ 25 = 56 %	+ 6	36	20/ 25 = 80 %	− 3	9
5	12/ 25 = 48 %	− 2	4	21/ 25 = 84 %	+ 1	1
Mittel	62/124 = 50 %	$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma[D^2]}{s}} = \pm 5{,}4$ $\sigma_B = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} = \pm 10$		103/124 = 83 %	$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma[D^2]}{s}} = \pm 3$ $\sigma_B = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} = \pm 7{,}5$	

Eine auf Grund der Verteilung des Tiermaterials auf die einzelnen Versuche zu erwartende übernormale Streuung ist für die Teilversuche mit 20—25 Tieren nicht festzustellen. Damit ist aber nicht bewiesen, daß eine solche Uebernormalität auch für die großen Versuche mit 100—125 Tieren nicht in Frage kommt bzw. vernachlässigt werden darf. Es ist leicht einzusehen, daß die Uebernormalität um so größer ist, je mehr Tiere des Vorrats N auf eine Versuchsserie entfallen, denn dann ist N—n relativ klein und infolgedessen der Faktor $\sqrt{\frac{N}{N-n}}$, der als Maß für die Uebernormalität betrachtet werden kann, relativ groß. Da aber der Faktor allerhöchstens den Wert 1,4 erreichen kann (vgl. S. 60), für gewöhnlich aber kleiner ist, so kann das BERNOULLIsche Theorem auch auf die großen Versuche ohne Bedenken angewandt werden.

s. S. 58

1) s. Tabelle 12 der vorangehenden Arbeit (S. 27).

Das Auftreten einer übernormalen Streuung der beschriebenen Art läßt sich auf sehr einfache Weise vermeiden, wenn man nämlich die nacheinander herausgegriffenen Tiere nach folgendem Schema[1]) auf die verschiedenen Versuchsgruppen verteilt:

1. Versuch 2. Versuch 3. Versuch 4. Versuch
1. Tier --- 2. Tier --- 3. Tier --- 4. Tier
/
8. „ --- 7. „ --- 6. „ --- 5. „
/
9. „ --- 10. „ --- 11. „ --- 12. „
/
(usw.) --- 13. „

Da sich die Wahrscheinlichkeit p′ des Ueberlebens von Ziehung zu Ziehung nur wenig ändert, so wird auch die Gesamtheit der Wahrscheinlichkeiten für alle Versuche annähernd gleich sein. Durch die Umkehrung der Reihenfolge wird erreicht, daß eventuell vorhandene Unterschiede in der Immunisierbarkeit zwischen den zuerst und den zuletzt herausgegriffenen Tieren (vgl. S. 59) sich ausgleichen.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse mit Hilfe einer Kennlinie (s. S. 69) kommen nur die Differenzen der Ueberlebensprozentsätze zweier Vergleichsversuche in Frage. Selbstverständlich sind auch diese Differenzen der Fehlerstreuung unterworfen, und gerade für sie gilt ein Urnenschema, bei dem die gezogenen Kugeln nicht wieder in die Urnen zurückgelegt werden. Außerdem kann hier aber auch die Heterogenität des Tiermaterials eine übernormale Streuung der Differenzen zur Folge haben, die um so größer sein kann, je größer der Unterschied in der Wirksamkeit der zu vergleichenden Dosen ist (s. S 71).

In Tabelle 3 sind die bei den sechs Parallelversuchen von Jan./Febr. bis Nov./Dez. 1933 (Tabelle 5 der vorangehenden Arbeit) aufgetretenen Differenzen der Ueberlebensprozentsätze mit ihren mittleren Fehlern zusammengestellt. Das arithmetische Mittel dieser Differenzen ist $4{,}4 \pm 2{,}9$[2]), mit einer Streuung von $6{,}4 \pm 1{,}8$. Das Mittel der berechneten (Bernoulli-) Streuungen ist $6{,}2 \pm 0{,}2$[3]). Diese Berechnung gilt selbstverständlich nur

1) Dieses Verteilungsschema wird seit Dezember 1934 in Frankfurt a. M. angewandt.

2) Berechnung des mittleren Fehlers nach der Formel:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{s-1}} = \frac{6{,}4}{\sqrt{5}} = 2{,}9$$

3) Die Berechnung des mittleren Fehlers der mittleren Streuung nach der Formel

$$m_{\sigma_B} \approx \frac{\sigma_B}{\sqrt{2\,\Sigma[n_i]}}$$

(vgl. S. 62) ist hier etwas umständlich: Für den einzelnen Versuch ist

$$\sigma_{B_{Diff.}} = \sqrt{\sigma^2_{B_1} + \sigma^2_{B_2}} = \sqrt{\frac{p_1 \cdot q_1}{n_1} + \frac{p_2 \cdot q_2}{n_2}}$$

wobei n_1 und n_2 etwa gleich groß und deshalb durch n_i ersetzt werden können. Dann ist $2\,\Sigma[n_i] = \Sigma[n_1 + n_2]$, also gleich der Gesamtzahl der Versuchstiere, wobei allerdings von den beiden Maiversuchen mit L 31 nur einer berücksichtigt werden darf. Der mittlere Fehler des Mittelwertes der sechs Streuungen ist dann

$$m_{\sigma_B} \approx \frac{6{,}2}{\sqrt{1379}} \approx 0{,}2.$$

unter der Voraussetzung, daß die Streuungen rein zufällig, d. h. daß die Impfstoffe F 47 und L 31 ganz gleichwertig seien. Auch hier stimmen tatsächlich vorhandene und theoretisch zu erwartende Streuung sehr gut überein. Weder der Einfluß des Urnenschemas noch der des Tiermaterials macht sich bemerkbar. Daß auch die Heterogenität des Tiermaterials keinen Einfluß auf die Streuung ausübt, kann darin seinen Grund haben, daß die von beiden Impfstoffen angewandten Dosen (je 20 L_f) in ihrer antigenen Wirksamkeit nahezu übereinstimmen.

Tabelle 3.

	L 31	L 47	Diff. $\pm \sigma_{B\ Diff.}$	D	D_2
Januar	23/107 = 27,1 %	37/102 = 36,3 %	$9{,}2 \pm 6{,}4$	+ 4,8	23,0
März	43/113 = 38,1 %	58/118 = 49,1 %	$11{,}0 \pm 6{,}5$	+ 6,6	43,6
Mai	65/107 = 60,7 %	57/103 = 55,3 %	$-5{,}5 \pm 5{,}9$	— 9,9	98,0
	67/110 = 60,9 %				
Juli	80/120 = 66,7 %	84/121 = 69,4 %	$2{,}7 \pm 6{,}0$	— 1,7	2,9
September	81/119 = 68,0 %	81/122 = 66,4 %	$-1{,}6 \pm 6{,}1$	— 6,0	36,0
November	72/123 = 58,5 %	86/124 = 69,3 %	$10{,}8 \pm 6{,}1$	+ 6,4	41,4
		Mittlere Differenz	$= 4{,}4 \pm 2{,}9$	$\Sigma[D^2] = 244{,}5$	

$$\sigma_{Diff.} = \sqrt{\frac{\Sigma[D^2]}{s}} = \sqrt{\frac{244{,}5}{6}} = 6{,}4 \pm 1{,}8 \qquad \left(m_\sigma = \frac{\sigma}{\sqrt{2s}} = \frac{6{,}4}{\sqrt{12}} = 1{,}84\right)$$

Anstatt das arithmetische Mittel aus den sechs einzelnen Versuchen zu nehmen, kann man auch alle sechs Versuche zu einem Versuch zusammenfassen: Da bis auf den für L 31 doppelt ausgeführten Maiversuch die Parallelversuche alle mit fast gleichen Tierzahlen angestellt sind, so muß auch die Zusammensetzung des vereinigten Materials der Versuche mit L 31 wieder die gleiche sein wie die der Versuche mit F 47. Wenn von den beiden Maiversuchen mit L 31 nur der mit 107 Tieren berücksichtigt wird, ergeben sich folgende Zahlen:

L 31: 370/689 = $53{,}7 \pm 1{,}9$ Proz. Ueberlebende,
F 47: 403/690 = $58{,}4 \pm 1{,}87$ Proz. Ueberlebende.

Die Differenz zwischen beiden Werten ist $4{,}7 \pm 2{,}7$.

Dieser Wert ist etwas genauer als der Wert $4{,}4 \pm 2{,}9$, weil alle Versuchstiere gleichmäßig berücksichtigt sind. Bei dem einfachen arithmetischen Mittel 4,4 sind die Gewichte der einzelnen Versuche nicht in die Rechnung einbezogen.

Die Differenz 4,7 ist gleich dem 1,7fachen ihres mittleren Fehlers; sie liegt also im Bereich des Zufälligen. Aber selbstverständlich braucht nicht angenommen zu werden, daß zwischen den beiden Impfstoffen überhaupt kein Unterschied in der antigenen Wirksamkeit besteht. Die Methode der Bestimmung des Unterschiedes in der Immunisierungskraft, der einer bestimmten Differenz der Ueberlebensprozentsätze entspricht, wird in den folgenden Abschnitten behandelt. Im vorliegenden Zusammenhang kam es nur darauf an, zu zeigen, daß man das Theorem von Bernoulli bei der Auswertung der Resultate anwenden kann, ohne große Fehler zu begehen.

2. Die Methoden der Wertbestimmung von Antigenen.

Die exakte Messung des Schutzwertes von Antigenen war noch bis vor kurzem ein Problem, das allen Lösungsversuchen unüberwindlich scheinende Hindernisse entgegensetzte. Die Ursache war die ungemein starke Variabilität des Versuchsmaterials — Meerschweinchen oder Kaninchen — in Bezug auf die Immunisierbarkeit. Die Dosis, die 80 Proz. der Tiere schützt, beträgt z. B. etwa das 20fache von der Dosis, bei der 20 Proz. der Tiere am Leben bleiben. Zur Erzielung einer hinreichenden Genauigkeit sind infolgedessen außerordentlich hohe Tierzahlen erforderlich. Dazu kommt, daß infolge der starken zeitlichen Schwankungen der Immunisierbarkeit jeder Versuch doppelt ausgeführt werden muß („allgemeines Standardprinzip"; s. Fußnote 1 zu S. 15; vergl, S. 57). Das in der Serologie übliche Verfahren, zwei Versuchsreihen mit prozentual abgestuften Dosen zu vergleichen und daraus die Dosen gleicher Wirksamkeit zu ermitteln, käme wegen der für jedes der zahlreichen Kollektive erforderlichen hohen Tierzahlen nicht in Frage. Auch die für die Auswertung pharmakologischer Präparate sehr wertvolle Methode von Behrens (7) und Kärber (8), die ebenfalls mit mehreren, aber verhältnismäßig kleinen Kollektiven arbeiten und aus einer Reihe von Dosen verschiedener Wirksamkeit eine Dosis mittlerer Wirksamkeit errechnen, scheidet hier aus; denn auch sie würde, um bei der großen Streuung des Versuchsmaterials eine genügende Genauigkeit zu erzielen, sehr hohe Tierzahlen erfordern. Bewährt hat sich bis jetzt nur die auf dem Ehrlichschen Standardprinzip beruhende Methode der Versuchsauswertung mit Hilfe eines Kurvendiagramms („characteristic curve", Wirkungskurve), die vor allem von Trevan (9, 10) ausgearbeitet worden ist. Ein mathematisch exakteres Auswertungsverfahren dieser Art hat neuerdings Gaddum (11) angegeben. Im allgemeinen genügt jedoch das einfachere Verfahren von Trevan vollkommen.

a) Die Trevansche Auswertungsmethode.

Die Versuchsanordnung ist die seit der Einführung des Standardprinzips durch Ehrlich (6) übliche, nur daß anstelle einer größeren Anzahl von Versuchen jeweils nur zwei ausgeführt werden, durch die der Prozentsatz der gegen eine bestimmte Prüfungsdosis eines Testgiftes geschützten Tiere für die zu vergleichenden Dosen des Standardpräparates und des unbekannten Impfstoffes ermittelt wird. Die ungefähre Größe der erforderlichen Antigendosen muß durch Vorversuche festgestellt werden, denn es dürfen ja nicht alle Tiere sterben oder am Leben bleiben.

Zur Konstruktion des zur Auswertung der Versuche erforderlichen Diagramms, der Wirkungskurve, sind besonders sorgfältig ausgeführte Versuchsreihen notwendig. Das Diagramm gilt für jedes Präparat des betreffenden Impfstoffes und braucht deshalb nur einmal ermittelt zu werden[1]).

1) Vergl. jedoch S. 20 der vorangehenden Arbeit.

Zur Bestimmung einzelner Punkte der Kurve braucht man die Prozentsätze der durch bestimmte Antigendosen gegen ein und dieselbe Dosis des Testgiftes geschützten Tiere. Diese Prozentsätze werden als Ordinaten, die Logarithmen der Antigendosen als Abszissen aufgetragen. Durch die so festgelegten Punkte läßt sich eine mehr oder weniger *S*-förmige Kurve legen, die um so symmetrischer ist, je mehr Tiere für die Bestimmung jedes Punktes benützt wurden. Diese *S*-förmige Kurve nähert sich einer der dem Gaussschen Fehlergesetz entsprechenden normalen Summenkurven, die durch die Gleichung

$$p' = \frac{h}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_{-\infty}^{x} e^{-h^2x^2} dx$$

gegeben sind.

p' ist der Bruchteil der Tiere, der durch Dosen kleiner oder gleich der angewandten Antigendosis ($x = \log.$ Dosis) geschützt wird. h ist eine den Steilheitsgrad der Kurve bestimmende Konstante. Im Bernoullischen Theorem ist der Parameter $h = 1/\mu \cdot \sqrt{2}$, wobei μ den absoluten Betrag der Streuung in Einheiten x bedeutet.

Um den Prozentsatz der Tiere zu erhalten, der von einer bestimmten Antigendosis gerade geschützt wird, braucht man nur den Prozentsatz der bereits von der nächst kleineren Dosis geschützten Tiere abzuzählen[1]). Auf diese Weise kommt man zu einer Kurve, die eine Gausssche Verteilungskurve

$$\frac{dp'}{dx} = \frac{h}{\sqrt{\pi}} \cdot e^{-h^2x^2}$$

annähert. Diese Kurve gibt die Verteilung des Tiermaterials nach der Immunisierbarkeit der Tiere, und zwar stehen links die Tiere mit der höchsten Immunisierbarkeit, denn sie werden bereits durch kleine Antigendosen gegen die Dosis des Testgiftes geschützt, während die am weitesten rechts stehenden Tiere erst durch die stärksten Antigendosen geschützt werden.

Die Verwendung eines logarithmischen Abszissenmaßstabes bietet verschiedene Vorteile für die Messung. Die Wirkungskurven, die man erhält, wenn man als Abszissen die Dosen selbst wählt [Kisskalt (20), Shackell (12), Trevan (9)], sind keine normalen Aufzählungskurven; sie flachen sich mit steigenden Dosen mehr und mehr ab (Fig. 2). Diese Abweichung wird um so stärker, je größer die Streuung (Variabilität) des Versuchsmaterials ist. Bei der überaus großen Streuung des Meerschweinchenmaterials nach der Immunisierbarkeit ist die Abweichung bereits so stark, daß die *S*-Form der Kurve kaum mehr erkennbar ist. Wiechowski (13) hat darauf hingewiesen, daß man, um „typische Variationskurven" zu erhalten, die, Dosenabstufung in einer geometrischen Reihe vornehmen muß. Später

1) Vgl. Kisskalt (20), S. 54. Kisskalt hat meines Wissens zuerst (1915) erkannt, daß die Wirkungskurven integrierte Häufigkeitsverteilungskurven sind.

haben Gray, Trevan, Bainbridge und Attwood (14) aus der Gestalt ihrer Wirkungskurven für pharmakologische Präparate geschlossen, daß die Tiere nicht nach der wirksamen Dosis selbst, sondern nach dem Logarithmus der Dosis normal verteilt sind. Sie berechnen auf Grund ihres Schlusses die Standardabweichung des Logarithmus der Dosis als die halbe Differenz der Logarithmen der beiden Dosen, durch die 16 bzw. 84 % der Tiere getötet werden, denn bei einer normalen Verteilung befinden sich etwa 32 (genauer 31,73) Proz. der Varianten außerhalb der Grenzen der Standardabweichung $\pm \mu$. Gaddum (11) bringt in seiner sehr gründlichen Arbeit eine Reihe von Belegen für die Richtigkeit der Annahme Wiechowskis und Trevans und seiner Mitarbeiter.

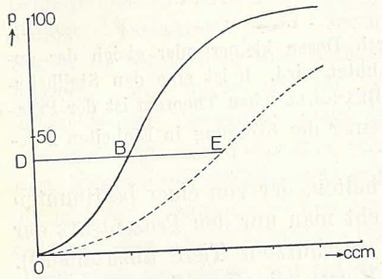


Fig. 2.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines logarithmischen Dosenmaßstabes ist, daß gleiche prozentuale Unterschiede in der Größe zweier Dosen durch gleiche Strecken auf der Abszisse dargestellt werden, denn $\log. A_2/A_1 = \log A_2 - \log. A_1$. Noch wichtiger aber ist, daß für ein bestimmtes Tiermaterial die Kurven verschiedenwertiger Präparate parallel verlaufen [Trevan 1929 (10), Gaddum 1933 (11)]. Die mehr oder weniger große Steilheit der Kurve hängt von dem prozentualen Unterschied der Grenzdosen ab, bei denen alle Tiere am Leben bleiben oder alle Tiere sterben. Die Steilheit der Kurve gibt also ein Maß für die Größe der Streuung des verwendeten Versuchsmaterials.

Wird als Abszisse statt des Logarithmus die Antigendosis selber aufgetragen, etwa in ccm, dann werden die Kurven um so flacher, je geringer die Wirksamkeit des Impfstoffes ist, wie man sich leicht an der der Gaddumschen Arbeit (11) entnommenen Skizze (Fig. 2) klar machen kann. Die beiden Kurven stellen die Wirkungskurven von Präparaten dar, die sich in ihrer Wirksamkeit wie 2 : 1 verhalten. Man kann sich ein solches Verhältnis einfach durch Verdünnung eines Teiles eines Präparates auf das doppelte Volumen herstellen. Da von dem verdünnten Teile gerade die doppelte Dosis erforderlich ist, um den gleichen Prozentsatz an geschützten Tieren zu erhalten, so muß jede Abszisse DE der punktierten Kurve doppelt so groß sein, wie die entsprechende Abszisse DB der ausgezogenen Kurve. Es wäre falsch, aus dem Steilheitsgrad einer solchen Kurve auf die Größe der Streuung des Tiermaterials schließen zu wollen, denn beide Kurven gelten ja für das gleiche Tiermaterial.

Da die theoretische Summenkurve in dem Bereich zwischen $p = 20$ und $p = 80$ (%) fast geradlinig verläuft, pflegt man anstatt der *S*-Kurven einfach gerade Linien zu zeichnen. Im Verhältnis zu dem Fehler der Ueberlebensprozentsätze ist der Fehler, der dadurch entsteht, sehr gering, auch wenn man sich nicht auf die nächste Umgebung des Mittelpunktes ($p = 50$ %) beschränkt.

Für den geraden Bereich der Wirkungskurve kann als Maß der Steilheit das Steigungsmaß

$$\alpha = \frac{dp}{dx}$$

der sich der Kurve am besten anpassenden Geraden definiert werden.

Die Auswertung einer Messung mit Hilfe der Trevanschen Kennlinie gestaltet sich nun folgendermaßen: Der Versuch liefert die beiden Punkte $P_1\{p_1, x_1$ für die Dosis A_1 des Standardimpfstoffes und $P_2\{p_2, x_2$ für die Dosis A_2 des zu prüfenden Impfstoffes. Durch beide Punkte denkt man sich Parallelen zu der Kennlinie gezogen (Fig. 3). Der horizontale Abstand M der beiden Parallelen ist der Logarithmus des Verhältnisses zweier Dosen A_1 und A_2', die den gleichen Prozentsatz an geschützten Tieren ergeben, und damit des reziproken Verhältnisses der Wirksamkeit der beiden Impfstoffe.

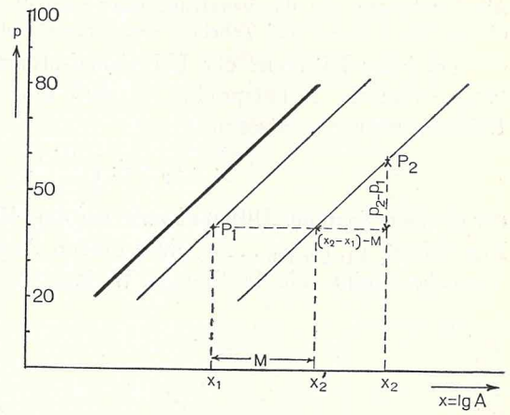


Fig 3..

Wie aus Figur 3 hervorgeht, ist

$$M = \frac{p_1 - p_2}{\alpha} - (x_1 - x_2).$$

Noch bequemer ist die Auswertung, wenn die Antigendosis in definierten Einheiten des Standards angegeben wird. So ist als „Schutzeinheit" (SE) 1 ccm des Standardpräparates F 47, das als Urstandard der Diphtherieantigene zu betrachten ist, definiert. Ist A_1 die Anzahl der Schutzeinheiten der Standarddosis, A_2 die gesuchte Anzahl der Schutzeinheiten der angewandten Dosis des zu prüfenden Impfstoffes, dann gibt der Quotient A_2/A_1 das Verhältnis R der Wirksamkeiten beider Impfstoffdosen an. Den Logarithmus dieses Verhältnisses für die durch den Versuch gefundene Differenz der Ueberlebensprozentsätze findet man mit Hilfe der Kennlinie (Fig. 4):

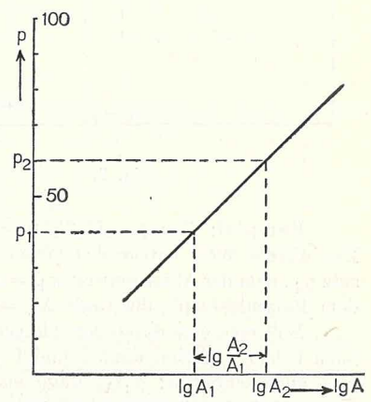


Fig. 4.

$$\log R = x_2 - x_1 = \frac{p_2 - p_1}{\alpha}.$$

Daraus folgt:

$$\log A_2 = x_2 = \frac{p_2 - p_1}{\alpha} + x_1 = \log R + \log A_1$$

oder:

$$A_2 = R \cdot A_1.$$

Vorteilhaft ist die Verwendung von Koordinatenpapier mit logarithmischer Abszissenteilung, die die Benutzung einer Logarithmentafel überflüssig macht (vgl. die Figuren 8 und 9 und Tabelle 8 der vorangehenden Arbeit, S. 19).

Da jeder Differenz der Ueberlebensprozentsätze ein bestimmtes Wirkungsverhältnis R entspricht, so muß auch dem mittleren Fehler des Ueberlebensprozentsatzes p

$$\sigma_p = \pm \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}},$$

der die zu erwartende Differenz zwischen dem Mittelwert p_o und den einzelnen Ergebnissen $p_1, p_2, p_3, \ldots p_s$ einer großen Anzahl gleichzeitig ausgeführter Versuche angibt, ein bestimmtes Wirkungsverhältnis entsprechen. Es sei $p_o + \sigma_p = p_+$ und $p_o - \sigma_p = p_-$ (Fig. 5). Dem mittleren Fehler $\sigma_p = p_+ - p_o = p_o - p_-$ entspricht auf der Abszisse die Differenz $\sigma_x = x_+ - x_o = x_o - x_-$. Da $x = \log A$, so folgt: $\sigma_x = \log A_+/A_o = \log A_o/A_- = \sigma_{\log A_o}$. Ist α das Steigungsmaß der Kennlinie, dann ist der mittlere Fehler des Logarithmus der Dosis gegeben durch die Beziehung

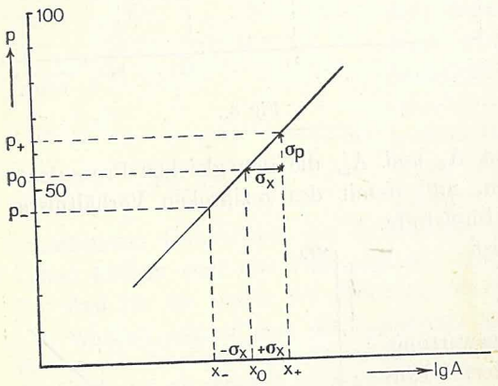


Fig. 5.

$$\sigma_x = \frac{\sigma_p}{\alpha}$$

Beispiel: Für $p = 50\,\%$, $n = 100$ und $\alpha = 50$ ist $\sigma_p = \pm 5\,\%$ und $\sigma_x = 0{,}1$. Das diesem Wert entsprechende Wirkungsverhältnis A_+/A_o ist 1,26. Dem Prozentsatz p_+, dem der Abszissenwert $x_+ = x_o + \sigma_x$ zukommt, würde die Dosis $A_+ = A_o \cdot 1{,}26$, dem Prozentsatz p_- die Dosis $A_- = A_o/1{,}26$ entsprechen.

Will man eine durch den Tierversuch gemessene Antigendosis A mit ihrem mittleren Fehler angeben, dann schreibt man am besten: $\log A \pm \sigma_{\log A}$. Dafür könnte man auch schreiben: $A \overset{\times}{:} f_A$, wenn man den Faktor A_+/A_o mit f_A bezeichnet. Dann hat man aber zu beachten, daß dem n-fachen Mittelfehler des Logarithmus der Dosis der Wert f_A^n entspricht ($n \cdot \sigma_x = n \cdot \log f_A = \log f_A^n$).

In ganz analoger Weise entspricht dem Mittelfehler der Differenz zweier Ueberlebensprozentsätze p_1 und p_2 ein mittlerer Fehler der Differenz der zu p_1 und p_2 gehörigen Abszissenwerte x_1 und x_2. Der mittlere Fehler der Differenz $p_1 - p_2$ ist

$$\sigma_{p\,\mathrm{Diff}} = \sqrt{\frac{p_1 \cdot q_1}{n_1} + \frac{p_2 \cdot q_2}{n_2}}.$$

Der mittlere Fehler der Differenz $x_1 - x_2$ ist dann

$$\sigma_{x\,\mathrm{Diff.}} = \sigma_{\log R} = \frac{1}{\alpha} \cdot \sqrt{\frac{p_1 \cdot q_1}{n_1} + \frac{p_2 \cdot q_2}{n_2}}.$$

Für $p_1 = p_2$ und $n_1 = n_2$ geht dieser Ausdruck über in

$$\sigma_{\log R} = \frac{1}{\alpha} \cdot \sqrt{\frac{2pq}{n}}.$$

Diese Formel gilt angenähert auch für nicht zu große Unterschiede zwischen p_1 und p_2 bzw. n_1 und n_2 [Trevan (9)].

Es ist vorteilhaft, beide Versuchsserien möglichst gleich groß zu machen, denn für $n_1 = n_2$ wird der mittlere Fehler der Differenz zu einem Minimum:

Setzt man $n_1 + n_2 = 2n$ und $\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} = \frac{1}{n+\delta} + \frac{1}{n-\delta} = \frac{2n}{n^2 - \delta^2}$, dann ist für $n_1 = n_2 = n$ $\delta = 0$ und damit $1/n_1 + 1/n_2 = 2n/n^2 - \delta^2$ ein Minimum.

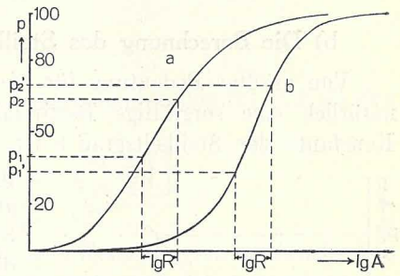


Fig. 6.

Beispiel: Die Dosis des Standardimpfstoffes enthalte A_1 Schutzeinheiten. Es soll durch den Tierversuch die Anzahl der Schutzeinheiten (A_2) einer bestimmten Dosis eines unbekannten Impfstoffes ermittelt werden. Der Ueberlebensprozentsatz des Standardversuches sei p_1, der des unbekannten Impfstoffes p_2, die Anzahl n der für jeden Versuch benützten Tiere sei 100, das Steigungsmaß α der Kennlinie 50.

1. $p_1 = 50\,\%$, $p_2 = 70\,\%$

$$\log R = x_2 - x_1 = \frac{p_2 - p_1}{\alpha}$$

$$\log R = 0{,}4 \pm 0{,}136 \quad \left(\sigma_{\log R} = \frac{\sqrt{46}}{50} = 0{,}136\right)$$

$$R = 2{,}51 \overset{\times}{:} 1{,}37;$$

$$A_2 = A_1 \cdot R = A_1 \cdot 2{,}51 \overset{\times}{:} 1{,}37.$$

2. $p_1 = p_2 = 50\,\%$

$$\log R = 0 \pm 0{,}14$$

$$R = 1 \overset{\times}{:} 1{,}385 \qquad \left(\sigma_{\log R} = \frac{1}{50} \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot 2500}{100}} = 0{,}1414\right)$$

$$A_2 = A_1 \overset{\times}{:} 1{,}385.$$

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Trevanschen Methode ist die Verwendung eines in seiner Zusammensetzung stets gleichbleibenden Versuchsmaterials, denn nur dann kann die Wirkungskurve in ihrer Gestalt unverändert bleiben. Ist das aber nicht der Fall, dann muß die Bestimmung von R, des Verhältnisses der Wirksamkeiten der beiden zu vergleichenden Dosen, fehlerhaft werden. Es wurde bereits im ersten Abschnitt (S. 57 und 64) darauf hingewiesen, daß unter diesen Umständen eine übernormale Streuung der Versuchsergebnisse, d. h. der Differenzen der Ueberlebensprozentsätze der beiden Vergleichsversuche zu erwarten ist. Das sei an Figur 6 erläutert: Die mit A_1 SE des Standardpräparates und mit einer Dosis des in seiner Wirksamkeit unbekannten Präparates, die A_2 SE ent-

halten möge, ausgeführten Parallelversuche mögen die Ueberlebensprozentsätze p_1 und p_2 ergeben. Die Wirkungskurve a liefert für die Differenz $p_2 - p_1$ das Wirkungsverhältnis R und damit $A_2 = R \cdot A_1$ SE. Wird aber der Versuch mit einem in seiner Zusammensetzung der Wirkungskurve b entsprechenden Tiermaterial ausgeführt, dann entspricht dem gleichen Wirkungsverhältnis R eine größere Differenz $p'_2 - p'_1$ der Ueberlebensprozentsätze. Für ein und dasselbe Wirkungsverhältnis R wird man also bei Verwendung heterogenen Tiermaterials verschiedene Differenzen der Ueberlebensprozentsätze zu erwarten haben. Diese Streuung der Differenzen kommt noch zu der Fehlerstreuung (S. 55) hinzu, so daß eine übernormale Streuung der Versuchsergebnisse resultieren muß.

b) Die Berechnung des Steilheitsgrades der Wirkungskurve.

Von größter Bedeutung für die TREVANsche Auswertungsmethode ist natürlich eine sorgfältige Bestimmung der Kennlinie, deren wichtigste Konstante der Steilheitsgrad α ist. Aus den beobachteten Werten $p_1, x_1, p_2, x_2, p_3, x_3, \ldots p_i, x_i, \ldots$ läßt sich das arithmetische Mittel $\bar{p}, \bar{x}$ berechnen. [Die Symbole sind möglichst im Anschluß an die Arbeit von GADDUM (11) gewählt.] Das Steigungsmaß α ist dann gegeben durch

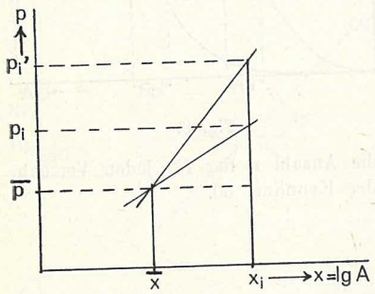


Fig. 7.

$$\alpha = \frac{p - \bar{p}}{x - \bar{x}}. \qquad (1)$$

Da den Beobachtungen p_i, x_i verschiedenes Gewicht beizulegen ist, müssen $\bar{p}$ und $\bar{x}$ als „gewogenes Mittel" der beobachteten Werte p_i, x_i bestimmt werden. Nach CZUBER [(2) S. 322, Nr. 188] ist als Gewicht die Größe $h^2 = 1/2\sigma_p^2$ oder $1/\sigma_p^2$ anzusehen — konstante Faktoren sind ohne Bedeutung —, weil $h^2 = \frac{p \cdot q}{n}$ das Präzisionsmaß des betreffenden Versuches [vgl. (2) S. 150, Nr. 101] ist. Setzt man $1/pq = B$ („Gewichtsfaktor" nach GADDUM), dann ist das Gewicht des betreffenden Versuches $Bn = 1/\sigma_p^2$. $\bar{x}$ und $\bar{p}$ sind dann gegeben durch

$$\bar{x} = \frac{\Sigma[B_i n_i x_i]}{\Sigma[B_i n_i]} \; (2) \text{ und } \bar{p} = \frac{\Sigma[B_i n_i p_i]}{\Sigma[B_i n_i]} \; (3)$$

[vgl. CZUBER (2) S. 323, Nr. 188]. Das Steigungsmaß α kann man mit GADDUM (11) als gewogenes Mittel aus den Werten $\alpha_1 = \frac{p_1 - \bar{p}}{x_1 - \bar{x}}$, $\alpha_2 = \frac{p_2 - \bar{p}}{x_2 - \bar{x}}$ usw. auffassen. Als Gewicht der „Beobachtung" α_i ergibt sich der Wert $B_i\, n_i\, (x_i - \bar{x})^2$ durch folgende Ueberlegung: Es sei x_i, p_i (Fig. 7) der beobachtete und x_i, p_i' der wahre Wert eines Versuchsergebnisses. Dann ist der wahre Wert für α:

$$\frac{p_i' - \bar{p}}{x_i - \bar{x}} = \frac{(p_i - \bar{p}) + (p_i' - p_i)}{x_i - \bar{x}}$$

$$\alpha = \alpha_i + \frac{p_i' - p_i}{x_i - \bar{x}}.$$

Das letzte Glied stellt die Abweichung des „beobachteten" α_i vom wahren Wert α dar. Ist $p_i' - p_i$ der mittlere Fehler des beobachteten Wertes p_i, also σ_{p_i}, dann ist $\frac{p_i' - p_i}{x_i - \bar{x}}$ der mittlere Fehler des Wertes α_i:

$$\sigma_{\alpha_i} = \frac{\sigma_{p_i}}{x_i - \bar{x}}.$$

Das Gewicht der Beobachtung α_i ist

$$\frac{1}{\sigma^2_{\alpha_i}} = B_i n_i\, (x_i - \bar{x})^2. \qquad (4)$$

Als gewogenes Mittel der Werte α_i erhält man analog (2) und (3) den Ausdruck

$$\alpha = \frac{\Sigma\left[B_i n_i (x_i - \bar{x})^2 \cdot \left(\frac{p_i - \bar{p}}{x_i - \bar{x}}\right)\right]}{\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})^2]}.$$

Darin ist $B_i n_i (x_i - \bar{x})$ die Abweichung der Werte x_i vom arithmetischen Mittel $\bar{x}$. Da infolgedessen $\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})] = 0$, und da $\bar{p}$ konstant ist, so wird

$$\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x}) \cdot \bar{p}] = \bar{p} \cdot \Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})] = 0$$

und

$$\alpha = \frac{\Sigma[B_i n_i p_i (x_i - \bar{x})]}{\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})^2]}. \qquad (5)$$

Der mittlere Fehler von α berechnet sich aus der Formel für die Standardabweichung eines gewogenen Mittels:

$$\sigma_\alpha = \frac{\sqrt{\sigma^2_{\alpha_1} \cdot g_1^2 + \sigma^2_{\alpha_2} \cdot g_2^2 + \ldots}}{g_1 + g_2 + \ldots} = \frac{\sqrt{\Sigma[\sigma^2_{\alpha_i} \cdot g_i^2]}}{\Sigma[g_i]}$$

worin $g_1, g_2, \ldots g_i \ldots$ die Gewichte der Beobachtungen $\alpha_1, \alpha_2, \ldots \alpha_i \ldots$ sind. Aus $g_i = 1/\sigma^2_{\alpha_i}$ folgt

$$\sigma^2_\alpha = \frac{\frac{1}{\sigma^2_{\alpha_1}} + \frac{1}{\sigma^2_{\alpha_2}} + \ldots}{\left(\frac{1}{\sigma^2_{\alpha_1}} + \frac{1}{\sigma^2_{\alpha_2}} + \ldots\right)^2} = \cancel{\frac{1}{\Sigma[\sigma^2_{\alpha_i}]}} = \frac{1}{\Sigma\left[\frac{1}{\sigma^2_{\alpha_i}}\right]}$$

Demnach ist

$$\sigma_\alpha = \frac{1}{\sqrt{\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})^2]}}. \qquad (6)$$

Für die Frankfurter Versuche vom Juli 1933 (Tabelle 7 der vorangehenden Arbeit, S. 17) findet man die Werte:

$$\bar{x} = -0{,}078 = \log 0{,}835 \text{ (SE)}.$$
$$\bar{p} = 54{,}6\,\%,$$
$$\alpha = 42 \pm 6{,}4,$$

und für die Versuche vom Januar 1934 erhält man:

$$\bar{x} = 0{,}091 = \log 1{,}233 \text{ (SE)},$$
$$\bar{p} = 37{,}5\ \%,$$
$$\alpha = 47{,}5 \pm 2{,}5.$$

Bei den Angaben für den Januarversuch ist jedoch zu beachten, daß sehr extreme Werte (9, 13 und 79 %) in die Rechnung einbezogen wurden, die, da sie außerhalb des geradlinigen Bereiches der S-Kurve liegen, einen zu flachen Verlauf der Geraden bedingen müßten. Wenn trotzdem der Wert für α höher ist als bei der Sommerkurve, so ist das auf die Fehlerstreuung zurückzuführen. Offenbar sind die Werte 9 und 13 % extreme Minusvarianten. Berücksichtigt man nur die mittleren Werte für 1,15, 2,3 und 5,8 Schutzeinheiten, dann findet man für α den viel kleineren Wert 39 ± 9, der sich aus dem anscheinend zu hohen Wert 47 % für 1,15 SE. ergibt. Der Fehler, der durch die Berücksichtigung extremer Punkte entsteht, scheint demnach im Vergleich zu der Fehlerstreuung sehr gering zu sein.

Da vorausgesetzt wird, daß die Steilheit der Wirkungskurve unabhängig von zeitlichen Schwankungen in der Immunisierbarkeit für ein bestimmtes Tiermaterial konstant ist, läßt sich die Bestimmung des Mittelwertes aus beiden Versuchsreihen rechtfertigen.

Das Gewicht für $\alpha_{\mathrm{I}} = 42 \pm 6{,}4$ ist $1/\sigma^2_{\alpha_{\mathrm{I}}} = 0{,}0246$,

„ „ „ $\alpha_{\mathrm{II}} = 47 \pm 2{,}5$ „ $1/\sigma^2_{\alpha_{\mathrm{II}}} = 0{,}1671$.

$$\alpha_{\mathrm{M}} = \frac{246 \cdot 42 + 1671 \cdot 47{,}5}{1917} = 46{,}7.$$

Der mittlere Fehler des gewogenen Mittels α_{M} ist nach (6):

$$\sigma_{\alpha_{\mathrm{M}}} = \sqrt{\frac{1}{0{,}0246 + 0{,}1671}} = 2{,}3.$$

Aus den empirisch gezeichneten Kennlinien der Tabelle 8 der vorangehenden Arbeit (S. 19) findet man für α_{M} den Wert 48,1, der mit dem berechneten Werte sehr gut übereinstimmt.

c) Die Gaddumsche Auswertungsmethode.

Wenn auch die Abweichungen der Wirkungskurve von einer Geraden noch in dem Bereich zwischen $p = 10$ und $p = 90$ % ziemlich gering sind, so ist doch zu bedenken, daß einem Wert von 10 % oder 90 % bei 100 Versuchstieren ein mittlerer Fehler von $\sqrt{\frac{900}{100}} = 3$ % entspricht, also ein dreifacher Mittelfehler von 9 %. Man darf daher, wenn man p-Werte zwischen 10 und 90 zuläßt, nur Ueberlebensprozenzsätze zwischen 19 und 81 berücksichtigen, denn einem beobachteten Werte von 10 bzw. 90 % könnte ja ein wahrer Wert von 1 bzw. 99 % zugrunde liegen, und dann wäre die Abweichung von der Geraden sehr stark!

Um aber doch extremere Werte berücksichtigen zu können, hat J. H. Gaddum in der schon mehrfach erwähnten Arbeit (11) einen neuen Weg eingeschlagen.

Gaddum setzt an Stelle der Werte p die durch die Gleichung

$$p' = \frac{p}{100} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{y} e^{-\frac{y_2}{2}} dy \qquad (7)$$

gegebenen äquivalenten Werte $y = \Phi(p')$.

Die Gleichung (7) stellt die Gleichung der normalen Aufzählungskurve dar, bei der y in Standardabweichungen als Einheit ausgedrückt ist.

Die allgemeine Form der Gleichung ist

$$p' = \frac{1}{\mu\sqrt{2\pi}} \cdot \int_{-\infty}^{y} e^{-\frac{y^2}{2\mu^2}} dy \qquad (8)$$

worin μ die Standardabweichung der Kurve $\left(\mu = \sqrt{\frac{\Sigma[y^2]}{s}}\right)$ bedeutet. Diese allgemeine Gleichung gilt für jede normale Aufzählungskurve, also auch für die den beobachteten Werten zugrundeliegende Idealkurve. Ihre Gestalt hängt lediglich von der Wahl der Abszisseneinheit (d. i. der Einheit von y) ab. Wählt man μ als Einheit, dann geht die Gleichung in die Form (7) über.

Da aber nun für die den beobachteten Werten entsprechende Kurve die Abszisseneinheit $x = \log$ Antigendosis durch die Wahl des Tiermaterials festgelegt ist, so wird μ, in Einheiten x ausgedrückt (μ_x), in den meisten Fällen mehr oder weniger von 1 verschieden sein. Die Gaddumsche Kurve ist also ebenfalls keine Gerade, doch ist die Abweichung von einer Geraden, auch wenn μ wesentlich verschieden von der Abszisseneinheit ist, sehr viel kleiner als die der Wirkungskurve. warum nicht?

Wie später noch gezeigt werden wird, ist μ_x für das Frankfurter Tiermaterial etwa 0,75, also nicht sehr verschieden von der Einheit. Die Gaddumsche Kennlinie wird also für das Frankfurter Material nur wenig von einer Geraden abweichen.

Ist die Standardabweichung (μ_x) des Tiermaterials groß, die Abszisseneinheit also klein im Vergleich zu μ_x, dann verläuft die Kurve flach, ist μ_x klein, dann ist die Kurve steil. Der Steilheitsgrad kann also auch bei der Gaddumschen Kennlinie als Maß für die Streuung des Tiermaterials angesehen werden.

Gaddum bezeichnet die Streuung μ, gemessen in Logarithmen der Dosis (μ_x), mit λ. Da die Standardabweichung für y (μ_y) gleich 1 gesetzt ist, so ergibt sich als Steigungsmaß (b) der Gaddumschen Kennlinie der Ausdruck

$$b = \frac{dy}{dx} = \frac{\mu_y}{\mu_x} = \frac{1}{\lambda}.$$

Die Streuung des Tiermaterials ist also gleich dem reziproken Wert des Steigungsmaßes b.

Das Steigungsmaß b spielt für die Auswertung nach Gaddum dieselbe Rolle, wie das Steigungsmaß α für die Auswertung nach der Wirkungskurve. b ist gegeben durch die Beziehung

$$b = \frac{y - \bar{y}}{x - \bar{x}},$$

worin $\bar{y}$ und $\bar{x}$ die gewogenen Mittel der „Beobachtungen" y_i und x_i darstellen. Aus der Beziehung

$$\frac{dp'}{dy} = \frac{\sigma_{p'}}{\sigma_y}$$

ergibt sich das Gewicht $1/\sigma^2_y$. σ_y ist die Streuung der Werte y, die der Streuung $\sigma_{p'} = \sqrt{\frac{p' \cdot q'}{n}}$ entspricht. Es ist

$$\frac{1}{\sigma^2_y} = \frac{1}{\sigma^2_{p'}} \cdot \left(\frac{dp'}{dy}\right)^2 = \frac{n}{p' \cdot q'} \cdot \left(\frac{dp'}{dy}\right)^2 = n \cdot B,$$

wenn man auch hier einen Gewichtsfaktor $B = \frac{1}{p' \cdot q'} \left(\frac{dp'}{dy}\right)^2$ einführt. Die Werte für $\frac{dp'}{dy}$ können aus einer Tabelle der Ordinaten für die normale Kurve entnommen werden, wie sie sich z. B. bei RIETZ-BAUR (5) findet. In der GADDUMschen Arbeit (11) ist eine Tabelle der B-Werte mitgeteilt, aus der man für jeden Wert p′ sofort den zugehörigen Wert B entnehmen kann.

Für die Berechnung von b bleiben alle Formeln dieselben wie für die Berechnung von α, nur hat man an Stelle von p mit dem Gewichtsfaktor $\frac{1}{p \cdot q}$ die Größe y mit dem Gewichtsfaktor $\frac{1}{p' \cdot q'} \cdot \left(\frac{dp'}{dy}\right)^2$ zu setzen.

Der Uebersichtlichkeit halber sei der Gang der Rechnung noch einmal zusammengestellt: Zunächst werden aus einer Tabelle der normalen Aufzählungskurve die den gefundenen Werten $p_1, p_2, p_3, \ldots$ entsprechenden Werte $y_1, y_2, y_3, \ldots$ entnommen und die dazugehörigen Gewichtsfaktoren $B_1, B_2, B_3 \ldots$ nach der Formel

$$B = \frac{1}{\sigma_y^2 \cdot n} = \frac{1}{p' \cdot q'} \cdot \left(\frac{dp'}{dy}\right)^2$$

ausgerechnet oder der erwähnten Tabelle bei GADDUM entnommen. Mit Hilfe der Formeln (2) und (3) findet man die gewogenen Mittel $\bar{x}$ und $\bar{y}$ aus den „Beobachtungen" $x_1, y_1, x_2, y_2, x_3, y_3, \ldots$ Schließlich hat man aus (5) das Steigungsmaß b zu errechnen, dessen mittlerer Fehler durch (6) gegeben ist.

Als praktisches Beispiel sei die Berechnung von b für den Versuch vom Januar 1934 ausgeführt (Tab. 4).

Tabelle 4.

SE	log SE $= x_i$	p	y_i	B	n	B · n	Bnx_i	Bny_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$Bny_i(x_i - \bar{x})$	$Bn(x_i - \bar{x})^2$
0,29	— 0,538	9	— 1,34	0,34	115	39,1	— 21	— 52,4	— 0,862	0,743	+ 45,2	29,1
0,58	— 0,236	13	— 1,13	0,40	112	44,8	— 10,6	— 50,7	— 0,560	0,313	+ 28,3	14,0
1,15	0,061	47	— 0,075	0,635	118	75,0	4,6	— 5,6	— 0,263	0,069	+ 1,48	5,2
2,3	0,362	47	— 0,075	0,635	109	69,3	25,1	— 5,2	+ 0,038	0,0014	— 0,20	0,1
5,8	0,764	71	0,55	0,57	116	66,1	50,5	36,4	0,440	0,194	+ 16,00	12,8
11,5	1,061	79	0,81	0,50	126	63	66,9	51	0,737	0,542	+ 37,6	34,1
							$\Sigma[Bnx_i] = 115{,}5$				$\Sigma[Bny_i(x_i - \bar{x})] = 128{,}48$	
												$\Sigma[Bn(x_i - \bar{x})^2] = 95{,}3$

$\bar{x} = 0{,}324 = \log 2{,}11$ (SE)
$\bar{y} = -0{,}0743$ (entspr. $\bar{p} = 47{,}1$ %)
$b = 1{,}35 \pm 0{,}11$.

Die entsprechenden Werte für den Juliversuch 1933 sind:

$\bar{x} = 0{,}0905 = \log 0{,}81$ (SE)
$\bar{y} = 0{,}105$ (entspr. $\bar{p} = 54{,}2$ %)
$b = 1{,}10 \pm 0{,}18$.

Mit Hilfe der Gewichte für b

$$\frac{1}{\sigma_b^2} = \Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})^2$$

findet man als gewogenes Mittel zwischen den beiden Werten $b_I = 1{,}1$ und $b_{II} = 1{,}35$

$$b_{(I,\,II)} = \frac{32 \cdot 1{,}1 + 95 \cdot 1{,}35}{127} = 1{,}28 \pm 0{,}09$$

$$\left(\sigma_{b\,(I,\,II)} = \frac{1}{\sqrt{\Sigma\left[\frac{1}{\sigma_b^2}\right]}} = \frac{1}{\sqrt{\Sigma[B_i n_i (x_i - \bar{x})]^2]}} = \frac{1}{\sqrt{127}} = \pm 0{,}09\right)$$

In Figur 8 sind die für die Versuche vom 19. 7. 33 und 25. 1. 34 erhaltenen GADDUMschen Kennlinien und die dem gewogenen Mittel entsprechende Gerade dargestellt.

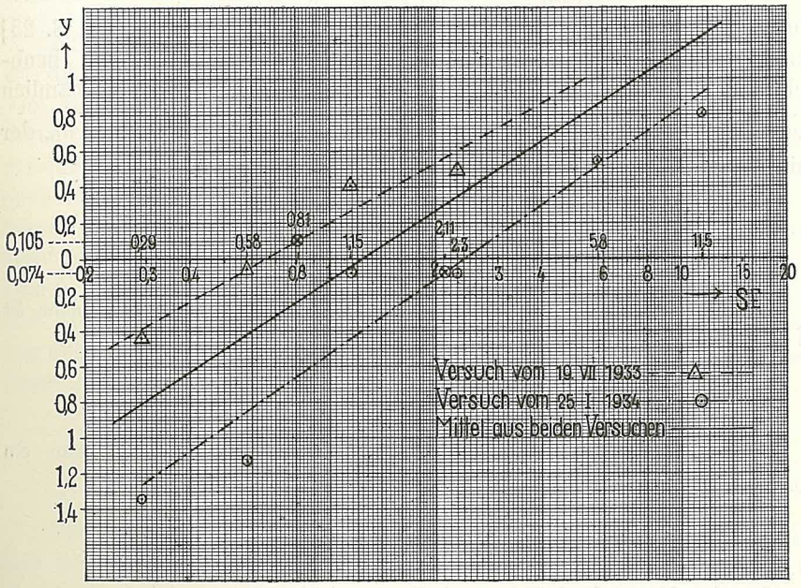


Fig 8.

Aus $b = \frac{dy}{dx} = \frac{dy}{dp} \cdot \frac{dp}{dx} = \frac{dy}{dp} \cdot \alpha$ läßt sich α berechnen. Für $p = 50$ % $(y = 0)$ ist α das Steigungsmaß der Tangente durch den Mittelpunkt der Wirkungskurve.

$$\frac{dp}{dy} = \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{\frac{-y^2}{2}} = 39{,}9 \qquad (y = 0)$$

$$\alpha = b \cdot \frac{dp}{dy} = 1{,}28 \cdot 39{,}9 = 51{,}1 \pm 3{,}6.$$

Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem nach der TREVANschen Methode erhaltenen Werte 47 ± 2 überein, der ja, infolge der S-Krümmung der Kurve etwas niedriger sein muß.

Die Genauigkeit der TREVANschen Methode reicht, wie das Beispiel zeigt, für praktische Zwecke vollkommen aus. Damit soll nicht gesagt sein, daß die GADDUMsche Methode keinen nennenswerten Vorteil böte.

Sie ist auf jeden Fall exakter als die TREVANsche und sie gestattet vor allem die Mitverwendung sehr extremer Werte von p[1]). Da die Aufstellung des Auswertungsdiagramms nur einmal gemacht zu werden braucht, und da auch die Rechnung nach GADDUM kaum mehr Arbeit macht als die Berechnung der TREVANschen Kennlinie, so wird man unbedingt der GADDUMschen Methode den Vorzug geben müssen. Für viele Fälle kann man auf die Rechnung verzichten und die Lage der Kennlinie empirisch einzeichnen. Die Rechnung wird auch überflüssig, wenn überhaupt nur zwei Punkte bestimmt werden, denn dann ist $b = \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2}$, und man braucht beide Punkte nur durch eine Gerade zu verbinden. Nach GADDUM [(11), S. 23] erzielt man in diesem Falle die größte Genauigkeit, wenn die beobachteten Prozentsätze um 6 bzw. 94 % herum liegen. Dann wird nämlich der Wert $\frac{\sigma_b^2}{b^2}$ zu einem Minimum, und, da b konstant ist, wird auch σ_b, der mittlere Fehler des Steigungsmaßes, zu einem Minimum.

Es ist nämlich für die beiden Punkte x_1, y_1 und x_2, y_2 nach (6):

$$\sigma_b^2 = \frac{1}{B_1 n_1 + B_2 n_2} \cdot \frac{1}{(x_1 - x_2)^2} = \frac{\sigma_{y_1}^2 + \sigma_{y_2}^2}{(x_1 - x_2)^2}. = \frac{1}{\sigma_{y_1}^{-2} + \sigma_{y_2}^{-2}} \frac{1}{(x_1 - x_2)^2}$$

Liegen nun die beiden Punkte symmetrisch zur X-Achse ($y_1 = -y_2$), dann ist $y_1^2 = y_2^2$. Ist auch noch $n_1 = n_2$, so wird auch $\sigma_{y_1}^2 = \sigma_{y_2}^2$ und man bekommt:

$$\frac{\sigma_b^2}{b^2} = \frac{2\sigma_y^2}{2(2y)^2} = \frac{\sigma_y^2}{2y^2}$$

Bildet man die Quotienten $\frac{\sigma_{y_1}^2 \cdot n}{y_1} = -\frac{\sigma_{y_2}^2 \cdot n}{y_2}$, dann bekommt man ein Minimum für $p_1 = 6$ % und $p_2 = 94$ %.

d) Die Einstellung des Standardimpfstoffes F 191.

Da der Urstandard F 47 und der ihm gleichwertige (s. Abschnitt 3) dänische Impfstoff L 31 allmählich aufgebraucht wurden, mußte man an die Einstellung eines neuen Standardimpfstoffes denken. Der hierfür bestimmte Impfstoff F 191 ist — im Gegensatz zu den flüssigen Formoltoxoiden F 47 und L 31 — ein durch Natriumsulfatfällung gewonnenes Trockenpräparat (Formoltoxoid). Um festzustellen, ob ein derartiger Impfstoff zur Messung der nach den üblichen Verfahren hergestellten flüssigen Diphtherieantigene in jeder Hinsicht geeignet ist, wurde für F 191 nochmals die GADDUMsche Kennlinie ermittelt. Es wurden im ganzen drei Punkte bestimmt, und zwar mit den Dosen 24, 6 und 1,5 mg in je 3 ccm Lösung. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 5 zusammengestellt (vgl. Tabelle 12 der vorangehenden Arbeit, S. 27).

1) Für die TREVANsche Methode wäre das Auszeichnen der flachen Enden der S-Kurve erforderlich.

Tabelle 5.

mgr	x_i	p	y_i	B	n	B · n	Bnx_i	Bny_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$Bny_i(x_i - \bar{x})$	$Bn(x_i - \bar{x})^2$
1,5	0,176	24,6	— 0,686	0,535	65	34,7	6,10	— 23,8	— 0,544	0,296	12,9	10,28
6	0,778	76,8	0,733	0,522	125	65,2	50,75	47,75	0,058	0,0034	2,77	0,22
24	1,380	88,7	1,21	0,368	62	22,8	31,45	27,6	0,66	0,436	18,2	9,93
					252	122,7	88,30	51,55			33,90	20,43

Die Rechnung ergibt:

$$\bar{x} = 0{,}72 = \log 5{,}25 \text{ (mgr)}$$
$$\bar{y} = 0{,}42 \quad (p = 66{,}3\ \%)$$
$$b = 1{,}66 \pm 0{,}22$$

Die neue Kennlinie ist etwas steiler als die für F 47 ermittelte, doch ist die Differenz $b_{F\,191} - b_{F\,47} = 0{,}38 \pm 0{,}24$ statistisch nicht gesichert. Von dem Ergebnis des Juliversuches allein ($b = 1{,}10 \pm 0{,}18$) ist der Wert 1,66 gerade durch den zweifachen Mittelfehler (Diff. $= 0{,}56 \pm 0{,}28$) getrennt. Auch dieser Unterschied liegt im Bereich des Zufälligen. Es ist auch möglich, daß er durch die Heterogenität des Tiermaterials (s. Abschnitt 2e) bedingt worden ist. Die Annahme, daß die Verschiedenheit der Impfstoffe einen Unterschied in der Steilheit der Kennlinie bedingt haben könnte, dürfte demgegenüber kaum in Betracht zu ziehen sein. Man ist also berechtigt, den Auswertungen mit F 191 als Standard eine Kennlinie zugrunde zu legen, deren Steilheitsgrad das gewogene Mittel aus den drei Bestimmungen darstellt (Fig. 9)[1]). Dieses gewogene Mittel ist

$$b = \frac{32 \cdot 1{,}1 + 95 \cdot 1{,}35 + 20{,}5 \cdot 1{,}66}{147{,}5} = 1{,}33 \pm 0{,}08.$$

$$\left(\sigma_b = \frac{1}{\sqrt{147{,}5}} = 0{,}082.\right)$$

Die Standardabweichung des Frankfurter Tiermaterials (in Logarithmen der Antigendosis) ist hiernach

$$\lambda = \frac{1}{b} = 0{,}75 \pm 0{,}05.$$

Der Einstellung des neuen Standards nach Schutzeinheiten lagen die Ergebnisse dreier Messungen zugrunde, von denen zwei mit F 47 und eine mit dem (nach Kubikzentimetern) gleichwertigen Impfstoff L 31 als Standard ausgeführt waren (Tabelle 6; vgl, Tabelle 12 der vorangehenden Arbeit S. 27).

Es wurde für jede Messung die Dosis von F 191 ermittelt, in der gerade eine SE enthalten ist. Aus der Kennlinie (Fig. 9) wurde zunächst

1) Da es bei der Auswertung nur auf die Neigung der Kennlinie, nicht auf den absoluten Wert der einem bestimmten Ueberlebensprozentsatz entsprechenden Antigendosis ankommt, darf, wie es aus Gründen der Zweckmäßigkeit geschehen ist, die Kennlinie so gelegt werden, daß ihr Mittelpunkt (p = 50 %) mit dem Nullpunkt (log 1) der Abszissenteilung zusammenfällt. Um die Ablesung zu vereinfachen, sind außer den y-Werten auch die ihnen entsprechenden p-Werte eingetragen.

Tabelle 6.

Versuch	Datum	Impfstoff	Menge	n	p	y	$\sigma_y^2 \cdot n = \frac{1}{B}$	B · n
1	21. 8. / 18. 9. 34	F 47	1,5 ccm	124	50	0	1,57	79
		F 191	15 mg	124	83	0,96	2,25	55
2	26. 9. / 24. 10. 34	F 47	2 ccm	124	46,8	—0,08	1,58	78,5
		F 191	8 mg	123	65,0	0,385	1,66	74
3	7. 11. / 5. 12. 34	L 31 [1])	3 ccm	124	68,6	0,485	1,70	73
		F 191	5,25 mg [2])	252	66,3 [2])	0,42	1,69	149

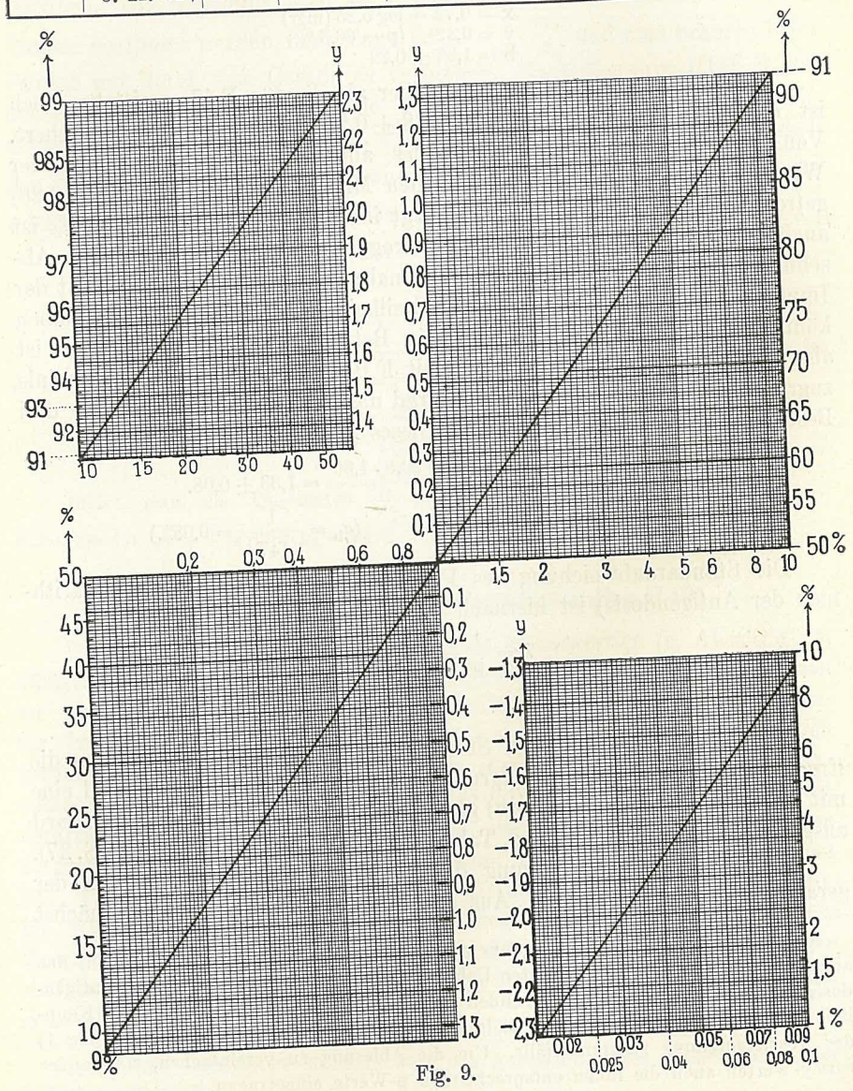


Fig. 9.

1) Mit F 47 wirkungsgleich (s. Abschnitt 3, S. 86).
2) Mittelwerte nach Auswertung von Tabelle 5 (S. 79).

das Verhältnis der Wirksamkeit der angewandten Dosen abgelesen. Für Versuch 1 findet man: 15 mg von F 191 verhalten sich in ihrer Wirksamkeit zu 1,5 ccm von F 47 (oder: 10 mg F 191 zu 1 SE) wie 5,2 : 1. 10 mg enthalten folglich 5,2 SE, 1 SE = 1,92 mg.

Aus Versuch 2 ergibt sich:

Wirksamkeit von 4 mg F 191 zu 1 ccm F 47 wie 2,24 : 1; 4 mg = 2,24 SE, 1 SE = 1,79 mg.

Versuch 3 liefert für 5,25 mg den Wert 2,7 SE, 1 SE = 1,95 mg.

Das gewogene Mittel aus den drei Werten berechnet sich wie folgt: Die Werte 1,92, 1,79 und 1,95 stellen das Verhältnis der Wirksamkeit von 1 ccm F 47 (bzw. L 31) = 1 SE zu der Wirksamkeit von 1 mg F 191 dar. Der mittlere Fehler des Logarithmus des Verhältnisses zweier Dosen A_1 und A_2 mit den Ueberlebensprozentsätzen p_1 und p_2 ist nach Trevan (s. S. 71):

$$\sigma_{\log R} = \frac{\sqrt{\sigma_{p_1}^2 + \sigma_{p_2}^2}}{\alpha}$$

Für die Auswertung nach Gaddum hat man nur statt p und α y und b zu setzen:

$$\sigma_{\log R} = \frac{\sqrt{\sigma_{y_1}^2 + \sigma_{y_2}^2}}{b} = \frac{1}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{B_1 n_1} + \frac{1}{B_2 n_2}}$$

Natürlich muß man die tatsächlich gefundenen Ueberlebensprozentsätze bzw. die ihnen entsprechenden y-Werte in die Rechnung einsetzen, nicht etwa die Werte, die 1 ccm F 47 und 1 mg F 191 entsprechen. Für die drei Werte von Versuch 3 gilt jedoch auch hier das gewogene Mittel $\bar{p} = 66{,}3$ %. (Die Werte B · n s. Tabelle 6.)

Die Werte, die man auf diese Weise erhält, sind: $\log R \pm \sigma_{\log R} =$

(Versuch 1) 0,283 ± 0,131, Gewicht f. log R: 58,3
(Versuch 2) 0,253 ± 0,122, „ „ „ „ 67,3
(Versuch 3) 0,290 ± 0,108, „ „ „ „ 86

$$\text{Gewogenes Mittel: } \overline{\log R} = \frac{0{,}283 \cdot 58{,}3 + 0{,}253 \cdot 67{,}3 + 0{,}29 \cdot 86}{211{,}6}$$

$$\sigma_{\overline{\log R}} = \frac{1}{\sqrt{\Sigma\left[\frac{1}{\sigma_{\log R}^2}\right]}} = \frac{1}{\sqrt{211{,}6}} = 0{,}069$$

$$\overline{\log R} = 0{,}276 \pm 0{,}069$$

$$\overline{R} = 1{,}89 \times 1{,}17$$

Das Ergebnis der drei Messungen lautet also: In 1,89 mg des Impfstoffes F 191 ist eine Schutzeinheit enthalten.

e) Der Einfluß des Tiermaterials auf die Genauigkeit der Dosenbestimmung.

Die Auswertungsmethode nach Trevan-Gaddum gründet sich auf die Annahme, daß die Wirkungskurve für jedes Präparat des gleichen Impfstoffes und auch für jede Jahreszeit, in der die Messung ausgeführt wird, die gleiche Steilheit besitzt. Das gilt natürlich nur für ein und dasselbe

Tiermaterial, denn die Steilheit der Kurve hängt von der Streuung der Tiere nach ihrer Immunisierbarkeit ab. Ein sehr heterogenes Tiermaterial mit stark schwankender Streuung wird nicht nur eine flache Kurve haben, sondern auch einen von Versuch zu Versuch veränderlichen Steilheitsgrad. Je steiler die Kurve, um so kleiner der einem bestimmten Ueberlebensprozentsatz entsprechende Dosenfehler, und je konstanter die Neigung der Kurve, um so genauer die Auswertung nach der Kennlinie. Geringe Streuung und größtmögliche Einheitlichkeit in der Zusammensetzung besitzt aber nur ein genotypisch gleichartiges Tiermaterial, eine durch fortgesetzte Inzucht gewonnene reine Linie (vgl. Abschnitt VI 1 der vorangehenden Arbeit, S. 32 f.),

Der Vergleich der Wirksamkeit zweier Impfstoffe gründet sich auf die bei Immunisierung mit den zu vergleichenden Dosen sich ergebende Differenz der Ueberlebensprozentsätze. Es ist ohne weiteres klar, daß, je steiler die Kennlinie ist, um so größer auch der Unterschied der Ueberlebensprozentsätze sein muß.

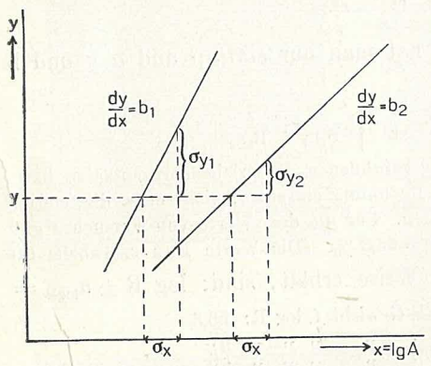


Fig. 10.

Der Logarithmus des Wirkungsverhältnisses der zu vergleichenden Impfstoffdosen sei $\log R = dx$. Wird die Messung mit verschiedenem Tiermaterial ausgeführt, so gilt die Gleichung

$$\frac{dp_1}{dx} : \frac{dp_2}{dx} = b_1 : b_2 \text{*)},$$

worin dp_1 und b_1 die Differenz der Ueberlebensprozentsätze und das Steigungsmaß der Kennlinie des einen, dp_2 und b_2 Differenz und Steigungsmaß des andern Tiermaterials bedeuten. Es ist also

$$dp_2 = dp_1 \cdot \frac{b_2}{b_1},$$

d. h. bei dem Tiermaterial mit der kleineren Streuung sind die Differenzen der Ueberlebensprozentsätze größer als bei dem Material mit der größeren Streuung. Bei Verwendung gleich großer Tierzahlen muß sich daher ein Unterschied in der Wirksamkeit der Impfstoffe um so sicherer nachweisen lassen, je steiler die Kennlinie, d. h. je kleiner die Streuung des Tiermaterials ist.

Man wird also bei steilem Verlauf der Kennlinie mit weniger Tieren ein statistisch gesichertes Ergebnis zu erwarten haben als bei flachem Verlauf. Zwischen der Neigung der Kennlinie und der für einen Versuch erforderlichen Tierzahl besteht eine einfache Beziehung: Die Fehlerstreuung für den gefundenen Wert p % sei σ_{y_1} (Fig. 10). Dieser Streuung entspricht eine Dosenstreuung $\sigma_{x_1} = \frac{\sigma_{y_1}}{b_1}$, wenn b_1 der Steilheitsgrad der Kennlinie ist. Es möge nun bei einem andern Tiermaterial, dessen Kennlinie das Steigungsmaß b_2 hat, für denselben Prozentsatz p die Streuung σ_{x_2} gleich σ_{x_1} sein.

*) denn $\frac{dy}{dx} = \frac{dp}{dx} \cdot \frac{dy}{dp}$, wobei $\frac{dy}{dp}$ als konstant zu betrachten ist.

Dann ist $\frac{\sigma_{y_1}}{b_1} = \frac{\sigma_{y_2}}{b_2}$ oder, da $\sigma_y = \sigma_p \cdot \frac{dy}{dp} = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} \cdot \frac{dy}{dp}$:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{b_2^2}{b_1^2},$$

d. h. die erforderliche Tierzahl ist umgekehrt proportional dem Quadrat des Steigungsmaßes b.

3. Der Unterschied zwischen L 31 und F 47.

Die außerordentlich große Streuung des Tiermaterials in Bezug auf die Immunisierbarkeit der Tiere bzw. den mit einer bestimmten Antigendosis zu erreichenden Immunitätsgrad machte die Erhöhung der für einen Versuch erforderlichen Tierzahl von 25 auf 100 Tiere nötig, da die Beschaffung reinrassigen Tiermaterials in ausreichender Menge vorläufig nicht möglich war[1]). Die Dosenfehler der mit 20—25 Tieren ausgeführten Versuche waren so groß, daß von einer zuverlässigen Messung nicht die Rede sein konnte. Eine Auswertung des gesamten Materials der vor 1933 in London, Kopenhagen und Frankfurt a. M. ausgeführten Versuche durch J. H. Gaddum (15), in der vier Impfstoffe (F 47, L 31, ferner ein englischer: 859 und ein französischer: 38 772) in Bezug auf ihre antigene Wirksamkeit miteinander verglichen wurden, hatte sehr widerspruchsvolle Ergebnisse. Während die Resultate von London und Kopenhagen einigermaßen übereinstimmten, wichen die Ergebnisse der Frankfurter Versuche[2]) ziemlich stark davon ab, wie die in Tabelle 7 zusammengestellten Zahlen der relativen Wirksamkeit der vier Impfstoffe zeigen. Die starke Abweichung der Frankfurter Versuche führt Gaddum auf die durch einen zu flachen Verlauf der Kennlinie bedingte größere Ungenauigkeit der Messung zurück. Als Steigungsmaß der Kennlinie des Frankfurter Materials findet Gaddum auf graphischem Wege den Wert b = 1,2, der mit den im vorigen Abschnitt angegebenen genaueren Werten gut übereinstimmt. Dagegen findet Gaddum für das englische Material den Wert 3,8 und für das dänische sogar 4. Das würde bedeuten, daß die Frankfurter Versuche mit der

Tabelle 7[3]).

Versuchsort	b	Relative Wirksamkeit (geometrisches Mittel = 100)			
		F 47	L 31	859	38 772
Frankfurt a. M. . .	1,2	76	44	231	130
Kopenhagen . . .	4	154	59	95	116
London	3,8	144	69	103	98
London (Schick Test)	(2,75)	(154)	(48)	(124)	(109)

10fachen Tierzahl hätten ausgeführt werden müssen, um dieselbe Genauigkeit zu bekommen wie die englischen und die dänischen:

1) Vgl. S. 32 f. der vorangehenden Arbeit.
2) S. Tab. 2 der vorangehenden Arbeit (S. 8).
3) Diese Tabelle ist der Arbeit von Gaddum (15) entnommen.

$$\frac{n_{Ffm.}}{n_{Lond.}} = \left(\frac{3{,}8}{1{,}2}\right)^2 = 10 \qquad \frac{n_{Ffm.}}{n_{Kop.}} = \left(\frac{4}{1{,}2}\right)^2 = 11$$

Die von GADDUM angegebenen Werte für b sind Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen. Die Werte der Einzelbestimmungen weichen infolge der geringen Tierzahlen oft erheblich vom Mittel ab. So ist für eine Einzelbestimmung mit dem englischen Material[1]) b = 2,35. Die Berechnung von b aus einer ebenfalls nur kleinen Reihe von anderen Versuchen ergab 2,75. Diese Zahlen zeigen, daß das englische Material zwar eine durchschnittlich geringere Streuung besitzt, die aber wegen der kleinen Tierkollektive von Versuch zu Versuch großen Schwankungen unterworfen ist. Die Schwankungen sind wesentlich größer als die der späteren Frankfurter Versuche mit je 100—125 Tieren.

Der relativ hohe Wert für das b der dänischen Versuche ist nicht auf die Verwendung von reingezüchtetem Tiermaterial zurückzuführen. Teilt man nämlich das Material von drei am 26. 6. 33 ausgeführten, in dem Bericht (1) eingehend analysierten dänischen Versuchen in Gewichtsklassen mit einem Klassenspielraum von 10 g ein (Fig. 11), dann stellt man für alle Verteilungskurven eine deutliche Mehrgipfeligkeit fest, die auf die Zusammensetzung des Materials aus mehreren (3—5) Gewichtsrassen schließen läßt. Da aus den dänischen Versuchen [vgl. (1), S. 7] hervorgeht, daß Tiere verschiedener Gewichtsklassen auch verschiedene Immunisierbarkeit besitzen, so folgt, daß das dänische Tiermaterial auch in Bezug auf Immunisierbarkeit nicht einheitlich ist. Man kann höchstens sagen, daß das dänische Material genotypisch mehr homogen ist als die in Frankfurt benützten Tiere.

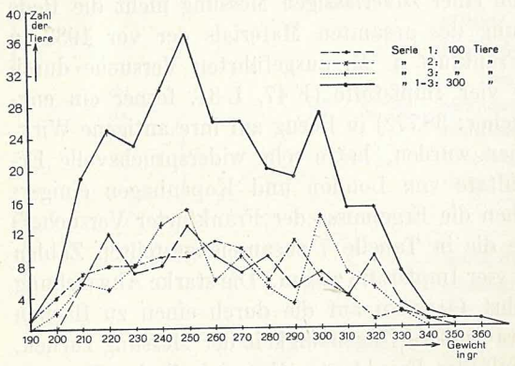


Fig. 11.

Die Ermittlung des Steigungsmaßes für das dänische Material ist, wie GADDUM ausdrücklich betont, sehr roh; der Wert 4 ist eigentlich mehr geschätzt als gemessen. Angenommen, die Kennlinie verliefe wirklich so steil wie GADDUM angibt, dann müßte die Differenz der Ueberlebensprozentsätze beim Vergleich zweier verschiedenwertiger Dosen für das dänische Material etwa dreimal so groß sein wie für das deutsche; denn

$$\frac{dp_{Kop.}}{dp_{Ffm.}} = \frac{b_{Kop.}}{b_{Ffm.}} = \frac{4}{1{,}33} = 3{,}0.$$

1) Es sind bei den englischen Versuchen nur je 18 Tiere benutzt worden. Diese Zahlen sind natürlich, mag das Material noch so einheitlich sein, viel zu klein, um das Steigungsmaß der Kennlinie sicher zu bestimmen.

In der Tat hatten die eben erwähnten dänischen Versuche vom 26. 6. 1933, die mit je 1,5 L_f von L 31 (2 Versuche mit zusammen 195 Tieren) und F 47 (1 Versuch mit 99 Tieren) ausgeführt wurden, folgendes Ergebnis:

L 31: 73/195 = 37,5 % Ueberlebende
F 47: 54/99 = 54,5 % "

Die Differenz beträgt 17,0 ± 6,1 %, also das 2,8fache ihres mittleren Fehlers. Das Resultat spricht mit ziemlich großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß eine Flockungseinheit von F 47 einen höheren Schutzwert besitzt als eine Flockungseinheit von L 31. Nimmt man die Zahl 17 als wahren Wert der Differenz der Ueberlebensprozentsätze an, dann würde ihr für das Frankfurter Material eine Differenz von 5,7 entsprechen. Aus der GADDUMschen Kennlinie mit b = 1,33 (Fig. 9) ergibt sich dann für die Differenz 5,7 % (p etwa 46 %) ein Dosenverhältnis $R = \frac{9{,}4}{7{,}3} = 1{,}29$, d. h. 1 L_f F 47 hat den 1,3fachen Schutzwert von 1 L_f L 31. GADDUM findet dagegen auf Grund der früheren, mit 25 Tieren ausgeführten dänischen Versuche für F 47 den 2,6fachen Schutzwert von L 31 (s. Tabelle 7). Dieses Resultat läßt sich also auf Grund der neuen dänischen Versuche nicht mehr aufrechterhalten, wenn man b = 4 setzt.

Da nun der Wert 17 der Differenz mit einem ziemlich großen Fehler behaftet ist, so ist die Zuverlässigkeit der Rechnung nicht sehr groß. Dagegen ist die Auswertung der deutschen Versuche von Jan./Febr bis Nov./Dez. 1933 (S. 65) mit einem bedeutend kleineren Fehler verbunden. Der Differenz 4,7 ± 2,7 entspricht das Wirkungsverhältnis 1,21, d. h. F 47 hätte den 1,2fachen Schutzwert von L 31. Im ungünstigsten Falle würde die Differenz $4{,}7 + 3 \cdot 2{,}7 = 12{,}8$ sein. Dieser Differenz entspricht das Wirkungsverhältnis 1,7 (1,66), d. h. der Schutzwert pro L_f ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73 % kleiner als das 1,7fache des Schutzwertes von L 31. Ebenso wahrscheinlich wie die Differenz $4{,}7 + 3 \cdot 2{,}7$ ist die Differenz $4{,}7 - 3 \cdot 2{,}7 = -3{,}4$. Dann wäre L 31 der bessere Impfstoff, und zwar wäre L 31 etwa 1,2mal so wirksam wie F 47.

Eine noch etwas größere Genauigkeit läßt sich erzielen, wenn man die dänischen Versuche in die Rechnung einbezieht[1]). Die Rechnung sei unter der GADDUMschen Annahme, daß die dänische Kurve den Steilheitsgrad b = 4 besitzt, durchgeführt. Der gefundenen Differenz 17 entspricht für b = 1,33 die Differenz 5,7. Der mittlere Fehler der Differenz, der außer von der Tierzahl nur von der Größe der tatsächlich gefundenen p-Werte abhängt, bleibt unverändert. Es ist also das gewogene Mittel zwischen 5,7 ± 6,1 und 4,7 ± 2,7 zu berechnen. Die Gewichte sind 0,137 und 0,027. Man findet

$$\text{Diff.} = \frac{5{,}7 \cdot 0{,}027 + 4{,}7 \cdot 0{,}137}{0{,}164} = 4{,}9 \pm 2{,}5$$

1) Daß die Versuche unter etwas anderen Bedingungen ausgeführt sind, spielt für die Vergleichbarkeit keine Rolle; denn α ist für ein bestimmtes Tiermaterial unabhängig von der zur Prüfung verwandten Giftdosis eine Konstante (s. S. 99).

Dieser Differenz entspricht für $p = 54\,\%$ (das ist etwa der mittlere Prozentsatz) das Wirkungsverhältnis 1,23.

Selbst wenn man annimmt, daß der Steilheitsgrad des dänischen Materials nicht größer sei als 1,33, wäre das Wirkungsverhältnis zwischen F 47 und L 31 pro L_f nur 1,3, d. i. das dem gewogenen Mittel zwischen $17 \pm 6{,}1\,\%$ und $4{,}7 \pm 2{,}7\,\%$ ($= 6{,}7 \pm 2{,}5\,\%$) entsprechende Wirkungsverhältnis.

Die Frage nach dem Unterschied in der antigenen Wirksamkeit zwischen den Impfstoffen L 31 und F 47 nach Flockungseinheiten kann nun wie folgt beantwortet werden:

Auf Grund des Ergebnisses der dänischen Versuche vom 26. 6. 33 ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,5 % die antigene Wirksamkeit von F 47 größer als die von L 31. Jedoch ist der Unterschied keinesfalls so groß, wie von Gaddum (15) und von dem dänischen „Bericht" (1) angegeben wird: Eine Flockungseinheit von F 47 hat etwa den 1,3fachen Schutzwert von einer Flockungseinheit von L 31, sodaß beide Impfstoffe, nach Flockungseinheiten gerechnet, nur wenig verschieden sind.

Ist der Unterschied zwischen den beiden Impfstoffen nach Flockungseinheiten nur gering, so ist er nach Volumeinheiten nahezu gleich Null, wie aus folgender Rechnung hervorgeht:

20 L_f von F 47 schützen geradesoviel wie $1{,}3 \cdot 20$ L_f von L 31 oder: 2,3 ccm F 47 haben den gleichen Schutzwert wie $1{,}3 \cdot 1{,}82$ ccm L 31, d. h. 1 ccm von L 31 enthält 0,97 SE. Bei alleiniger Berücksichtigung der deutschen Versuche findet man: 2,3 ccm F 47 haben den gleichen Schutzwert wie $1{,}2 \cdot 1{,}82$ ccm L 31; 1 ccm L 31 enthält 1,05 SE [1]). Da die dänische Wirkungskurve wahrscheinlich steiler ist als die deutsche, so wird der wahrscheinliche Wert zwischen den Zahlen 0,97 und 1,05 liegen.

Zwischen gleichen Volumina von F 47 und L 31 besteht also so gut wie kein Unterschied in der immunisierenden Wirksamkeit [2]). Durch dieses Ergebnis findet die Verwendung von L 31 an Stelle von F 47 bei der Einstellung des neuen Standardimpfstoffes F 191 (S. 27) ihre Erklärung.

4. Jahreszeitliche Schwankungen der Immunisierbarkeit.

Die Veranlassung zur Anwendung des Standardprinzips für die Wertbestimmung der Impfstoffe haben die starken Schwankungen der Ergebnisse von zeitlich auseinanderliegenden Versuchen gegeben. Tabelle 5 der vorangehenden Arbeit (S. 12) zeigt, daß die durch die gleiche Antigendosis erzielte Schutzwirkung zu verschiedenen Zeiten ganz verschieden ist. Diese zeitlichen Schwankungen können zweierlei Ursachen haben: Sie können einmal bedingt sein durch die Uneinheitlichkeit des Versuchsmaterials (Abschnitt 1,

1) Vgl. Tabelle 11 der vorangehenden Arbeit (S. 26).

2) Der Fehler ist infolge des umfangreichen Materials so klein, daß er kaum ins Gewicht fällt: Bei Zulassung des 2fachen Mittelfehlers erhält man als Schutzwert für 1 ccm von L 31 0,8 bzw. 1,2 SE als Grenzwert.

S. 56). Das in der Regel von verschiedenen Züchtern stammende Material muß selbstverständlich in seiner Zusammensetzung starken Schwankungen unterworfen sein. Zweitens aber kann es sich auch um zeitliche Schwankungen in der Immunisierbarkeit der einzelnen Tiere handeln, so wie auch die angeborene Giftresistenz der Tiere zeitlichen Schwankungen (Saisonschwankungen) unterworfen ist [1]).

Am meisten Wahrscheinlichkeit besitzt die Annahme, daß die individuelle Immunisierbarkeit der Tiere, ebenso wie die Giftresistenz, einer periodischen jahreszeitlichen Schwankung unterworfen ist. Aus der Tabelle 5 (vorangehende Arbeit S. 12) geht hervor, daß in den Monaten Januar/Februar [2]) ein Minimum der Immunisierbarkeit besteht, während ein ausgesprochenes Maximum nicht zu existieren scheint, denn die Ueberlebensprozentsätze der Monate Mai/Juni bis November/Dezember stimmen ziemlich überein. Für L 31 ist die Differenz der Ueberlebensprozentsätze zwischen dem Januar/Februar-Versuch auf der einen und dem Mittel der Versuche von Mai/Juni bis November/Dezember auf der anderen Seite ($365/576 = 63\,\%$ bei einer durchschnittlichen Tierzahl von 116 Meerschweinchen pro Versuch):

$$\text{Diff.} = 36 \pm \sqrt{\frac{27 \cdot 73}{107} + \frac{63 \cdot 37}{116}} = 36 \pm 6{,}2\,\%$$

und für F 47 — das Mittel der Versuche Mai/Juni bis November/Dezember ist $308/470 = 65{,}5\,\%$ bei einer durchschnittlichen Tierzahl von 117,5 —:

$$\text{Diff. } (65{,}5 - 36{,}3) = 29{,}2 \pm 6{,}4\,\%$$
$$\text{Diff. } (65{,}5 - 46{,}8) = 18{,}7 \pm 6{,}5\,\%.$$

Die Differenzen sind statistisch durchaus gesichert. Da nicht anzunehmen ist, daß die Zusammensetzung des Tiermaterials einem periodischen Wechsel unterworfen ist, so, daß im Sommer die gut immunisierbaren, im Winter die weniger gut immunisierbaren Stämme überwiegen, so kann kein Zweifel darüber bestehen, daß die Immunisierbarkeit der einzelnen Tiere im Laufe des Jahres starken Schwankungen unterworfen ist.

Zwischen den Ergebnissen der beiden Januarversuche mit F 47 besteht eine Differenz von $(46{,}8 - 36{,}3 =)\ 10{,}5 \pm \sqrt{\frac{36 \cdot 64}{102} + \frac{47 \cdot 53}{109}} = 10{,}5 \pm 6{,}7$. Die Differenz ist etwa 1,5mal so groß wie ihr mittlerer Fehler. Vergleicht man

1) Daß für die Schwankungen der Versuchsergebnisse nicht die jahreszeitlichen Schwankungen der Giftresistenz verantwortlich gemacht werden können, ist in der vorangehenden Arbeit (S. 16) gezeigt worden. Wie Tabelle 6 der vorangehenden Arbeit (S. 15) zeigt, vertragen die Meerschweinchen bei Immunisierung mit gleichen Antigendosen im Sommer etwa 300 % Toxin mehr als im Winter. Nichtimmunisierte Meerschweinchen vertragen dagegen im Sommer nur etwa 10 % mehr als im Winter (17). In dieser Tatsache ist, worauf Prigge (24) hingewiesen hat, ein weiterer Beweis dafür zu sehen, daß die jahreszeitlichen Schwankungen als Schwankungen der Immunisierbarkeit aufgefaßt werden müssen.

2) Als Versuchsdatum ist das Datum der Antigeninjektion angegeben. Die Bildung der Immunität erfolgt jedoch erst allmählich, sodaß als Immunisierungszeit die Zeit zwischen Antigen- und Toxininjektion anzusehen ist.

aber das mit L 31 im Januar 1933 erzielte Ergebnis mit dem Resultat des F 47-Versuches vom Januar 1934, wobei man wegen der 1,3fachen Ueberlegenheit von F 47 statt 27,1 % den Wert 32,3 % einzusetzen hat — dieser Wert ergibt sich aus der GADDUMschen Kennlinie, Fig. 9 —, dann findet man die Differenz 14,5 ± 6,4. Die Differenz ist fast 2,3mal so groß wie ihr mittlerer Fehler. Die Wahrscheinlichkeit, daß sie zufällig ist, ist nur 1 : 46,5. Man darf also annehmen, daß es sich hier entweder um Unterschiede in der Zusammensetzung des Tiermaterials handelt, oder daß außer den jahreszeitlichen Schwankungen noch Schwankungen mit größeren Perioden vorkommen[1]).

In beiden Versuchsreihen (mit L 31 und F 47) bildet das Resultat des März/April-Versuches einen Uebergang von dem Minimum des Januar/Februar-Versuches zu den hohen Werten der späteren Versuche. Auch der Mai/Juni-Versuch erreicht noch nicht ganz das Maximum. Es wäre möglich, daß beim einzelnen Tier im Laufe eines Jahres ein allmählicher Anstieg und ebenso auch ein allmähliches Abklingen der Immunisierbarkeit stattfindet. Ob dieses Ansteigen und Abklingen in gesetzmäßiger Weise erfolgt, muß sich herausstellen, wenn es möglich ist, den Einfluß der Heterogenität des Versuchsmaterials auszuschalten, d. h. wenn die Versuche mit genotypisch homogenem Versuchsmaterial ausgeführt werden können (vgl. S. 32).

5. Ueber die Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes für die Beziehung zwischen Immunitätsgrad und Antigendosis.

a.

Die Beobachtung, daß eine normale Verteilungs- bzw. Aufzählungskurve (Wirkungskurve) erst dann resultiert, wenn als Verteilungsargument (Abszissenmaßstab) nicht die Dosis der wirksamen Substanz, sondern ihr Logarithmus gewählt wird, veranlaßte WIECHOWSKI (13) zu der Bemerkung, daß „in Anbetracht der allgemeinen biologischen Geltung des WEBER-FECHNERschen Gesetzes die Dosenabstufung in einer geometrischen Reihe erfolgen muß. Denn es wachsen die Reizerfolge entsprechend den Logarithmen der Zunahme der Reizgrößen".

Abgesehen davon, daß diese Formulierung des WEBER-FECHNERschen Gesetzes nicht ganz korrekt ist[2]), könnte dieser Satz zu der irrigen Auffassung führen, als ob man aus der Tatsache, daß die Beziehung zwischen

1) Dafür spricht, daß im Jahre 1934 bei den staatlichen Prüfungen mit F 47 und L 31 als Standardpräparaten alle Ueberlebensprozentsätze etwas höher als erwartet ausgefallen sind; vgl. Abschnitt III der vorangehenden Arbeit (S. 14).

2) Es muß heißen: „. . . es wachsen die Reizerfolge entsprechend den Logarithmen der Reizgrößen". Denn das Gesetz besagt, daß die Zunahme der Reizerfolge der Zunahme der Logarithmen der Reizgrößen proportional ist (nicht dem Logarithmus der Zunahme der Reizgrößen).

dem Ueberlebensprozentsatz (Reizerfolg) und dem Logarithmus der Antigendosis (Reizgröße) durch eine lineare Funktion gegeben ist:

$$p_2 - p_1 = k \cdot (\log A_2 - \log A_1)$$

oder

$$p = k \cdot \log A + \text{const} \quad ,$$

die Gültigkeit des WEBER-FECHNERschen Gesetzes folgern könnte. Das ist jedoch keineswegs möglich.

Zunächst ist festzustellen, daß die Beziehung zwischen dem Ueberlebensprozentsatz und dem Logarithmus der Antigendosis durch eine normale Aufzählungskurve dargestellt wird; sie ist also nur für einen bestimmten Bereich linear und auch da nur angenähert, sodaß im Gegenteil gefolgert werden könnte, daß das WEBER-FECHNERsche Gesetz nicht oder nicht streng gültig sei. In Wirklichkeit ist aber die Folgerung der Gültigkeit des Gesetzes von der Form der normalen Aufzählungskurve ganz unabhängig. Die Gültigkeit des WEBER-FECHNERschen Gesetzes für die Beziehung zwischen Immunitätsgrad und Antigendosis gründet sich vielmehr, wie gezeigt werden soll, lediglich auf die Tatsache, daß sich für die Antigendosis bei Anwendung eines logarithmischen Abszissenmaßstabes wieder die gleiche Aufzählungskurve ergibt, die für den Immunitätsgrad bei üblicher arithmetischer Darstellung vorauszusetzen ist, nämlich eine normale Summationskurve.

Das WEBER-FECHNERsche Gesetz gilt also nur, wenn als Maß des Immunitätsgrades ein Verteilungsargument definiert wird, auf Grund desseu bereits bei Anwendung eines arithmetischen Maßstabes eine normale Aufzählungskurve erscheint. Es würde aber auch gelten, wenn die Form der normalen Aufzählungskurve eine ganz andere und dementsprechend die Beziehung zwischen Ueberlebensprozentsatz und Logarithmus der Antigendosis auch nicht angenähert linear wäre.

Man muß sich darüber klar sein, daß sich das WEBER-FECHNERsche Gesetz auf das einzelne Individuum bezieht. Da nun aber die Immunität nicht wie eine gewöhnliche Reizerscheinung rasch wieder abklingt, und da eine erneute Immunisierung eine ganz andere biologische Wirkung hat als die erste, sodaß ein und dasselbe Tier nicht zweimal unter gleichen Bedingungen immunisiert werden kann, läßt sich das WEBER-FECHNERsche Gesetz nur für den Vergleich von mehreren Individuen anwenden, die man sich als gleichartig vorzustellen hat. Unter diesen Voraussetzungen hat man das Gesetz, falls es für die Beziehung zwischen Immunitätsgrad und Antigendosis gültig ist, folgendermaßen zu formulieren:

„Die Unterschiede der Immunitätsgrade, die sich bei einem Tier entwickeln, je nachdem, ob es mit einer kleineren oder größeren Antigendosis immunisiert wird, sind proportional den Differenzen der Logarithmen der angewandten Antigendosen":

$$J_2 - J_1 = k \cdot (\log A_2 - \log A_1)$$

oder

$$J = k \cdot \log A + \text{const.}$$

Da es bis jetzt noch nicht möglich ist, Tiere von gleichartiger Immunisierbarkeit zu erkennen, ist man gezwungen, an Stelle von einzelnen Tieren Tierkollektive zu benützen. Der Mittelwert des bei genügend großen Kollektiven des gleichen Tiermaterials durch eine bestimmte Antigendosis hervorgerufenen Immunitätsgrades kann als konstant angesehen werden, wenigstens solange es sich um gleichzeitig ausgeführte Versuche handelt. Jedes Kollektiv gruppiert sich also um Tiere mit einer mittleren Immunisierbarkeit, die kurz als „Mitteltiere" bezeichnet werden mögen. Alle Mitteltiere des gleichen Tiermaterials haben gleiche Immunisierbarkeit.

Die Beziehung zwischen Antigendosis und erreichtem Immunitätsgrad hängt ab von dem Maß, in dem die Immunität gemessen wird. Man könnte z. B. als Immunitätsmaß der Mitteltiere (oder irgendwelcher anderer Tiere gleicher Immunisierbarkeit) den Prozentsatz der gegen die Prüfungsdosis des Testtoxins geschützten Tiere wählen. Dieser ist aber als Immunitätsmaß deshalb schlecht geeignet, weil er nur für eine bestimmte Toxindosis, also nur für einen verhältnismäßig kleinen Bereich, gilt. Ein besseres Maß bekäme man, wenn man mit wechselnden Toxindosen, aber gleichen Ueberlebensprozentsätzen arbeitete. Dann könnte man z. B. die Toxindosis, gegen die 50 % der Tiere geschützt sind, als Immunitätsmaß benützen. Eine zutreffende Vorstellung von der wirklichen Größe der Immunität, d. h. der Größe der Reaktion des Körpers auf den „Reiz" der Antigendosis, gewinnt man jedoch durch die Toxindosis ebensowenig wie durch den Prozentsatz der geschützten Tiere. Deshalb kann aus der Beziehung zwischen Ueberlebensprozentsatz bzw. Toxindosis und Antigendosis kein Schluß auf die Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes gezogen werden.

Es ist anzunehmen, daß die Häufigkeitsverteilung eines genotypisch homogenen Tiermaterials nach dem durch eine bestimmte Antigendosis erzeugten Immunitätsgrad, ebenso wie die Häufigkeitsverteilung nach Größe oder Gewicht, eine normale Gaußverteilung ist, solange nicht irgendwelche Gründe gegen eine normale Verteilung angeführt werden können[1]). Als Maß für den Immunitätsgrad sei darum ein Verteilungsargument definiert, auf Grund dessen die Verteilung der Tiere nach dem durch eine bestimmte Antigendosis bewirkten Immunitätsgrad eine normale Gaußverteilung ist.

1) Eine schiefe Verteilung könnte z. B. dadurch bedingt sein, daß schon die „Immunisierbarkeit" (also eine vor Durchführung der Immunisierung bereits vorhandene Eigenschaft) schief verteilt wäre. Die Schiefheit der Verteilung würde nach Kapteyn (22) dadurch zustandekommen, daß die Wirkung der die Variation bedingenden Ursachen auf verschieden große Varianten verschieden stark ist. Wenn die Varianten vor Einwirkung dieser Ursachen noch völlig gleich waren, dann sind sie es, nachdem die Ursachen eine Zeitlang gewirkt haben, nicht mehr, und wenn dann die Ursachen noch weiter einwirken, so müssen ihre Wirkungen je nach der Größe der entstandenen Unterschiede verschieden groß sein, und es wird eine schiefe Verteilung resultieren. Im allgemeinen pflegt die Abweichung von der normalen Kurve nur gering zu sein und erst bei sehr großen Kollektiven merklich zu werden.

Trägt man die Immunitätsgrade als Abszissen in ein gewöhnliches Koordinatensystem mit arithmetischer Abszissenteilung ein, dann erhält man symmetrische Verteilungs- bzw. Aufzählungskurven. In Figur 12 sind für zwei mit den Antigendosen A und A′ immunisierte Kollektive, deren Mitteltiere die Immunitätsgrade J_m bzw. J'_m erworben haben, die Verteilungskurven gezeichnet.

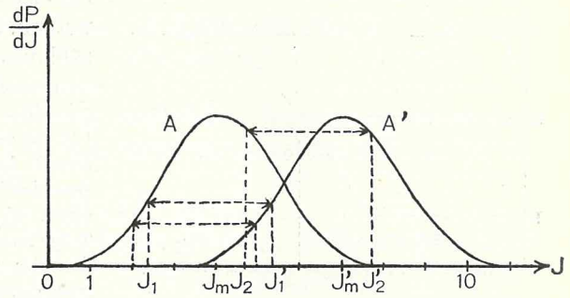


Fig. 12. *dP* bedeutet den Prozentsatz, der durch ein Intervall *dJ* der Kurvenfläche dargestellt ist.

Nehmen wir nun an, daß für das soeben definierte Immunitätsmaß das Weber-Fechnersche Gesetz gültig sei. Es muß dann für zwei Tiere gleicher Immunisierbarkeit, von denen das eine mit A, das andere mit A′ immunisiert ist, der Unterschied der Immunitätsgrade gleich $k \cdot (\log A - \log A')$ sein, denn in unserem Beispiel gilt für jedes Paar von Immunitätsgraden

$$J - J' = k \cdot (\log A - \log A').$$

Es sei ferner angenommen, daß die Konstante k für alle Tiere gleich sei. Die Kurven für A und A′ müssen also so gezeichnet sein, daß der Abstand zwischen zwei entsprechenden Immunitätsgraden (J_1, J_1'; J_2, J_2' usw.) stets der gleiche ist (in der Figur $J' - J = 3$). Mit anderen Worten, die für verschiedene Antigendosen sich ergebenden Verteilungskurven müssen den gleichen Parameter (und damit auch die gleiche Standardabweichung) haben, d. h. sie müssen kongruent sein[1]).

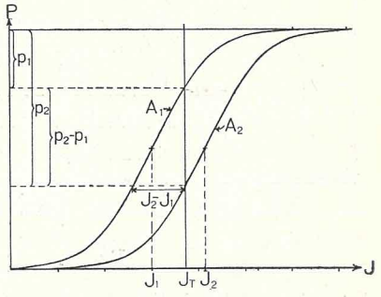


Fig. 13.

Was für die Verteilungskurven gilt, gilt natürlich auch für die Aufzählungskurven. In Figur 13 sind zwei Aufzählungskurven für die Antigendosen A_1 und A_2 gezeichnet, deren Mitteltiere die Immunitätsgrade J_1 bzw. J_2 erworben haben. Es möge nun sämtlichen Tieren dieser Kollektive die Giftdosis T injiziert werden, die für alle Tiere, deren Immunitätsgrad kleiner als J_T ist, tödlich ist. Dann gibt die Ordinate zu J_T für jedes Kollektiv den Prozentsatz q der getöteten Tiere an. Der Prozentsatz der Ueberlebenden ist $p = 100 - q$. Mit Hilfe dieser

1) Das letztere würde auch gelten, wenn der Immunitätsgrad z. B. der Wurzel der Antigendosis proportional wäre, sofern nur der Proportionalitätsfaktor für alle Tiere der gleiche ist.

Prozentsätze läßt sich die für die TREVANSche Auswertungsmethode benützte Wirkungskurve konstruieren (Fig. 14). Da wegen der vorausgesetzten Beziehung $J_2 - J_1 = k \cdot (\log A_2 - \log A_1)$ die Abstände der Logarithmen der Antigendosen in Figur 14 den Abständen der entsprechenden Immunitätsgrade in Figur 13 proportional sind, so muß, wenn als Abszissen die Logarithmen der Antigendosen gewählt werden, ebenfalls eine normale Aufzählungskurve resultieren.

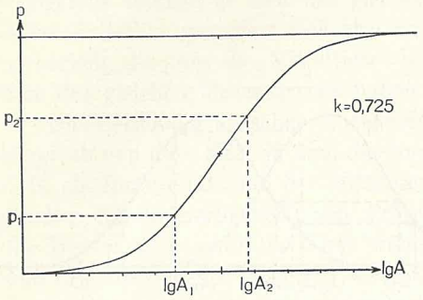
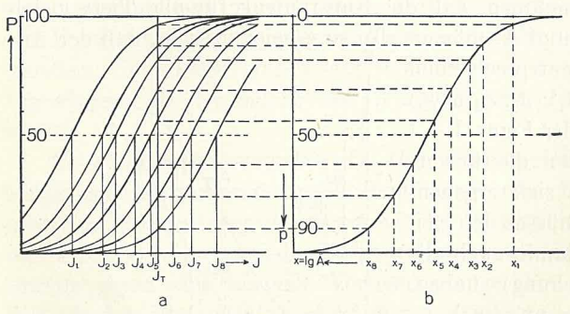


Fig 14.

Das läßt sich geometrisch sehr anschaulich an Figur 15 klarmachen. In 15a ist eine Reihe von Aufzählungskurven für die Dosen $A_1, A_2, A_3 \ldots A_8$ gezeichnet. Die Prozentsätze p sind durch die Ordinaten zu J_T gegeben. Trägt man nun in den gleichen Abständen der Aufzählungskurven, aber von rechts nach links, auf der Abszisse die Logarithmen der Antigendosen auf (man wählt also die Abstände der Logarithmen so, daß in der Gleichung $J_2 - J_1 = k \cdot (\log A_2 - \log A_2)$ der Proportionalitätsfaktor $k = 1$ wird) und zeichnet zu jedem Abszissenpunkt die zugehörige Ordinate q ein, dann erhält man eine zu den Aufzählungskurven in 15a parallele Kurve 15b, denn jeder Punkt der neuen Kurve hat, wie man aus der Figur ersieht, von dem entsprechenden Punkte einer der Aufzählungskurven den gleichen Abstand. Die neue Kurve ist auch dann noch eine normale Aufzählungskurve, wenn $k \neq 1$ ist; denn dann braucht ja nur jedes Abszissenintervall mit $^1/_k$ multipliziert zu werden.



Fg. 15.

Die Kurve 15b unterscheidet sich von der gesuchten Wirkungskurve nur dadurch, daß die Prozentsätze der getöteten Tiere für abnehmende Logarithmen der Antigendosen aufgetragen sind. Man braucht sich die Kurve nur um 180° gedreht zu denken, um die Wirkungskurve in der gewohnten Darstellung zu haben.

Auch analytisch läßt sich leicht zeigen, daß die in Figur 14 erhaltene Wirkungskurve eine normale Aufzählungskurve sein muß:

Aus $\frac{p_2 - p_1}{J_2 - J_1} = \frac{p_2 - p_1}{k \cdot (\log A_2 - \log A_1)}$ folgt für $J_2 \rightarrow J_1$ (vgl. Figur 13 und 14):

$$\frac{dp}{dJ} = \frac{1}{k} \cdot \frac{dp}{d \log A},$$

d. h. das Steigungsmaß der Wirkungskurve ist für jeden Wert p[1]) proportional dem Steigungsmaß der Aufzählungskurven an der entsprechenden Stelle. Wählt man $k = 1$, dann lassen sich beide Kurven zur Deckung bringen.

1) Man beachte, daß mit p (= 100—q) der Prozentsatz der gegen die Toxindosis T geschützten Tiere bezeichnet wird, während P den Prozentsatz der Tiere angibt, die einen bestimmten Immunitätsgrad J erreicht haben.

Man erhält also, wenn zwischen dem als „normales Verteilungsargument" definierten Immunitätsgrad und der Antigendosis die Beziehung $J - J' = k \cdot (\log A - \log A')$ besteht, bei Verwendung eines logarithmischen Maßstabes als Wirkungskurve eine normale Aufzählungskurve. Für jede andere Beziehung zwischen „normalem" Immunitätsgrad und Antigendosis würde sich eine verzerrte Wirkungskurve ergeben. Da die empirisch ermittelten Wirkungskurven normale Aufzählungskurven sind, so muß zwischen dem „normalen" Immunitätsgrad und der Antigendosis das WEBER-FECHNERsche Gesetz gelten.

Durch die Tatsache, daß die empirischen Wirkungskurven normale Aufzählungskurven sind, wird auch die zweite Annahme, daß nämlich die Konstante k der Beziehung

$$J = k \cdot \log A + \text{const}$$

für alle Tiere des gleichen Tiermaterials gleich ist, bewiesen: Wäre k für Tiere verschiedener Immunisierbarkeit verschieden, dann würde das bedeuten, daß die Geraden, die die Beziehung zwischen dem Immunitätsgrad und dem Logarithmus der Antigendosis geben, nicht parallel zueinander verschoben, sondern gegeneinander geneigt sind. Betrachten wir die drei Geraden, die für das Mitteltier (V) und für zwei in Bezug auf ihre Immunisierbarkeit symmetrisch dazu liegende Tiere (V′ und V″) gelten (Fig. 16). Da nach Voraussetzung die Aufzählungskurven nach dem Immunitätsgrad normal, also symmetrisch, sind, so muß, auch wenn k für die drei Geraden verschieden wäre, für jede Antigendosis die zugehörige Differenz $J' - J = J - J''$ sein, d. h. die drei Geraden müßten sich in einem Punkte schneiden. Die Geraden würden also mit steigenden Antigendosen entweder, wie in Figur 16 gezeichnet, divergieren oder konvergieren. Im ersteren Falle würde die Aufzählungskurve mit steigendem Immunitätsgrad flacher, im letzteren Falle steiler werden. Die sich ergebende Wirkungskurve würde in beiden Fällen unsymmetrisch ausfallen, wie man sich an Hand von Figur 15 leicht klar machen kann.

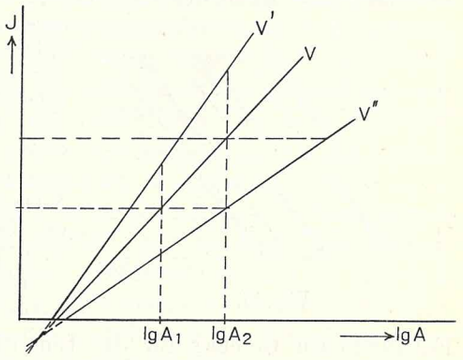


Fig. 16.

Die Schlußfolgerung, daß k für alle Tiere des gleichen Materials gleich ist, darf aus der Normalität der Wirkungskurve freilich nur unter der Voraussetzung gezogen werden, daß wenigstens solche Tiere, die durch eine bestimmte Antigendosis gleichen Immunitätsgrad erwerben, auch durch jede andere Antigendosis gleichen Immunitätsgrad erwerben, also gleiches k besitzen müssen. Diese Voraussetzung darf aber höchstens für genotypisch reines Material gemacht werden. Bei genotypisch heterogenem Material muß dagegen mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß man es mit einem Gemisch von Elementarrassen („reinen Linien") zu tun hat, von denen jede einen

anderen Wert für k aufweist. Ein solches Gemisch kann selbstverständlich Tiere enthalten, die nur durch eine bestimmte Antigendosis gleichen Immunitätsgrad, durch jede andere Dosis dagegen verschiedene Immunitätsgrade erwerben. Wenn nun, wie das bei dem Frankfurter Versuchsmaterial der Fall ist, auch bei genotypisch heterogenem Tiermaterial eine normale Aufzählungskurve erscheint, dann kann daraus zunächst nur gefolgert werden, daß für Gruppen von Tieren, die durch die gleiche Antigendosis den gleichen Immunitätsgrad erworben haben, ein mittlerer Wert von k existiert, der für alle derartigen Gruppen der gleiche ist (Fig. 17). Dann könnte freilich die Verteilung der Tiere nach dem Immunitätsgrad nicht mehr normal sein, wie man sich an Hand der Figuren 16 und 17 leicht klarmachen kann. Dies würde aber im Widerspruch stehen zu der Grundvoraussetzung, unter der alle bisherigen Betrachtungen angestellt sind (s. S. 90).

Es darf nun die zusätzliche Annahme gemacht werden, daß sich in der der Wirkungskurve zugrundeliegenden Verteilungskurve (die sich nur auf Tiere gleichen Immunitätsgrades bezieht) die links stehenden Gruppen aus anderen Elementarrassen zusammensetzen als die rechts stehenden. Zumindest sind die Anteile der Elementarrassen verschieden. Wenn also k für die einzelnen Elementarrassen erheblich verschieden wäre, dann müßten auch die links stehenden Gruppen der Verteilungskurve andere Mittelwerte für k haben als die rechts befindlichen. Diese Unterschiede der k-Werte würden aber eine unsymmetrische Wirkungskurve zur Folge haben. Auf Grund der Normalität der Wirkungskurve darf also auch bei genotypisch heterogenem Material angenommen werden, daß k für alle Tiere gleich ist. Kleine Unterschiede von k werden sich allerdings nicht erkennen lassen, solange die durch sie bedingte Veränderung der Wirkungskurve innerhalb der Fehlergrenzen der Kurvenbestimmung (s. S. 73) liegt.

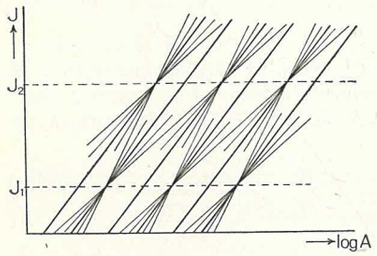


Fig. 17.

Daß aus der Form der Wirkungskurve auf die Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes für das Einzeltier kein Schluß gezogen werden kann, ist bereits in der vorangehenden Arbeit (S. 21 f.) gezeigt worden. Auch der von Hemmingsen (23) entwickelte Gedankengang beruht, wie dort ausgeführt ist, auf einem Trugschluß. Nur unter der Annahme, daß der Immunitätsgrad der durch eine bestimmte Antigendosis immunisierten Tiere normal verteilt ist, darf aus der normalen Verteilung der Logarithmen der gerade wirksamen Dosen geschlossen werden, daß die Beziehung zwischen Antigendosis und Immunitätsgrad dem Weber-Fechnerschen Gesetz entspricht, und daß k für alle Tiere den gleichen Wert hat.

Hemmingsen hat auch den Versuch unternommen, die schiefe Verteilung der gerade wirksamen Dosen und die Normalverteilung ihrer Logarithmen (Wirkungskurve) auf Grund der Kapteynschen Hypothese (vgl. Fußnote zu S. 90) zu erklären. Man müßte also annehmen, daß bereits vor Injektion der Antigendosen eine schiefe Verteilung besteht, etwa in bezug auf die für die Immunisierung der Tiere maßgebliche Reizbarkeitsschwelle. Diese Annahme könnte, wenn man eine lineare Beziehung zwischen Schwellenwertsdosis und Reizbarkeitsschwelle voraussetzt, in der Tat verständlich machen, warum die Schwellenwertsdosen

der verschiedenen Tiere oder die Dosen, die einen bestimmten Immunitätsgrad erzeugen, schief verteilt sind. Aber dann ist es logisch nicht gerechtfertigt, die bei Einführung eines logarithmischen Maßstabes sich ergebende Normalität der Wirkungskurve außerdem — wie das Hemmingsen offenbar beabsichtigt — auf die Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes zurückzuführen. Eine schiefe Verteilung der individuell wirksamen Dosen könnte bestehen, gleichgültig, ob das Weber-Fechnersche Gesetz gültig ist oder nicht (vgl. Fig. 4—6 der vorangehenden Arbeit, S. 24).

Es besteht nun keine Notwendigkeit, bei den Tieren eine für die Immunisierung maßgebliche Eigenschaft vorauszusetzen, welche schief verteilt sein müßte. Man kann sich nämlich vorstellen, daß sich alle Tiere hinsichtlich ihrer „Gesamtreaktion" gleich verhalten und sich nur durch die individuelle Reizbarkeitsschwelle unterscheiden. Es würde demgemäß auch bei Tieren, die mit unterschwelligen Dosen immunisiert werden, eine — wenn auch latente — Reaktion ablaufen. Nimmt man nun an, daß die zum Ueberschreiten der individuellen Reizbarkeitsschwellen erforderlichen „Grundreaktionen" den Reizbarkeitsschwellen proportional sind, und daß die Unterschiede zwischen den Grundreaktionen entsprechend dem Weber-Fechnerschen Gesetz proportional den Differenzen der Logarithmen der Schwellenwertdosen sind, so sind die Logarithmen der Schwellenwertsdosen normal verteilt, wenn die Reizbarkeitsschwellen normal verteilt sind, und wenn k für alle Tiere den gleichen Wert hat.

Faßt man, diesen Vorstellungen entsprechend, den Immunitätsgrad als Differenz zwischen der „Gesamtreaktion" und der zum Ueberschreiten der Reizbarkeitsschwelle erforderlichen „Grundreaktion" auf, so läßt sich auch zeigen, daß einerseits die durch eine bestimmte Antigendosis erzeugten Immunitätsgrade und andererseits die Logarithmen der Dosen, die einen bestimmten Immunitätsgrad erzeugen, normal verteilt sein müssen, wenn die Reizbarkeitsschwellen normal verteilt sind.

Da das Kapteynsche Theorem nur dann zur Erklärung herangezogen werden kann, wenn man die — an sich nicht widerlegbare — Annahme macht, daß eine lineare Beziehung zwischen Reizbarkeitsschwelle und Schwellenwertsdosis besteht, dürfte der zuletzt entwickelte Gedankengang den Vorzug verdienen, zumal er imstande ist, die Normalität der Wirkungskurve (mit logarithmischer Abszisse) aus dem Weber-Fechnerschen Gesetz herzuleiten. Außerdem erscheint es nicht angängig, die sehr beträchtliche Abweichung der Dosenverteilung von der Normalität mit den geringfügigen Schiefheiten in Parallele zu setzen, die man sich auf Grund des Kapteynschen Theorems zu erklären pflegt (vgl. auch Fußnote zu S. 90).

b.

Wenn auch die Abhängigkeit des Ueberlebensprozentsatzes vom Logarithmus der Antigendosis nicht streng linear, sondern durch eine normale Aufzählungskurve gegeben ist, so kann man doch diese normale Aufzählungs-

(Wirkungs-)Kurve für einen bestimmten Bereich als linear ansehen. Bezeichnet man die Prozentsätze der durch die Antigendosen A_1 und A_2 gegen die gleiche Dosis des Testgiftes geschützten Tiere mit p_1 und p_2, dann ist

$$p_2 - p_1 = \alpha \cdot (\log A_2 - \log A_1) = \alpha \cdot \log \frac{A_2}{A_1}, \qquad (1)$$

worin der Proportionalitätsfaktor α das Steigungsmaß des mittleren, als geradlinig anzusehenden, Bereiches der Wirkungskurve bedeutet $\left(\alpha = \frac{dp}{d \log A}\right)$.

Ebenso wie für die Immunisierbarkeit (S. 67f.) erhält man auch für die Widerstandsfähigkeit gegen Toxin normale Aufzählungskurven, wenn man als Verteilungsargument den Logarithmus der Toxindosis wählt [Glenny und Südmersen 1909, zitiert nach Trevan (9), S. 438, und Trevan (10)]. Man darf wohl annehmen, daß die Wirkungskurven auch dann noch normal sind, wenn die Tiere sämtlicher Kollektive mit der gleichen Antigendosis immunisiert sind[1]). Die Wirkungskurve für nicht immunisierte Tiere ist eine Aufzählungskurve nach der Giftresistenz, die Wirkungskurve für immunisierte Tiere dagegen eine Aufzählungskurve nach der Höhe der erreichten Immunität: In der der Wirkungskurve zugrundeliegenden Verteilungskurve stehen links die Tiere, die bereits durch kleine Toxindosen getötet werden, also einen niederen Immunitätsgrad erreicht haben, rechts die Tiere, die erst durch hohe Toxindosen getötet werden, deren Immunitätsgrad also entsprechend hoch ist. Man könnte also auch den Immunitätsgrad durch den Logarithmus der Toxindosis messen, die ein Tier gerade tötet bzw. die es gerade noch erträgt. Auch diese Verteilung ist eine normale, wenn die entsprechenden Wirkungskurven normale Aufzählungskurven sind. Die Beziehung zwischen dem Prozentsatz der getöteten Tiere und der Toxindosis, mit der die Tiere vergiftet wurden, kann dann ebenfalls für einen gewissen Bereich der Wirkungskurve als linear angesehen werden:

$$q_2 - q_1 = \tau \cdot (\log T_2 - \log T_1).$$

Da $p = 100 - q$ ist, kann man auch schreiben:

$$p_1 - p_2 = \tau \cdot (\log T_2 - \log T_1) = \tau \cdot \log \frac{T_2}{T_1}. \qquad (2)$$

Der Proportionalitätsfaktor $\tau = \frac{dq}{d \log T} = \frac{-dp}{d \log T}$ entspricht, ganz analog dem Faktor α, dem Steigungsmaß des mittleren, geradlinigen Bereiches der Wirkungskurve.

1) Eine Wirkungskurve dieser Art hat Gaddum (15) zur Bestimmung von b aus Versuchen mit der Schickschen Probe (vgl. Tab. 7, S. 83) benützt. Er erhält für die Abhängigkeit des dem Prozentsatz der gegen eine bestimmte Toxindosis negativ reagierenden Tiere entsprechenden y-Wertes [$y = \Phi(p)$] vom Logarithmus der Toxindosis eine angenähert geradlinige Kennlinie, d. h. die Beziehung zwischen dem Prozentsatz der negativ reagierenden Tiere und dem Logarithmus der Toxindosis ist durch eine normale Aufzählungskurve gegeben.

Aus (1) und (2) läßt sich die Aenderung des Prozentsatzes der geschützten Tiere bei gleichzeitiger Veränderung von Antigen- und Toxindosis ermitteln:

1) Es werde bei konstanter Toxindosis T_1 die Antigendosis von A_1 auf A_2 erhöht. Dabei steige der Prozentsatz der geschützten Tiere von p_1 auf p_i (Fig. 18). Es ist dann

$$p_i - p_1 = \alpha \cdot \log \frac{A_2}{A_1}. \qquad (3)$$

2) Wird nun bei konstanter Antigendosis A_2 die Toxindosis von T_1 auf T_2 gesteigert, und möge der Prozentsatz von p_i auf p_2 sinken, dann ist

$$p_i - p_2 = \tau \cdot \log \frac{T_2}{T_1}. \qquad (4)$$

3) Aus (3) und (4) folgt durch Subtraktion:

$$p_2 - p_1 = \alpha \cdot \log \frac{A_2}{A_1} - \tau \cdot \log \frac{T_2}{T_1}. \qquad (5)$$

Ist $\tau \cdot \log \frac{T_2}{T_1} > \alpha \cdot \log \frac{A_2}{A_1}$, dann ist $p_2 - p_1$ negativ, der Prozentsatz nimmt ab.

Werden Antigen- und Toxindosis proportional erhöht oder vermindert: $A_2 = g \cdot A_1$ und $T_2 = g \cdot T_1$, dann wird $\log \frac{A_2}{A_1} = \log \frac{T_2}{T_1} = \log g$; daraus folgt

$$p_2 - p_1 = \log g \cdot (\alpha - \tau). \qquad (6)$$

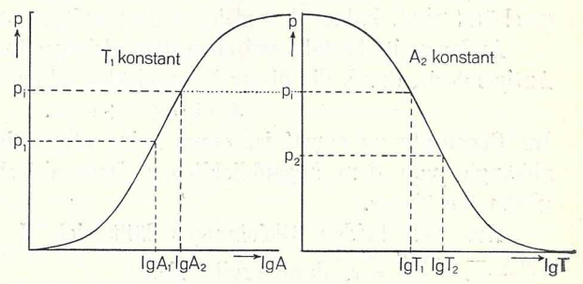


Fig. 18.

Aus der Formel ist nicht zu ersehen, ob bei proportionaler Erhöhung von Antigen- und Toxindosis der Prozentsatz der geschützten Tiere zu- oder abnimmt. Der Wert für α folgt aus der Beziehung

$$\frac{dp}{dx} = \frac{dy}{dx} \cdot \frac{dp}{dy}$$

(s. S. 77). Für $p = 50\,\%$ und $\frac{dy}{dx} = b = 1{,}33$ ist $\alpha = 1{,}33 \cdot 39{,}89 = 53$. Der Wert für τ ist nicht bekannt. Wie aus Tabelle 8[1]) hervorgeht, steigt der Prozentsatz der geschützten Tiere bei proportionaler Erhöhung von Antigen- und Toxindosis. Es muß also $\alpha - \tau$ ein positiver Wert ($\alpha > \tau$) sein.

Aus Gleichung (5) ergibt sich noch ein interesssanter Zusammenhang, eine Beziehung zwischen Toxindosis und Antigendosis: Setzt man $p_2 = p_1$, d. h. hält man den Prozentsatz konstant, dann ist

1) Vgl. Tabelle 10 der vorangehenden Arbeit (S. 25).

$$\alpha \cdot \log \frac{A_2}{A_1} = \tau \cdot \log \frac{T_2}{T_1},$$

$$\log \frac{T_2}{T_1} = \frac{\alpha}{\tau} \cdot \log \frac{A_2}{A_1} = \log \left(\frac{A_2}{A_1}\right)^{\frac{\alpha}{\tau}},$$

$$T_2 : T_1 = A_2^r : A_1^r$$

oder

$$T = f \cdot A^r,$$

wobei f und $r = \frac{\alpha}{\tau}$ Konstanten sind.

Zu dem gleichen Ergebnis kommt man auch noch auf einem anderen Wege: Da auch die Beziehung zwischen dem Prozentsatz der getöteten Tiere und der Toxindosis durch eine normale Aufzählungskurve gegeben ist, d. h. da auch der Logarithmus der Toxindosis ein „normales Immunitätsmaß" darstellt, so besteht zwischen dem definitionsgemäß normal verteilten Immunitätsgrad und dem Logarithmus der für das betreffende Tier gerade tödlichen Toxindosis eine lineare Beziehung:

$$J = k' \cdot \log T + \text{const}'$$ [1]).

Die Größen k′ und const′ sind von der Variabilität des Tiermaterials unabhängige Konstanten, denn alle Tiere, die gegen eine Toxindosis T gerade geschützt sind, haben den gleichen Immunitätsgrad.

Andererseits besteht zwischen dem gleichen Immunitätsgrad J und der Antigendosis, durch die dieser Immunitätsgrad erzeugt wird, die Beziehung

$$J = k \cdot \log A + \text{const.}$$

Im Gegensatz zu const′ ist const keine allgemeine Konstante: const ist abhängig von dem augenblicklichen Immunisierbarkeitszustand des betreffenden Tieres.

Aus den beiden Gleichungen läßt sich J eliminieren. Setzt man $\frac{\text{const} - \text{const}'}{k'} = c$, dann ergibt sich

$$\log T = \frac{k}{k'} \cdot \log A + c. \qquad (7)$$

Der Faktor c ist als Funktion von const ebenfalls abhängig von dem augenblicklichen Immunisierbarkeitszustand des einzelnen Tieres. Setzt man $\frac{k}{k'} = r$ und $c = \log f$, dann erhält man wieder

$$T = f \cdot A^r. \qquad (8)$$

Aus Gleichung (7) läßt sich die bisher stillschweigend gemachte Annahme, daß sowohl α wie auch τ für jeden Wert von T bzw. A bei einem bestimmten Tiermaterial konstant sind, beweisen: In Figur 19 sind die Geraden der Abhängigkeit des Logarithmus der Toxindosis vom Logarithmus der Antigendosis für ein Mitteltier (V) und zwei in Bezug auf die Logarithmen der gegen eine bestimmte Toxindosis gerade schützenden Antigendosen „symmetrisch liegende" Tiere — z. B. für die auf der Grenze zwischen erstem und zweitem (p = 25 %) bzw. drittem und viertem Quartil (p = 75 %) der Wirkungskurve befindlichen Tiere (V′ und V″) — dargestellt[1]). Wenn k für alle Tiere des benützten Versuchsmaterials gleich ist, wie das aus der Normalität der Wirkungskurve gefolgert wurde (S. 93), dann müssen die Geraden parallel verlaufen. Daraus folgt, daß die Abstände log A″ — log A′ und log T′ — log T″ und damit auch die Größen α und τ für alle Werte von T bzw. A die gleichen sind[2]).

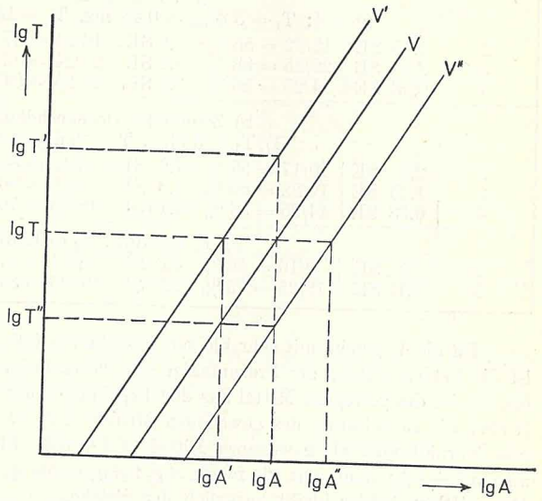


Fig. 19.

Da r wegen $\alpha > \tau$ größer als 1 ist, so muß, wenn der Prozentsatz der geschützten Tiere sich nicht ändern soll, die Toxindosis stärker erhöht werden als die Antigendosis: Wenn $A_2 = z \cdot A_1$, dann muß $T_2 = z^r \cdot T_1$ sein.

Die Berechnung von r aus den Daten der Tabelle 8 geschieht am einfachsten nach Gleichung (6):

$$\alpha - \tau = \frac{\Delta p}{\log g},$$

$$r = \frac{\alpha}{\tau} = \frac{\alpha}{\alpha - \frac{\Delta p}{\log g}}.$$

Als wahrscheinlichsten Wert findet man r = 2,5.

1) Aus dieser nur formal mit dem Weber-Fechnerschen Gesetz übereinstimmenden Beziehung kann die Gültigkeit des Weber-Fechnerschen Gesetzes nicht erschlossen werden, denn es wird über die Beziehung zwischen Reizgröße (Antigendosis) und Wirkung (Immunitätsgrad) nichts ausgesagt! Tiere mit dem gleichen Immunitätsgrad, die also gegen eine und dieselbe Toxindosis gerade geschützt sind, können je nach ihrer Immunisierbarkeit diesen Immunitätsgrad durch ganz verschiedene Antigendosen erworben haben.

1) Wenn man als Maß für den Immunitätsgrad den Logarithmus der gerade ertragenen Toxindosis wählt, dann hat man in Figur 19 eine anschauliche Darstellung des Weber-Fechnerschen Gesetzes. Eine Kurve dieser Art, die die Abhängigkeit des Logarithmus der Toxindosis, die gerade eine Reaktion hervorruft, vom Logarithmus der Antigendosis, mit der die Tiere immunisiert waren, darstellt, wird von Gaddum (15) zur Auswertung der Schick-Versuche (s. Fußnote zu S. 96) konstruiert. Aus seinen Bemerkungen geht hervor, daß erst durch die Einführung der Logarithmen der Toxindosen die Kurve für die Auswertung brauchbar wird. Der tiefere Grund hierfür dürfte darin zu suchen sein, daß die Kurve bei logarithmischem Ordinatenmaßstab einer Geraden, bei arithmetischer Ordinate dagegen einer Exponentialkurve entspricht.

2) Ueber die Möglichkeit des unmittelbaren Nachweises für die Konstanz von k bzw. von α und τ vgl. Fußnote 2 zu S. 102.

Tabelle 8.

Aenderung des Prozentsatzes der geschützten Tiere bei proportionaler Erhöhung von Antigen- und Toxindosis (vgl. Tab. 10 auf S. 25).

Versuch	A_1	p_1	A_2	p_2	Δp	Gewicht
	a) Vierfache Dosenerhöhung ($g = 4$; $T_1 = 3\ dl_{100} = 0{,}45$ mg, $T_2 = 12\ dl_{100} = 1{,}8$ mg T 172)					
2	1,15 SE	12/22 = 55 %	4,6 SE	16/24 = 67 %	12 ± 14,3 %	0,0049
3	2,3 SE	22/25 = 88 %	9,2 SE	22/24 = 92 %	4 ± 8,5 %	0,0137
4	0,58 SE	14/25 = 56 %	2,3 SE	21/25 = 84 %	28 ± 12,4 %	0,0065
	b) Zweifache Dosenerhöhung ($g = 2$) 1) $T_1 = 3\ dl_{100}$, $T_2 = 6\ dl_{100} = 0{,}9$ mg T 172					
1	2,3 SE	10/17 = 59 %	4,6 SE	16/19 = 84 %	25 ± 14,6 %	0,0047
2	1,15 SE	12/22 = 55 %	2,3 SE	9/16 = 56 %	1 ± 16,4 %	0,0037
4	0,58 SE	14/25 = 56 %	1,15 SE	19/25 = 76 %	20 ± 13,1 %	0,0058
	2) $T_1 = 6\ dl_{100}$, $T_2 = 12\ dl_{100}$ T 172					
2	2,3 SE	9/16 = 56 %	4,6 SE	16/24 = 67 %	11 ± 15,7 %	0,0041
4	1,15 SE	19/25 = 75 %	2,3 SE	21/25 = 84 %	8 ± 11,3 %	0,0079

Da die Versuche mit sehr kleinen Kollektiven (16—25 Tieren) angestellt wurden, ist die Fehlerstreuung der Prozentsätze sehr beträchtlich. Als wahrscheinlichster Wert für Δp ist das gewogene Mittel aus den Ergebnissen der einzelnen Versuche anzusehen. (Ueber die Berechnung des gewogenen Mittels s. S. 72f.). Für die drei Versuche mit $g = 4$ erhält man als gewogenes Mittel $11{,}8 \pm 6{,}3$. Für $g = 2$ ist Δp halb so groß, also $5{,}9 \pm 6{,}3$; denn aus (*6*) folgt: $\Delta p_2 : \Delta p_1 = \log g_2 : \log g_1 = \log 4 : \log 2 = 2 : 1$. Der mittlere Fehler bleibt natürlich der gleiche.

Aus den fünf Versuchen mit $g = 2$ folgt als gewogenes Mittel $13{,}2 \pm 6{,}2$. Da die mittleren Fehler beidemal gleich sind, so darf als wahrscheinlichster Wert für Δp bei zweifacher Dosensteigerung das einfache arithmetische Mittel zwischen 5,9 und 13,2 genommen werden: $\Delta p = 9{,}55 \pm 4{,}4$. Für r findet man dann

$$r = \frac{53}{53 - \frac{9{,}55}{0{,}3}} = 2{,}5.$$

Der größtmögliche Wert für Δp bei Zulassung des dreifachen mittleren Fehlers, d. h. der Wert, der in 370 Fällen voraussichtlich gerade einmal überschritten wird, läßt sich durch folgende Ueberlegung finden:

Aus Versuch 3 (Tabelle 8) ergibt sich ein Zuwachs von nur 4 %, der offenbar zu klein ist. Der mittlere Fehler der Differenz ist 8,5. Vergrößert man die Differenz 4 um ihren dreifachen mittleren Fehler, dann wird $\Delta p = 29{,}5$ %. Diesem Wert entspricht für $g = 2$ die Hälfte, also $\Delta p = 14{,}75$ %. Die Werte $\Delta p = 25$ und $\Delta p = 20$ in den Versuchen 1 und 4 sind also mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zu hoch!

Nimmt man an, daß die Differenz 4 gerade um den zweifachen Mittelfehler vom wahren Wert abweicht, dann ist für $k = 4$ $\Delta p = 4 + 17 = 21$ % und für $g = 2$ $\Delta p = 10{,}5$. Daraus folgt: $r = 2{,}95$. Andererseits ist, da bei allen Versuchen Δp positiv ist, sehr wahrscheinlich $\alpha > \tau$. Es ist also anzunehmen, daß der wahre Wert von r zwischen 1 und 3 liegt.

c.

In der Beziehung

$$J = k \cdot \log A + \text{const}$$

ist const für Tiere verschiedener Immunisierbarkeit verschieden. Um zu einem für alle Tiere verwendbaren Maß für den Immunitätsgrad zu

kommen, sei der Immunitätsgrad der Tiere, die gerade die Prüfungsdosis T_0 des Testtoxins (1,8 mg = 12 dl_{100} des Toxins T 172) zu entgiften vermögen, als „0“ definiert. Durch diese Definition ist für jedes beliebige Versuchsmaterial der Nullpunkt der Immunitätsskala festgelegt: Den Immunitätsgrad 0 haben z. B. die Mitteltiere aller Kollektive, von denen gerade 50 % gegen T_0 geschützt sind, gleichgültig, welche Antigendosis zur Erzielung dieses Schutzes erforderlich ist. Setzt man dieser Definition entsprechend

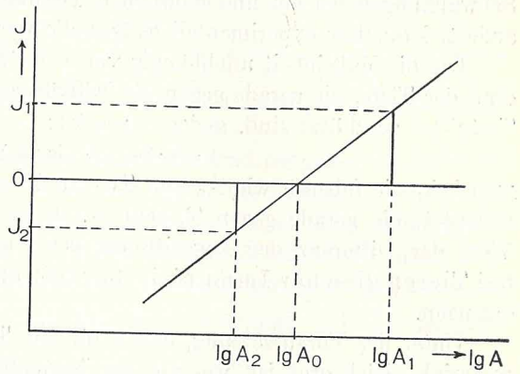


Fig. 20.

$$0 = k \cdot \log A_0 + \text{const},$$

so ergibt sich für die Beziehung zwischen der Antigendosis und dem durch sie erzeugten Immunitätsgrad die Gleichung

$$J = k \cdot (\log A - \log A_0),$$

worin A_0 die Antigendosis bedeutet, die bei dem betreffenden Tier gerade den Immunitätsgrad 0 erzeugt (Fig. 20).

Infolge des so definierten Nullpunktes ist das Immunitätsmaß nur ein relatives Maß. Der Immunitätsgrad 0 bedeutet nicht, daß keine Immunität vorhanden ist, sondern er stellt einen ganz bestimmten Immunitätsgrad dar, so wie der Nullpunkt des gewöhnlichen Thermometers eine ganz bestimmte Temperatur angibt, nämlich die des Gefrierpunktes von Wasser unter Normaldruck.

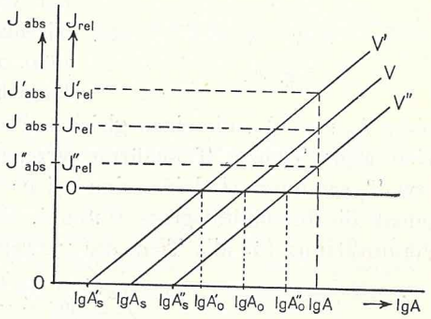


Fig. 21.

Das Weber-Fechnersche Gesetz kann nur gelten, wenn eine „Reizschwelle“ existiert, d. h. wenn erst von einer bestimmten Reizgröße (Antigendosis) an eine Reaktion (Immunität) ausgelöst wird. Ein absolutes Maß ließe sich durch Ermittelung der Schwellenwertsdosis A_s einführen. Diese Dosis ist gegeben durch die Gleichung

$$0 = k \cdot \log A_s + \text{const}_{abs}.$$

Durch Subtraktion von

$$J_{abs} = k \cdot \log A + \text{const}_{abs}$$

ergibt sich

$$J_{abs} = k \cdot (\log A - \log A_s).$$

Wie die relative Temperatur in Celsiusgraden sich von der absoluten Temperatur nur um den Wert 273 unterscheidet, so ist auch der relative Immunitätsgrad von dem absoluten nur durch eine für alle Tiere gleiche Konstante verschieden (Fig. 21):

$$J_{abs} - J_{rel} = \text{const}_{abs} - \text{const}_{rel} = k \cdot (\log A_0 - \log A_s).$$

Es wurde bereits gezeigt, daß für Tiere eines bestimmten Versuchsmaterials k eine Konstante ist. Ob k aber konstant bleibt, wenn man zu einem andern Tiermaterial übergeht, oder wenn sich infolge jahreszeitlicher Schwankungen bei ein und demselben Tiermaterial die Immunisierbarkeit ändert, kann nur experimentell festgestellt werden[1]).

Um die Maßeinheit unabhängig von k festzulegen, sei der Immunitätsgrad der Tiere, die gerade gegen die (willkürlich zu wählende) Dosis T_1 des Testgiftes geschützt sind, gleich 1 gesetzt:

$$1 = k \cdot (\log A_1 - \log A_0),$$

wobei A_1 die (ebenso wie A_0 von Tier zu Tier verschiedene) Antigendosis bedeutet, die gerade gegen T_1 schützt. k ist also gleich dem reziproken Wert der Differenz der Logarithmen der Antigendosen A_0 und A_1, die bei Tieren gleicher Immunisierbarkeit die Immunitätsgrade 0 bzw. 1 erzeugen.

Unter der Voraussetzung, daß k für alle Tiere eines bestimmten Tiermaterials gleich groß ist, was aus der Normalität der Wirkungskurven geschlossen wurde (s. S. 93), läßt sich k für jedes Tiermaterial experimentell bestimmen:

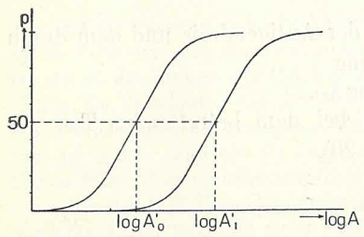


Fig. 22.

Man ermittelt zur gleichen Zeit die Wirkungskurven gegenüber den Toxindosen T_0 und T_1. Da das Steigungsmaß α der Wirkungskurven für ein bestimmtes Tiermaterial unabhängig von T ist[2]), genügt zur Bestimmung der zweiten Wirkungskurve ein Kollektiv. Die Antigendosen A_0 und A_1, die einen gleichen Prozentsatz (z. B. 50 %, Fig. 22) der Tiere gegen T_0 bzw. T_1 schützen, erzeugen bei Tieren, die gerade gegen T_0 bzw. T_1 geschützt sind (das sind bei p = 50 % die Mitteltiere), definitionsgemäß die Immunitätsgrade 0 und 1. Für diese Tiere — und damit nach Voraussetzung für alle Tiere des verwendeten Materials — ist also

$$k = \frac{1}{\log A'_1 - \log A'_0},$$

Sollte sich herausstellen, daß k unabhängig von jahreszeitlichen Schwankungen und von der Art des Tiermaterials ist, dann wäre es zweckmäßig, den Immunitätsgrad der gegen T_1 geschützten Tiere nicht gleich 1, sondern gleich $\log A_1 - \log A_0$ zu setzen.

1) Es erscheint sehr unwahrscheinlich, daß sich k, das für alle Tiere des Versuchsmaterials im gleichen Zeitpunkt den gleichen Wert hat, bei allen Tieren im gleichen Sinne und um den gleichen Betrag ändert. Ebenso wie Trevan und Gaddum für ihre Auswertungsmethoden Parallelität der Sommer- und Winterkurven, d. h. gleichbleibendes α, voraussetzen, wird man auch annehmen dürfen, daß k von jahreszeitlichen Schwankungen unabhängig ist, d. h. daß auch τ sich nicht verändert.

2) Auf Grund der experimentellen Bestimmung von α für zwei Werte von T kann man ermitteln, ob k konstant ist oder nicht: Sind beide Wirkungskurven gleich (parallel), dann ist α gleich, und dann muß auch k konstant sein (s. Fig. 19); vgl. auch die Ausführungen auf S. 99)

Dadurch wird k gleich 1, d. h. die Einheit des Immunitätsmaßes ist gleich dem Zuwachs an Immunität, der durch Erhöhung der Antigendosis um das zehnfache erreicht wird:

$$J' - J = \log 10\ A - \log A = 1.$$

Wenn k zu verschiedenen Jahreszeiten verschiedene Werte hat, dann muß (wegen $k/k' = \alpha/\tau$; s. S, 98) natürlich auch τ veränderlich sein, denn α ist für gleiches Tiermaterial zu verschiedenen Zeiten wegen der Parallelität der Wirkungskurven (Trevan) konstant, und k' ist vom Tiermaterial überhaupt unabhängig. Die oben bewiesene Konstanz von τ für jeden Wert A gilt also zunächst nur für gleichzeitig, d. h. mit völlig gleichem Tiermaterial ausgeführte Versuche.

Nachdem nun das Maß für den Immunitätsgrad festgelegt ist, läßt sich die (ideale) Verteilungskurve eines mit einer bestimmten Antigendosis immunisierten und mit T_0 vergifteten Kollektives nach dem Immunitätsgrad leicht konstruieren. Da für k = 1 die Aufzählungskurve nach dem Immunitätsgrad kongruent ist mit der Wirkungskurve, so ist auch die Standardabweichung μ gleich der Standardabweichung λ $\left(=\frac{1}{b}\right)$ der Wirkungskurve. (Für $k \neq 1$ hat man den aus der Beziehung $\mu = k \cdot \lambda$ sich ergebenden Wert zu setzen; vgl. Fig. 13 u. 14.) Den Immunitätsgrad 0 haben die Tiere, die gerade geschützt sind. Sind z. B. p % des Kollektives gegen T_0 geschützt, dann teilt die durch den Nullpunkt gelegte Ordinate die Verteilungsfläche im Verhältnis p : q (Fig. 23).

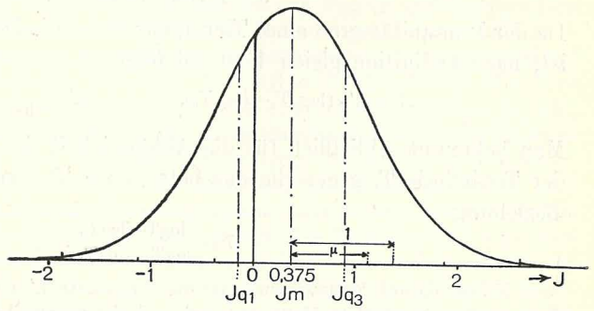


Fig. 23.

Figur 23 stellt unter der Voraussetzung, daß k = 1 ist, die (ideale) Verteilungskurve des am 19. 7. 1933 mit 2,3 SE immunisierten Kollektives dar, in dem 84/121 = 69 % der Tiere geschützt waren. Die Standardabweichung μ ist gleich der Standardabweichung $\lambda = 0{,}75$ der Wirkungskurve für das Frankfurter Tiermaterial. Für den Immunitätsgrad der verschiedenen Tiere gilt folgendes:

Ein Tier, das besser als q % und schlechter als 100—q = p % immunisiert wird, würde durch die Antigendosis A (p), welche p % der Tiere schützt, gerade den Immunitätsgrad 0 erwerben. Der Immunitätsgrad J, den dieses Tier durch die Antigendosis A erhält, ergibt sich aus der Gleichung

$$J = \log A - \log A_0 = \log \frac{A}{A_0},$$

in der A_0 den Wert A (p) annimmt. Es ist also $J = \log \frac{A}{A(p)}$. Wenn wie im vorliegenden Falle 69 % der Tiere geschützt sind [A = A(69)], dann ist

$$J = \log \frac{A(69)}{A(p)}.$$

Das Wirkungsverhältnis A(69)/A(p) wird in der bekannten Weise aus der Kennlinie (Figur 9) ermittelt.

Für den Immunitätsgrad des Mitteltieres findet man

$$J_m = \log \frac{A(69)}{A(50)} = \log 2{,}37 = 0{,}375.$$

Der Immunitätsgrad eines Tieres, das besser immunisiert ist als 25 % und schlechter als 75 %, das also durch die Dosis A(75) gerade geschützt würde, ist

$$J_{q_1}{}^{1)} = \log \frac{A(69)}{A(75)} = \log \frac{2{,}37}{3{,}22} = -0{,}137,$$

und der Immunitätsgrad eines Tieres, das durch die Dosis A(25) gerade geschützt würde,

$$J_{q_3} = \log \frac{A(69)}{A(25)} = \log \frac{2{,}37}{0{,}31} = 0{,}883,$$

Der Immunitätsgrad eines Tieres läßt sich natürlich auch durch den Logarithmus der gerade ertragenen Toxindosis ausdrücken. Für die Prüfungsdosis T_0 ist J definitionsgemäß gleich 0. Daraus folgt

$$0 = k' \cdot \log T_0 + \text{const}'.$$

Man kann also auch schreiben

$$J = k' \cdot (\log T - \log T_0).$$

Da der Immunitätsgrad eines Tieres, das gegen die Dosis T_1 gerade geschützt ist, nach Definition gleich 1 ist, so folgt

$$1 = k' \cdot (\log T_1 - \log T_0), \qquad k' = \frac{1}{\log T_1 - \log T_0}.$$

Man bekommt schließlich für die Abhängigkeit des Immunitätsgrades von der Toxindosis T, gegen die das betreffende Tier gerade geschützt ist, die Beziehung

$$J = \frac{\log T - \log T_0}{\log T_1 - \log T_0}.$$

Es sei darauf hingewiesen, daß die Konstante k′ nur für Toxinpräparate mit gleichem Toxoidgehalt (s. Fußnote 1 auf S. 7 der vorangehenden Arbeit) den gleichen Wert hat. k′ muß also für jedes neue Testtoxin neu bestimmt werden, d. h. es müssen zwei Dosen Θ_0 und Θ_1 ermittelt werden, die von gleichartig (d. h. mit gleicher Antigendosis) immunisierten Tieren die gleichen Prozentsätze töten, wie die Dosen T_0 und T_1 des Standardtoxins T 172. Mit k′ ändert sich auch τ (s. S. 98); τ ist also einerseits vom Tiermaterial, andererseits vom verwendeten Testtoxin abhängig.

6. Erworbene Immunität und natürliche Giftresistenz.

Die Messung der immunisierenden Wirksamkeit eines Impfstoffes durch den Tierversuch ist nur dann möglich, wenn die bereits vor der Immunisierung vorhandene unspezifische Giftresistenz gegenüber der „erworbenen Immunität“ vernachlässigt werden darf[2]). In der vorangehenden Arbeit

1) Mit q_1 und q_3 pflegt man die Grenzen zwischen erstem und zweitem bzw. drittem und viertem Quartil einer Verteilungsfläche zu bezeichnen. Jq_1 und Jq_3 sind also die Immunitätsgrade der auf diesen Grenzen befindlichen Tiere.

2) Eine Erhöhung der Giftresistenz durch die in den Formoltoxoidpräparaten enthaltenen unspezifischen Substanzen scheidet aus, denn nach Issaeff (16) sind solche Erscheinungen bereits nach fünf Tagen restlos verschwunden, während bei der Wertbemessung der Diphtherieantigene die Intoxikation erst 28 Tage nach der Immunisierung vorgenommen wird.

(S. 6 f.) ist dargelegt, daß der Fehler, der durch die „natürliche Resistenz“ verursacht wird, um so kleiner ist, je größer die Anzahl der sicher tödlichen Dosen (dl_{100}) ist, mit der die Tiere vergiftet werden.

Als sicher tödliche Dosis (dosis certe letalis minima) wird eine Giftmenge bezeichnet, die alle nicht immunisierten Versuchstiere bei subkutaner Injektion bis zum Ablauf des 5. Tages nach der Injektion tötet. Wenn die Verteilung der Tiere nach ihrer Giftresistenz (gemessen durch den Logarithmus der gerade tödlichen Toxindosis, vgl. S. 96) genau dem Gaussschen Fehlergesetz entspräche, dann könnte man streng genommen von einer dl_{100} überhaupt nicht sprechen, denn die Gausssche Fehlerkurve verläuft asymptotisch, d. h. wie groß auch immer die Giftdosis wäre, es müßte stets Tiere geben, die am Leben bleiben. Prigge (17) hat darauf hingewiesen, daß bereits durch 0,15 mg des Testtoxins T 172, eine Dosis, die nur um etwa 66 % größer ist als die dl_{75}, normale Meerschweinchen von 250 g Gewicht ausnahmslos innerhalb von fünf Tagen getötet werden. Ebenso scharf läßt sich die dl_0 (dosis certe tolerata maxima), die Dosis, die kein Versuchstier innerhalb von fünf Tagen tötet, angeben: $dl_0 = 0{,}03$ mg T 172 (18). Die den tatsächlichen Verhältnissen entsprechenden Verteilungskurven verlaufen also nicht asymptotisch, sondern schneiden die Abszissenachse. Auf diese Tatsache gründet sich die von Prigge und Hartoch (19) angegebene Fehlerberechnung für den einfachen Reihenversuch, welche die Entscheidung über die Zulässigkeit des einfachen Reihenversuches zur Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen gestattet. Bei allen biologischen Häufigkeitsverteilungen muß es eine obere und eine untere Grenze geben, worauf Prigge bezüglich des Diphtherietoxins in der obenerwähnten Arbeit (17) bereits nachdrücklich hinweist. In einer unbegrenzt großen Menge von Bohnen werden sicherlich extrem kleine Exemplare zu finden sein. Eine bestimmte Mindestgröße aber muß jede Bohne haben, um überhaupt lebensfähig zu sein. Ebenso kann aus biologischen Gründen eine obere Grenze nicht überschritten werden. Die Verteilung folgt also nicht rein dem Gesetz des Zufalls, sondern außerdem noch Gesetzen biologischer Natur, die um so stärker in Erscheinung treten, je extremer die Varianten sind. Hierfür finden sich bei Yule (21) einige Beispiele, aus denen der nichtasymptotische Verlauf der Verteilungskurve gefolgert werden muß.

Für die Giftresistenz scheinen bis zur dreifachen Standardabweichung ($\pm 3\ \mu$) die Abweichungen der Verteilungskurve von der Gaussschen Zufallskurve nur gering zu sein, die Schnittpunkte mit der Abszissenachse jedoch nicht weit von $\pm 3\ \mu$ entfernt zu liegen:

Berechnet man die Streuung aus einer für das Diphtherietoxin T 172 mit dem Frankfurter Meerschweinchenmaterial ermittelten Wirkungskurve, dann findet man für μ den Wert $0{,}19 \pm 0{,}07$: Die dl_{75} ist — allerdings nur mit 40 Tieren — zu 0,09 bestimmt. Da die Wirkungskurve zwischen $p = 25$ % und $p = 75$ % nur wenig von einer Geraden abweicht, und da als zweiter Punkt dieser Geraden die dl_{50} (das geometrische Mittel zwischen der dl_0 und der dl_{100}: $\sqrt{0{,}03 \cdot 0{,}15} = 0{,}067$) gegeben ist, so läßt sich μ mit Hilfe dieser Geraden finden als Differenz der Abszissen für die Prozentsätze $p = 69$ ($\log T(69) = +\ ½\ \mu$) und $p = 31$ ($\log T(31) = -\ ½\ \mu$). Man findet $\mu = \log 1{,}55 = 0{,}19$.

Die Grenzen des einfachen mittleren Fehlers des Wertes 0,09 für die dl_{75} sind etwa 0,08 und 0,1. Für den Wert 0,08 ist $\mu = 0{,}12$. Da aus einer Versuchsreihe mit einem anderen Toxin (T 28) für μ der Wert 0,11 gefunden wird, dürfte der Wert 0,08 der dl_{75} besser entsprechen als der Wert 0,09.

Nimmt man den Unterschied der Logarithmen der Grenzdosen dl_0 und dl_{100} zu 6 μ an, dann findet man

$$\mu = \frac{1}{6} \cdot \log \frac{0{,}15}{0{,}03} = 0{,}12.$$

Die Zahlen zeigen, daß man keinen großen Fehler begeht, wenn man als Standardabweichung den sechsten Teil der Differenz der Logarithmen der Grenzdosen dl_0 und dl_{100} annimmt.

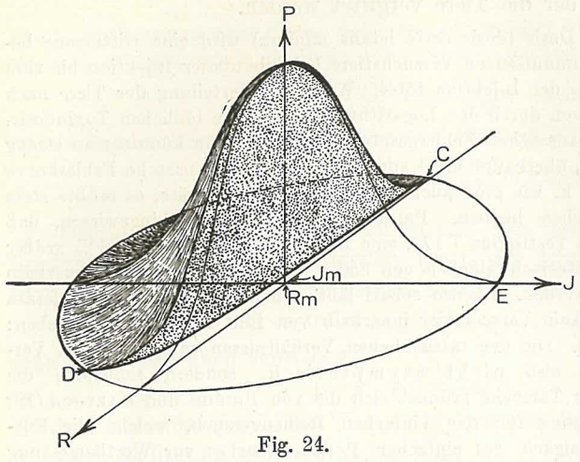


Fig. 24.

Da sowohl die Verteilung nach dem Immunitätsgrad wie auch die Verteilung nach der primär vorhandenen Resistenz (gemessen durch den Logarithmus der gerade entgifteten bzw. vertragenen Toxindosis) normal ist und da vorausgesetzt werden darf, daß zwischen Immunitätsgrad und Giftresistenz keine Korrelation besteht, so läßt sich die Verteilung nach beiden Argumenten zugleich durch eine räumliche Figur darstellen: Auf den Achsen i und r der Grundfläche werden die Immunitäts- bzw. Resistenzgrade abgetragen. Die Ordinate P gibt den Prozentsatz der Tiere mit dem Immunitätsgrad i und dem Resistenzgrad r an. Mißt man die Größen i und r in Standardabweichungen μ_i bzw. μ_r als Einheiten:

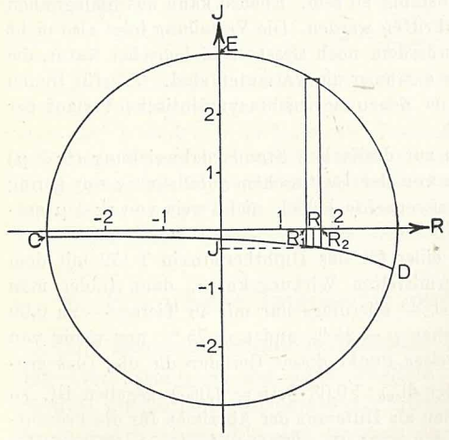


Fig 25.

$$J = \frac{i}{\mu_i}, \qquad R = \frac{r}{\mu_r},$$

dann wird aus dem zweiseitigsymmetrischen Verteilungskörper ein Rotationskörper (Fig. 24) dessen Grundfläche ein Kreis mit (nach dem Gaussschen Fehlergesetz) unendlich großem Radius ist. Nach den obigen Bemerkungen ist die Grundfläche des den tatsächlichen Verhältnissen entsprechenden Verteilungskörpers jedoch endlich, und zwar liegen die Schnittpunkte der einzelnen Vertilungskurven mit der Grundfläche ungefähr auf der Peripherie des Kreises mit dem Radius 3 (μ).

Wie groß ist nun der zu erwartende Ueberlebensprozentsatz bei einer Antigendosis, die — für sich allein — 50 % der Tiere schützen würde?

Wenn gerade 50 % der Tiere durch erworbene Immunität gegen die Toxindosis T_0 geschützt sind, dann befinden sich diese Tiere alle auf dem Halbkreis über der R-Achse (Fig. 25). Infolge der natürlichen Resistenz werden aber mehr als 50 % der Tiere am Leben bleiben, und zwar von Tieren eines bestimmten Resistenzgrades um so mehr, je höher der Resistenzgrad ist. Die punktierte Fläche über der Linie CD (Fig. 24) stellt die Grenz zwischen Leben und Tod dar. Der über dem Flächenstück CDEC der Grundfläche befindliche Teil des Verteilungskörpers entspricht dem Anteil der überlebenden Tiere.

Die Verteilungskurve der Prozentsätze nach dem Resistenzgrad hat die Gleichung

$$\frac{dP}{dR} = \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{R^2}{2}}.$$

Einen Resistenzgrad zwischen R_1 und R_2 ($R_2 - R_1 = \Delta R$, Fig. 25) haben

$$\Delta P = \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{\overline{R}^2}{2}} \Delta R$$

Prozent erreicht. Die Verteilungskurve dieser ΔP Prozent nach ihrem Immunitätsgrad ist

$$\frac{d\Delta P}{dJ} = \frac{\Delta P}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{J^2}{2}}.$$

Der Prozentsatz der Tiere mit einem Resistenzgrad zwischen R_1 und R_2, die einen Immunitätsgrad größer oder gleich J (Fig. 25) erreicht haben, ist gegeben durch das Integral

$$\int_J^{\infty} \frac{100}{2\pi} \cdot e^{-\frac{R^2}{2}} \Delta R \cdot e^{-\frac{J^2}{2}} dJ.$$

Geht man zur Grenze $R_1 = R_2 = R$ über und summiert alle auf diese Weise erhaltenen Integrade zwischen den Grenzen $R = -\infty$ und $R = +\infty$, dann erhält man für den Prozentsatz der Tiere, die auf Grund ihrer erworbenen Immunität und ihrer natürlichen Giftresistenz am Leben bleiben, das Doppelintegral

$$p = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_J^{+\infty} \frac{100}{2\pi} \cdot e^{-\frac{R^2}{2}} \cdot e^{-\frac{J^2}{2}} dR\, dJ.$$

Die Punkte der Linie CD (Fig. 25)[1]) sind gegeben durch die Gleichungen

$$J = \frac{\log T_J}{\mu_i} \quad \text{und} \quad R = \frac{\log T_R}{\mu_r},$$

wenn man mit T_J die durch die erworbene Immunität, mit T_R die infolge der natürlichen Resistenz gerade entgiftete bzw. vertragene Toxindosis bezeichnet. Die Tiere mittlerer Immunisierbarkeit vermögen nach Voraussetzung (50 % Schutz) durch die erworbene Immunität gerade die injizierte

1) Die Figur 25 entspricht im wesentlichen den Figuren der Tabelle 1 der vorangehenden Arbeit (S. 6), nur daß dort an Stelle der Logarithmen die Dosen selbst eingetragen sind und daß die Annahme gemacht ist, daß nicht die Giftdosis T_0, sondern ein bestimmter Anteil derselben von 50 % der Tiere auf Grund der erworbenen Immunität entgiftet wird. Hieraus ergibt sich eine etwas verschiedene Betrachtungsweise.

Dosis T_0 zu entgiften, während die Tiere mit mittlerer Resistenz auf Grund ihrer Resistenz gerade eine dl_{50} vertragen. Setzt man den Punkt $[J_m, R_m]$ als Koordinatenanfangspunkt (Fig 24), dann wird

$$J = \frac{\log T_J - \log T_0}{\mu_i} \quad \text{und} \quad R = \frac{\log T_R - \log dl_{50}}{\mu_r}.$$

Da die Tiere, die sich auf der Linie CD, der „Grenzlinie" zwischen Leben und Tod, befinden, gerade die Dosis T_0 ertragen können, so besteht zwischen T_J und T_R dieser Tiere die Beziehung

$$T_J + T_R = T_0.$$

Man erhält für die Linie CD die Gleichungen

$$J = \frac{\log (T_0 - T_R) - \log T_0}{\mu_i}, \quad R = \frac{\log T_R - \log dl_{50}}{\mu_r}.$$

Die Differentiation nach T_R ergibt

$$\frac{dJ}{dT_R} = \frac{-1}{\mu_i \cdot (T_0 - T_R) \cdot \ln 10}, \quad \frac{dR}{dT_R} = \frac{1}{\mu_r \cdot T_R \cdot \ln 10}.$$

Daraus folgt

$$\frac{dJ}{dR} = -\frac{\mu_r}{\mu_i} \cdot \frac{T_R}{T_0 - T_R}.$$

Für μ_r sei der Wert 0,12 ($= \frac{1}{6} \cdot \log \frac{0,15}{0,03}$, s. o. S. 105) gewählt. μ_i ist die Standardabweichung der Wirkungskurve für variable Toxindosen bei konstanter Antigendosis, deren Steilheitsgrad mit τ bezeichnet wurde (S. 96). Zwischen μ_i und τ besteht derselbe Zusammenhang wie zwischen λ und α. Es ist $\lambda : \frac{1}{\alpha} = \mu_i : \frac{1}{\tau}$ oder $\mu_i = \frac{\alpha}{\tau} \cdot \lambda$.

Der Wert $\frac{\alpha}{\tau}$ liegt sehr wahrscheinlich zwischen 1 und 3 (vgl. S. 100). Es sei zunächst angenommen, daß $\frac{\alpha}{\tau} = 1$, also $\mu_i = \lambda = 0,75$ ist.

Die dl_{50} ist, wenn die Logarithmen der Dosen normal verteilt sind, das geometrische Mittel zwischen den Grenzdosen dl_0 und dl_{100} ($dl_{50} = 0,067$ mg T 172, s. S. 105).

Tabelle 9.

T_0	R	$\mu_i = \lambda = 0,75$		$\mu_i = 2,5 \cdot \lambda = 1,875$	
		J	$\frac{dJ}{dR}$	J	$\frac{dJ}{dR}$
3 dl_{100} = 0,45 mg T 172	−2	−0,052	−0,015	−0,021	−0,006
	0	−0,093	−0,028	−0,037	−0,011
	+2	−0,172	−0,056	−0,069	−0,022
12 dl_{100} = 1,8 mg T 172	−2	−0,012	−0,0035	−0,0048	−0,0014
	0	−0,023	−0,0062	−0,0091	−0,0025
	+2	−0,039	−0,011	−0,0155	−0,0044

Wie die in Tabelle 9 zusammengestellten Werte von $\frac{dJ}{dR}$ für $T_0 = 3\ dl_{100}$ und $T_0 = 12\ dl_{100}$ zeigen, verläuft die Linie CD zwischen den Grenzen $\pm 2\ \mu_r$ fast parallel zur R-Achse. Da sich zwischen diesen Grenzen 95,5 % aller Tiere befinden, so kann man, ohne einen großen Fehler zu machen, die

Linie CD durch eine Parallele zur R-Achse ersetzen. Der Fehler wird am kleinsten, wenn die Parallele an der Stelle, an der sich die meisten Tiere befinden, mit der Linie CD zusammenfällt. Da sich die meisten Tiere auf der Linie CD in der Umgebung des Punktes $R = 0$ befinden, so hat man die Parallele durch diesen Punkt der Linie CD zu legen. Der Prozentsatz der Ueberlebenden ist dann näherungsweise gegeben durch das Integral

$$p = \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \int_{J(R=0)}^{+\infty} e^{-\frac{J^2}{2}}\, dJ.\ ^{1)}$$

Für $T_0 = 3dl_{100} = 0,45$ mg T 172 findet man

$$p = 53,6\ \%$$

und für $T_0 = 12\ dl_{100} = 1,8$ mg T 172

$$p = 50,9\ \%.$$

Durch Erhöhung der Prüfungsdosis des Testtoxins auf das Vierfache sinkt der durch die natürliche Resistenz verursachte Fehler von 3,6 % auf 0,9 %, also auf ein Viertel.

Setzt man für $\frac{\alpha}{\tau}$ den berechneten Wert 2,5 (s. S. 99) ein, dann werden die absoluten Beträge der Fehler erheblich geringer:

$$p_{3dl_{100}} = 51,5\ \% \text{ und } p_{12dl_{100}} = 50,4\ \%,$$

während die Relation 4 : 1 erhalten bleibt.

Die Fläche CDEC würde sich, wenn sich die Grenzdosen vom Sommer zum Winter um ein Zehntel verringern (17), sodaß die Werte für dl_{100} und dl_0 von 0,15 bzw. 0,03 auf 0,135 bzw. 0,027 herabsinken, nur um einen verschwindenden Betrag verkleinern. Z. B. würde man an Stelle von 53,6 % und 50,9 % die Werte 53,2 % und 50,8 % erhalten. Auch hieraus ist zu ersehen, daß die sehr beträchtlichen jahreszeitlichen Schwankungen im Prozentsatz der durch eine bestimmte Antigendosis geschützten Tiere keinesfalls durch die Schwankungen der natürlichen Resistenz verursacht werden können, sondern, wie bereits in der vorangehenden Arbeit (S. 16) gezeigt wurde, als Schwankungen in der Immunisierbarkeit aufgefaßt werden müssen.

Nachtrag bei der Korrektur.

Die von mir benützte 3. Auflage des Czuberschen Werkes (2) enthält auf S. 184 eine Unrichtigkeit. Die betreffende Stelle ist in der 4. Auflage, die ich erst während der Korrektur in die Hand bekam, berichtigt. Danach ist der mittlere Fehler für das auf S. 58 beschriebene Urnenschema

$$\sqrt{\frac{N-n}{N} \cdot \frac{p \cdot q}{n}}\ ^{2)},$$

1) Die Auswertung dieses Integrals kann nach der bereits früher erwähnten Tabelle in Rietz-Baur (5) ausgeführt werden.

2) Für genügend große Werte von N, n und N—n!

also kleiner als der mittlere Fehler des BERNOULLI-Schemas. Die zu erwartende Fehlerstreuung der Versuchsergebnisse ist infolgedessen nicht übernormal, sondern unternormal. Diese Unternormalität wird sich am stärksten bemerkbar machen, wenn das Versuchsmaterial restlos auf zwei Versuchsserien verteilt wird. Der Korrektionsfaktor des mittleren BERNOULLI-Fehlers ist dann $1:\sqrt{2} = 0{,}707$. Das gilt besonders für die Versuche der Tabelle 5 der vorangehenden Arbeit (S. 12). deren Ergebnisse also höher zu bewerten sind, als es auf S. 65 geschehen ist: Die Differenz zwischen den Werten 53,7 % für L 31 und 58,4 % für F 47 ist $4{,}7 \pm 1{,}9$, also nicht das 1,7fache sondern das 2,5fache ihres mittleren Fehlers! In ähnlicher Weise sind auch die Versuche der Tabelle 13 (S. 28) zu bewerten.

Trotzdem ist das auf S. 64 angegebene Verteilungsschema in vielen Fällen vorzuziehen; denn es gewährleistet bei der Aufteilung des Materials auf mehr als zwei Serien Gleichheit der Wahrscheinlichkeiten p′ für jede Serie, während die bei nacheinander erfolgender Fertigstellung der einzelnen Serien unvermeidlichen Schwankungen der p′-Werte eine übernormale Streuung verursachen können (vgl. S. 56 unten). Außerdem ist eine möglichst gleichmäßige Verteilung aus den auf S. 59 und 64 angeführten Gründen wünschenswert.

Literaturverzeichnis.

1) Rapport, Statens Seruminstitut, Kopenhagen. Mai 1934 (nicht im Druck erschienen).

2) CZUBER, E., Wahrscheinlichkeitsrechnung I, 3. Aufl., Leipzig und Berlin 1914.

3) LEXIS, W., Abhandlungen zur Theorie der Bevölkerungs- und Moralstatistik. Jena 1903.

4) CHARLIER, C. V. L., Vorlesungen über die Grundzüge der mathematischen Statistik. 2. Aufl. Lund 1920.

5) RIETZ-BAUR, Handbuch der mathematischen Statistik. Leipzig und Berlin 1930.

6) EHRLICH, P., Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrb., Bd. 6, S. 299, 1898.

7) BEHRENS, GROS und HILDEBRANDT, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 167, S. 365, 1932.

8) KÄRBER, G., Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 162, S. 480, 1931.

9) TREVAN, J. W., The Error of Determination of Toxicity. Proc. Roy. Soc. B, Bd. 101, S. 483, 1927.

10) — A statistical note on the testing of anti-dysentery-sera. Journ. Path. Bact., Vol. 32, p. 127, 1929.

11) GADDUM, J. H., Methods of Biological Assay depending on a Quantal Response. Med. Res. Council 1933, Special Report Series, Nr. 183.

12) SHACKELL, L. F., Journ. Pharm. a. exp. Therap., Vol. 24, p. 53, 1925.

13) WIECHOWSKI, W., Die Messung pharmakologischer Wirksamkeit am lebenden Tier, insbesondere die Ermittelung der minimal tödlichen Gabe... Arch. exp. Path. u. Pharm., Bd. 128, S. 135, 1928.

14) GRAY, TREVAN, BAINBRIDGE und ATTWOOD, Proc. Roy. Soc. B, Vol. 108, p. 54, 1931.

15) GADDUM, J. H., Summary of Conclusions relative to Experiments with Diphtheria Antigen. 1933. Diese Arbeit wurde auf Grund des von der Standardisierungskommission des Völkerbundes zusammengestellten Materials (15a) angefertigt und den beteiligten Instituten in Abschrift zugesandt.

15a) Diphtheria Immunisation. Statement regarding the present state of the work carried out in accordance with resolution V (diphtheria prophylactic) of the report of the Permanent Commission on Biological Standardisation (Meeting, held in London on June 23rd, 1931.) 1932 (nicht im Druck erschienen).

16) ISSAEFF, Untersuchungen über die künstliche Immunität gegen Cholera. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 16, S. 287, 1894.

17) PRIGGE, R., Ueber den Toxongehalt des Diphtheriegiftes. II. Mitteilung. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 81, S. 185, 1934.

18) Prigge, R., Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung des Diphtheriegiftes. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 77, S. 421, 1933.

19) — und Hartoch, O., Untersuchungen über die Wertbestimmung des Dysenterieserums mit Hilfe eines hochwertigen Shiga-Kruse-Toxins. Diese Zeitschr., H. 23, S. 1, 1930.

20) Kisskalt, K., Untersuchungen über Konstitution und Krankheitsdisposition. 4. Die Kurve der Giftdisposition. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 81, S. 42, 1915.

21) Yule, G. U., On the Distribution of Deaths with Age when the Causes of Death Act Cumulatively, and Similar Frequency Distributions. Journ. Roy. Stat. Soc., Vol. 73, p. 26, 1910.

22) Kapteyn, J., Skew frequency curves in biology and statistics. Groningen 1904.

23) Hemmingsen, A. M., The Accuracy of Insulin Assay on White Mice, Part I. Quart. Journ. Pharm., Vol. 6, p. 39, 1933.

24) Prigge, R., Verhandlungen der Deutschen Gesellsch. f. Innere Medizin, 47. Kongreß (Wiesbaden 1935) S. 543.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 6533