

Acta Medica Okayama

Volume 3, Issue 2

1932

Article 8

AUGUST 1932

Studien über die Bindungs- und Hemmungszone in der Immun- und Kolloidreaktion.

Kazuyoshi Ohtahara*

*Okayama University,

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

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

Studien über die Bindungs- und Hemmungszone in der Immun- und Kolloidreaktion.

Von

Kazuyoshi Ohtahara.

Eingegangen am 22. Februar 1932.

Einleitung.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, dass bei verschiedenen Immunreaktionen, namentlich sofern es sich um die Agglutination, Präzipitation, Komplementbindungsreaktion und Hämolyse handelt, das Phänomen der Bindung und Bindungshemmung zwischen dem Immunogen und dem Immunkörper vorhanden ist. Diese Erscheinung, besonders die der Ringpräzipitation, hat im Jahre 1927 Prof. M. Ogata¹⁾ schon hervorgehoben. Er hat eine Methode für den Nachweis der Präzipitation mittels der Immunkörperverdünnung gefunden und mit dieser nachgewiesen, dass der Antikörper mit dem Antigen in einer gewissen Verdünnung d. h. in einer geeigneten Antigenverdünnung am stärksten reagiert. Er nannte diese geeignete Antigenmenge für Antikörper die Bindungszone. Diese Bindungszone ist sowohl durch Präzipitinreaktion als auch durch Komplementbindungsreaktion in gleicher Weise nachweisbar. Bei diesen Reaktionen kann man auch eine negative Reaktion (Hemmungszone) im Antigen- und Immunserumteil beobachten, bei der bei geeignetem Mengeverhältnis wieder eine positive Reaktion erzeugt wird (Siehe Tabelle 1, 2 und 3).

Das unten angeführte Immunserum wurde mit 1% Gummiarabicum oder 10% Meerschweinchenserum absteigend verdünnt und auf die Immunserumverdünnung wurden die gleicherweise mit 0.85% Kochsalzlösung verdünnten Antigene vorsichtig überschichtet. Die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur je nach 1/4, 1/2, 1 und 2 Stunden abgelesen.

Wie man aus Tabelle 1, 2 und 3 ersieht, treten bei einer bestimmten Verdünnung des Antigens und des Antikörpers eine Bindungszone und eine Bindungshemmung auf. Wie oben zu sehen, reagiert dieses Antirinderserum am stärksten mit der Antigenver-

Tabelle 1. Präzipitinreaktion nach Ogatascher
Immunkörperverdünnungsmethode.

Immuns serum Nr. 1.

Antigen- verdünnung	Antikörperverdünnung											
	1	10	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000
1: 25												
1: 50												
1: 100												
1: 250												
1: 500												
1: 1,000												
1: 2,500												
1: 5,000												
1: 10,000												
1: 25,000												
1: 50,000												
1: 100,000												
1: 250,000												

Antigen.....Rinderserum.

AntikörperAntirinderkaninchenimmuns serum.

B.Z. bedeutet: Bindungszone.

P.Z. „ : Prozone.

||| bedeutet: Positive Reaktion innerhalb 1/4 Stunde.

|| „ : „ „ 1/2 Stunde.

|| „ : „ „ 1 Stunde.

+ „ : „ „ 2 Stunden.

Tabelle 2. Präzipitinreaktion nach Ogatascher
Immunkörperverdünnungsmethode.

Immuns serum Nr. 2.

Antigen- verdünnung	Antikörperverdünnung									
	1	25	5	10	25	50	100	250	500	1,000
1: 25										
1: 50										
1: 100										
1: 250										
1: 500										
1: 1,000										
1: 2,500										
1: 5,000										
1: 10,000										
1: 25,000										
1: 50,000										
1: 100,000										

Antigen.....Rinderserum.

AntikörperAntirinderkaninchenimmuns serum.

Tabelle 3. Komplementbindungsreaktion nach Ogatascher Verdünnungsmethode.

Immunserum Nr. 2.

Antigen- verdünnung	Antikörperverdünnung								
	1: 25	1: 5	1: 10	1: 25	1: 50	1: 100	1: 250	1: 500	1: 1,000
1: 100	≡	≡	≡	≡	≡	++	—	—	—
1: 250	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	—	—
1: 500	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	—	—
1: 1,000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	—	—
1: 2,500	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	—
1: 5,000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	—
1: 10,000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	++ B.Z.	—
1: 25,000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—
1: 50,000	+	++	≡	≡	≡	≡	≡	+	—
1: 100,000	—	— P.Z.	+	++	++	++	+	—	—
1: 250,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Antigen.....Rinderserum.

AntikörperAntirinderkaninchenimmunserum.

≡ bedeutet: Komplette Hemmung.

≡ „ : Fast komplette Hemmung.

++ „ : Grosse Kuppe.

+ „ : Kleine Kuppe.

— „ : Komplette Hämolyse.

dünnung 1:5,000–10,000 (Bindungszone), und der Titer des verdünnten Präzipitins zeigt dabei 1:500. Bei der Verdünnung des Immunserums 1:250 sieht man die hemmende Wirkung der Antigene (1:25, 50, 100–500) deutlich. Bei den hohen Antigenverdünnungen 1:10,000–50,000 wurde die Reaktion bei grosser Immunkörpermenge gehemmt; gerade bei der Antigenverdünnung 1:50,000 wurde in der schwachen Verdünnung des Immunserums 1:25 eine deutliche Hemmung beobachtet. Die Resultate der Komplementbindungsreaktion stimmen mit denen der Ringprobe des Präzipitations beinahe überein, nur geht die Bindungszone und Prozone noch in den verdünnten Antigenteil über.

Vorläufig möchte ich aus obigen Versuchen die Folgerung ziehen, dass die Reaktionen zwischen Antikörper und Antigene zueinander in einem bestimmten Mengenverhältnisse stehen und in geeigneten Mengen die Reaktionen bis zum höchsten Verdünnungsgrad erkennbar sind. Wenn bei hochgradiger Antigenverdünnung der Antikörper,

oder umgekehrt, wenn bei hochgradiger Antikörperverschüttung das Antigen konzentriert ist, so sind Hemmungserscheinungen zu beobachten.

Diese Hemmungserscheinungen sind noch weiter nachweisbar an dem Phänomen der Präzipitation zwischen Toxin und Antitoxinmischung. Im Jahre 1922 veröffentlichte *Ramon*²⁾ eine Bestimmungsmethode des Diphtherieserums in vitro. Als er 20 cc Prüfungstoxin mit Antitoxinserum von verschiedenen Konzentrationen im Reagenzglas mischte, bemerkte er eine Trübung oder einen flockigen Niederschlag bei einem geeigneten Verhältnis des Toxins zum Antitoxin, und neben dieser deutlichen Flockenbildung, die sich in bestimmten Konzentrationen gezeigt hatte, stellte er ausserdem eine verminderte Präzipitinbildung, ja sogar das Ausbleiben einer Flockenbildung fest. Er beobachtete auch, dass in dieser Konzentration Toxin und Antitoxin vollkommen neutralisiert wurden. *T. Inoue*³⁾ hat im Jahre 1931 diese Zusammenhänge zwischen dem Tetanustoxin und dem Antitetanustoxin genau studiert und in den Arbeiten aus der Med. Universität Okayama (Bd. 2, Heft 3) eine Mitteilung darüber gemacht. Er kam zu dem Schluss, dass das *Ramonsche* Phänomen nichts anderes ist als die Prozoneerscheinung bei der Präzipitinreaktion. Dieses Phänomen ist auch durch Komplementbindungsreaktion in gleicher Weise nachweisbar.

Dieselben Erscheinungen zeigen sich auch bei der passiven Anaphylaxiereaktion. *S. Kuwana*⁴⁾ hat im Jahre 1931 hervorgehoben, dass die geeignetste Antigenmenge, mit der man bei aktiv oder passiv immunisierten Kaninchen starke Anaphylaxie erzeugen kann, eine der Bindungszone entsprechende Dosis ist (*Sunouchi*⁵⁾, *Haku*⁶⁾). Wenn beim Versuche über passive Anaphylaxie am Kaninchen (Blutdruckmessung), das minimal sensibilisiert wurde, eine zu grosse Menge des Antigens reinjiziert wird, so wird die Reaktion umgekehrt gehemmt.

Grosse Analogien zu den Hemmungserscheinungen der Immunreaktion zeigte auch die Kolloidreaktion. Von besonderer Wichtigkeit für die Immunitätslehre ist auch die gegenseitige Beeinflussung der Kolloide. Es ist durch genaue Untersuchungen bereits festgestellt worden, dass gegenseitige Fällung von entgegengesetzt geladenen Kolloidstoffen das Fällungsoptimum zeigt.

Schon *Graham*⁷⁾ war es bekannt, dass Mischungen mancher Hydrosole zu Niederschlagbildungen führen. Bereits im Jahre 1899 wurde durch *Bordet*⁸⁾ die grosse Analogie hervorgehoben, welche das Phänomen der Agglutination mit der Ausflockung von Ton-, Kaolin-, etc., Partikeln durch Salze zeigt. In späterer Zeit wurde diese Erscheinung wiederholt beschrieben (*Linder* u. *Picton*⁹⁾, *Lottermoser*¹⁰⁾ u. *Hardy*¹¹⁾). Eingehendere Versuche über die gegenseitige Fällung von entgegengesetzt geladenen Kolloiden verdanken wir *Biltz*¹²⁾. Er konnte die Beobachtung machen, dass nur elektrisch entgegengesetzt geladene Kolloide miteinander unter Niederschlagbildung reagieren. Für die Fällung war ein bestimmtes Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten erforderlich. Bei Überschuss von dem einen oder anderen Kolloid bleibt die Fällung aus. Er konnte auch die Mengenverhältnisse, mit denen die Kolloide in Reaktion treten, feststellen und fand eine variable Proportion, wie sie zwischen adsorbierendem Material und adsorbierter Substanz zu finden ist. Bei der Reaktion zweier verschieden geladener Kolloide hängen die Eigenschaften der Reaktionsprodukte von den verwandten Mengen der Ausgangsprodukte ab. Das Reak-

tionsprodukt besitzt gewissermassen die algebraische Summe der Eigenschaften der Reaktionskomponenten nach ihren Mengenverhältnissen. Da die Reaktionskomponenten entgegengesetzte Ladung besitzen, so muss das Reaktionsprodukt das Vorzeichen des überschüssigen Kolloids führen. Bei bestimmten Mengenverhältnissen muss es zur elektrischen Neutralisation kommen, was wiederum unter sonst günstigen Versuchsbedingungen zur Ausflockung des Reaktionsproduktes führen kann.

Die hier dargelegten Vorstellungen über den beim Zusammenbringen zweier Kolloide stattfindenden Reaktionsmechanismus erleichtern das Verständnis des Verhältnisses der Einwirkung von Elektrolyten auf denselben, die im Experiment und Organismus eine grosse Rolle spielen und besonders für die Immunreaktionen von besonderer Bedeutung sind. Nach den Beobachtungen von *Biltz*¹²⁾¹³⁾, *Neisser* u. *Friedemann*¹⁴⁾, *Bechhold*¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ *Porges*²⁰⁾, begünstigen in dieser Weise Elektrolyte die gegenseitige Fällung von Kolloiden.

Die Erscheinungen der Ausflockungs- und Hemmungszone in der Kolloidreaktion sind von zahlreichen Autoren beobachtet und erörtert worden. Von den Forschern, welche die wichtigsten Arbeiten in dieser Richtung ausgeführt haben, seien hier *Bechhold*, *Biltz*, *Neisser* u. *Friedemann*, *Buxton* u. *Schaffer*²¹⁾ und *Oscar Teague* u. *Buxton*²²⁾²³⁾²⁴⁾ erwähnt. Von diesen Autoren sind verschiedene Versuche unternommen worden, in der Hoffnung, etwas mehr Licht auf die physikalische Seite der interessanten Frage der Hemmung der Agglutination zu werfen und den Grad der Ähnlichkeit zwischen der Agglutination von Bakterien und der Fällung unorganischer Suspensionen zu bestimmen, ohne dass eine befriedigende Erklärung für ihr Auftreten gegeben worden wäre.

Im Jahre 1931 hat *N. Sugimoto*²⁵⁾ über die Präzipitation zwischen Mastix und Aluminiumsulfat in den Arbeiten aus der Med. Universität Okayama (Bd. 2, Heft 2) einige Mitteilungen gemacht und die Hemmungserscheinungen in der Kolloidreaktion nachgewiesen. Er kam zu dem Schluss, dass bei der Kolloidreaktion sich eine optimale Flockungszone findet, die der Bindungszone bei der immunserologischen Reaktion sehr ähnlich ist.

Zur Ergänzung dieser Beziehung der Immunreaktion und Kolloidreaktion benutzte ich die kolloidalen Farbstoffen und studierte besonders die Hemmungserscheinungen. Es ist der Zweck meiner Arbeit, die Beziehung zwischen immunserologischer Reaktion und Kolloidreaktion durch die Bindungs- und Bindungshemmungsphänomene zu untersuchen, indem ich als Kolloidreaktion die Fällung zwischen Anilinfarbstoffen anwandte. Der Farbstoff ist vorteilhafter als Suspensionen von Bakterien und ähnliche Substanzen, da wir sowohl negative wie positive Farbstoffe wählen können, und überdies beim Farbstoffversuch die Wanderung elektrischer Ladung durch Farbumschlag sofort beobachtet wird.

Experiment.

1. Die gegenseitige Ausflockung von Farbstoffen.

Die Versuche mit Farbstoffen sind hauptsächlich mit folgenden Stoffen ange-

stellt worden;

Negative Farbsäuren: Kongorot, Nigrosin und Biebricher Scharlachrot.

Positive Farbbase: Janusgrün.

Bei Mischung von Farbstoffen, die elektrisch entgegengesetzt geladen sind, wird eine Ausflockung beobachtet, die besonders stark ist in bestimmten Konzentrationen von beiden Kolloiden (Siehe „Kolloidchemie von Zsigmondy“ Teil 2, S. 188). Wenn einer der Farbstoffe im Überschuss vorhanden ist, so tritt gewöhnlich eine Vorhemmungszone für diesen Farbstoff auf, innerhalb welcher keine Ausflockung erfolgt. Die Existenz dieser Zone, d. h. die optimale Konzentration bei gegenseitiger Ausflockung von Farbstoffen wurde zuerst durch Neisser u. Friedemann festgestellt. Diese Autoren beobachten bei Eosin und Bismarckbraun eine optimale Ausflockungszone und Hemmungszone nach der Konzentration beider Farbstofflösungen.

Die Versuche über die gegenseitige Ausflockung von Janusgrün und Kongorot werden in Tabelle 4. beschrieben. Beide Farbstoffe wurden in destilliertem Wasser gelöst und je 1 cc von beiden Kolloidlösungen gemischt. Dann wurde in einer Reihe von Reagenzgläsern eine Kolloidlösung in bestimmte Konzentration gebracht und eine andere Kolloidlösung darin absteigend verdünnt. Diese Reagenzgläser werden 1 Stunde lang bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt, dann in Zimmertemperatur gesetzt und nach 24 Stunden makroskopisch beobachtet.

Tabelle 4.

Ausflockungsreaktion zwischen Janusgrün und Kongorot.

In jedem Röhrchen 1 cc von jedem Farbstoff. Die angegebene Prozentgehalte bedeuten die endgültige Konzentration von jedem Farbstoff. Beobachtung nach 24 Stunden.

1 cc→ ↓	Janusgrünkonzentration in Prozent					
	1/100		1/200		1/400	
Kongorot-konzentration in Prozent	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums
1/ 40	—	braun	—	braun	—	rötlich braun
1/ 60	—	"	—	"	—	"
1/100	—	bräunlich violett	—	bräunlich violett	—	"
1/200	≡	farblos	—	"	—	"
1/240	≡	"	—	"	—	"
1/280	≡	blassblau	—	"	—	"
1/320	++	"	—	"	—	"
1/400	++	"	+	farblos	—	blassrot
1/480	++	blau	++	"	—	"
1/560	—	"	+	blassblau	—	"
1/800	—	"	—	"	—	"

+ bedeutet: makroskopisch sichtbare geringe Ausflockung.

++ bedeutet: makroskopisch sichtbare stärkere Ausflockung.

≡ bedeutet: makroskopisch sichtbare starke Ausflockung.

— bedeutet: makroskopisch keine Ausflockung.

In Tabelle 4 sieht man eine interessante Fällungserscheinung bei der Kombination von beiden Farbstoffmengen. Auf eine ähnliche Erscheinung bei der Präzipitinreaktion habe ich ja vorher hingewiesen. Wurde mit 1/100 %igem Janusgrün absteigend verdünnt Kongorot gemischt, so machte sich nach 24 Stunden eine Flockungszone in geeigneter Kongorotmenge (1/200 – 1/480 %) deutlich bemerkbar, wobei das Gemisch in dieser Zone beinahe entfärbt wurde. Ausserhalb dieser Zone blieb die Flockenbildung sowohl im noch verdünnten als auch im konzentrierten Teil des Kongorotes negativ. Deswegen kann man diesen konzentrierten Teil als die Hemmungszone des Kongorotes auf Janusgrün betrachten. Eine Reihe von Versuchen, bei denen die Konzentration des Janusgrüns in 1/200 % verdünnt wird, verschiebt diese Flockungszone noch weiter in 1/480 %iger Lösung von Kongorot. Bei 1/400 %iger Lösung von Janusgrün kann man die Flockungszone nicht mehr beobachten.

Wir finden also bei der Reaktion von entgegengesetzt geladenen Farbstoffen das Optimum der Fällung, mit anderen Worten, es besteht eine Bindungszone und in dieser erscheint auch die Farbe des Mediums ganz oder nahezu farblos.

Die optimale Ausflockungszone zweier Farbstoffe ergibt sich aus folgenden Prozentsätzen:

Janusgrün	Kongorot	Farbe des Mediums
1/100 %	1/200 %	farblos
1/200 %	1/400 – 1/480 %	farblos

Wir finden auch, dass in Bezug auf den optimalen Ausflockungspunkt sich die beiden Farbstoffe ungefähr wie 2:1 verhalten, d. h. dass bei Mischung zweier Teile von Janusgrün und einem Teile von Kongorot vollständige Ausfällung eintritt. Wenn die Menge des Janusgrüns im Verhältnis zum Kongorot grösser wird, so verändert sich auch diese Fällungsreaktion, wie auch trotz der Flockenbildung die Farbe des Mediums bläulich bleibt, wodurch angedeutet wird, dass das überschüssige Janusgrün, d. h. der Teil, der über 2:1 hinausgeht, an der Fällung nicht mehr teilnimmt. Ausser dieser Ausflockungszone neigt sich die Farbe des Mediums nach der Eigenfarbe des überwiegenden Stoffes. Es ist auch interessant, dass man beim Querlesen dieser Tabelle findet, dass bei bestimmtem Prozentsatz des Kongorotes das Janusgrün absteigend verändert wird. Bei Mischung von 1/560 %igem Kongorot und 1/100 %igem Janusgrün tritt keine Ausflockung ein, wenn aber das Janusgrün auf 1/200 % verdünnt wird, so erfolgt Flockenbildung. Dieses Phänomen hat eine grosse Analogie mit den Prozoneerscheinungen in der Immunreaktion, wo das Janusgrün an Stelle des Immunkörpers und das Kongorot an Stelle des Antigens treten kann.

Um diese gegenseitige Fällung der Farbstoffe noch weiter zu studieren, habe ich statt Kongorot Nigrosin und Biebricher Scharlachrot nach *Teague* u. *Buxton* angewendet.

Tabelle 5.

Ausflockungsreaktion zwischen Janusgrün und Nigrosin.

In jedem Röhrchen 1 cc von jedem Farbstoff. Die angegebenen Prozentgehalte bedeuten die endgültige Konzentration. Beobachtung nach 24 Stunden.

1 cc→ ↓	Janusgrünkonzentration in Prozent						
	1/60		1/100		1/200		1/400
Nigrosin- konzentration in Prozent	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung
1/ 40	—	bläulich violett	—	violett	—	violett	—
1/ 60	—	"	—	"	—	"	—
1/ 100	+	"	—	"	—	bräunlich violett	—
1/ 200	≡	blau	++	bräunlich violett	—	"	—
1/ 240	≡	"	≡	blassblau	—	"	—
1/ 280	≡	"	≡	"	—	"	—
1/ 320	≡	"	≡	farblos	+	"	—
1/ 400	≡	"	≡	blassblau	++	"	—
1/ 480	++	"	++	"	++	farblos	—
1/ 560	++	"	++	blau	++	"	—
1/ 800	+	"	+	"	+	blassblau	—
1/1600	—	"	—	"	—	"	—

+ bedeutet: makroskopisch sichtbare geringe Ausflockung.

++ " : " " stärkere Ausflockung.

≡ " : " " starke Ausflockung.

— " : " keine Ausflockung.

Die Versuchsergebnisse, wie sie in Tabelle 5 und 6 gezeigt werden, sind analog mit denen der Tabelle 4, soweit die Feststellung eines bestimmten Optimalpunktes innerhalb der Ausflockungszone in Frage kommt, aber das Mengenverhältnis der Farbstoffe in der Optimalzone scheint drei Teile Janusgrün auf einen Teil Nigrosin und einen Teil Biebricher Scharlachrot zu betragen. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, ist die Ausflockungszone viel breiter bei gegenseitiger Ausflockung von Janusgrün und Biebricher Scharlachrot als von Janusgrün und Kongorot, doch ist die Flockenbildung beim Optimum auch etwas schwächer, weshalb die übrigbleibende Flüssigkeit relativ stark gefärbt ist. Aus diesen Tatsachen schliesse ich, dass der Grad der Ausflockung und die Breite der Ausflockungszone durch die kolloidale Natur der verwendeten Stoffe bedingt sind,

Tabelle 6. Ausflockungsreaktion zwischen Janusgrün und Biebricher Scharlachrot.

In jedem Röhrchen 1 cc von jedem Farbstoff. Angegeben ist die Endkonzentration. Beobachtung nach 24 Stunden.

1 cc→ ↓	Janusgrünkonzentration in Prozent						
	1/60		1/100		1/200		1/400
Biebr. Sch.- rotkonzentra- tion in Pro- zent	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung
1/ 40	—	bläunlich violett	—	braun	—	bräunlich rot	—
1/ 60	+	"	—	"	—	"	—
1/100	++	"	+	bräunlich violett	—	"	—
1/200	+++	"	++	"	—	bräunlich violett	—
1/240	+++	blau	++	blassblau	++	"	—
1/280	+++	"	+++	"	++	blassblau	—
1/320	++	"	+++	"	++	"	—
1/400	++	"	++	blau	+	"	—
1/480	+	"	+	"	+	"	—
1/560	—	"	+	"	+	"	—
1/800	—	"	—	"	—	"	—

+ bedeutet: makroskopisch sichtbare geringe Ausflockung.

++ " : " " stärkere Ausflockung.

+++ " : " " starke Ausflockung.

— " : " keine Ausflockung.

weil, wie wohl schon bekannt, Janusgrün hochkolloidal, Kongorot vollständig kolloidal und Biebricher Scharlachrot gering kolloidal ist.

2. Der Einfluss von Elektrolyten auf die gegenseitige Ausflockung von Farbstoffen.

Um einerseits die Elektrolytenwirkung auf die Ausflockung des Kolloides zu studieren und um andererseits kolloidale und serologische Reaktionen in demselben Medium zu prüfen, habe ich Kochsalz zur Farbstofflösung hinzugefügt, oder die Farbstoffe in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Dabei wurde die zugefügte Salzmenge so beschränkt, dass durch Elektrolyten allein die Fällung der Farbstoffe nicht stattfand. In einer frühern Arbeit von N. Sugimoto wurde diese Beziehung wegen der Labilität der Mastixlösung durch Kochsalz nicht berührt. Doch kann man bei der oben erwähnten gegenseitigen Ausflockung von Farbstoffen in physiologischer Kochsalzlösung die Reaktion beobachten. Die gegenseitige Flockenbildung von Farbstoffen in physiologischer Kochsalzlösung wird in Tabelle 7 genau angegeben.

Tabelle 7. Einfluss von NaCl auf die Ausflockung von Kongorot und Janusgrün.

Jeder der Farbstoffe gelöst in 0.85% Kochsalzlösung. Beobachtung nach 24 Stunden.

1 cc→ ↓	Janusgrünkonzentration in Prozent						
	1/100		1/200		1/400		1/800
Kongorot- konzentration in Prozent	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung	Farbe d. Mediums	Fällung
1/ 40	—	braun	—	braun	—	bräunlich rot	—
1/ 60	+	"	—	"	—	"	—
1/ 100	‡	"	—	"	—	"	—
1/ 200	‡	"	‡	blassbraun	—	braun	—
1/ 240	‡	blassblau	‡	farblos	—	"	—
1/ 280	‡	blau	‡	blassblau	—	"	—
1/ 320	‡	"	‡	"	+	"	—
1/ 400	‡	"	‡	blau	‡	farblos	—
1/ 480	‡	"	‡	"	‡	blassblau	—
1/ 560	‡	"	‡	"	‡	blau	—
1/ 800	‡	"	‡	"	+	"	—
1/1600	+	"	—	"	—	"	—
1/3200	—	"	—	"	—	"	—

+ bedeutet: makroskopisch sichtbare geringe Ausflockung.

‡ " : " " stärkere "

‡ " : " " starke "

— " : " keine Ausflockung.

Die Fällungsreaktion wird durch die Anwesenheit von Salz (0.85% NaCl) deutlich beschleunigt und man kann die gegenseitige Fällungsreaktion von beiden Farbstoffen in weit grösserer Verdünnung der Farbstoffe beobachten als es im salzfreien Medium möglich wäre. Ausserdem bemerkt man auch bei dieser Reaktion die Fällungs- und Fällungshemmungszone. Zunächst habe ich die Kochsalzmenge absteigend verdünnt und die Wirkung des Salzes auf die Reaktion genau untersucht.

Aus dieser Untersuchung wird der Einfluss der Elektrolyten noch klarer ersichtlich, weil dadurch die Ausflockungszone in geringem Salzgehalt schon erweitert ist. Bei 1/200%iger Janusgrünlösung ist die Flockungszone in destilliertem Wasser 1/400–1/560%ige Lösung von Kongorot. In 0.01%iger Kochsalzlösung ist die Ausflockungszone vollkommen analog mit jener in destilliertem Wasser, und 0.05- und 0.1%ige Lösungen erweitern die Ausflockungsgrenzen bis zu 1/240%iger und 1/1600%iger Lösung von Kongorot. Bei weiterem Zusatz von

Tabelle 8. Einfluss von NaCl auf die Ausflockung von Kongorot und Janusgrün.

$\downarrow$ 1 cc → ↓	Janusgrünkonzentration in Prozent											
	1/100						1/200					
	NaCl %					dest. Wass.	NaCl %					dest. Wass.
	0.5	0.25	0.1	0.05	0.01		0.5	0.25	0.1	0.05	0.01	
Kongorot- konzentration in Prozent												
1/ 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/ 60	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/ 100	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/ 200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	—
1/ 240	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
1/ 280	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	—	—
1/ 320	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—
1/ 400	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
1/ 480	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
1/ 560	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	+	+
1/ 800	+++	++	+	—	—	—	++	++	+	+	—	—
1/1600	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/3200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

NaCl bis zu 0.5 %iger Lösung wird die Ausflockungszone noch breiter.

3. Ultrafiltration der Farbstoffe nach Zsigmondy.

Kraft²⁶⁾ hat gezeigt, dass die Farbstoffe in Bezug auf ihre kolloidalen Eigenschaften stark verschieden sind, und dass diese Unterschiede zum grossen Teil von der Grösse der Moleküle abhängen. Er vertritt weiter die Ansicht, dass das Färbvermögen eines Farbstoffes grossenteils auf seiner kolloidalen Natur beruht, und dass Farbstoffe von niedrigem Molekulargewicht in der Lösung schwerer kolloidale Aggregate bilden als solche von hohem.

Bei der gegenseitigen Ausflockung von Janusgrün und Kongorot, bemerkte ich, dass ein sehr geringer Überschuss von Kongorot die gebildeten Präzipitate leicht auflösen kann, dagegen bei Janusgrün ein grosser Überschuss erforderlich ist um die Präzipitate wieder zu lösen (Siehe Tabelle 4). Diese Tatsachen sind auch aus Tabelle 5 ersichtlich, weil zur Auflösung des Präzipitates ein sehr geringer Überschuss von Nigrosin, dagegen ein sehr grosser Überschuss von Janusgrün benötigt wird. Nach Tabelle 6 wird das Präzipitat wieder aufgelöst, wenn ein relativ erheblicher Überschuss von Biebricher Scharlachrot einerseits und von Janusgrün anderseits vorhanden ist.

Es scheint als ob diese Verschiedenheiten in Bezug auf die Auflösung des Niederschlags zum grossen Teil von der kolloidalen

Natur des Farbstoffes abhängen, da ja Kongorot zum vollständigen Kolloid, Janusgrün und Nigrosin zum Hochkolloid und Biebricher Scharlachrot zum mässigen Kolloid gehört, was wohl als bekannt vorausgesetzt werden darf. Um diese Angaben noch zu stützen, wurde die kolloidale Natur der Farbstoffe, die in diesem Versuche benutzt wurden, folgendermassen geprüft.

Zur Bestimmung ihrer kolloidalen Natur wurde der Ultrafiltrationsapparat nach *Zsigmondy*^{27) 28) 29) 30)} benutzt, um die Teilchengrösse des Janusgrüns und Kongorots zu prüfen. Bei farbigen Lösungen ist es nicht schwer, die Filtrierbarkeit des Farbstoffes durch verschiedene Membrane zu beurteilen, weil durch die Farbe des Filtrats sofort die Durchlässigkeit des Farbstoffes festgestellt werden kann; wenn man z. B. ein wasserklares Filtrat bekommt, so weiss man, dass die Kolloidteilchen sämtlich zurückgehalten worden sind, ist dagegen das Filtrat gefärbt, so lässt sich schon nach der Farbennuance die Durchlässigkeit des Farbstoffes vermuten. Ich benutzte zu der Untersuchung 1/100%ige Lösung von jedem Farbstoffe. Die Versuchsergebnisse sind deutlich ersichtlich aus den folgenden Tabelle.

Tabelle 9. Ultrafiltration.

		Filter		
		Mittel	Fein	Feinst
Janusgrün	Filtrierbarkeit	≡	≡	±
	Zeitverlauf	10 Min.	15 Min.	20 Min.
Kongorot	Filtrierbarkeit	+	—	—
	Zeitverlauf	25 Min.	30 Min.	30 Min.
Gemisch von 1/50% Janusgrün u. 1/100% Kongorot	Filtrierbarkeit	—	—	—
	Zeitverlauf	40 Min.	40 Min.	40 Min.

Wie man aus der obigen Tabelle ersieht, passiert 1/100%ige Lösung von Janusgrün noch ein „Fein“-Filter in 15 Minuten, aber nicht Filter „feinst“. 1/100%ige Lösung von Kongorot passiert noch teilweise das Filter „mittel“, wird aber von einem Filter „fein“ vollkommen zurückgehalten. Das Gemisch von beiden Farbstoffen wird also von Filter „mittel“ vollkommen zurückgehalten, weil dabei die kleinen Kolloidteilchen durch Adsorption vergrössert werden.

Es war von vornherein anzunehmen, dass die Moleküle des Kongorots grösser sind als die des Janusgrüns, deswegen werden kleine Moleküle von Janusgrün durch grosse Moleküle von Kongorot adsorbiert und zuerst neutralisiert und dann wird die Ausflockung gebildet. Wenn aber bei gegenseitiger Ausflockung Überschuss von Kongorot vorhanden ist, so werden die Anionen durch die Neutralteilchen adsorbiert und man erhält ein negativ geladenes Hydrosol.

Ist Janusgrün im Überschuss vorhanden, so spielen dessen Kationen dieselbe Rolle, und es wird ein positives Hydrosol gebildet. Nur bei einem Konzentrationsverhältnis von nahezu 2:1 bekam man die optimale Ausflockungserscheinung.

4. Kataphoresenversuch mit Farbstoff.

Um das Verhalten der Farbstoffe gegen den elektrischen Strom feststellen, wandte ich den Mikroelektrodialysenapparat^{31) 32)} nach *T. Asaba*³³⁾ an. Im Jahre 1931 hat *T. Asaba* hervorgehoben, dass, wenn die Präzipitinogen-Präzipitinbindung zur Elektrodialyse führt, ein Teil des Präzipitins sich wieder von dem Präzipitat abtrennt und zur Kathode wandert.

Nach meinen Verguchen mit diesem Apparat, wandert 1/100%ige Janusgrünlösung von destilliertem Wasser nach 2 Minuten zur Kathode bei 1.5 Milliamp., und das Medium wird vollständig klar. Im gleicher Weise wandert 1/100%ige Lösung von Kongorot nach 1.5 Minuten bei gleichem Milliamp. zur Anode und das Medium wird farblos. Aus diesem Versuche schliesse ich, dass Janusgrün elektrisch positiv und Kongorot negativ geladen ist.

Um diesen Zustand der Ladung von beiden Farbstoffen noch eingehender zu prüfen wurde die Elektrodialyse mit gebildetem Niederschlag in folgender Weise vorgenommen. Die zwei Farbstoffe werden in geeigneten Mengenverhältnissen, um optimale Ausflockung zu bilden, gemischt, der Niederschlag nach 24 Stunden 2 mal mit destilliertem Wasser gewaschen, 2 cc destilliertes Wasser wird wieder zugefügt und das Ganze dann zur Elektrodialyse aufgestellt. Dabei bemerkte ich, dass der Niederschlag sich nach 15 Minuten wieder abtrennt, d. h. dass das Janusgrün zur Kathode wandert und dadurch das Hartfilterpapier auf der Kathodenseite bläulich gefärbt wird, während Kongorot zur Anode geht und die Anodenseite rötlich gefärbt wird und die Flüssigkeit in der Mitte farblos wird.

Tabelle 10. Kataphorese.

		Kathode	Anode
Janusgrün	Kataphorese	≡≡≡	—
	Zeitverlauf	2 Min.	2 Min.
	P. H.	6.31	6.29
Kongorot	Kataphorese	—	≡≡≡
	Zeitverlauf	1 1/2 Min.	1 1/2 Min.
	P. H.	6.50	6.24
Gemisch von 1/50% Janusgrün u. 1/100% Kongorot.	Kataphorese	Janusgrün	Kongorot
	Zeitverlauf	15 Min.	15 Min.
	P. H.	6.81	6.58

Diese interessante Tatsache liefert uns einen weiteren Beweis dafür, dass die gegenseitige Ausflockung durch entgegengesetzte elektrische Ladung hervorgerufen und aus diesem gebundenen

Zustand durch Aenderung der elektrischen Stromrichtung wieder getrennt wird.

5. Ringpräzipitation zwischen den entgegengesetzt geladenen Farbstoffen.

Diese Reaktion aus dem obigen Versuche, wonach elektrisch entgegengesetzt geladene Farbstoffe bei Mischung in geeigneten Mengenverhältnissen unter Niederschlagbildung reagieren, kann man durch serologische oder chemische Fällungsreaktion nachprüfen, indem die Ringpräzipitation zwischen beiden Farbstoffen angewendet wird. Mit dieser Absicht prüfte ich die Ringpräzipitation zwischen den Farbstoffen und bekam befriedigende Resultate.

Zum Nachweisen des Präzipitins mittels der Ringprobe wurde in unserem Institut folgende Immunkörperverdünnungsmethode angewandt und die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur je nach 1/4, 1/2, 1 und 2 Stunden abgelesen.

Immunkörperverdünnungsmethode: Wenn absteigend verdünnte Präzipitogene auf das Immunserum, welches mit 10% Meerschweinchenserum oder 1% Gummiarabicumlösung in gleicher Weise verdünnt worden ist, überschichtet werden, so ist die Reaktion am stärksten in einem gewissen Grade der Antigenverdünnung. Dieser am stärksten reagierende Grad der Antigenverdünnung heisst die Bindungszone des Immunserums, und den höchsten Verdünnungsgrad des Immunserums, bei welchem in der Bindungszone noch eine weisse ringförmige Trübung auftritt, nennen wir den Präzipitintiter nach der Immunkörperverdünnungsmethode.

Auch bei der Kolloidreaktion wurde diese Ringprobe angewandt, indem auf das Janusgrün, welches mit 1% Gummiarabicumlösung in absteigender Weise verdünnt war, das mit destilliertem Wasser in gleicher Weise verdünnte Kongorotlösung überschichtet wurde. Dabei konnte man an den Grenze beider Farbstoffe eine bräunlich-violette ringförmige Trübung bemerken.

Die Ergebnisse werde in Tabelle 11. genau angegeben.

Wie aus den obigen Tabellen hervorgeht, sieht man zwischen beiden Farbstoffen eine positive Ringpräzipitation, die bei der serologische Präzipitinreaktion wohl in allgemeinen bekannt ist. Deswegen kann man auch bei diesem Kapillarröhrchenversuch das Ausfällungsphänomen zwischen entgegengesetzt geladenen Farbstoffen, wie bei Mischproben, beobachten. Janusgrünlösung reagiert dabei am stärksten mit 1/480 – 1/560%iger Kongorotlösung und beträgt dabei die Janusgrünverdünnung 1/800 – 1/1600%. Ausserhalb dieser beiden geeigneten Fällungszonen reagierten beide Stoffe schwächer und man bemerkt oft eine Hemmungszone bei konzentrierten Farbstoffteilen. Der optimale Fällungspunkt beider Farbstoffe liegt im Verhältnis von nahezu 2:1 oder 3:1. Diese Reaktion wird erst von der Janusgrünseite aus beschrieben. Bei verhältnismässig starker Konzentration desselben (1/100 – 1/200%) ist die Reaktionszone in Kongorotlösung breit und ist es schwer, die zur Ausflockung geeignete

Tabelle 11.
Ringpräzipitation zwischen Janusgrün und Kongorot.

Kongorot- konzentration in Prozent	Janusgrünkonzentration in Prozent					
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
1/ 40	—	—	—	—	—	—
1/ 60	≡	≡	—	—	—	—
1/ 100	≡	≡	≡	—	—	—
1/ 200	≡	≡	≡	—	—	—
1/ 240	≡	≡	≡	≡	—	—
1/ 280	≡	≡	≡	≡	—	—
1/ 320	≡	≡	≡	≡	—	—
1/ 400	≡	≡	≡	≡	—	—
1/ 480	≡	≡	≡	≡	≡	—
1/ 560	≡	≡	≡	≡	≡	—
1/ 800	—	≡	≡	≡	+	—
1/1600	—	—	—	+	+	—
1/3200	—	—	—	—	—	—

≡ bedeutet: Positive Reaktion innerhalb 1/4 Stunde.

≡ " : " " " 1/2 Stunde.

≡ " : " " " 1 Stunde.

≡ " : " " " 2 Stunden.

— " : Negative Reaktion im ganzen Zeitverlaufe.

Kongorotmenge gleich nachzuweisen. Bei der Verdünnung von Janusgrün (1/400–1/800 %) reagiert Kongorot im konzentrierten Teil (1/40–1/200 %) ganz negativ und man kann die optimale Ausflockungszone zwischen 1/320–1/560 %iger Lösung von Kongorot finden. Bei noch mehr verdünntem Janusgrün (1/1600 %) wird die optimale Ausflockungszone noch schmaler (1/480–1/560 %) und bei stark verdünntem Janusgrün (über 1/1600 %) bleibt die Reaktion ganz negativ. Umgekehrt werde ich diese Reaktion nochmals von der Kongorotseite aus überprüfen. Dabei bemerkt man noch eine Hemmungszone im Janusgrünteil in verdünnter Kongorotlösung. Auf 1/800–1/1600 %ige Lösung von Kongorot reagiert das Janusgrün (1/100 %) nicht, dagegen tritt bei noch grösserer Verdünnung von Janusgrün (1/400–1/800 %) die Reaktion wieder ein, genau wie bei der Prozoneerscheinung in der Immunreaktion.

Ich möchte diese Ringprobe mit der gewöhnlichen Mischprobe (Siehe Tabelle 4) vergleichen. Die Resultate der oben erwähnten Ausflockungsreaktion zwischen Janusgrün und Kongorot stimmen mit denen der Mischprobe beinahe überein, doch in Bezug auf die Empfindlichkeit der Reaktion, tritt die Ringpräzipitation viel schärfer

hervor als die Ausflockungserscheinung, weil die Reaktion in beiden Lösungen auch bei 4 facher Verdünnung der Mischprobe deutlich erkennbar ist. Diese Ringpräzipitationsprobe wird weiter bei verschiedenen anderen gegenseitigen Ausflockungen von Farbstoffen angewandt.

Tabelle 12.
Ringpräzipitation zwischen Janusgrün und Nigrosin.

Nigrosin- konzentration in Prozent	Janusgrünkonzentration in Prozent					
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
1/ 40	++	—	—	—	—	—
1/ 60	+++	+	—	—	—	—
1/ 100	+++	+++	—	—	—	—
1/ 200	+++	+++	++	—	—	—
1/ 240	+++	+++	+++	+	—	—
1/ 280	+++	+++	+++	+++	—	—
1/ 320	+++	+++	+++	+++	+	—
1/ 400	+++	+++	+++	+++	++	—
1/ 480	+++	+++	+++	+++	++	—
1/ 560	+++	+++	+++	+++	+	—
1/ 800	—	++	+++	++	+	—
1/1600	—	—	—	—	—	—
1/3200	—	—	—	—	—	—

+++ bedeutet: Positive Reaktion innerhalb 1/4 Stunde.

+++ " : " " " 1/2 Stunde.

++ " : " " " 1 Stunde.

+" " : " " " 2 Stunden.

— " : Negative Reaktion im ganzen Zeitverlaufe.

Wie oben erwähnt, wurde Janusgrün mit 1% Gummiarabicumlösung absteigend verdünnt und darüber Nigrosinlösung vorsichtig überschichtet. Das Ergebnis ist analog zu dem bei Janusgrün und Kongorot und man kann die optimale Ausflockungszone oder Hemmungszone bestimmen. Die geeignete Nigrosinmenge zur Flockenbildung ist in diesem Versuch 1/400–1/480% der verschiedenen Janusgrünverdünnungen, wobei die höchste Janusgrünverdünnung 1/1600% beträgt. Bei einer Verdünnung der Janusgrünlösung von 1/100–1/400% bemerkt man die hemmende Wirkung der Nigrosinlösung bei 1/40–1/200%, und bei hoher Janusgrünverdünnung (1/800–1/1600%) wird die hemmende Wirkung des Nigrosins noch deutlicher ersichtlich. Andererseits kann man bei hoher Nigrosinverdünnung (1/800–1/1600%) die hemmende Wirkung des Janusgrüns zeigen. In Bezug auf die optimale Flockenbildung stehen beide Farbstoffe

nahezu im Verhältnis von 3:1 oder 4:1. In diesen Proben zeigt sich die Ringprobe noch viel schärfer als bei der Mischprobe, und die Reaktion bei der Janusgrünverdünnung ist viel stärker als bei der Mischprobe (Siehe Tabelle 5).

Tabelle 13.
Ringpräzipitation zwischen Janusgrün und Biebrich. Scharlachrot.

Biebr. Scharl.- konzentration in Prozent	Janusgrünkonzentration in Prozent					
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
1/ 40	≡	+	—	—	—	—
1/ 60	≡	≡	++	—	—	—
1/ 100	≡	≡	≡	+	—	—
1/ 200	≡	≡	≡	≡	+	—
1/ 240	≡	≡	≡	≡	+	—
1/ 280	≡	≡	≡	≡	++	—
1/ 320	≡	≡	≡	≡	++	—
1/ 400	≡	≡	≡	≡	+	—
1/ 480	≡	≡	≡	≡	+	—
1/ 560	—	++	+	—	—	—
1/ 800	—	—	—	—	—	—
1/1600	—	—	—	—	—	—
1/3200	—	—	—	—	—	—

≡ bedeutet: Positive Reaktion innerhalb 1/4 Stunde.

≡ " : " " " 1/2 Stunde.

++ " : " " " 1 Stunde.

+" : " " " 2 Stunden.

— " : Negative Reaktion im ganzen Zeitverlaufe.

In diesen Farbstoffen kann man auch die Bindungszone-, Hemmungszone- und Prozoneerscheinungen deutlich wahrnehmen. Der optimale Bindungsprozentsatz beider Farbstoffe ist, wie beim Nigrosin, nahezu 3:1 oder 4:1 und die Resultate der Ringprobe stimmen mit denen des Mischpräzipitations beinahe überein, nur das Reaktionsgebiet und die Reaktionsfähigkeit sind viel schärfer und stärker ausgeprägt als bei der Mischprobe.

Diese Hemmungserscheinungen bei der Kolloidreaktion stehen in sehr nahen Beziehungen zu denen der Präzipitinreaktion. Dieselben werden auch deutlich bei Antigenüberschuss und oft bei Antikörperüberschuss beobachtet. Wenn in dieser Weise einer der Farbstoffe im Überschuss vorhanden ist, so findet keine vollständige Neutralisation zwischen beiden Farbstoffmolekülen statt, und dann tritt keine Fällung oder Ausflockung ein. Nur bei bestimmten

Mengenverhältnissen beider Reaktionskomponenten kommt elektrische Neutralisation zustande und man kann die Fällung deutlich bemerken.

6. *Die Wirkung der Fällungsreaktion von entgegengesetzt geladenen Farbstoffen auf das Komplement.*

Bei einer Übersicht über die vorliegenden Versuchsmaterialien, erkennen wir, dass sehr nahe Beziehungen zwischen der gegenseitigen Ausflockungsreaktion von Farbstoffen und der immunserologischen Reaktion vorhanden sind. Wenn in der serologischen Reaktion eine Bindung von Antigen und Antikörper stattfindet und gleichzeitig das Komplement gebunden wird, dann tritt auch die Komplementbindungsreaktion ein. Diese Tatsache lässt vermuten, dass, wenn das Komplement zur Farbstofflösung hinzugefügt wird, der Komplementschwund auch bei gegenseitiger Flockenbildung von Farbstoffen stattfinden kann. In dieser Auffassung habe ich die Versuche über Komplementbindungsreaktion bei Kolloidfällung angestellt, doch leider sind sie mir nach gewöhnlichen Methode, wie bei der Immunserologischen Reaktion, nicht gelungen.

Komplementbindungsmethode: Als Hämolysin benutzte ich ein inaktiviertes Antiziegenhämolysin von Kaninchen (in 2-fach gelöster Dosis) und als Komplement frisches Serum von Meerschweinchen (in 2-fachem Komplementtiter). Die Blutemulsion war 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenes 1 oder 2.5% defibriniertes Ziegenblut. Bei der Ausführung dieser Probe liess ich zuerst das Gemisch von beiden Farbstofflösungen und das Komplement eine Stunde lang im Brutschrank bei 37°C stehen. Alsdann hielt ich es nach Zusatz der Blutkörperchenaufschwemmungen und der Hämolysinlösung 2 Stunden lang im Brutofen und über Nacht im Eisschrank.

Tabelle 14. Komplementbindungsreaktion zwischen den entgegengesetzt geladenen Farbstoffen nach gewöhnlicher serologischer Methode.

Kongorot-konzentration in Prozent	Janusgrünkonzentration in Prozent									
	1/100	1/120	1/140	1/160	1/200	1/240	1/280	1/320	1/400	1/800
1/200	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1/240	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/280	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/320	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/400	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/800	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—

/ bedeutet: Eigene Hemmung.

— „ : Komplette Hämolyse.

Wie man aus der obigen Tabelle ersieht, bleibt das Komplement bei Flockenbildung des Farbstoffes unverändert und wirkt hämolytisch. Nach diesem negativen Resultate kann man vermuten, dass die kolloidale Flockenbildung nicht so stark auftritt wie bei der serologischen Reaktion, anderseits erfordert die Bildung von grossen Flocken bei der gegenseitigen Farbstoffreaktion ziemlich lange Zeit, so dass ein Stehenlassen von 1 oder 2 Stunden bei 37°C nicht genügend ist, während beim Stehenlassen bis zu 24 Stunden in Zimmertemperatur, sich erst das grosse deutliche Präzipitat zeigt, weil die Teilchen sich miteinander vereinigen und sich vergrössern.

Nach diesen Tatsachen kann man vermuten, dass bei einer Reaktion von entgegengesetzt geladenen Farbstoffen noch längere Zeit als bei der gewöhnlichen Komplementbindungsreaktion nötig ist um die Flockenbildung vollständig zu machen und das Komplement mitzunehmen. Deshalb verlängerte ich die Reaktionszeit des Kongorots, Janusgrüns und Komplements bis auf 24 Stunden d. h. das Gemisch digerierte im Brutschrank bei 37°C, und blieb über Nacht in Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Behandlung wurde das hämolytische System zugefügt und 2 Stunden lang im Brutofen aufbewahrt. Dabei muss man bei diesem Verfahren die eigene Hemmung seitens eines jeden Farbstoffes auf das Komplement und den Komplementwert vorsichtig berücksichtigen.

Die Resultate sind in folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 15. Komplementbindungsreaktion zwischen den entgegengesetzt geladenen Farbstoffen.

Kongorot- konzentration in Prozent	Janusgrünkonzentration in Prozent									
	1/100	1/120	1/140	1/160	1/200	1/240	1/280	1/320	1/400	1/800
1/100	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1/240	/	≡	≡	≡	≡	≡	++	++	—	—
1/280	/	≡	≡	≡	++	—	—	—	—	—
1/320	/	—	+	++	+	—	—	—	—	—
1/400	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/800	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—

/ bedeutet: Eigene Hemmung.

≡ „ : Komplette Hemmung.

≡ „ : Fast komplette Hemmung.

++ „ : Grosse Kuppe.

+ „ : Kleine Kuppe.

— „ : Komplette Hämolyse.

Kontrolle 1.

	Janusgrünkonzentration in Prozent									
	1/100	1/120	1/140	1/160	1/200	1/240	1/280	1/320	1/400	1/800
0.85% Kochsalzlösung (cc)	0.5	1.5	1.0	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5
Janusgrünlösung (cc)	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Komplement (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hämolyse (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Rote Emulsion (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Reaktion			—		—		—		—	

|||| bedeutet: Komplette Hemmung.
 — „ : Komplette Hämolyse.

Kontrolle 2.

	Kongorotkonzentration in Prozent									
	1/100	1/120	1/140	1/160	1/200	1/240	1/280	1/320	1/400	1/800
0.85% Kochsalzlösung (cc)	0.5	1.5	1.0	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5
Kongorotlösung (cc)	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Komplement (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hämolyse (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Rote Emulsion (cc)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Resultat			—						—	

|||| bedeutet: Komplette Hemmung.
 — „ : Komplette Hämolyse.

Kontrolle 3. Komplementtiter.

	Komplementmenge (5%) cc									
	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05
Nach 1 St.								++	—	—
Nach 24 St.								++	—	—

|||| bedeutet: Komplette Hämolyse.
 ++ „ : Schwache Hämolyse.
 — „ : Komplette Hemmung.

Die Stärke dieser Reaktion ist aus zeitlichen Gründen viel schwächer als bei der spezifisch serologischen Reaktion. Dabei wird auch die Frage nahegelegt, ob das Komplement durch gebildete Flocken, d. h. Partikelchen vom Niederschlag, mechanisch adsorbiert werden kann. Um diese Frage zu lösen, habe ich nach der vollständigen Flockenbildung zu diesen Media das Komplement hinzugefügt und nach 24 Stunden den Komplementschwund durch Zusatz des hämolytischen Systems untersucht.

Tabelle 16.

Kongorot-konzentration in Prozent		Janusgrünkonzentration in Prozent								
		1/120	1/140	1/160	1/200	1/240	1/280	1/320	1/400	1/800
1/240	Fällung K. B. R.	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	+ —	— —	— —	— —	— —
1/280	Fällung K. B. R.	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	+ —	— —	— —	— —
1/320	Fällung K. B. R.	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	+ —	— —	— —	— —
1/400	Fällung K. B. R.	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	++ —	— —	— —
1/800	Fällung K. B. R.	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —

K. B. R. bedeutet Komplementbindungsreaktion.

— „ Komplette Hämolyse.

+ bedeutet: makroskopisch sichtbare geringe Ausflockung.

++ „ : „ „ stärkere „

≡ „ : „ „ starke „

— „ : „ keine Ausflockung.

Die obige Tabelle zeigt, dass nach vollständiger Flockenbildung von Janusgrün und Kongorot das Komplement 24 Stunden lang in diesem Gemisch unverändert bleibt und bei Zusatz des hämolytischen Systems hämolytisch wirkt. Aus diesem Versuche kann man ersehen, dass das Phänomen der Komplementbindung mit dem Präzipitinbildungsvorgang in sehr inniger Beziehung steht und dass dagegen das gebildete Präzipitat nicht so stark auf den Komplementschwund einwirkt.

Bei jedem Versuche wurden immer genaue Kontrollen angesetzt, um zu wissen, ob das Janusgrün oder Kongorot selbst auf die Komplemente hemmend wirkte, ob das hämolytische System genügend benutzt wurde, oder ob die Komplemente allein hämolytisch

keine Wirkung hatten, und überdies besonders ob die Komplement-titer bei 24 stündiger Erhaltung unverändert blieben.

Zusammenfassung.

Wie die oben aufgeführten Tatsachen lehren, zeigen die Agglutinin- und Präzipitinreaktionen die sinnfälligsten Ähnlichkeiten mit den Ausflockungserscheinungen der Kolloide.

Man kann bei der Agglutination und Präzipitation nach *Bordets* Vorgang zwei getrennte Reaktionsphasen unterscheiden: 1. Die eigentliche primäre Reaktion, die sog. Bindung, 2. Die sekundäre Reaktion, die Fällung. Für das Zustandekommen der sekundären Reaktion ist in vielen Fällen ein bestimmtes Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten erforderlich. Bei Überschuss der einen oder anderen Komponente bleibt die Fällung oft aus. Die quantitativen Verhältnisse der Bindung haben zuerst *Landsteiner* u. *Jagic*^{34) 35)} mit den analogen Beziehungen bei der Kolloidreaktion verglichen. In eingehenden Versuchen hat dann *Biltz* diese Frage behandelt, wie oben erwähnt, und den Nachweis erbracht, dass das Bindungsgesetz, das für die Reaktionskomponente der Präzipitation Geltung hat, auch bezüglich der Wirkung der Kolloide aufeinander zu beobachten ist. Vor allem zeigt die gegenseitige Fällung von Kolloiden, besonders die gegenseitige Ausflockung von Farbstoffen, typische Reaktionen, die den Zoneerscheinungen in der Immunreaktion sehr nahe stehen.

Wie obige Versuche zeigten, ist für das Zustandekommen der Fällungsreaktion ein bestimmtes Mengenverhältnis der Reaktionskomponenten erforderlich, und es bleibt bei Überschuss der einen oder anderen Komponente sowohl bei der Präzipitinreaktion als auch bei der gegenseitigen Farbstoffausflockung die Fällung aus.

Das Zustandekommen der Reaktion ist weiter von der Anwesenheit von Elektrolyten, besonders der H-Ionenkonzentration, abhängig, und bezüglich der Präzipitinreaktion wiesen *Michaelis*³⁶⁾, *Davidsohn*³⁷⁾, *Fleischmann* u. *Michaelis*³⁸⁾ u. a. analoge Verhältnisse nach. In meinem Versuch wurde auch die Farbstofffällung durch mässigen Zusatz von Kochsalz befördert.

Die Phänomene der optimalen Fällung oder der negativen Reaktion werden bei der Kolloidreaktion durch elektrische Ladung erklärt. Diese Erklärungen sind schon vor Jahren von mehreren Autoren erörtert worden. Doch werden diese Phänomene auch durch Veränderung des spezifischen Gewichtes und der Viskosität (*Müller*³⁹⁾), oder der Oberflächenspannung (*Hardy*, *Ostward*⁴⁰⁾, *Joos*⁴¹⁾, *Friedberger*⁴²⁾ und *Freundlich*⁴³⁾) mehr oder weniger beeinflusst. Nach meinen Versuchen mit Ultrafiltration und Elektrodialyse wird, sofern es sich wenigstens um die gegenseitige Ausflockung handelt, dieses Phänomen hauptsächlich von der elektrischen Ladung beeinflusst. Der Grund ist folgender: Wenn zwei Farbstoffe (Janusgrün und Kongorot) in einem solchen Verhältnisse gemischt wird, dass eine vollständige Ausflockungserscheinung erzeugt wird, und das Präzipitat zur Elektrodialyse gebracht wird, so wird das Präzipitat wieder abgetrennt. Dabei wandert das positiv geladene Janusgrün zur Kathode und das Hartfilterpapier auf der Kathodenseite wird bläulich gefärbt, während das elektrisch negativ geladene Kongorot zur Anode geht und die Anoden-

seite rötlich färbt, wobei die dazwischen befindliche Flüssigkeit farblos wird.

Über die Komplementbindungsreaktion der Kolloide sind von zahlreichen Autoren Beobachtungen und Erörterungen gemacht worden. Schon vor Jahren war es bekannt, dass Witte-Pepton (*Löwenstein*), Pflanzenschleim (*Lingelsheim*⁴³⁾), Glykogen (*Wandelstadt*⁴⁵⁾), Pulver und Niederschläge die Komplemente binden. Als dann später die Komplementbindung zum Nachweis einer Antigen-Antikörper-Reaktion benutzte wurde, wandte man sich diesem Phänomen mit grösserem Interesse zu. *Landsteiner* u. *Stankovic*^{46) 47)} haben systematisch diese Frage vom kolloidchemischen Gesichtspunkt aus behandelt und festgestellt, dass sämtliche Kolloide, insbesondere aber Niederschläge und Fällungen, imstande sind, Komplement zu adsorbieren.

Ich habe weiter ausser diesen Adsorptionsphänomenen den Komplementschwund bei Präzipitatbildung, wie bei Präzipitinbildung von Antigen-Antikörperreaktion, sowie bei Fällungsreaktionen zwischen entgegengesetzt geladenen Farbstoffen nachweisen können, wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist. Dabei kann man die mechanische Adsorption ausschliessen, weil durch das gebildete Präzipitat das Komplement nicht so stark beeinflusst wird wie bei der Präzipitatbildung. Doch ist diese Wirkung nicht so stark wie bei der serologischen Komplementbindung und erfordert dabei noch längere Zeit als bei letzterer.

Schluss.

Die wesentlichsten, in den vorhergehenden Experimenten zu beachtenden Punkte sind folgende:

1. Die Immunreaktionen, besonders die Präzipitinreaktion, zeigen gleiche Phänomene in Bezug auf optimale Flockenbildung oder Hemmungserscheinungen mit gegenseitiger Ausflockung von Farbstoffen.
2. Die gegenseitige Ausflockung von Farbstoffen ist am vollständigsten, wenn die beiden Farbstoffe in geeigneten Mengenverhältnissen stehen. Überschuss der einen oder anderen Komponente hebt die Fällung auf.
3. Die Anwesenheit von Elektrolyten erweitert die Ausflockungszone beträchtlich.
4. Bei diesen Fällungserscheinungen von Farbstoffen kann man durch Kapillarröhrchenversuch, wie beim Ringpräzipitinversuch, die Präzipitatbildung in der Grenzschicht beider Farbstoffe beobachten.
5. Hochkolloidale Farbstoffe haben eine enge Zone vollkommener Ausflockung, während wenig kolloidale Farbstoffe eine unvollkommene Ausflockung mit einer ausgedehnten Zone besitzen, mit andern Worten, der Grad der Ausflockung und die Breite der Ausflockungszone werden durch die kolloidale Natur der verwendeten Stoffe bedingt.

278 K. Ohtahara: Studien über die Bindungs- und Hemmungszone usw.

6. Wenn gegenseitige Fällung eintritt, sind die Farbstoffe imstande, das Komplement zu adsorbieren.

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.

- ¹ Ogata, Kongressberichte der hyg., mikrob. u. parasit. Generalversammlung 1927. — ² Ramon, Compt. r. Soc. Biol. T. 86, p. 661, 1922. — ³ Inoue, Arb. aus d. med. Universität Okayama Bd. 2, S. 369, 1931. — ⁴ Kuwana, Arb. aus d. med. Universität Okayama Bd. 2, S. 336, 1931. — ⁵ Sunouchi, Arb. aus d. med. Universität Okayama Bd. 1, S. 1, 1928. — ⁶ Haku, Arb. aus d. med. Universität Okayama Bd. 1, S. 246, 1929. — ⁷ Graham, Phil. Trans. Roy. Soc. Vol. 151, p. 183, 1861. — ⁸ Bordet, Ann. Pasteur T. 13, p. 225, 1899. — ⁹ Linder u. Picton, Journ. of Chem. Soc. Vol. 67, p. 63, 1895. — ¹⁰ Lottermoser, Über anorganische Kolloide Leipzig, 1901. — ¹¹ Hardy, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 33, S. 385, 1900. — ¹² Biltz, Ber. d. deutsch. Chem. Gesellsch. Bd. 37, S. 1905, 1904. — ¹³ Biltz, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 48, S. 615, 1904. — ¹⁴ Neisser u. Friedemann, Münch. med. Wochenschr. S. 465 u. 829, 1904. — ¹⁵ Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 48, S. 385, 1904. — ¹⁶ Bechhold, Wien. klin. Wochenschr. Bd. 18, S. 666, 1905. — ¹⁷ Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 60, S. 257, 1907. — ¹⁸ Bechhold, Münch. med. Wochenschr. Bd. 54, S. 1921, 1907. — ¹⁹ Bechhold, Bioch. Zeitschr. Bd. 6, S. 379, 1907. — ²⁰ Porges, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 40, S. 133, 1905. — ²¹ Buxton u. Schaffer, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 57, S. 47, 1907. — ²² Teague u. Buxton, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 60, S. 469, 489, 1907. — ²³ Teague u. Buxton, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 62, S. 287, 1908. — ²⁴ Teague u. Buxton, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 57, S. 64, 1907. — ²⁵ Sugimoto, Arb. aus d. med. Universität Okayama Bd. 2, S. 284, 1930. — ²⁶ Kraft, Ber. d. deutsch. Chem. Gesellsch. Bd. 32, S. 1608, 1899. — ²⁷ Zsigmondy, Kolloidchemie 5. Aufl. 1925. — ²⁸ Zsigmondy, Bioch. Zeitschr. Bd. 171, S. 198, 1926. — ²⁹ Zsigmondy u. Bachmann, Zeitschr. f. anorg. u. allg. Chem. Bd. 103, S. 1, 1918. — ³⁰ Zsigmondy, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 111, S. 222, 1924. — ³¹ Dhéré et Gorgolewski, C. r. Acad. des Sci. T. 150, p. 993, 1910. — ³² Pauli, Deutsch. klin. Wochenschr. Bd. 3, S. 1, 1924. — ³³ Asaba, Kongressberichte d. hyg. Generalversammlung 1931. — ³⁴ Landsteiner u. Jagic, Münch. med. Wochenschr. Bd. 51, S. 1185, 1904. — ³⁵ Landsteiner u. Jagic, Wien. klin. Wochenschr. Bd. 17, S. 63, 1904. — ³⁶ Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration 1922. — ³⁷ Michaelis u. Davidsohn, Bioch. Zeitschr. Bd. 47, S. 59, 1912. — ³⁸ Fleischmann u. Michaelis, Bioch. Zeitschr. Bd. 2, S. 425, 1906. — ³⁹ Müller, Allg. Chemie der Kolloide 1907. — ⁴⁰ Ostward, Bioch. Zeitschr. Bd. 48, S. 224, 1912. — ⁴¹ Joos, Zeitschr. f. Hyg. u. Injek. Bd. 40, S. 203, 1902. — ⁴² Friedberger, Zentralbl. f. Bakt. Orig., Bd. 31, S. 109, 1902. — ⁴³ Freundlich, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 44, S. 129, 1903. — ⁴⁴ Lingelsheim, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 42, S. 308, 1903. — ⁴⁵ Wendelstadt, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 34, S. 831, 1903. — ⁴⁶ Landsteiner u. Stankovic, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 42, S. 353, 1906. — ⁴⁷ Landsteiner u. Stankovic, Bioch. Zeitschr. Bd. 15, S. 33, 1908.