

Die Immunisierung gegen Kalbslab.

Von

S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 16. Februar 1912.)

In dieser Zeitschrift habe ich früher über Versuche berichtet, aus welchen folgendes hervorgeht:¹⁾

1. Die Magenschleimhaut von Kalb, Meerschweinchen, Hecht und Schwein enthält neben dem Lab auch eine labungshemmende Substanz. Das Lab kommt besonders nach der Behandlung der neutralen Infusion der Schleimhaut (des Labzymogens) mit Salzsäure und Neutralisieren zum Vorschein, die hemmende Substanz nach Behandeln mit schwachem Ammoniak und Neutralisieren. Letztere wird durch Behandlung mit schwacher Salzsäure unter Freiwerden von Lab mindestens zum Teil zerlegt.

2. Der Hemmungskörper wird zum mindesten beim Kalbe in der Magenschleimhaut bereitet.

3. Die Hemmung ist spezifisch, indem nur oder vorzugsweise die Wirkung des arteigenen Labs gehemmt wird.

4. Beim Erhitzen der hemmenden Lösung auf 100° bleibt die spezifische Hemmung zum Teil erhalten; doch wird dieselbe nunmehr beim Behandeln mit Salzsäure nicht aufgehoben.

5. Beim Erhitzen des mit HCl erhaltenen, fertigen Labs in konzentrierter Lösung werden auch hemmende Substanzen erhalten, die aber keine spezifische Wirkung besitzen, das Lab nicht an sich verfestigen und wahrscheinlich als proteolytische Spaltungsprodukte aufzufassen sind.

Da folglich unter Umständen spezifisch wirkende Hemmungskörper im Tierkörper normal gebildet werden, so erübrigt

¹⁾ Bd. 72, S. 187; Bd. 74, S. 242; Bd. 76, S. 355, 1911.

nachzusehen, ob dieselben mit anderen, vorher gefundenen hemmenden Substanzen identisch sein können, und dies dürfte zweckmäßig zunächst dadurch geschehen können, daß wir prüfen, ob die letzteren spezifische Wirkung besitzen.

Zuerst wurden von Hammarsten und Rödén im normalen Pferdeserum, sowie in anderen Sera Substanzen nachgewiesen, welche die Wirkung des Kalbslaba zu hemmen imstande sind. Die im normalen Pferdeserum vorhandene hemmende Substanz ist seitdem von sehr vielen Forschern studiert worden. So viel ich habe finden können, existieren aber keine Untersuchungen über das Verhalten des normalen Serums zu Labenzymen von verschiedenen Tierarten.

Deshalb habe ich eine solche Prüfung unternommen; aus derselben geht hervor, daß die Wirkung keineswegs art-spezifisch ist.

Zunächst wurde das normale Pferdeserum geprüft. Das Serum wurde möglichst neutralisiert, mit 25 Teilen Wasser verdünnt und einerseits eine Nacht im Eisschrank mit Salzsäure (25 ccm + 5 ccm 1^o/₁₀iger HCl) behandelt und mit titrierter NaOH neutralisiert, andererseits mit der entsprechenden Mischung von HCl und NaOH versetzt. Dann wurde mit folgenden Mischungen nach Erwärmen auf 37° und Zusatz von 1 ccm von verschiedenen Lablösungen die Gerinnungszeiten bestimmt:

1 ccm H ₂ O + 10 ccm Milch	A
1 » mit HCl behandelte Serummischung + 10 ccm Milch	B
1 » » Salz versetzte » + 10 » »	C

	A	B	C
Pferdelab	10 Min.	9 Min.	10 ¹ / ₂ Min.
Kalbslab	9 »	9 »	Keine Ger. in 3 St.
Schweinelab	9 ¹ / ₂ »	9 ¹ / ₂ »	11 ¹ / ₂ Min.
Schafslab	11 ¹ / ₂ »	11 »	16 ¹ / ₂ »
Meerschweinchenlab	11 »	11 »	19 »

Es wurde folglich für das Pferdelab keine Hemmung gefunden, während die Hemmung für Kalbslab sehr stark und für übrige untersuchte Labenzyme sehr schwach gefunden

wurde (C). Die Hemmung war in allen Fällen nach der Behandlung mit HCl nicht mehr vorhanden (B), was mit meinen vorherigen Untersuchungen vollkommen übereinstimmt.¹⁾

Mit neutralisiertem Kalbsserum in der Verdünnung 1 Serum : 5 H₂O wurden folgende Gerinnungszeiten erhalten. Die Säulen A, B, C haben dieselbe Bedeutung wie oben:

	A	B	C
Kalbslab	13 Min.	12 ¹ / ₂ Min.	14 ¹ / ₂ Min.
Pferdelab	12 »	11 ¹ / ₂ »	13 ¹ / ₂ »
Schweinelab	9 ¹ / ₂ »	9 »	15 »
Schafslab	13 »	12 »	21 »
Meerschweinchenlab	14 ¹ / ₂ »	13 »	19 »
Hechtslab	16 »	15 ¹ / ₂ »	20 »

Die geringfügige Hemmung wird auch hier bei der Behandlung mit Salzsäure aufgehoben. Von artspezifischer Hemmung kann keine Rede sein.

Kaninchenserum in der Verdünnung 1 Serum : 10 H₂O ergab:

	A	B	C
Kaninchenlab	20 Min.	24 Min.	20 Min.
Pferdelab	9 ¹ / ₂ »	17 ¹ / ₂ »	17 ¹ / ₂ »
Schweinelab	6 ¹ / ₂ »	11 »	11 ¹ / ₂ »
Kalbslab	12 ¹ / ₂ »	12 ¹ / ₂ »	12 ¹ / ₂ »
Meerschweinchenlab	8 »	10 ¹ / ₂ »	8 ¹ / ₂ »

Auch hier ist keine artspezifische Hemmung zu ersehen, und die vorhandene Hemmung wird durch Salzsäure nicht aufgehoben.

Es muß hervorgehoben werden, daß der Grad der Hemmung sehr an der Verdünnung des Serums liegt, und daß folglich in den Fällen, wo in den obigen Versuchen keine Hemmung erhalten wurde, eine solche mit konzentrierterem Serum wohl hätte hervortreten können. Aus der Tatsache, daß das Kalbsserum keine artspezifische Hemmung ergibt, ist zu

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 85, 1909.

folgern, daß der durch Ammoniakbehandlung des Zymogens erhaltene Hemmungskörper nicht von eingeschlossenem Serum herrühren kann. Zu dem gleichen Schlusse bin ich bereits vorher auf anderem Weg gelangt.¹⁾

Die in normalem Serum vorhandenen Hemmungskörper der Labenzyme wirken nach dem Gesagten nicht spezifisch. Dagegen ist artspezifische Hemmung in den durch Immunisierung mit Lab erhaltenen Sera vorhanden. Zuerst wies Morgenroth nach, daß nach Immunisierung einer Ziege mit käuflichem Lab deren Serum die Wirkung des angewandten Labs hemmte.²⁾ Dann folgten neue Untersuchungen von Morgenroth, nach welchen die durch Immunisierung mit tierischem und pflanzlichem Lab erzeugten Hemmungskörper spezifische Wirkung zeigten.³⁾ Ferner liegt eine Beobachtung Moros vor, nach welcher das mit Kalbslab erhaltene Immunserum Kalbslab stärker hemmt als Menschenlab;⁴⁾ v. Eissler fand, daß nach Immunisierung von Gänsen mit Schweinelab das Serum wohl Schweinelab, aber nicht Kalbs- oder Hühnerlab hemmt.⁵⁾ Sehr interessant wäre es, zu erfahren, in welcher Weise die Lablösungen bereitet waren, welche bei den erwähnten Immunisierungsversuchen angewandt wurden. Hierüber hat nur v. Eissler genaue Angaben gemacht. Derselbe behandelte die abgeschabte Schleimhaut mit 1%iger NaCl-Lösung 24 Stunden im Brutofen, worauf filtriert und im Eisschrank mit Chloroform aufbewahrt wurde. Hierbei wurde die Reaktion wahrscheinlich schwach sauer, aber irgend welche absichtliche Aktivierung des Labs durch zugesetzte Säure kam nicht vor. Wahrscheinlich enthielt die Lösung sowohl Labzymogen wie Lab.

Daß es von einer gewissen Bedeutung ist für den bei der Immunisierung erreichten Hemmungsgrad, ob dabei das Zymogen oder das aus dem Zymogen durch Behandlung mit Salzsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 212, 1911.

²⁾ Zentralblatt f. Bakteriol., Bd. 26, S. 349, 1899.

³⁾ Ebenda, Bd. 27, S. 721, 1900.

⁴⁾ Ebenda, Bd. 37, S. 485, 1904.

⁵⁾ Ber. d. Wien. Akad. Wissensch., Bd. 114, Abt. 3, S. 119, 1905.

erhaltene fertige Lab benutzt wird, geht aus Immunisierungsversuchen hervor, welche ich einerseits mit einer neutralen Infusion des Kalbsmagens, andererseits mit derselben Infusion mit Salzsäure aktiviert, ausgeführt habe.

Immunisierungsversuch 1. Eine Infusion der Schleimhaut von Kalbsmagen wurde mit 5 Teilen Wasser auf 1 Teil feuchter Schleimhaut und etwas CaCO_3 bereitet. Das Ganze wurde eine Nacht im Eisschrank belassen, worauf filtriert, mit 3 Volumen Wasser verdünnt und mit Toluol im Eisschrank aufbewahrt wurde. Vor der Anwendung wurde eine Portion der Infusion eine Nacht im Eisschrank aktiviert (25 ccm Inf. + 5 ccm 1%iger HCl) und dann mit 5 ccm titrierter Natronlauge neutralisiert; eine andere, gleich große Portion wurde, ohne aktiviert zu werden, mit der entsprechenden Menge NaCl versetzt. Erstere Lösung wird Lab genannt, letztere Zymogen. Beide wurden mit NaCl auf 0,9% versetzt. Die Lösungen wurden vor dem Einspritzen mindestens eine Nacht unter Toluol aufbewahrt. Die Kaninchen vertrugen die eingespritzten Mengen vorzüglich. Nur ausnahmsweise, wenn bei anderer Verfahrungsweise kürzere Zeit als eine Nacht mit Toluol aufbewahrt wurde, trat in zwei Fällen Abszeßbildung ein.

Zwei gleich große Kaninchen wurden für die Immunisierung benutzt. Beide erhielten an denselben Tagen die gleichen Mengen von Lab bzw. Zymogen eingespritzt. In dem Laufe von 25 Tagen erhielten sie im ganzen 54 ccm Lab bzw. Zymogen in allmählich steigenden Dosen. Die geringste Dose war 5 ccm, die größte 10, und die Einspritzungen wurden mit Intervallen von 3—4 Tagen vorgenommen. 6 Tage nach der letzten Einspritzung wurden die Tiere durch Verblutung getötet. Zur selben Zeit wurde auch das Blut eines nicht vorbehandelten Kontrolltieres für Untersuchung genommen.

Die Sera wurden mit 2 Teilen Wasser verdünnt und mit Kalbslab geprüft. Um die Einwirkung des Alkalis im Serum auf das Enzym möglichst zu vermeiden, wurde zunächst die Milch (10 ccm) mit 2 ccm Serummischung bzw. Wasser vermischt, das Ganze auf 37° erwärmt und mit 1 ccm der Lablösung versetzt. Die Gerinnungszeiten waren:

1 ccm Lab	+	2 ccm H ₂ O		8 ¹ / ₂ Min.
1 » »	+	2 » normale Serummischung	10	»
1 » »	+	2 » Labserummischung	13 ¹ / ₂	»
1 » »	+	2 » Zymogenserummischung	115	»

Mit 1 ccm Serummischung ergab sich:

1 ccm Lab	+	1 ccm H ₂ O		7 ¹ / ₂ Min.
1 » »	+	1 » normale Serummischung	8	»
1 » »	+	1 » Labserummischung	9	»
1 » »	+	1 » Zymogenserummischung	43	»

In diesem Falle war folglich die mit Lab erreichte Hemmung kaum nachweisbar, während die mit dem Zymogen erzeugte sehr ausgesprochen war.

Immunisierungsversuch 2. In diesem Versuche wurde vor der Immunisierung das Hemmungsvermögen des Serums bei der Verdünnung 1 : 1 (= ¹/₂ Serum) bestimmt. Nach der Immunisierung wurde bestimmt, bei welcher Verdünnung das Serum mit derselben Labmenge wie vorher eben dasselbe Hemmungsvermögen zeigte wie vor der Immunisierung. Wenn das Verhältnis zwischen der Verdünnung vor und nach der Immunisierung durch die Zahl n angegeben wird, so kann n als zahlenmäßiges Resultat der Immunisierung betrachtet werden. In der Tat gibt die Zahl n an, wievielmals das vor der Immunisierung vorhandene normale Hemmungsvermögen während der Immunisierung zugenommen hat. Die Immunisierung wurde in der gleichen Weise ausgeführt wie in Versuch 1; nur wurde die ursprüngliche Infusion der Magenschleimhaut (5 Teile Wasser auf 1 Teil Schleimhaut) nicht wie vorher mit 3 Volumen Wasser verdünnt, sondern direkt mit Salzsäure bzw. Salzlösung versetzt. Die eingespritzten Lösungen waren folglich etwa 4 mal konzentrierter als im vorhergehenden Versuch. Mit Intervallen von 3—4 Tagen wurden je 25 ccm der Lösungen eingespritzt. Im ganzen bekam jedes Kaninchen vor der ersten Untersuchung 200 ccm subcutan eingeführt. Mit dem Zymogen wurden in diesem Falle zwei Kaninchen behandelt. 3 Tage nach der letzten Einspritzung wurden aus Ohrenvenen Blutproben genommen; die Sera ergaben in der Verdünnung 1 : 10 folgende Gerinnungszeiten:

1 ccm Kalbslab	+	1 ccm H ₂ O		9 ¹ / ₂ Min.
1	>	>	+ 1 > Labserum	13 ¹ / ₂ >
1	>	>	+ 1 > Zymogenserum Nr. 1	Keine Ger. in 2 St.
1	>	>	+ 1 >	> 2 74 Min.

Das Hemmungsvermögen vor der Immunisierung war mit Serum in der Verdünnung 1 Serum : 1 Wasser untersucht worden.

Das Hemmungsvermögen war bei den drei Kaninchen dasselbe; für alle wurden nämlich die gleichen Gerinnungszeiten erhalten:

1 ccm Lab	+	1 ccm H ₂ O		8 ¹ / ₂ Min.
1	>	>	+ 1 > Serummischung	10 >

Nach der Immunisierung ergab das Serum des Lab-Kaninchens die gleiche Hemmung in der Verdünnung 1 : 20 und die Sera der zwei Zymogen-Kaninchen in den Verdünnungen 1 : 80 bezw. 1 : 60. Der Immunisierungsgrad war folglich:

mit Lab:	mit Zymogen:
	Nr. 1 Nr. 2
10	40 30.

Nach erneuerter Immunisierung des Lab-Kaninchens und des Zymogen-Kaninchens Nr. 1 mit im ganzen 300 ccm Lösung in dem Laufe von zwei Monaten wurde für beide Sera der Immunisierungsgrad 200 erhalten.

Aus den beiden angeführten Immunisierungsversuchen ergibt sich also, daß die Immunisierung zu Anfang bedeutend rascher verläuft beim Einspritzen des Zymogens als bei der Benutzung des entsprechenden Labs. Nach dem letzten Versuch wird aber bei fortgesetzter Immunisierung der Erfolg in beiden Fällen etwa der gleiche.

Immunisierungsversuch 3. In diesem Versuch wurden mit verschiedenen Präparaten drei verschiedene Tiere immunisiert; die drei Präparate wurden aus der gleichen neutralen Infusion des Kalbsmagens folgendermaßen hergestellt:

1. Die Infusion wurde 24 Stunden mit Salzsäure behandelt und neutralisiert (50 ccm Infusion + 10 ccm 1%iger HCl + 10 ccm NaOH) = Lab.

2. Die Infusion wurde mit schwachem Ammoniak 15 Min.

bei 37° behandelt und neutralisiert (50 ccm Infusion + 10 ccm 0,1 norm. NH_3 + 10 ccm 0,1 norm. H_2SO_4) = Hemmungskörper.

3. Die Infusion wurde ohne Ammoniakbehandlung mit der entsprechenden Menge Am_2SO_4 -Lösung versetzt (50 ccm Infusion + 20 ccm Am_4SO_4) = Zymogen.

Die infolge der Behandlung mit Salzsäure oder Ammoniak in 1 und 2 stattgefundene Verdünnung war folglich in beiden Fällen die gleiche; in 3 wurde die in 2 zugekommene Menge Am_2SO_4 auf einmal zugesetzt.

Es wurden vor der ersten Probenahme in dem Laufe von 30 Tagen mit Intervallen von 3—4 Tagen im ganzen 92 ccm eingespritzt. Die kleinste Dose war 5 ccm, die größte 12 ccm. Der erzeugte Immunisierungsgrad war in den drei Fällen wie folgt:

mit Lab:	mit Hemmungskörper:	mit Zymogen:
8	12	30.

Dann wurde die Immunisierung mit dem Lab-Kaninchen und dem Zymogen-Kaninchen noch 25 Tage fortgesetzt, während welcher Zeit im ganzen 96 ccm der entsprechenden Lösungen eingespritzt wurden. Darauf wurden als Resultate der ganzen Immunisierung folgende Zahlen erhalten:

mit Lab:	mit Zymogen:
12	35.

Die gefundenen Zahlen können keine größere Genauigkeit beanspruchen. So viel scheint aber aus denselben geschlossen werden zu können, daß Immunisierung erreicht werden kann sowohl mit dem salzsäurebehandelten Zymogen (Lab), wie auch mit dem Hemmungskörper, der kein freies Lab enthält. Das beste Resultat wird aber mit der neutralen Infusion der Schleimhaut (dem Zymogen), welche wohl freies Lab enthält, aber lange nicht in derselben Menge, wie das aus derselben mit Salzsäure erhaltene Lab.

Der durch Immunisierung mit dem Zymogen erhaltene Antikörper schwindet innerhalb des Organismus ziemlich rasch aus dem Blute. Einen Monat nach der letzten der zwei oben angeführten Prüfungen, wo der Wert 35 erhalten wurde, ergab frisch genommenes Blut die Ziffer 4 und noch 1½ Monat später die Zahl 2.

Um den zeitlichen Verlauf der Immunisierung mit dem Zymogen verfolgen zu können, habe ich das im Versuch 3 für die Einspritzung von Zymogen benutzte Kaninchen, nachdem die Wirkung der Immunisierung auf die Ziffer 2 gesunken war, auf einmal 20 ccm nicht verdünnter Infusion der Magenschleimhaut (1 Teil Schleimhaut + 5 Teile Wasser) eingespritzt. Vor der Einspritzung, sowie an den 6 ersten und dem achten Tage nach der Einspritzung wurden Blutproben aus dem Ohre genommen, welche schließlich auf einmal in bezug auf den Immunisierungsgrad untersucht wurden. Die für die verschiedenen Tage erhaltenen Zahlen waren:

Am Tage:	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Immunisierungsgrad:	2	2	2	10	50	100	100	—	80.

Wenn der Verlauf der Immunisierung graphisch wiedergegeben wird, erhält man eine Kurve, welche im großen und ganzen mit derjenigen übereinstimmt, welche Morgenroth bei der Immunisierung von Ziegen gegen Lab fand.¹⁾ Nach neuen Einspritzungen am 8. und 15. Tage von 20 ccm nicht verdünntem Zymogen wurde am 22. Tage eine Blutprobe genommen, welche den Immunisierungsgrad 200 zeigte. Nach einem Monate war diese Ziffer in frisch genommenem Blut auf 20 gesunken; erneuertes Einspritzen von je 20 ccm Zymogen an 3 Tagen mit den gewöhnlichen Intervallen brachte die Ziffer 300 herbei. Dies war der höchste Immunisierungsgrad, den ich überhaupt erreicht habe. Nach dem oben Gesagten bedeutet die Ziffer 300, daß das betreffende Immunserum etwa 300 mal so stark hemmte, wie dasselbe Serum vor der Immunisierung.

Morgenroth wandte bei seinen Versuchen eine andere Methode für die Messung des Hemmungsvermögens des Immunserums an, welche keine direkte Vergleichung mit meinen Resultaten ermöglicht. Das wirksamste Immunserum (Ziege), welches er der Prüfung unterzog, schützte Kuhmilch, zu 2% zugesetzt, gegen das 200fache der normal wirksamen Labmenge. Bei Kaninchen konnte Morgenroth keine erhebliche Antilab-Bildung erzeugen.

¹⁾ Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 26, S. 356, 1899.

Der Antikörper hält sich bedeutend besser im aufbewahrten Serum als innerhalb des Organismus. Das am 22. Tage des vorigen Versuches gewonnene Serum zeigte noch nach einem Monate dasselbe Hemmungsvermögen (200fach das normale) wie sofort bei der Blutentnahme. Innerhalb des Organismus war während derselben Zeit das Hemmungsvermögen von 200 auf 20 gesunken. Der Antikörper wird folglich innerhalb des Organismus stetig zerlegt, und diese Zerstörung muß offenbar früher oder später der weiteren Immunisierung eine Grenze setzen.

Eigenschaften des Immunserrums.

In bezug auf die Eigenschaften des nach der Immunisierung im Serum vorhandenen Antikörpers interessiert uns in erster Linie dessen Verhalten zu Labenzymen verschiedenen Ursprungs. In dieser Beziehung wurde zunächst das mit Hilfe von Zymogen im obigen Versuch 3 erhaltene Immunserrum vom Immunisierungsgrad 35 untersucht. Das Serum wurde mit 20 Teilen Wasser verdünnt und mit verschiedenen Labenzymen geprüft. Die Gerinnungszeiten waren wie folgt:

	Lab von				
	Kalb	Schaf	Schwein	Pferd	Meer-schweinchen
1 ccm Lab + 1 ccm H ₂ O	14 1/2 Min.	14 Min.	11 Min.	15 1/2 Min.	12 Min.
1 > > + 1 > Serum	>2 Stund.	66 >	14 1/2 >	21 1/2 >	17 1/2 >

Nachdem der Immunisierungsgrad bei fortgesetzter Immunisierung auf die Ziffer 200 gebracht war, wurde das Verhalten des Serums in der Verdünnung 1 Serum : 50 Wasser noch einmal geprüft und zwar mit folgendem Resultat:

	Lab von			
	Kalb	Schaf	Schwein	Pferd
1 ccm Lab + 1 ccm H ₂ O	11 Min.	9 Min.	8 1/2 Min.	9 Min.
1 > > + 1 > 1/50-Immuns.	>60 >	18 1/2 >	9 >	9 1/2 >

Die in Versuch 2 mit Lab und mit Zymogen erhaltenen Immunsera von dem Immunisierungsgrad 200 verhielten sich in der Verdünnung 1 Serum : 200 Wasser zu verschiedenen Labenzymen wie folgt:

	Lab von				
	Kalb	Schaf	Schwein	Pferd	Hecht
1 ccm Lab + 1 ccm H ₂ O . .	10 ¹ / ₂ Min.	9 ¹ / ₂ Min.	10 ¹ / ₂ Min.	10 ¹ / ₂ Min.	11 Min.
1 > > + 1 > ¹ / ₂₀₀ -Lab- Immuns.	20 >	13 >	10 ¹ / ₂ >	10 ¹ / ₂ >	10 ¹ / ₂ >
1 > > + 1 > ¹ / ₂₀₀ -Zym- Immuns.	19 ¹ / ₂ >	14 ¹ / ₂ >	10 ¹ / ₂ >	10 >	10 >

Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß das Kalbslab am kräftigsten gehemmt wird; in allen Fällen erfuhr aber auch das Schafslab eine ausgesprochene Hemmung. Die übrigen untersuchten Labenzyme wurden nur in der ersten Tabelle mit nur wenig verdünntem Serum schwach gehemmt; wahrscheinlich ist diese Hemmung kaum größer als die durch normales Kaninchenserum erzeugte. Andererseits ist die Hemmung von Kalbslab und Schafslab durch normales Serum eine sehr geringe. In der Verdünnung 1 Serum : 5 H₂O wurde mit 1 ccm verdünnten Normalserums folgende Gerinnungszeiten erhalten:

	Ohne Serum	Mit Serum
Kalbslab	14 Min.	16 Min.
Schafslab	14 >	16 >

während Schweinelab die Ziffern 13 bzw. 17 ergab.

Die zwei durch Immunisierung mit dem Zymogen bezw. mit dem entsprechendem Lab erzeugten Immunsera verhielten sich nach den obigen Ziffern in der gleichen Weise zu verschiedenen Labenzymen, und die Hemmung war in beiden Fällen in der gleichen Weise spezifisch. Auch in anderen untersuchten Beziehungen verhalten sich die zwei Immunsera in der gleichen Weise. Beide werden beim Erhitzen auf 100° zerlegt, wie folgender Versuch mit den zwei Sera in der Verdünnung 1 : 200 H₂O zeigt:

	Immuneserum erhalten mit	
	Zymogen	Lab
Lab + H ₂ O	10 Min.	10 Min.
auf 100° erhitztem Serum	10 »	10 »
nicht erhitztem Serum	29 ¹ / ₂ »	27 ¹ / ₂ »

Mit beiden Sera wird das Reihenfolgephänomen erhalten:

	Zymogenserum	Labserum
Milch + H ₂ O + Lab	9 ¹ / ₂ Min.	9 ¹ / ₂ Min.
Milch + Serum + Lab	18 ¹ / ₂ »	19 »
(Serum + Lab) 10 Min. bei 37° + Milch	27 ¹ / ₂ »	29 ¹ / ₂ »

Ein anderes mit Hilfe von Zymogen erhaltenes Immuneserum ergab in der Verdünnung 1 : 90 H₂O folgende Ziffern:

Milch + H ₂ O + Lab	10 Min.
Milch + Serum + Lab	24 »
(Serum + Lab) 10 Min. bei 37° + Milch	52 ¹ / ₂ »

Beim Behandeln mit Salzsäure verlieren die in den zwei Weisen bereiteten Immunsera zum Teil ihre Hemmungsfähigkeit, sowohl gegenüber dem Kalbslab wie gegenüber dem Schafslab. Zwei Immunsera in der Verdünnung 1 : 50 H₂O wurden einerseits mit Salzsäure eine Nacht bei Zimmertemperatur behandelt und mit titrierter Natronlauge neutralisiert (10 ccm + 2 ccm 1%iger HCl + 2 ccm NaOH), andererseits mit der entsprechenden Menge NaCl versetzt. Darauf wurde mit verschiedenen Labenzymen geprüft.

	Lab von				
	Kalb	Schaf	Pferd	Schwein	Hecht
	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.
1 ccm Lab + 1 ccm H ₂ O	9 ¹ / ₂	9 ¹ / ₂	10 ¹ / ₂	8	11
1 » » + 1 » Lab-Immuns. behandelt mit HCl	21 ¹ / ₂	14	10	8	10 ¹ / ₂
do. nicht » » »	40	18 ¹ / ₂	10	8	10
1 ccm Lab + 1 ccm Zymogen-Immuns. behandelt mit HCl	17 ¹ / ₂	15	10 ¹ / ₂	8	10 ¹ / ₂
do. nicht » » »	24	19 ¹ / ₂	10 ¹ / ₂	8	10 ¹ / ₂

Besser gelingt es, das Antilab durch Salzsäure bei 37° zu zerlegen. Mit einem durch Immunisieren mit Lab erhaltenen

Serum in der Verdünnung 1 : 100 H₂O wurden nach Behandlung mit HCl bei 37° (10 ccm + 2 ccm 1%iger HCl) und Neutralisieren folgende Ziffern erhalten:

	1.	2.
1 ccm Lab + 1 ccm Salzlösung	10 Min.	10 Min.
1 » » + 1 » Immuns. beh. mit HCl	14 »	14 »
1 » » + 1 » » nicht beh. » »	56 »	57 »

In diesem Falle war also der Antikörper fast vollständig zerlegt.

Auch der bereits durch Lab in Anspruch genommene Antikörper wird beim Behandeln mit Salzsäure zerlegt. Infolge davon wird das bereits von dem Antikörper neutralisierte Lab durch Salzsäure mindestens zum großen Teil wieder in aktive Form übergeführt. Dies geschieht bei gewöhnlicher Temperatur, aber besser bei 37°. Lab und Serum, beide in zweckmäßiger Verdünnung wurden vermischt und zunächst 1 Stunde bei 37° gehalten. Dann wurde die Mischung einerseits mit Salzsäure 2 1/2 Stunden bei 37° behandelt und neutralisiert (10 ccm + 2 ccm 1%iger HCl + 2 ccm NaOH), andererseits mit der entsprechenden Menge NaCl versetzt. Dann wurden folgende Gerinnungszeiten erhalten:

1 ccm Lab + 1 ccm Salzlösung	11 1/2 Min.
2 » mit HCl behandelte Lab-Serummischung	21 »
2 » mit NaCl versetzte »	86 »

In diesem Falle wurde also aus einem Gemenge von Lab und Antilab, wo das Lab bereits zum größten Teil neutralisiert war, mit Hilfe von Salzsäure das Lab wieder zum Teil in Freiheit gesetzt. Andererseits gelingt es mit Hilfe von schwachem Ammoniak, das bereits am Lab gebundene Antilab in wirksame Form zu überführen, mindestens wenn die vorhandenen Mengen von Lab und Antilab einigermaßen bedeutend sind, wie folgender Versuch zeigt. Lab und neutrales Immuserum wurden in solchen Mengen vermischt, daß 1 ccm der Mischung nach 1 Stunde Erhitzen auf 37° eine Gerinnungszeit von 14 Minuten ergab. Bereits nach 15 Minuten mit NH₃ bei 37° und Neutralisieren (10 ccm + 2 ccm 0,1 norm. NH₃ + 2 ccm 0,1 norm. H₂SO₄) ergab die Mischung eine schwache Hemmung:

1 ccm Lab + 2 ccm H₂O 15 Min.
 1 » » + 2 » Mischung 27 »

Nach 1 Stunde mit NH₃ bei 37° und Neutralisieren wurden folgende Zeiten erhalten:

1 ccm Lab + 2 ccm H₂O 13 Min.
 1 » » + 2 » Mischung > 120 »

oder praktisch vollkommene Hemmung. Mit 1 ccm der so erhaltenen Lösung und verschiedenen Labenzymen wurden folgende Zeiten erhalten:

	Lab von			
	Kalb	Schaf	Schwein	Pferd
1 ccm Lab + 1 ccm H ₂ O . . .	13 Min.	12½ Min.	12½ Min.	17 Min.
1 » » + 1 » Mischung .	34 »	24 »	13½ »	17 »

Die mit Hilfe von Ammoniak aktivierte hemmende Substanz verhielt sich folglich in bezug auf die spezifische Wirkung wie das Antilab, und es dürfte wohl keinem Zweifel unterliegen, daß dieselbe infolge Zerstörung von Lab durch das Ammoniak aus der Verbindung Lab—Antilab frei wurde. Wird die Mischung von Lab und Antilab nach kurzer Behandlung mit Ammoniak der Einwirkung von Salzsäure ausgesetzt, so wirkt die Lösung nach Neutralisieren wiederum labungserregend. Die eben besprochene Mischung, welche nach 15 Minuten mit NH₃ bei 37° schwach hemmte, wurde nach ½ Stunde mit Salzsäure bei 37° (10 ccm + 2 ccm 1%iger HCl + 2 ccm NaOH) mit Milch geprüft. 2 ccm der neutralisierten Mischung ergaben eine Gerinnungszeit von 25 Minuten. Nach 1 Stunde mit Ammoniak und der gleichen Nachbehandlung konnte aber kein freies Lab nachgewiesen werden.

Fassen wir das über die Immunisierung und das erhaltene Immuneserum Gesagte zusammen, so ergibt sich folgendes:

1. Die Immunisierung gegen Kalbslab geschieht zu Anfang am besten mit dem Zymogen. Nur nach sehr lange fortgesetztem Immunisieren wird etwa der gleiche Immunisierungsgrad er-

halten mit dem Lab wie mit dem Labzymogen. Das hergestellte Immuneserum wird in beiden Fällen das gleiche.

2. Das Immuneserum hemmt die Wirkung des Kalbslabs aber auch — obwohl in geringerem Grade — die des Schafslabs. Die übrigen untersuchten Labenzyme werden nicht oder nur in geringem Grade beeinflußt.

3. Das erzeugte Antilab wird beim Erhitzen auf 100° zerlegt, gibt das Reihenfolgephänomen und wird durch 0,2%ige HCl zum größten Teil zerlegt. Auch in Verbindung mit dem Lab wird das Antilab mindestens zum Teil zerstört. Aus der Verbindung Lab—Antilab wird mit sehr schwachem Ammoniak Antilab frei.

Außerdem ist aus den obigen Versuchen zu folgern, daß die Hemmungswirkung der normalen Sera nicht artspezifisch ist. Da eine artspezifische Hemmung in bezug auf das Immuneserum vorhanden ist, können wir also folgern, daß das Antilab nicht mit dem Hemmungskörper des normalen Serums identisch sein kann. Die Tatsache aber, daß der aus dem Kalbszymogen durch Behandlung mit NH_3 erhältliche Hemmungskörper spezifische Wirkung zeigt, indem derselbe die Wirkung des Kalbslabs und in weniger ausgesprochenem Grade auch die des Schafslabs hemmt (S. 238), zusammengestellt mit dem Befunde, daß das Immunisieren zu Anfang besser gelingt mit dem Zymogen als mit dem Lab, das den fraglichen Hemmungskörper nicht oder nur in geringerem Grade enthält, veranlaßt uns, die Möglichkeit zu diskutieren, ob das Antilab beim Immunisieren mit dem Zymogen vielleicht aus dem im Zymogen vorhandenen Hemmungskörper entstehen kann.

Für eine solche Bildungsweise spricht zunächst die artspezifische Wirkung, welche für beide die gleiche ist; daß außer dem Kalbslab auch das Schafslab gehemmt wird, liegt wahrscheinlich an der Verwandtschaft der beiden Tierarten. Daß das Immunisieren am Anfang besser gelingt mit dem Zymogen, das den Hemmungskörper enthält, als mit dem Lab, das durch Zerstören des Hemmungskörpers erhalten wird, könnte wohl auch als Stütze für die angedeutete Bildungsweise angeführt werden. Außerhalb des Organismus wird der Hemmungs-

körper des Zymogens durch Zerstören des vorhandenen Labs mit Hilfe von Alkali erhalten, und man kann sich wohl denken, daß der mit dem Zymogen dem Tiere zugeführte Hemmungskörper nach Zerstören des Labs als bis zu einem gewissen Grade fertiges Material für die Antikörperbildung innerhalb des Tieres verwendet wird.

Bei fortgesetzter Immunisierung erwirbt wohl der Organismus des Tieres unter der Einwirkung des Labs allmählich das Vermögen, von selbst den Antikörper herzustellen, und die Bedeutung des zugeführten Hemmungskörpers für die Bildung des Antilabs wird weniger hervortretend. Immerhin bleibt aber die Bedeutung des Zymogens, das verhältnismäßig wenig freies Lab enthält, für die Bildung des Antilabs zum mindesten dieselbe wie die der Lablösung, welche viel mehr wirksames Lab in sich schließt.

Es fragt sich alsdann, ob der Hemmungskörper im Zymogen und das durch Immunisieren erhaltene Antilab in anderen Beziehungen die gleichen Eigenschaften zeigen. In folgenden Beziehungen ist die Übereinstimmung eine vollkommene:

1. Die artspezifische Hemmung ist in beiden Fällen vollkommen gleich:

2. Beide zeigen das Reihenfolgephänomen.

3. Beide werden durch Salzsäure mindestens zum größten Teil zerlegt.

4. Aus der Verbindung zwischen Lab und einer der beiden hemmenden Substanzen wird bei der Behandlung mit Salzsäure Lab frei und bei der Behandlung mit schwachem Ammoniak hemmende Substanz.

Dagegen verhalten sich die beiden hemmenden Stoffe verschieden beim Erhitzen ihrer Lösungen auf 100°. Das durch Immunisieren erhaltene Antilab verliert bei 100° vollständig sein Hemmungsvermögen. Wird der aus dem Zymogen erhaltene Hemmungskörper auf 100° erhitzt, so bleibt die Hemmungsfähigkeit der Lösung mindestens zum Teil erhalten, aber dieselbe verschwindet nunmehr nicht beim Behandeln mit Salzsäure.¹⁾ Die hemmende Substanz verschwindet also beim Er-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 355, 1911.

hitzen als solche; dafür tritt aber eine andere in der gleichen Weise spezifisch wirkende hervor. In welcher Beziehung beide zueinander stehen, bleibt unentschieden. Es wäre wohl möglich, daß das Zymogen zwei spezifisch wirkende Hemmungskörper enthält, von welchen der eine durch Salzsäure und durch Hitze zerlegt wird, der andere nicht. Nur der zerlegbare wird für die Bildung von Antilab verwendet. Darauf deuten auch Versuche hin, welche ich früher publiziert habe.¹⁾ Nach Behandlung des Zymogens mit nicht zu schwachem Natronhydrat und Neutralisieren enthält nämlich die Lösung eine hemmende Substanz, welche kochbeständig ist und nicht oder nur sehr langsam der Einwirkung von Salzsäure unterliegt. Bei dieser Einwirkung wird wahrscheinlich der durch Hitze oder Salzsäure zerlegbare Hemmungskörper zerstört. Bei der Einwirkung auf das Zymogen von schwacher Natronlauge oder noch besser von schwachem Ammoniak wird dagegen ein durch Salzsäure zerstörbarer Hemmungskörper erhalten. Da aber in derselben Lösung auch der hitzebeständige Hemmungskörper vorhanden ist, tritt derselbe beim Erhitzen auf 100° hervor, während der labile Hemmungskörper zerstört wird.

Nach allem dem scheint die Übereinstimmung zwischen dem immunisatorisch erzeugten Antilab und dem im Labzymogen vorhandenen labilen Hemmungskörper eine derart innige zu sein, daß offenbar nichts für die Annahme in dem Wege steht, daß letzterer bei der Immunisierung mit dem Zymogen als Material für die Bildung des Antilabs dienen kann. Wahrscheinlich wird der im Zymogen vorhandene Hemmungskörper in der Magenschleimhaut durch einen Prozeß gebildet, welcher dem der Immunisierung ähnlich ist. Über die Natur dieses Prozesses geben meine Versuche keinen Aufschluß.

Es liegt auf der Hand, daß die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche mit Hilfe der Ehrlichschen Theorie bezüglich der Bildung von Antikörpern nicht genügend erklärt werden können. Nach der Ehrlichschen Seitenkettentheorie entstehen die Antikörper eben infolge der Reaktion der Antigene

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 190, 1911.

auf gewisse Zellen, und man müßte also erwarten, daß die Bildung von Antikörpern um so ausgiebiger erfolgen wird, je mehr Antigen (in diesem Falle freies Lab) zugeführt wird. Dies war in meinen Versuchen nicht der Fall. Im Gegenteil erzeugte das Zymogen, das viel weniger freies Lab enthielt als die daraus bereitete Lablösung, im Anfang des Immunisierens entschieden mehr Antilab als die entsprechende Lablösung. Sogar der aus dem Zymogen mit Ammoniak erzeugte Hemmungskörper, welcher kein freies Lab enthielt, ergab beim Immunisieren zum mindesten ebensoviel Antilab wie das freie Lab. Erst bei längere Zeit anhaltendem Immunisieren scheint der Organismus das Vermögen zu bekommen, von selbst das Antilab herzustellen.

Die Ergebnisse obiger Versuche lassen sich folgendermaßen kurz zusammenfassen:

1. Die Hemmung der Labwirkung durch normales Serum ist nicht artspezifisch.

2. Immunisierung von Kaninchen mit Labzymogen vom Kalb ergibt zu Anfang eine bessere Ausbeute an Antilab als Immunisierung mit der entsprechenden Menge fertigen Labs. Erst nach längere Zeit fortgesetztem Immunisieren wird der Erfolg in beiden Fällen der gleiche.

3. Beim Immunisieren mit dem Zymogen wird dasselbe Antilab gebildet wie beim Immunisieren mit dem Lab. Dieses Antilab zeigt dieselben Eigenschaften wie der im Zymogen vorhandene Hemmungskörper des Labs. Letzterer wird wahrscheinlich beim Immunisieren mit dem Zymogen als Material für die Bildung des Antilabs verwendet.

4. Die wichtigste Eigenschaft des beim Immunisieren erhaltenen Antilabs und des Hemmungskörpers im Zymogen ist die artspezifische Hemmung, durch welche dieselben von den hemmenden Substanzen des normalen Serums sich besonders unterscheiden.