

# *Acta Medica Okayama*

---

*Volume 2, Issue 3*

1930

*Article 5*

APRIL 1931

---

## Studien über die Präzipitation zwischen Tetanustoxin und Antitetanustoxin

Tohru Inoue\*

\*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

# Studien über die Prazipitation zwischen Tetanustoxin und Antitetanustoxin\*

Tohru Inoue

## Abstract

Wenn die Prazipitation bei Bindung zwischen Toxin und Antitoxin spezifisch im engeren Sinne, wie Ramon, Hoen, Zippe und Tschertkow u. a. behaupten, hervorgerufen wird, so ergeben sich aus obigen Versuchsreihen viele Tatsachen, die dem widersprechen. Erstens ist dieses Prazipitinphanomen nicht lediglich eine Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin, wie es Ramon u. a. mit Prozonphanomen verteidigen, weil mit Serumprazipitin oder Bakterienprazipitin dieselbe Reaktion gezeitigt werden kann, wenn man die Immunisierungsweise und Verdünnungsweise der Antigene und des Immunserums möglichst unter denselben Bedingungen vornimmt, Um die namlichen Phänomene mit gewöhnlichem Prazipitin deutlich nachzuprüfen, muss man mit stark hochimmunisiertem Prazipitinserum in grossem Umfange die Reaktion in so weit verdünntem Antigen und Antikörper beobachten, dass man bei beiden die Hemmung am schwach verdünnten Teile erkennen kann. Zweitens mochte ich die Reinheit der Toxinlösungen serologisch diskutieren. Von der Antigenität für Prazipitinbildung aus gesehen, enthält die Toxinlösung eine geringe Menge von Bakterieneiweiss, die durch Antibakterienimmunserum mittels Prazipitinreaktion nachweisbar ist, wenn auch bei einem Versuche der Bouillonstoff ganz ausgeschlossen werden kann. Umgekehrt, wenn man mit verschiedenen Antitoxinseren mittels Prazipitinreaktion oder Komplementbindung zwischen Toxin oder Bakterienextrakt arbeitet, so reagieren diese Antitoxine mit beiden Antigenen immer positiv. Auf Grund dieser Tatsache darf man annehmen, dass das Bakterieneiweiss an der Prazipitinreaktion zwischen Toxin und Antitoxin stets mitbeteiligt ist. Drittens will ich Prazipitinwert und Antitoxinwert kurz vergleichen. Wenn man ideal reine Toxine als Antigene benutzt oder solche, die sehr wenig Bakterieneiweiss enthalten, so konnte der Parallelismus zwischen Antitoxinwert und Prazipitinwert irgend einen näheren Zusammenhang haben. Doch um diese quantitativen Beziehungen festzustellen, muss man Prazipitinbildung durch Bakterien und Toxin selbst scharf differenzieren oder mit einwandfreiem Toxin, das mit Antibakterienprazipitin nachweislich keine Reaktion zeigt, die Prazipitinreaktion nachweisen. Bei meinem Versuche zeigen beide Werte in einigen Fällen Parallelismus, aber in vielen Fällen eine grosse Abweichung. Viertens mochte ich über Resistenz der Toxinlösung gegen physikalische oder chemische Einwirkung auf Toxigenität und auf Prazipitino-genität einiges hinzufügen. Gegen äussere Einwirkung ist, wie schon bekannt, die Toxigenität sehr labil, die Prazipitino-genität dagegen sehr stabil. In dieser letzteren Hinsicht ist die Prazipitino-genität der Toxinlösung noch resistenter als Serumantigene und steht den Bakterienantigenen näher. Und diese Beziehungen sind denen aus passiver Anaphylaxie gleich, weil das durch Antitoxinserum (Prazipitintiter 1 : 50) sensibilisierte Tier auf Reinjektion von Toxin oder Bazillenextrakt nach 24 stündiger Inkubation auch mit denselben Symptomen der

---

\*Copyright (C) OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL

Anaphylaxie reagiert wie beim Prazipitinversuche. Aus Antitetanusseren kann ich auch etwas verminderte Sympbome bei Toxinreinjektion nachweisen.

Aus dem Hygienischen Institut der med. Universität Okayama  
(Vorstand: Prof. Dr. M. Ogata).

## Studien über die Präzipitation zwischen Tetanustoxin und Antitetanustoxin.\*

Von

**Tohru Inoue.**

*Eingegangen am 19. Januar 1931.*

### 1. Einleitung.

Das Phänomen der Präzipitation bei der Toxin- und Antitoxinmischung wurde zuerst von *Calmette* und *Massol*<sup>1)</sup> besonders beachtet. Wenn man auf Antikobragiftserum Kobragift einwirken lässt, bildet sich ein flockiger Bodensatz.

*Nicolle, Césari* und *Débains*<sup>2)</sup> bemerkten einen sehr deutlichen blauweissen Ring, der am Neutralisierungspunkte des Toxins am auffallendsten auftrat, als sie auf Tetanus- und Diphtherietoxin, die vorher mit 1%igem Gelatin vermischt worden waren, je das entsprechende Antitoxinserum von verschiedenen Konzentrationen überschichteten. Sie gaben ferner an, dass man die Menge des Antitoxins in vitro auf Grund der Flockungsreaktion bestimmen kann. Von *Georgi*<sup>3)</sup> wurde die ausflockende Wirkung des Diphtherieheilsersums systematisch untersucht und durch die Arbeit von *Ramon* diese Bestimmungsmethode praktisch angewendet.

Im Jahre 1922 veröffentlichte *Ramon*<sup>4)</sup> die Bestimmungsmethode des Diphtherieserums in vitro. Als er 20 cc Prüfungstoxin mit Antitoxinserum von verschiedenen Konzentrationen in Reagenzgläschen mischte, sah er eine Trübung oder einen flockigen Niederschlag bei einem geeigneten Verhältnis des Toxins zum Antitoxin.

Neben dieser deutlichen Flockung, die sich in bestimmten Reagenzgläschen gezeigt hatte, beobachtete er ausserdem eine verminderte Präzipitinbildung, ja sogar das Ausbleiben einer Flockenbildung. Er nannte die Erscheinung, die am auffallendsten in dem Gläschen auftrat, in dem sich die obengenannte Trübung oder der Niederschlag am

---

\* Gekürzt, als Referat vorgetragen auf der 331. monatlichen Versammlung der Okayamaer medizinischen Gesellschaft.

frühesten und reichlichsten bildete, „*précipitin indicateur et précipité initial*“. Er beobachtete auch, dass in diesem Gläschen Toxin und Antitoxin vollkommen neutralisiert wurden. Er gab ferner an, dass man unter Anwendung dieser Reaktion den antitoxischen Wert des nachzuprüfenden Serums bestimmen kann und dass das Resultat dieser Reaktion mit dem des Tierversuches fast parallel geht.

Über die Beziehung zwischen der Präzipitinogenität und der Giftigkeit des Diphtherietoxins äusserte er sich 1923<sup>5, 6)</sup> wie folgt: In der Kultur des *Bac. diphtheriae* nimmt die Präzipitinogenität bis zum 8. oder 9. Tage nach der Aussaat parallel mit der Giftigkeit zu. Hier-nach bleibt erstere unverändert, während letztere allmählich abnimmt.

Wenn man Diphtherietoxin in 5°C hält, so nimmt die D. L. M. bis zum Ende eines Jahres um die Hälfte ab, während die Präzipitinogenität unverändert bleibt. Bei einer Hitzewirkung von 50°C geht das Absteigen der Giftigkeit mit der Veränderung der Präzipitinogenität nicht parallel einher. Unter der Wärmewirkung von 70°C verschwinden die Toxität und die Präzipitinogenität fast ganz. Unter Finwirkung von Jod und Formalin bleibt die Präzipitinogenität intakt, dagegen nimmt die Giftigkeit ab. So bleibt die Präzipitinogenität einer Toxinlösung unter der chemischen Einwirkung relativ stabil, während ihre Giftigkeit sehr labil ist. Dieses veränderte Toxin nennt man nach *Ehrlich* Toxoid.

*Ramon* untersuchte diese Toxoidfrage mittels eines Anatoxinversuches. *Renoux*<sup>8, 9)</sup>, *S. Schmidt*<sup>10)</sup>, *Scholz*<sup>11)</sup>, *Glenny* und *Okell*<sup>12)</sup>, *Bayne-John* und *Stanhope*<sup>13)</sup>, *Povitzky* und *Banzhaf*<sup>14)</sup>, und *Meguro*<sup>15)</sup> nahmen die obengenannte Tatsache nach *Ramon* als richtig an und fügten hinzu, dass die Immunitätseinheit nach der *Ramonschen* Methode mit dem Ergebnis beim Tierversuche völlig übereinstimme.

*Kraus*, *Löwenstein* und *Bäcker*<sup>16)</sup>, *Moloney* und *Weld*<sup>17)</sup>, *Zingher*<sup>18)</sup> und *Hartley*<sup>19)</sup>, die die *Ramonsche* Methode nachprüften, behaupten dagegen, dass zwischen dieser Bestimmungsmethode und dem Tierversuche kein strenger Parallelismus zu finden sei. Zwischen den Ergebnissen dieser Methode und denen des Tierversuches finde sich manchmal ein grosser Unterschied, der wenigstens eine Schwankung von 50–60% aufweise.

Inzwischen veröffentlichten *Hoer*, *Zippe* und *Tschertkow*<sup>20)</sup> eine Bestimmungsmethode des diphtherischen Serums nach der Ringpräzipitation, derzufolge eine Reihe von Versuchen<sup>21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)</sup> über die Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin angestellt wurden, die stark vereinfacht werden konnten. Die Ergebnisse stimmten mit denen des Tierversuches nach der *Ehrlichschen* Methode völlig überein.

Wie oben erwähnt, bleibt nach der *Ramonschen* Methode die Präzipitinogenität immer dieselbe, wenn man auch durch Formalin die Toxität herabsetzt. Da aber nach dieser Ringprobe die Präzipitinogenität mit der Verminderung der Toxität parallel geht, so behaupten

sie, dass diese Methode zur Bestimmung des Antitoxinserums als die geeignetste anzusehen sei. Auch über die Beziehung zwischen Antitoxinwert und Präzipitintiter gaben *Hoens* und seine Mitarbeiter<sup>20)</sup> sowie *H. Schmidt*<sup>46)</sup> an, „dass Antitoxin und Präzipitin sich nicht nur in ein und derselben Eiweissfraktion des Serums befinden, sondern auch unlöslich miteinander verbunden sind, ein und dasselbe Wesen darstellen“.

Indessen scheinen die Ergebnisse der Nachprüfungen mehrerer Autoren mit *Hoens* Bericht nicht übereinzustimmen (*Iwanoff*<sup>28)</sup>, *Takeda*<sup>29)</sup> u. a.). Nach *Takeda* zeigen die Ergebnisse der Versuche *Ramons* und *Hoens* nicht bloss mit denen des *Ehrlich*schen Tierversuches Übereinstimmung, sondern es spielt auch das Eiweiss im Nährboden bei dieser Flockenbildung zwischen Toxin und Antitoxin eine Hauptrolle.

Nach *Bessemans*, *Pother* et *Dekess*<sup>30)</sup> reagiert, wenn man auf vorher mit Diphtherietoxin, Anatoxin und *Bac. diphtheriae* immunisiertes Pferde- und Kaninchenserum Antigen wirken lässt, ein Teil des ersteren mit Pepton oder Bouillon, des letzteren mit Toxin, Anatoxin oder Bakterien. Daher gaben sie an, dass wegen der Unbestimmtheit der Ergebnisse die *Ramonsche* Reaktion nicht ohne weiteres als die spezifische Reaktion anzusehen sei.

*Bronfenbrenner* und *Reichert*<sup>31)</sup> untersuchten bei Botulinusinfektion die Anwendbarkeit der *Ramonschen* Flockungsreaktion, um dadurch den Nachweis von dem Vorhandensein von Toxin im Blute zu erlangen, und behaupteten, dass das Auftreten der Ausflockung nicht von dem Antitoxingehalt des Serums, sondern davon, dass es einen antibakteriellen Immunkörper enthalte, abhängt.

*Zingher*<sup>18)</sup> prüfte die *Ramonsche* Ausflockungsmethode nach und kam zu dem Schlusse, dass die Ausflockungsreaktion wahrscheinlich ein spezifisches bakterielles Präzipitationsphänomen sei. Die Berichte über Tetanusheilserum sind jedoch auf diesem Gebiete noch sehr mangelhaft.

Im Jahre 1924 kam *Scholz*<sup>32)</sup> auf Grund seiner Untersuchungsergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass die Flockungsreaktion als Auswertungsmethode zu wenig empfindlich sei. 1926 teilten *Abt* und *Erber*<sup>33)</sup> mit, dass ein bedeutender Prozentsatz von Tetanusheilserum mittels Flockungsmethode mit Erfolg titriert werden könne und nur ein kleiner Prozentsatz dieser Seren unregelmässig oder garnicht flocke. *S. Schmidt*<sup>34)</sup> äusserte sich 1928 über die Schwierigkeit der Auswertung des Tetanusheilserums mittels der Flockungsreaktion. Dagegen teilte *Kalic*<sup>35)</sup> mit, dass die Flockungsmethode mit Erfolg für die Auswertung von Seren gebraucht werden könne.

*Hoens* und *Tschertkow*<sup>36)</sup> gaben an, dass der Präzipitintiter zwischen dem Toxin und dem Antitoxinserum mit den Resultaten *in vivo* übereinstimmte, als sie ihre Bestimmungsmethode im Reagenzglas des

Diphtherieserums zur Wertbestimmung des Tetanusheilserums anzuwenden.

Ich beschäftigte mich auch mit folgenden vier Fragen:

1. Tritt die Präzipitation zwischen Tetanustoxin und Antitoxin ebenso wie bei Diphtherietoxin und Antitoxin auf?
2. Ist die Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxin spezifisch, und ist das *Ramonsche* Phänomen auf die Toxin-Antitoxinbindung allein beschränkt?
3. Besteht ein Parallelismus zwischen dem Präzipitinwert und dem Antitoxinwert?
4. Ist das Bakterieneiweiß an der Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinserum beteiligt?

Um diese Fragen zu beantworten, stellte ich mit Tetanustoxin und Antitoxinserum den nachfolgenden Versuch an.

## 2. Untersuchungsmethode.

### A. Tetanustoxin und Antitoxin.

Zum Versuche verwandte ich getrocknetes Pulver von dem Tetanustoxin unseres Institutes, das in der Menge von 0.000001 g ein Mäuschen mit dem Körpergewicht von 13 g sicher abtöten konnte.

Als Antitoxin benützte ich eigenes Antitoxinserum, das durch mehrmalige Immunisierung (über 35 mal) von gesunden Kaninchen (über 2,000 g K. G.) bei 5 tägigen Pausen mit aufsteigenden Dosen dieses Toxins (von 0.00005 bis 0.2 g) hergestellt wurde. Für die erste Injektion wurde 0.00005 g desselben verwendet, mit Kochsalzlösung verdünnt und durch Papierfilter abfiltriert. Daneben habe ich käufliche Antitoxinsera von Pferden als Kontrolle benützt.

### B. Wertbestimmung der Toxine und Antitoxine.

Zur Wertbestimmung des Antitoxinserums und der Toxität des Toxins benützte ich Mäuse von 12–13 g Körpergewicht. Bei der Messung der Antitoxineinheit wurde Toxin in 2-facher Menge der D. L. M. mit Antitoxin in verschiedenen Verdünnungen gemischt. Als Injektionsmenge wurde immer 0.5 cc von dieser Mischung verwendet, die Mischung von Toxin und Antitoxin 20 Minuten lang in Zimmertemperatur digeriert und subkutan dem Versuchstiere injiziert. Die Versuchstiere wurden in bestimmten Kästen 4 Tage lang beobachtet. Zur Bestimmung der D. L. M. des Toxins wandte ich die minimale Toxinmenge an, die 4 Tage nach der Injektion das Versuchstierchen sicher abtöten konnte.

### C. Emulsion der Tetanusbazillen.

Eine 4–5 tägige Bouillonkultur wurde abzentrifugiert und der Bakterienleib angesammelt; dann wurde der Bodensatz mit 0.85%iger Kochsalzlösung vielmals gewaschen und abzentrifugiert. Zuletzt wurden Bakterien in Kochsalzlösung in geeigneter Menge aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung benützte ich als Antigen für die Immunisierung.

### D. Extrakt der Tetanusbazillen.

Der oben erwähnte ausgewaschene Bakterienleib wurde in sterilem Aq. destillata aufgeschwemmt, 4–5 Tage lang bei 37°C im Brutschrank gehalten und während dieser Zeit öfter umgeschüttelt; dann wurde er durch *Berkefeld*-Kerze filtriert. Zuletzt wurde Kochsalz bis zu 0.85%-Gehalt zugesetzt. Dieser Bazillenextrakt wurde als Präzipitinogen verwendet.

### E. Präzipitation.

Die Reaktion wurde nach *Uhlenhuth*scher Methode und *Ogatascher*<sup>37)</sup> Verdünnungsmethode ausgeführt. Als Verdünnungsflüssigkeit gebrauchte ich 1%ige Arabiagummi-Kochsalzlösung. Eine genaue Beschreibung hierüber wurde schon früher in dieser Zeitschrift 1. Band 2. Heft S. 247 (*Haku*<sup>36)</sup>) gegeben.

### F. Komplementbindung.

Als Hämolyse benützte ich ein inaktiviertes Antiziegenkaninchen-serum (in 2-fach gelöster Dosis), als Komplement wurde frisches Serum von Meerschweinchen (in 2-fachem Komplementtiter) verwendet. Das Blut war gewaschenes 5%iges defibriniertes Ziegenblut.

Bei dieser Probe liess ich zuerst das Gemisch von Antigen (Toxinlösung u. a.), Immunserum (Antitoxinsera u. a.) und Komplement eine Stunde lang im Brutschrank bei 37°C digerieren, um die Bindung der Antigene mit den Antikörpern zu fördern, alsdann, nach Zusatz der Blutkörperchenaufschwemmungen und der Hämolyse, hielt ich es 2 Stunden lang im Brutschrank, endlich über Nacht im Eisschrank. Bei jedem Versuche setzte ich ausserdem stets Kontrollen an, um zu erfahren, ob die Antigene oder das Immunserum selbst auf die Komplemente hemmend wirkten, ob das hämolytische System genügend benützt würde, oder ob die Komplemente allein hämolytisch keine Wirkung hätten.

### G. Anaphylaxie.

Bei dem anaphylaktischen Phänomen benützte ich ein Meerschweinchen von 230–250 g Körpergewicht. Das Meerschweinchen wurde durch die intravenöse Injektion des Immunserums sensibilisiert, und

nach 24 Stunden wurde das Antigen intravenös reinjiziert. Als anaphylaktische Symptome zeigt das Tier sprungartigen Krampf, Temperatursturz, heftige Lungenaufblähung, Niesen, Kratzen der Nase, Sträubung der Haare, Unruhe, Atemfrequenz usw.. Ich unterschied bei dem Anaphylaxiesymptom 4 Grade je nach der Symptomstärke, nämlich: schwache-, mittelmässige-, starke anaphylaktische Symptome und tödlichen Anaphylaxieschock.

#### H. Koliemulsion und Kolipräzipitinogen.

1. Eine 18 stündige Schrägagarkultur des Kolibazillus wurde in 10 cc Kochsalzlösung emulgiert und durch Erwärmen im Wasserbad bei 60°C abgetötet. Diese Aufschwemmung benützte ich als Antigen für die Immunisierung.

2. Das Kolipräzipitinogen wurde auf folgende Weise hergestellt: Eintägige Agarkultur wurde in sterilem destilliertem Wasser aufgeschwemmt, eine Stunde lang bei 60°C erhitzt, zwei Tage bei 37°C gehalten und dann durch *Berkefeld*-Kerze filtriert. Vor dem Versuche wurde Kochsalz bis zu 0.85% Gehalt zugesetzt.

### 3. Experiment.

#### A. Die Präzipitinbildung zwischen Toxin und Antitoxin.

Wenn man ein Antitoxinserum mit einer entsprechenden Toxinlösung mischt, so tritt Ausflockung in der Mischung auf. Oder wenn man auf ein Antitoxinserum eine Toxinlösung überschichtet, so erscheint ein weisser Ring an der Berührungsstelle. Diese Tatsache wurde zum ersten Male schon bei dem *Calmette*- und *Massolschen* Experiment über Kobragift bemerkt. Hiernach wurde sie besonders nach der Angabe von *Ramon* und *Hoen* als eine spezifische Präzipitinreaktion anerkannt, und viele Nachfolger traten dieser Ansicht bei, doch gibt es auch eine ihr widersprechende Meinung.

Um diese Frage zu lösen, stellte ich mit Antitetanustoxinserum von Kaninchen die nachstehende Untersuchung an.

a) Um den Antitoxinwert des Immunserums zu bestimmen, stellte ich den folgenden Versuch an:

1) Bestimmung der minimalen Dosis letalis.

Einer Reihe von Versuchstieren wurden verschiedene Toxinmengen mit Kochsalzlösung verdünnt (0.2 cc) subkutan injiziert (12.5–13 g Mäuschen). Die Ergebnisse sind folgende:

Mit 0.000001 g dieses Toxins kann man das Tierchen in 4 Tagen abtöten.

2) Bestimmung des Antitoxinwertes.

Tabelle 1.

Nr.	Körpergewicht d. Mäuschen (g)	Toxinmenge (g)	Verlauf (Tage)				
			1	2	3	4	5
1	13	0.0000025	—	—	±	+	+
2	12.5	0.0000005	—	+	+	+	st.
3	13	0.000001	+	++	##	st.	
4	13.5	0.000002	++	##	st.		
5	12.5	0.000004	##	st.			

+. ++. ##. zeigt d. Grade d. tetanischen Symptome.

—. // keine Symptome.

st. // gestorben.

Die 2-fache tödliche Minimaldosis des Toxins wurde mit Antitoxin-serum, das vorher mit Kochsalzlösung absteigend verdünnt worden war, gemischt. Diese Toxin- und Antitoxinsgemische (0.5 cc) wurden 20 Minuten lang bei Zimmertemperatur angestellt und dann den Versuchstieren subkutan injiziert. Aus der Serummenge berechnet, neutralisier-ten 0.0001 cc die einfache tödliche Minimaldosis des Toxins und 0.0002 cc des Serums die zweifache tödliche Minimaldosis, weil, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich, im ersten Falle das Tier am Ende des vierten Tages mit Tetanussymptomen starb, während es im zweiten Falle vollkommen gerettet wurde.

Tabelle 2.

Nr.	Körpergewicht d. Mäuschen (g)	Toxinmenge (g)	Antitoxin- serum- menge (cc)	Verlauf (Tage)				
				1	2	3	4	5
1	12.5	0.000002	0.00002	++	st.			
2	13	"	0.00004	+	++	st.		
3	13	"	0.0001	—	—	++	st.	
4	13	"	0.0002	—	—	—	—	—
5	12.5	"	0.0004	—	—	—	—	—
6	13.5	"	0.001	—	—	—	—	—
7(k)	12.5	"	—	++	##	st.		

k = Kontrolle.

b) Ringpräzipitinprobe (nach der *Uhlenhuths*chen -und der Verdünnungsmethode).

Präzipitinogen. Das Toxinpulver wurde genau gemessen und 0.01 g desselben vorsichtig in 1 cc Kochsalzlösung aufgelöst. Dann wurden aus dieser Stammlösung (1:100) die verschiedenen Verdünnungen des Präzipitinogens hergestellt.

*Uhlenhuthmethode.* Das Antitoxinserum von Kaninchen wurde im Original als solches in kleine Präzipitinröhrchen verteilt und das Präzipitinogen überschichtet.

*Verdünnungsmethode.* Das Antitoxinserum wurde mit 1%iger Gummiarabicumlösung mit physiologischer Kochsalzlösung, wie unten angegeben, verdünnt. Das verdünnte Präzipitinserum wurde wie das Originalserum bei der *Uhlenhuths*chen Methode zuerst in Röhrchen verteilt und dann das Präzipitinogen vorsichtig aufgeschichtet.

Die Reaktionen wurden bei beiden Verfahren, wie folgt, beobachtet:

Tabelle 3.

Antitoxin-Verd.	Toxin-Verdünnung							
	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	1:10,000	1:25,000
1: 1	###	###	###	###	###	++	—	—
1: 2.5	###	###	###	###	###	##	±	—
1: 5	###	###	###	###	###	###	++	—
1: 10	##	##	###	###	###	##	—	—
1: 25	##	##	###	###	##	++	—	—
1: 50	++	++	##	##	++	+	—	—
1:100	+	+	+	++	+	—	—	—
1:250	—	—	—	+	—	—	—	—
1:500	—	—	—	—	—	—	—	—

(B.Z.)

(R)

###. Positiv in 15 Minuten.

##. " " 30 Minuten.

++. " " 1 Stunde.

+. " " 2 Stunden.

—. Negativ im ganzen Zeitverlaufe.

Wie obiges Ergebnis zeigt, reagiert das Toxin mit dem Originalserum bis zur Verdünnung 1:5,000. Die Toxinmenge ist nach Gewicht 0.0002 g. Die Reagierbarkeit der Toxine geht noch etwas weiter bei einer Verdünnung des Immuserums 1:2.5 und ist am stärksten bei 1:5.

Nach der *Ramons*chen Angabe entspricht dies dem Resultate bei einer Toxinverdünnung 1:10,000, weil dabei die hemmende Zone bei dem unverdünnten Serumteile deutlich gesehen werden kann (R).

Nach der Verdünnungsmethode des Präzipitins kann man auch eine interessante Bindungszone des Immuserums beobachten, weil dies Antitoxinserum in geeigneter Antigenverdünnung (1:1,000) am stärksten reagiert.

Als Präzipitinwert kann man mit diesem Versuche den Präzipitintiter feststellen, und zwar nach *Uhlenhuth* 1:5,000, nach der Verdün-

nungsmethode 1 : 250 bei Bindungszone 1 : 1,000.

c) Mischprobe.

Es ist auch in unserem Institute bei der Serum- oder Bakterienpräzipitinprobe bestätigt worden, dass die Bindungszone des Immunserrums, d. h. die geeignete Antigenverdünnung, für jedes Immunserrum vorhanden ist, sowohl bei der Ringpräzipitinmethode als auch bei der Mischprobe gleich ist und dabei bei der Mischprobe die Schärfe der Reaktion als Ringprobe sich viel träger zeigt.

Bei den *Ramonschen* Phänomenen, bei denen die Hemmungszone des Immunserrums bei bestimmter Antigenverdünnung bemerkt wurde, sind auch eine Präzipitinreaktion oder andere Immunreaktionen beobachtet worden.

Um mit meiner Flockungsreaktion zwischen Toxin und Antitoxin diese Phänomene nachzuahmen, habe ich aus der vorliegenden Präzipitinprobe die Toxinverdünnung 1 : 10,000 benützt, weil dabei die Hemmungszone des Immunserrums schon beobachtet worden war.

1 cc verdünnte Toxinlösung (1 : 10,000) wurde mit absteigend verdünntem Antitoxinserrum (1 cc) vermischt und 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur möglichst steril gehalten. Wie unten angegeben, kann man das *Ramonsche* Phänomen deutlich beobachten, weil das Antitoxinserrum bei einer 1 : 5 Verdünnung am stärksten und bei einer grösseren oder geringeren Verdünnung schwächer oder garnicht reagiert.

Tabelle 4.

Nr. d. Reagenzgläschen	1	2	3	4	5	6	7
Toxinmenge (1 : 10,000) (cc)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Antiserrummengung (1 cc)	1 : 1	1 : 2.5	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Resultate	+	++	###	++	+	-	-

d) Komplementbindung zwischen Toxin und Antitoxin.

Es sind zwar schon viele Arbeiten über Komplementbindung zwischen Toxin und Antitoxin veröffentlicht worden; trotzdem ist es aber nicht überflüssig, von einem neuen Gesichtspunkt aus diese Frage nochmals nachzuprüfen. Die in unserem Institute vorliegenden Ergebnisse (*Ogata*<sup>37</sup>), *Sunouchi*<sup>38</sup>), *Makino*<sup>39</sup>), *Sasaki*<sup>40</sup>), *Sugimoto*<sup>41</sup>), besonders *Haku*<sup>36</sup>) haben den sicheren Nachweis erbracht, dass der komplementbindende Antikörper als identisch anzusehen ist mit Präzipitin oder mit dem anaphylaktischen Antikörper. Dabei reagiert das Immunserrum mit derselben Antigenverdünnung (Bindungszone) des Präzipitinversuches bis zur höchsten Verdünnung des Immunserrums. Von diesem Gesichtspunkt aus will ich Toxin und Antitoxin anwenden. Wie schon

im Abschnitte Methodik vorher gezeigt wurde, gibt es nichts Besonderes bei unserer Komplementbindung, nur muss dabei die geeignete Antigenverdünnung für Immunsrum (Bindungszone) und der Titer des Immunsrum genau bestimmt werden.

Als Antigen benützte ich Tetanustoxinlösung und als Antikörper das Kaninchenserum, das mit diesem Toxin nach vielmaliger Immunisierung hergestellt wurde. Nach Inaktivierung des Immunsrum wurden beide Komponenten mit Komplement bei 37°C digeriert, und nach 1 Stunde wurde ihnen das hämolytische System hinzugefügt. Die Resultate sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5.  
Komplementbindungsversuch.

Antiserumverd.	Toxinverdünnung						
	1:1,000	1:2,500	1:5,000	1:10,000	1:25,000	1:50,000	1:100,000
1:10	##	##	##	##	+	±	—
1:50	++	++	##	++	/	/	/
1:100	—	+	++	+	/	/	/
1:250	—	—	+	±	/	/	/
1:500	—	—	—	—	/	/	/

(B.Z.)

Kontrolle.

Nr.	0.85% Kochsalzlösung (cc)	0.1% Toxinlösung (cc)	10% Antiserum (cc)	5% Komplement (cc)	Hämolytisches System (cc)	Resultate
1	2.0	1.0	—	—	2.0	##
2	1.0	1.0	—	1.0	2.0	—
3	2.0	—	1.0	—	2.0	##
4	1.0	—	1.0	1.0	2.0	—
5	2.0	—	—	1.0	2.0	—
6	3.0	—	—	—	2.0	##

## = komplette Hemmung oder komplette Nicht-Hämolyse.

++ = starke Hemmung.

+ = mittelmässige Hemmung.

± = schwache Hemmung.

— = komplette Lösung.

Nach obiger Tabelle besteht auch Komplementbindung zwischen Toxin und Antitoxin bei Tetanus, und es zeigen sich bei verschiedenen Antigenen und Antiserumverdünnungen interessante Bindungsverhältnisse.

Nach der Ringprobe wurde die geeignete Antigenverdünnung für

dieses Antiserum als Bindungszone schon festgestellt. Dieselben Verhältnisse gelten auch für diese Komplementbindung, weil bei der Toxinverdünnung 1 : 5,000 die Reaktionen am stärksten auftreten und die Antiserumverdünnung bis 1 : 250 positiv reagiert. Das *Ramonsche* Phänomen konnte ich nicht nachprüfen, weil das Antitoxinserum auf das Komplement hemmend wirkte.

#### Kurze Zusammenfassung.

Aus der Reihe der obigen 4 Versuche kann man als Tatsache entnehmen, dass dieses Antitoxinserum spezifisch das Toxin neutralisiert und bei Verdünnung des Heilserums 1 : 5,000 der 2-fachen D. L. M. des Toxins entspricht.

Zweitens bildet dieses Antitoxinserum in vitro mit Toxin deutlich ein Präzipitat, wenn man beide in geeigneten Mengenverhältnissen mischt. Die Ringprobe zeigt aus technischen Gründen eine bessere Anwendbarkeit als die Mischprobe und eine grössere Schärfe der Reaktionen. Das *Ramonsche* Phänomen wird auch bei bestimmter Antigenverdünnung beobachtet. Bei der Bindung zwischen Toxin und Antitoxin wird das Komplement mitgenommen, und diese Reaktion geht mit der Präzipitinreaktion parallel.

Um meinen eigenen Versuch noch zu bestätigen, gebrauchte ich ausser Immunserum von Kaninchen als Antitetanusserum solches von Pferden, das im Handel erhältlich ist. Die käuflichen Antisera wurden mit unserem Toxin in Tier- und Präzipitinversuchen nachgeprüft. Die Resultate werden in Tabelle 6 kurz angegeben.

Der Titer von *Uhlenhuth* zeigt bei unverdünntem Antiserum die Reaktionsschwelle unserer Toxinlösung. Die Titer der Verdünnungsmethode sind bei geeigneter Toxinverdünnung die Verdünnungsgrade des Antitoxinserums.

Tabelle 6.

Bestimmung des Präzipitintiters und des antitoxischen Wertes von Pferdeserum.

Serumarten	T. n. U'scher Methode	Verdünnungsmethode	
		T. n. Verd.	Toxinlösung
1	1 : 250	1 : 8	1 : 100
		1 : 2	1 : 250
2	—	—	—
3	1 : 100	1 : 4	1 : 100
4	1 : 500	1 : 16	1 : 100
		1 : 4	1 : 250
		1 : 2	1 : 500
5	1 : 250	1 : 16	1 : 100
		1 : 2	1 : 250

Serumarten	Toxinmenge	Minimale Serummenge	Resultate
1	2 fache D. L. M.	0.00001	lebt
2	"	0.000001	"
3	"	0.000001	"
4	"	0.0000002	"
5	"	0.0000002	"

T. n. U'scher Methode = Titer nach *Uhlenhuth'scher* Methode.

T. n. Verd. = Titer nach Verdünnungsmethode.

### B. Über die Beziehung zwischen dem *Ramonschen* Grenzphänomen und dem Zonenphänomen des Serumpräzipitins.

Es ist ein sehr interessantes Phänomen, dass bei Toxin- und Antitoxinbindung in geeigneten Verdünnungen beider Stoffe die Präzipitini- und Agglutination am stärksten und am schnellsten auftritt. *Ramon*<sup>41)</sup> sieht dieses Phänomen als spezifisch für Toxin und Antitoxinbindung und als von der normalen Präzipitinercheinung stark abweichend an.

*Hoer* und *Moloney* erklärten diese Erscheinung weiter mit Peptisation der Kolloidsubstanzen. *Takeda*<sup>29)</sup> sah dagegen dieses Phänomen als Zonenphänomen bei Präzipitinreaktion an. Ich möchte dieses Phänomen einerseits aus der Immunisierungsweise, andererseits aus den Prozonen der Präzipitinreaktion, welche letztere mit Pneumokokkenpräzipitin zuerst von *Friedlander*, *Sobotka* und *Banzhaf*<sup>42)</sup> beobachtet wurden, erklären. Es ist schon durch frühere Arbeiten in unserem Institute genau nachgewiesen worden, dass bei hoch immunisiertem Präzipitin in verdünntem Immunserum die Reaktionen durch schwach verdünnte Antigene oft negativ bleiben. Immunserum gibt dabei eine entsprechende geeignete Antigenverdünnung, mit der man bis zur höchsten Verdünnung des Immunserums die Reaktion bemerken kann.

Diese Erscheinung wurde von Prof. *Ogata* als Bindungszone des Immunserums<sup>37)</sup> bezeichnet und von *Takeda* das Phänomen nach *Ramon* mit dieser hemmenden Wirkung des Antigens erklärt. Dies trifft jedoch auf das *Ramonsche* Phänomen nicht vollkommen zu, weil dabei eine hemmende Zone bei schwach verdünntem Immunserum auftritt. Gleichfalls interessant ist es, dass man dieser Erscheinung auch in anderen serologischen Reaktionen nachspürt. Mit Bezug auf Agglutinine oder Bakteriolyse wurde dieses Phänomen schon früher beobachtet, aber mit Bezug auf Präzipitin wurde es nur bei Pneumokokken als Prozonenerscheinung beschrieben. Um diese Frage genau zu beantworten, muss ich zuerst auf die Immunisierungsweise eingehen.

Bei der Antitoxinherstellung wurde das Tier über ein Jahr lang wiederholt mit einer kleinen Menge Toxin vielfach immunisiert. Bei meinem Versuche wurde das Kaninchen mehr als 1/2 Jahr lang über 35 mal mit Toxin immunisiert. Mit diesem hoch immunisierten Antiserum konnte man erst die präzipitierende Kraft nachweisen. Bei gewöhnlichem Präzipitinserum ist das Verhalten ganz anders als bei Serumantigen: bei diesen wird das Tier höchstens 5 mal immunisiert, weil das Präzipitin bei der Originalprobe nach *Uhlenhuth* die Reaktion schon bei 1,000 maliger Verdünnung des Antigens positiv zeigt. Mit diesem schwach immunisierten Präzipitin lässt sich weder die hemmende Wirkung der Antigene noch die des Antikörpers beobachten.

Mit gewöhnlichem Präzipitinserum kann man den Titer des Präzipitins nur unter 100 maliger Verdünnung des Immunserums gewinnen und das Zonenphänomen zeigt sich sehr undeutlich. Um das Immunserum herzustellen, das bei über 500 maliger Verdünnung mit Antigen ein Präzipitat bilden kann, muss man die Immunisierung über 5 mal fortsetzen. Nicht selten wird in unserem Institute erst bei mehr als 30 Injektionen von Immunserum in hoher Verdünnung eine positive Reaktion beobachtet. Es spricht hierbei auch die Individualität des Kaninchens mit. Dabei bemerken wir oft die hemmende Wirkung der Antigene in hoch verdünntem Immunserum (Genauerer hierüber enthalten die Arbeiten von *Kageyama*<sup>43</sup>, *Sunouchi*<sup>38</sup>, *Haku*<sup>36</sup>, *Sugimoto*<sup>41</sup>, *Sasaki*<sup>40</sup>), und, in kurzem erscheinend, von *Kuwana*).

Bei diesem hoch immunisierten Präzipitin sehen wir oft eine Prozonenerscheinung. Das unten angeführte Immunserum wurde auf folgende Weise hergestellt: Die Kaninchen wurden mit Rinderserum zu je 0.5 cc über 15 mal immunisiert. Nach regelmässigen Injektionen setzte ich zunächst mit der Behandlung der Tiere aus. Nach dieser Pause (etwa 1 Monat lang) wurde die Immunisierung fortgesetzt und mehr als 10 mal vorgenommen. Nach dieser hohen Immunisierung erfolgte die Prüfung. Das Immunserum wurde mit 10% Komplement oder 1% Gummiarabicum absteigend verdünnt. 0.1 cc des Immunserums wurde in Präzipitinröhrchen verteilt und der Reihe nach mit verdünntem Antigen vorsichtig überschichtet. Die Resultate werden in Tabelle 7. A genau angegeben.

Dieses Antirinderserum reagiert am stärksten mit der Antigenverdünnung 5,000 - 10,000 (B. Z.!), und der Titer des verdünnten Präzipitins zeigt dabei 1 : 500. Bei der Verdünnung des Immunserums 1 : 250 sieht man die hemmende Wirkung der schwach verdünnten Antigene (1 : 25, 50, 100, - 1,000) deutlich. Dieses Phänomen fällt, wie schon oben gesagt, mit dem *Ramonschen* nicht direkt zusammen. Um das *Ramonsche* Phänomen zu finden, muss man bei dem Immunserum in schwacher Verdünnung die hemmende Zone suchen.

Tabelle 7.  
A. Präzipitation.

Antikörper- verdünnung	Antigenverdünnung											
	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000	50,000	100,000
1: 1	###	###	###	###	###	###	###	###	±	±	—	—
1: 2.5	###	###	###	###	###	###	###	###	##	++	—	—
1: 5	###	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	—
1: 10	###	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	—
1: 25	###	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	—
1: 50	###	###	###	###	###	###	###	###	###	++	—	—
1: 100	++	##	##	###	###	###	###	###	##	±	—	—
1: 250	—	—	—	++	++	##	##	##	++	—	—	—
1: 500	—	—	—	—	—	—	±	+	+	—	—	—
1: 1,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(B. Z.)

## B. Komplementbindung.

Antikörper- verdünnung	Antigenverdünnung										
	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000	50,000	100,000	250,000
1: 2.5	##	##	##	##	##	##	##	##	±	—	—
1: 5	##	##	##	##	##	##	##	##	+	—	—
1: 10	##	##	##	##	##	##	##	##	++	±	—
1: 25	##	##	##	##	##	##	##	##	##	+	—
1: 50	##	##	##	##	##	##	##	##	##	++	—
1: 100	++	##	##	##	##	##	##	##	##	++	—
1: 250	—	—	—	±	±	++	##	##	++	+	—
1: 500	—	—	—	—	—	—	+	##	+	—	—
1: 1,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Kontrolle: Komplette Lösung.

## C. Tori-gatas Präzipitinometer.

Antigenverdünnung	Antikörperverdünnung					
	1:1	1:2.5	1:5	1:10	1:25	1:50
1:25,000	±	+	++	##	++	+

In obiger Tabelle 7. A möchte ich die Rubriken der Antigenverdünnung in der Längsrichtung lesen. Bei den hohen Antigenverdünnungen 10,000–100,000 kann man bei Serumpräzipitin auch die *Ramonsche* Grenzerscheinung nachweisen.

Gerade bei der Antigenverdünnung 1 : 50,000 in der schwachen Verdünnung des Immunserums 1 : 2.5 tritt eine deutliche Hemmungszone auf. Diese Erscheinung ist auch der Tatsache analog, dass bei der Antitoxinpräzipitation das Toxin als Antigen in sehr verdünnter Lösung benützt wird. Um dies Phänomen zu bestätigen, habe ich durch Komplementbindung mit diesem Serumpräzipitin eine Untersuchung angestellt, die aus Tabelle 7. B ersichtlich ist. Die Resultate stimmen mit denen des Ringpräzipitins völlig überein, nur geht das Prozonphenomen noch in den verdünnten Antigenteil über.

Dieses Prozonphenomen kann man aus der Präzipitinmenge nachweisen, weil bei schwach verdünnten Immunserumteilen stets kleinere Präzipitatmenge als bei geeigneter Immunserumverdünnung gebildet wird (Siehe Tabelle 7. C).

Bei Antikoliimmunserum von Kaninchen beobachtete ich ebenfalls die gleiche Prozonerscheinung und Bindungszone des Immunserums. Das heisst, dieses Antikoliimmunserum reagiert am stärksten mit der Antigenverdünnung 1 : 20 (B. Z.), und der Titer des verdünnten Präzipitins zeigt 1 : 3,200. Bei der Antigenverdünnung von 1 : 320, besonders von 1 : 640 in schwacher Verdünnung des Immunserums 1 : 1, 1 : 2.5 tritt eine deutliche Hemmungszone auf. Dieses Antikoliimmunserum wurde auf folgende Weise hergestellt: Das Kaninchen wurde mit einer absteigenden Dosis (0.5 bis 6 cc) von Koliemulsion bei 4 tägiger Pause ca. 7 mal intravenös injiziert; nach 20 tägiger Pause wurde die Immunisierung fortgesetzt und noch mehr als 14 mal vorgenommen.

Auf Grund der Immunisierungsweise und des Präzipitationsphänomens möchte ich behaupten, dass die Toxin- und Antitoxinpräzipitation in weiterem Sinne als gewöhnliche Präzipitation angesehen werden kann.

Tabelle 8.

Antikörperverdünnung	Antigenverdünnung								
	5	10	20	40	80	160	320	640	1280
1 : 1	###	###	###	###	###	###	+	-	-
1 : 2.5	###	###	###	###	###	###	++	-	-
1 : 5	###	###	###	###	###	###	++	-	-
1 : 10	###	###	###	###	###	###	++	+	-
1 : 25	###	###	###	###	###	###	++	+	-
1 : 50	###	###	###	###	###	###	++	+	-
1 : 100	###	###	###	###	###	###	++	-	-
1 : 200	###	###	###	###	##	++	+	-	-
1 : 400	++	##	###	###	++	+	-	-	-
1 : 800	++	++	##	++	+	-	-	-	-
1 : 1,600	+	++	++	+	-	-	-	-	-
1 : 3,200	-	-	±	-	-	-	-	-	-
1 : 6,400	-	-	-(B.Z.)-	-	-	-	-	-	-

(Prozonerscheinung)

## C. Über Antitoxinwert und Präzipitineinheit.

*Hoens* und andere haben bereits angegeben, dass der Präzipitintiter von diphtherischem Antitoxinserum nach ihrer Methode mit der Einheit des Antitoxins beim Tierversuche gleichzeitig einhergeht.

Nach meinem Experimente beim Tetanusversuche weisen aber, wie unten gezeigt, die Mengenverhältnisse zwischen Antitoxin und Präzipitin grosse Abweichungen auf.

Experiment mit Antitoxinseren von Kaninchen und Pferden: Diese Beziehungen habe ich nach dem *Hoenschen* Versuche mit Antitetanustoxinseren von Kaninchen und Pferden studiert. Wie schon oben gezeigt, hat mein Antitoxinserum von Kaninchen den Präzipitintiter 1 : 250 bei der Toxinverdünnung 1 : 1,000 (Bindungszone), den von 1 : 100 bei der Toxinverdünnung 1 : 100 (s. Tabelle 3), und nach dem Tierversuche entspricht das Antitoxinserum dem Neutralisierungswerte des Antitoxins für 2 D. L. M. des Toxins von 1 : 5,000 Serumverdünnung (s. Tabelle 2). Das Antitoxinserum von Pferden zeigte gleichermassen folgende Beziehungen zwischen Präzipitinwert und Antitoxinwert:

Tabelle 9.

Serumarten	Tierversuch		Präzipitation	
	Toxinmenge	Serummenge	Titer	Toxinlösung
1	2 D. L. M.	0.00001	1 : 8	1 : 100
2	"	0.000001	unklar	
3	"	0.000001	1 : 4	1 : 100
4	"	0.0000002	1 : 16	1 : 100
5	"	0.0000002	1 : 16	1 : 100

Wenn der Präzipitintiter den Antitoxinwert direkt anzeigt, laufen beide immer parallel. Das Kaninchenserum zeigt dagegen einen höheren Präzipitinwert und einen niedrigeren Antitoxinwert als das Pferdeserum. Im Pferdeserum selbst beobachtet man ebenfalls widersprechende Wertverhältnisse (z. B. in Tabelle 9, Seren 1 und 3).

Nach den *Hoenschen* Angaben suchte ich die „Lp“ Grösse mit meinem Antitoxinserum von Kaninchen. Nach dem obigen Versuche zeigt dessen antitoxischer Wert 5,000 E. und der Präzipitintiter 1 : 100, daher müsste die „Lp“ des Toxins (1 : 100 Verdünnung) 5,000/100, d. h. 50 E. entsprechen. Deswegen kann man mit meiner Toxinlösung bis zu 50 E. des Antitoxins immer eine positive Präzipitinreaktion nachweisen. Nach diesen Angaben stellt sich der antitoxische Wert der Seren von Pferden in folgender Weise dar:

Tabelle 10.

Serumarten	Präzipitintiter	Antitoxischer Wert durch Präzipitintiter	Antitoxischer Wert in vivo	Differenz bei den Methoden
Antitoxin v. Pferd 1	1 : 8	$8 \times 50 = 400 \text{ E.}$	100,000 E.	1 : 250
„ 2	unklar		1,000,000 E.	
„ 3	1 : 4	$4 \times 50 = 200 \text{ E.}$	1,000,000 E.	1 : 5,000
„ 4	1 : 16	$16 \times 50 = 800 \text{ E.}$	5,000,000 E.	1 : 6,250
„ 5	1 : 16	$16 \times 50 = 800 \text{ E.}$	5,000,000 E.	1 : 6,250

E. = Einheit.

Wie obige Tabelle zeigt, ist die Abweichung sehr gross, daher suchte ich mit Pferdeserum selbst wieder die „Lp“ Grösse. Wenn man die „Lp“ Grösse mit Antitoxinserum von Pferd 1 suchte, müsste die „Lp“ des Toxins  $100,000/8 = 12,500 \text{ E.}$  betragen. Deswegen wurde der antitoxische Wert der anderen Seren in folgender Weise berechnet:

Tabelle 11.

Serumarten	Präzipitintiter	Antitoxischer Wert durch Präzipitintiter	Antitoxischer Wert in vivo	Differenz bei den Methoden
Antitoxin v. Kaninch.	1 : 100	$100 \times 12,500 = 1,250,000 \text{ E.}$	5,000 E.	250 : 1
Antitoxin v. Pferd 3	1 : 4	$4 \times 12,500 = 50,000 \text{ E.}$	1,000,000 E.	1 : 20
„ 4	1 : 16	$16 \times 12,500 = 200,000 \text{ E.}$	5,000,000 E.	1 : 25
„ 5	1 : 16	$16 \times 12,500 = 200,000 \text{ E.}$	5,000,000 E.	1 : 25

Bei diesen Fällen kann man eine Umrechnung des Antitoxinwertes aus dem Präzipitinwerte nicht ohne weiteres erwarten. Wenn man den antitoxischen Wert aus dem Präzipitintiter bei der Bindungszone berechnete, so würden diese beiden Werte einander ziemlich nahestehen, weil der Antitoxinwert meines Kaninchenserums (Präzipitintiter 1 : 250 bei Toxinlösung 1 : 1,000 [B.Z.]) 12,500 E. entspricht. So neutralisiert es bei 250-facher Verdünnung dieses Antitoxinserums mit Toxinverdünnung 1 : 1,000 (1,000 D. L. M.), d. h. 2 D. L. M. des Toxins können durch 0.00008 cc desselben neutralisiert werden. Für den antitoxischen Wert (5,000 E.) des Tierversuches steht dieser Wert dem oben angegebenen Antitoxinwert nach *Hoen* sehr nahe. Bei anderen Seren konnte ich die Bindungszone nicht beobachten, weil bei diesen die Bindungszone des Immunserums im schwächeren Verdünnungsteile des Antigens stand.

#### D. Über das Präzipitinogen des Toxinantigens.

Betreffs der Reaktion zwischen Toxin und Antitoxinserum behaupt-

ten *Ramon* und seine Anhänger (*Hoen* u. a.), dass es sich um eine spezifische Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin handle. Dagegen teilten *Kraus*, *Löwenstein* und *Bäcker* in ihren früheren Arbeiten und neulich *Takeda* mit, dass die Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinserum hauptsächlich von dem Eiweiss im Nährboden her stammt, wenn sich auch die beiden an der Präzipitation etwas beteiligen. Auch *Zingher* teilte mit, dass die Ausflockungsreaktion wahrscheinlich ein spezifisch bakterielles Präzipitationsphänomen sei. Um diese Frage zu entscheiden, habe ich folgenden Versuch angestellt.

Versuch 1. Über Antigenität unserer Tetanustoxinlösung: Wenn in meinem zum Experimente verwandten Tetanustoxin irgend ein anderer Antigenstoff enthalten ist, so muss sich dieser auch an der Präzipitinreaktion zwischen Toxin und Antitoxinserum beteiligen. Wenn man auf Grund der Herstellungsweise des Tetanustoxins überlegt, welcher Stoff ausser dem Toxin selbst eine Antigenität bieten kann, so stösst man auf den Nährbodenstoff oder das Bakterieneiweiss. Um die Frage zu lösen, ob das benützte Toxin eine solche Substanz enthalte, habe ich Antipferdeserum von Kaninchen (20,000 Titer nach *Uhlenhuth*-scher Methode), Antirinderserum von Kaninchen (400,000 Titer nach *Uhlenhuth*-scher Methode) und Antitetanusbazillenserum von Kaninchen hergestellt und die Antigenität meiner Toxinlösung mittels Präzipitinreaktion geprüft. Die Resultate sind die folgenden:

Tabelle 12.

Arten d. Immunserums	Toxinverdünnung							
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1,600	1 : 3,200	1 : 6,400	1 : 12,800
Antipferdeserum	—	—	—	—	—	—	—	—
Antirinderserum	—	—	—	—	—	—	—	—
Antitetanusbazillen- serum	###	###	###	###	###	++	±	—

Aus diesem Versuche konnte ich schliessen, dass bei meiner Toxinlösung in der Antigenitätsfrage der Nährbodenstoff zuerst ausgeschlossen werden könnte. Dagegen reagiert das Antibazillenpräzipitin mit Toxinlösung stark; daher muss man umgekehrt über Antitetanus-toxin wieder diese Beziehung genau untersuchen. Der Eiweissgehalt dieses Bazillenextraktes entspricht in unverdünnter Lösung ungefähr dem Verhältnis 1 : 800, aus Serumeiweiss berechnet.

Versuch 2. Über die Antikörperarten im Antitetanus-toxinserum: Um die Antigenität des Toxins umgekehrt aus Antitoxinserum zu gewinnen, habe ich mit Antitetanus-toxinserum von Kaninchen verschiedenerlei Bouillonstoffe oder Bakterienextrakte zur Anwendung

gebracht, weil so manche Stoffe, die durch den Antigenversuch nicht nachweisbar sind, sich oft durch Immunkörperbildung finden lassen. Ich habe über Antitoxinserum von Kaninchen Bouillon, Rinderserum, Pferdeserum, *Liebigs* Fleischextrakt, Peptonlösung und Tetanusbazilleneextrakt überschichtet und die Präzipitinreaktion genau beobachtet.

Tabelle 13.

Art. d. Antig.	Antigenverdünnung									
	1:1	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000
Rinderserum	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pferdeserum	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liebigs Fleischextrakt	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
Bouillon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptonlösung	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetanusbazilleneextrakt	###	###	###	++	+	-	-	-	-	-

Aus den oben angeführten Versuchen 1 und 2 geht hervor, dass an der Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinserum auch das Bazilleneiweiss beteiligt ist. Diese Präzipitinbildung durch Bazilleneiweiss kann man auch mit dem Antitoxinserum von Pferden, wie es im Handel erhältlich ist, nachweisen (Tabelle 14).

Tabelle 14.

Antigenarten Serumarten	Toxin			Tetanusbazilleneextrakt		
	T. n. U'scher M.	T. n. Verd. M.	Toxinver- dünnung	T. n. U'scher M.	T. n. Verd. M.	Extrakt- verd.
Antitoxin- pferdeserum 1	1:250	1:8	1:100	1:2	1:2	1:1
" 2	unklar					
" 3	1:100	1:4	1:100	1:1	1:1	1:1
" 4	1:500	1:16	1:100	1:4	1:8	1:1
" 5	1:250	1:16	1:100	1:2	1:4	1:1

Wenn man den Präzipitintiter beobachtet, ist die Feststellung von Interesse, dass das Antitetanustoxinserum von Kaninchen sowohl mit Toxinlösung als auch mit Bazilleneextrakt in gleicher Verdünnung in geeigneter Antigenverdünnung gleich reagiert (Tabelle 15). Jedoch ist in der Lösung beider vom Eiweissgehalt aus die Bindungszone nicht gleich.

Tabelle 15.

Antitoxinserum v. Kaninchen	Bazillenextrakt						
	1:2.5	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250
1:1	###	###	###	###	++	+	-
1:10	###	###	###	++	/	/	/
1:50	###	##	##	+	/	/	/
1:100	##	##	++	+	/	/	/
1:250	-	+	±	-	/	/	/
1:500	-	-	-	-	/	/	/

E. Über die Beziehungen zwischen der Toxität und der Präzipitinogenität des Toxins (Physikalische und chemische Einwirkung auf Toxin).

Versuch 1. Infolge der Toxinherstellungsweise besteht bei verschiedenen Toxinarten oft kein Parallelismus zwischen Toxität und Präzipitinogenität. Ich habe nun aus einer Tetanusbouillonkultur eine schwache Toxinlösung hergestellt (B. Toxin) und diese mit meinem vorigen Toxin (A. Toxin) verglichen. Das Verhältnis der beiden zueinander ist wie folgt:

Tabelle 16.

Arten d. Toxins	D. L. M.	Präzipitinogenität (T. n. U'scher M.)
A. Toxin	0.000001	1:5,000
B. Toxin	0.05	1:40

Versuch 2. Wie aus Tabelle 16 ersichtlich, besteht bei Toxinarten keine innige Beziehung zwischen Toxität und Präzipitinogenität. Dann habe ich die physikalische Einwirkung auf Toxin durch Wärmewirkung genau untersucht und die Antigenitätsveränderung geprüft. Dabei habe ich diese Wirkung auf den Bakterienextrakt gleich mituntersucht, weil nach den früheren Untersuchungen die Präzipitinogenität des Toxins immer der Antigenität des Bakterieneiweisses nahesteht.

Drittens habe ich die Zustandsänderung des Serumeiweisses durch Hitzewirkung als Kontrolle beobachtet. Als ich das erhitzte Toxin und den Tetanusextrakt auf Antitetanustoxinserum und das erhitzte Rinderserum auf Antirinderserum überschichtete, zeigte sich der Titer nach Uhlenhuthscher Methode wie folgt:

Tabelle 17.  
a. Versuch mit Toxin.

Einwirkungsgrad		Toxinverdünnung					Toxität (D.L.M.)
Temperatur	Dauer	1 : 500	1 : 1,000	1 : 2,500	1 : 5,000	1 : 10,000	
70°C	1 Stunde	###	##	+	+	—	0.01 (belebt)
80°C	1 Stunde	###	##	+	±	—	0.01 (belebt)
100°C	15 Minut.	###	##	+	+	—	0.01 (belebt)
nicht erhitztes Toxin		###	##	+	+	—	0.000001

b. Versuch mit Bakterienextrakt.

Einwirkungsgrad		Verdünnung des Bakterienextraktes						
Temperatur	Dauer	1 : 5	1 : 10	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500
70°C	1 Stunde	###	###	###	##	+	+	—
80°C	1 Stunde	###	###	##	##	+	+	—
100°C	15 Minut.	###	###	##	##	+	+	—
nicht erhitzter Extrakt		###	###	###	##	##	+	—

c. Versuch mit Rinderserum.

Einwirkungsgrad		Verdünnung des Rinderserums											
Temperatur	Dauer	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000	50,000	100,000	200,000
60°C	1 Stunde	###	###	###	###	###	###	###	###	##	##	+	—
70°C	1 Stunde	###	###	###	###	###	###	##	##	+	—	—	—
80°C	1 Stunde	###	###	###	##	+	—	—	—	—	—	—	—
100°C	15 Minut.	###	##	##	+	—	—	—	—	—	—	—	—
nicht erhitztes Serum		###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	##	##

In Bezug auf die Thermostabilität des Antigens wiesen in unserem Institute schon *Sunouchi*<sup>44)</sup> und *Haku*<sup>45)</sup> an ihren Experimenten nach, dass Bakterieneiweiss durch Einwirkung von Wärme fast keine Veränderung erleidet, während Serumeiweiss dagegen sehr empfindlich ist. Bei meinen Versuchen verhielt es sich ebenso.

Aus obiger Tabelle erhellt sofort, dass die Wärme auf das Serumeiweiss einen grossen Einfluss ausübte, während sie auf die Toxinlösung und das Bakterieneiweiss hinsichtlich der Präzipitogenität fast keine merkliche Wirkung hatte. Besonders blieb die Präzipitogenität der Toxinlösung fast unverändert, wenn auch ihre Toxität völlig verloren ging. In diesem Punkte stehen meine Ergebnisse zum Berichte von *Hoën* u. a.<sup>23)</sup> im vollem Widerspruche. In Bezug auf die Thermostabilität verhielt sich die Toxinlösung ebenso wie das Bakterieneiweiss.

Versuch 3. Über die Präzipitinogenität des mit Formalin behandelten Toxins: Nach *Ramon* behält das durch Formalin entgiftete Toxin seine Präzipitinogenität immer weiter bei. Dagegen behaupten *Hoer* u. a., dass die Präzipitinogenität des Toxins mit der Toxität parallel abnimmt. Es scheint mir, dass diese Differenz der Untersuchungsmethode des Präzipitinwertes zuzuschreiben ist.

Ich habe meine Untersuchung mit Tetanustoxin, Tetanus- und Kolibazillenextrakt sowie Rinderserum angestellt, wobei die Antigene durch Formalin bis zu 0.5% Gehalt zugesetzt und für 6 Tage lang in den Brutschrank auf 48°C gebracht wurden. Die Resultate sind aus Tabelle 18 ersichtlich.

Tabelle 18.

## a. Versuch mit durch Formalin behandeltem Tetanustoxin.

Antigenarten	Antigenverdünnung						Toxität (D.L.M.)
	1:100	1:500	1:1,000	1:2,500	1:5,000	1:10,000	
nicht behandeltes Toxin	###	###	##	+	+	-	0.000001
Formalintoxin	###	##	##	+	-	-	0.01 (belebt)

## b. Versuch mit durch Formalin behandeltem Tetanusbazillenextrakt.

Antigenarten	Antigenverdünnung						
	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500
nicht behandelter Extrakt	###	###	###	++	+	+	-
Formalinextrakt	###	###	##	++	+	-	-

## c. Versuch mit durch Formalin behandeltem Kolibazillenextrakt.

Antigenarten	Antigenverdünnung						
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
nicht behandelter Extrakt	###	###	###	###	++	+	-
Formalinextrakt	###	###	##	++	+	-	-

## d. Versuch mit durch Formalin behandeltem Rinderserum.

Antigen- arten	Antigenverdünnung							
	1 : 1,000	1 : 2,500	1 : 5,000	1 : 10,000	1 : 25,000	1 : 50,000	1 : 100,000	1 : 200,000
nicht be- handeltes Serum	###	###	###	###	###	###	##	—
Formalin- serum	###	###	###	###	###	##	—	—

Wenn man das Bakterien- und Serumeiweiss oder Toxin mit Formalin behandelt, so nimmt die Präzipitinogenität mehr oder weniger ab, und die Veränderung der Antigenität ist bei diesen 3 Antigenarten fast gleich. Hinsichtlich der Toxitätsfrage gibt es keinen Parallelismus zwischen Toxität und Präzipitinogenität in den behandelten Toxinen und genuinen Toxinen.

Versuch 4. Der Adsorptionsversuch durch Kohle: Betreffs der Präzipitinogenität und Toxität des Toxins wurde aus einem Adsorptionsversuche mit Kohl ein interessanter Versuch nach *Takeda*<sup>29)</sup> beim Diphtherieversuche abgeleitet, bei dem die Toxität der Toxinlösung durch Kohlenadsorption stark vermindert wurde, die Präzipitinogenität dagegen unverändert blieb. Ich habe auch die Tetanustoxinlösung mit Tierkohle gemischt und 2 Stunden lang geschüttelt. Dies Gemisch wurde durch Papierfilter abfiltriert und das Filtrat auf die Toxität und Präzipitinogenität untersucht. Die Ergebnisse sind die folgenden:

Tabelle 19.

Antigen- arten	Antigenverdünnung								Toxität (D.L.M.)
	1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500	1 : 1,000	1 : 2,500	1 : 5,000	1 : 10,000	
vor der Adsorption	###	###	###	###	##	+	+	—	0.000001
nach der Adsorption	###	###	###	###	##	+	±	—	0.01 (belebt)

Das Resultat stimmt mit dem Berichte von *Takeda* völlig überein, indem die Präzipitinogenität der Toxinlösung unverändert bleibt, die Toxität des Filtrates wie bei Hitzeeinfluss oder Formalinwirkung dagegen stark vermindert wird.

Versuch 5. Passive Anaphylaxie: Aus obigen Versuche geht hervor, dass bei der Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinserum das im Toxin enthaltene Bakterieneiweiss eine grosse Rolle spielt. Die gleiche Tatsache ist auch mit Berücksichtigung der passiven Anaphylaxie nachweisbar (s. Tabelle 20).

Wenn man also einem Meerschweinchen, das vorher mit einem Antitetanustoxinserum sensibilisiert worden ist, nach 24 stündiger Inkubation Toxin oder Bakterienextrakt von Tetanus reinjiziert, so reagiert das Tier mit starker Anaphylaxie. Ich habe auch etwas verminderte anaphylaktische Symptome beobachtet, wenn das Tier durch Antibazillenserum von Tetanus sensibilisiert und die Toxinlösung reinjiziert wurde.

Tabelle 20.

Nr.	Serum für Sensibilisierung		Tier K. G.	Antigen		Symptome	Resultate
	Arten	Menge		Arten	Menge		
1	/	/	230 g	Toxin	3 cc (1:100)	keine Symptome	—
2	/	/	220 g	Extrakt	4 cc	keine Symptome	—
3	Antitoxinserum	2 cc	230 g	Toxin	1.7 cc (1:100)	Sträuben der Haare, Niesen, Temp. abstieg 4.6°C, Atemfrequenz,	++
4	Antitoxinserum	3 cc	250 g	Toxin	1.8 cc (1:100)	Starker Krampf, Niesen, Temp. abstieg 7.2°C	+++
5	Antitoxinserum	3 cc	240 g	Extrakt	3.8 cc	Sträuben der Haare, Krätzen der Nase, Niesen, leichter Krampf, Temp. abstieg 5.7°C	++
6	Antitetanus- bazillenserum	3 cc	250 g	Toxin	2 cc (1:100)	Sträuben der Haare, Krätzen der Nase, Niesen, Temp. abstieg 3.5°C	++
7	Antitetanus- bazillenserum	3 cc	230 g	Toxin	3 cc (1:100)	Unruhe, Sträuben der Haare, Atemfrequenz, Temp. abstieg 2°C	+

Präzipitintiter des Antitoxinserums 1 : 50.

Präzipitintiter des Antitetanusserums 1 : 40.

+, schwache ++, mittelmässige +++ , starke anaphylaktische Symptome.

#### 4. Zusammenfassung.

Wenn die Präzipitation bei Bindung zwischen Toxin und Antitoxin spezifisch im engeren Sinne, wie *Ramon*, *Hoën*, *Zippe* und *Tschertkow* u. a. behaupten, hervorgerufen wird, so ergeben sich aus obigen Versuchsreihen viele Tatsachen, die dem widersprechen.

Erstens ist dieses Präzipitinphänomen nicht lediglich eine Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin, wie es *Ramon* u. a. mit Prozon-

phänomen verteidigen, weil mit Serumpräzipitin oder Bakterienpräzipitin dieselbe Reaktion gezeitigt werden kann, wenn man die Immunisierungsweise und Verdünnungsweise der Antigene und des Immunserrums möglichst unter denselben Bedingungen vornimmt. Um die nämlichen Phänomene mit gewöhnlichem Präzipitin deutlich nachzuprüfen, muss man mit stark hochimmunisiertem Präzipitins serum in grossem Umfange die Reaktion in so weit verdünntem Antigen und Antikörper beobachten, dass man bei beiden die Hemmung am schwach verdünnten Teile erkennen kann.

Zweitens möchte ich die Reinheit der Toxinlösungen serologisch diskutieren. Von der Antigenität für Präzipitinbildung aus gesehen, enthält die Toxinlösung eine geringe Menge von Bakterieneiweiss, die durch Antibakterienimmuns serum mittels Präzipitinreaktion nachweisbar ist, wenn auch bei meinem Versuche der Bouillonstoff ganz ausgeschlossen werden kann. Umgekehrt, wenn man mit verschiedenen Antitoxinseren mittels Präzipitinreaktion oder Komplementbindung zwischen Toxin oder Bakterienextrakt arbeitet, so reagieren diese Antitoxine mit beiden Antigenen immer positiv. Auf Grund dieser Tatsache darf man annehmen, dass das Bakterieneiweiss an der Präzipitinreaktion zwischen Toxin und Antitoxin stets mitbeteiligt ist.

Drittens will ich Präzipitinwert und Antitoxinwert kurz vergleichen. Wenn man ideal reine Toxine als Antigene benützt oder solche, die sehr wenig Bakterieneiweiss enthalten, so könnte der Parallelismus zwischen Antitoxinwert und Präzipitinwert irgend einen näheren Zusammenhang haben. Doch um diese quantitativen Beziehungen festzustellen, muss man Präzipitinbildung durch Bakterien und Toxin selbst scharf differenzieren oder mit einwandfreiem Toxin, das mit Antibakterienpräzipitin nachweislich keine Reaktion zeigt, die Präzipitinreaktion nachweisen. Bei meinem Versuche zeigen beide Werte in einigen Fällen Parallelismus, aber in vielen Fällen eine grosse Abweichung.

Viertens möchte ich über Resistenz der Toxinlösung gegen physikalische oder chemische Einwirkung auf Toxizität und auf Präzipitino-genität einiges hinzufügen. Gegen äussere Einwirkung ist, wie schon bekannt, die Toxizität sehr labil, die Präzipitino-genität dagegen sehr stabil. In dieser letzteren Hinsicht ist die Präzipitino-genität der Toxinlösung noch resistenter als Serumantigene und steht den Bakterienantigenen näher. Und diese Beziehungen sind denen aus passiver Anaphylaxie gleich, weil das durch Antitoxins serum (Präzipitintiter 1:50) sensibilisierte Tier auf Reinjektion von Toxin oder Bazillenextrakt nach 24 stündiger Inkubation auch mit denselben Symptomen der Anaphylaxie reagiert wie beim Präzipitinversuche. Aus Antitetanusseren kann ich auch etwas verminderte Symptome bei Toxinreinjektion nachweisen.

### Schluss.

Aus meinen Experimenten möchte ich folgende Schlüsse ziehen:

1. Durch Tetanustoxin kann man auch das Präzipitinphänomen bei Bindung zwischen Toxin und Antitoxin nachweisen.
2. Die Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinserum ist nicht eine spezifische Reaktion, sondern man kann mit Serumpräzipitin oder Bakterienpräzipitin dasselbe Phänomen darstellen.
3. Das *Ramonsche* Phänomen ist nichts anderes als die Prozonenerrscheinung bei der Präzipitinreaktion, und dieses Phänomen ist auch durch Komplementbindung gleich nachweisbar.
4. Um die Neutralisierungsfrage mit Präzipitinreaktion zu klären, muss man erst die Reinheit des Toxins bestimmen, weil dabei eine Präzipitinbildung aus dem Nährboden oder aus dem Bakterieneiweiss möglich ist.
5. Das Bakterienweiss spielt bei der Antitoxinpräzipitation eine grosse Rolle.
6. Was die Resistenz gegen äussere Einwirkung anbetrifft, so ist Toxin sehr labil, Präzipitino-gen in Toxinlösung dagegen viel stabiler.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. Dr. *M. Ogata* herzlichst danken für seine ebenso wertvolle wie freundliche Anleitung und seine liebenswürdige Unterstützung bei meiner Arbeit.

### Literatur.

- <sup>1</sup> *Calmette* und *Massol*, Ann. de L'inst. Past., T. 23, p. 155, 1909. — <sup>2</sup> *Nicolle*, *Césari* u. *Débains*, Ann. de L'inst. Past., T. 34, p. 596, 1920. — <sup>3</sup> *Georgi*, Med. Klin., Nr. 41, S. 1061, 1920. — <sup>4</sup> *Ramon*, Compt. r. Soc. Biol., T. 86, p. 661, 1922. — <sup>5</sup> *ebenda*, Compt. r. Soc. Biol., T. 89, p. 2, 1923. — <sup>6</sup> *ebenda*, Compt. r. Soc. Biol., T. 88, p. 167, 1923. — <sup>7</sup> *ebenda*, Ann. de L'inst. Past., T. 38, p. 1, 1924. — <sup>8</sup> *Renaux*, Compt. r. Soc. Biol., T. 89, p. 92, 1923. — <sup>9</sup> *ebenda*, Compt. r. Soc. Biol., T. 90, p. 968, 1924. — <sup>10</sup> *S. Schmidt*, Compt. r. Soc. Biol., T. 88, p. 105, 1923. — <sup>11</sup> *Scholz*, Centralbl. f. Bakt., Bd., 91, S. 72, 1924. — <sup>12</sup> *Glenny* u. *Okell*, Journal of Path. u. Bakt., Vol. 27, p. 187, 1924, & Vol. 28, P. 464, 1925. — <sup>13</sup> *Bayne-John*, *Stanhope*, Journal of Immunol. Vol. 9, p. 481, 1924. — <sup>14</sup> *Povitsky* und *Banzhaf*, Proc. Soc. f. exper. Biol. & med., Vol. 22, p. 11, 1924. — <sup>15</sup> *Meguro*, Ijikorom, No. 653-654, 1925 (Tsuishō, 14 Nen) (Japanisch). — <sup>16</sup> *Kraus*, *Löwenstein* u. *Bäcker*, Wiener Klin. Wochenschr., S. 561, 1924. — <sup>17</sup> *Moloney* u. *Weld*, Journal of Path. & Bakt., Vol. 28, p. 655, 1925. — <sup>18</sup> *Zingher*, Proc. Soc. f. exper. Biol. & Med., Vol. 22, p. 454, 1925. — <sup>19</sup> *Hartley*, The British Journal of exper. Path., Vol. 6, p. 112, 1925. — <sup>20</sup> *Hoen*, *Zippe* u. *Tschertkow*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 45, S. 387, 1925. — <sup>21</sup> *Hoen*, *Zippe* u. *Tschertkow*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 47, S. 277, 1926. — <sup>22</sup> *Hoen*, *Zippe* u. *Tschertkow*, ebenda, Bd. 48, S. 191, 1926. — <sup>23</sup> *Hoen*, *Zippe* u. *Tschertkow*, ebenda, Bd. 51, S. 53, 1927. — <sup>24</sup> *Hoen*, *Zippe* u. *Tschertkow*

ebenda, Bd. 55, S. 149, 1928. — <sup>25</sup> *Hoën, Zippe u. Tschertkow*, ebenda, Bd. 58, S. 143, 1928. — <sup>26</sup> *Hoën, Zippe u. Tschertkow*, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 108, S. 61, 1928. — <sup>27</sup> *Hoën, Grünfeld u. Tschertkow*, Centralbl. f. Bakt., Bd. 107, S. 459, 1928. — <sup>28</sup> *Iwanoff*, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 107, S. 225, 1927. — <sup>29</sup> *Takeda*, Jikken Igaku Zasshi, Bd. 12, p. 163, 1928 (Shōwa 3 Nen) (Japanisch). — <sup>30</sup> *Bessemans, Pother et Dekess*, Compt. r. Soc. Biol., No. 25, p. 743, 1927. — <sup>31</sup> *Bronfenbrenner u. Reichert*, Proc. Soc. f. exper. Biol. & Med., Vol. 22, p. 391, 1925. — <sup>32</sup> *Scholz*, Centralbl. f. Bakt., Bd. 92, S. 434, 1924. — <sup>33</sup> *Abt et Erber*, Ann. de L'inst. Past., T. 40, p. 659, 1926. — <sup>34</sup> *S. Schmidt*, ebenda, T. 42, p. 63, 1928. — <sup>35</sup> *D. Kalic*, Compt. r. Soc. Biol., T. 98, p. 649, 1928. — <sup>36</sup> *Haku*, Arb. aus der med. Universität Okayama, Bd. 1, H. 2, S. 246, 1929. — <sup>37</sup> *Ogata*, Kongressberichte der hyg., mikrobiol. u. parasitol. Generalversammlung. 1927. — <sup>38</sup> *Sunouchi*, Arb. aus der med. Universität Okayama, Bd. 1, H. 1, S. 1, 1928. — <sup>39</sup> *Makino*, Okayama Igakkai Zasshi, Nr. 484, S. 989, u. Nr. 485, S. 1338, 1930. — <sup>40</sup> *Sasaki*, Arb. aus der med. Universität Okayama, Bd. 1, H. 4, S. 550, 1930, u. Okayama Igakkai Zasshi, Nr. 484, S. 1238, 1930. — <sup>41</sup> *Suginoto*, Arb. aus der med. Universität Okayama, Bd. 2, H. 2, S. 584, 1930. — <sup>42</sup> *Friedlander, Sobotka u. Banzhaf*, The Journal of exper. Med., Vol. 47, No. 1, p. 57-79, 1928. — <sup>43</sup> *Kageyama*, Okayama Igakkai Zasshi, Nr. 469, S. 392, 1929. — <sup>44</sup> *Sunouchi*, ebenda, Nr. 474, S. 1533, 1929. — <sup>45</sup> *Haku*, ebenda, Nr. 468, S. 66, 1929. — <sup>46</sup> *H. Schmidt*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 48, S. 217, 1926.

---