

# *Acta Medica Okayama*

---

*Volume 1, Issue 1*

1929

*Article 1*

DEZEMBER 1928

---

## Die Isolierung der Serumprazipitine

Gonzo Sunouchi\*

\*Okayama University,

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

# Die Isolierung der Serumprazipitine\*

Gonzo Sunouchi

## Abstract

1. Das Serumprazipitin isoliert sich reversibel aus Antigen-und Antikörperbindung. 2. Die Isolierungsmethode und der Nachweis des Prazipitins sind noch schwieriger als die anderer Immunkörper, und deshalb sind folgende Bedingungen zu berücksichtigen. a) Das Immuneserum muß eine genügende Prazipitinmenge enthalten. Diese wird erst nach vielmaliger Immunisierung erzielt. Die Prazipitinmenge ist nach der neuen Prazipitinmessung von Ogata bestimmbar. b) Zu Isolierungszwecken wird das Serumantigen durch Trocknen pulverisiert. Bei Mischung mit dem Immuneserum wird eine möglichst kleine Menge davon benutzt. c) Das salzfreie Medium ist viel zweckmäßiger für die Isolierung als das salzhaltige, am zweckmäßigsten ist destilliertes Wassermedium. d) Die Temperatur zur Isolierung beträgt zwischen 53°C-55°C. e) Als Zeitdauer für die Isolierung genügen 1/4-1/2 Stunde. 3. Die Eiweißmenge des isolierten Mediums geht nicht parallel mit der Prazipitinstärke. 4. Den komplementbindenden Ambozeptor kann man gleichzeitig in dem isolierten Prazipitinmedium nachweisen, sogar im gleichen Mengenverhältnis. 5. Aus obiger Isolierung kann man die Identifizierung beider Antikörper nachweisen.

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

## Die Isolierung der Serumpräzipitine

Von

Gonzo Sunouchi.

(Eingegangen am 8. November 1927.)

Die Reindarstellung des Immunkörpers, frei von Immuserum, ist ein interessantes Problem und notwendig, um die Natur des Ambozeptors noch genauer und sicherer erkennen zu können als dies im Serum oder der Körperflüssigkeit in Mischung mit anderen Bestandteilen möglich ist. Auch könnte man auf diese Weise die praktische Anwendbarkeit des isolierten Antikörpers finden, weil bei der Darstellung des vom Serumeiweiss freien Antikörpers seine verschiedenen unangenehmen Nebenerscheinungen sich ausschalten liessen. Deswegen werden bis heute viele Untersuchungen über die Isolierung des Antikörpers aus dem Immuserum vorgenommen und verschiedene Methoden veröffentlicht, doch zeigt es sich, dass wir von der Erfüllung obigen Wunsches noch weit entfernt sind und dass auch noch einige Antikörperarten (Präzipitin und komplementbindender Ambozeptor) bis jetzt unberührt geblieben sind. Die Isolierungsmethoden scheiden sich in zwei Gruppen, nämlich die Ausfällungsmethode und die Ausziehungsmethode.

*Die Ausfällungsmethode.* Mit der Ausfällungsmethode wurde früher als mit der Ausziehungsmethode begonnen. Sie wurde hauptsächlich auf Antitoxine angewendet, weil diese in der Praxis sehr benötigt wurden. Diese Isolierungsmethode bringt, wie der Name sagt, durch das Eiweissfällungsmittel auch den Antikörper zur Ausfällung; in dem erhaltenen Niederschlag findet sich der konzentrierte Antikörper. Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat oder Halbsättigung mit Ammonsulfat werden die Antitoxine gleichfalls mit Serumglobulin ausgefällt. Zuerst entdeckte *Pick*<sup>1)</sup> diese Tatsache bei Diphtherieantisera. Dieses Phänomen wurde von *Widal* und *Sicard*<sup>2)</sup> nachgeprüft. Diese fanden dabei ausserdem die Bakterienagglutinine auch in Serumglobulin enthalten. *Tizzoni* und *Cattani*<sup>3)</sup> hatten die Tetanusantitoxine mit derselben Methode behandelt und die Antitoxine in der Globulinfraktion von Immuserum nachgewiesen. Nach dieser Fraktionsmethode werden zwar die Antitoxine konzentriert, aber man ist trotzdem von der

Reindarstellung aus Immuns Serum noch weit entfernt.

*Die Ausziehungsmethode.* Bei dieser Methode ging man von der Ansicht aus, dass sich die Antikörper mit den Antigenen binden und danach von diesen wieder trennen lassen. *Hahn* und *Trommsdorff*<sup>4)</sup> sind die diesbezüglichen Versuche über das Typhusserum und die Typhusbazillen gelungen. Der Versuch über Hämagoagglutinine von *Landsteiner* und *Jagic*<sup>5)</sup> ist sehr interessant im Hinblick auf meine Präzipitinisolierung, weil beide die Tatsache gefunden haben, dass nach Waschung der agglutinierten roten Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung im Waschwasser Hämagoagglutinine nachzuweisen sind. Diese wieder getrennten Agglutinine vermehren sich in physiologischer Kochsalzlösung, proportional dem Temperaturanstieg des Mediums.

Sie vermuteten ausserdem, dass dabei auch die Präzipitine in gleicher Weise wie die Agglutinine zu isolieren sind. Doch konnten sie diese Vermutung nicht beweisen. *Michaelis*<sup>6)</sup> hatte die Isolierung der Präzipitine von dem Präzipitat versucht, aber nur die antigene Substanz in der isolierten Flüssigkeit gefunden und die Präzipitine nicht nachweisen können.

Die Untersuchungen von *Kosakai*<sup>7)</sup>, der im Rohrzuckermedium die Hämolyse aus roten Blutkörperchen isoliert hat, stellen einen grossen Fortschritt auf diesem Gebiete dar. Danach haben auch *Furuhata*<sup>8)</sup> die Hämagoagglutinine und *M. Ogata*<sup>9)</sup> die Bakterienagglutinine unter Einwirkung von Natronlauge als Ergebnisse beim Rohrzuckermedium erhalten. Diese 3 Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass salzfreies Medium für die Isolierung des gebundenen Antikörpers aus Antigen günstig wirkt. Später haben auf Grund desselben Gedankenganges *Miwa*<sup>10)</sup> und *Hunton*<sup>11)</sup> auch mit destilliertem Wasser diese begünstigende Wirkung nachgewiesen. In letzter Zeit hat *Kageyama*<sup>12)</sup> in unserem Institut die *Forsmannschen* Antikörper aus entsprechenden Antigenen, d. h. aus Schafblutkörperchen und auch aus Meerschweinchenorganen, nach obiger Methode (Rohrzuckermedium) isoliert. Diese Arbeit ist der Ausgangspunkt für meine Untersuchung, weil der Verfasser darin nachgewiesen hat, dass aus Organeiwässern Antikörper rein dargestellt werden können. Aber der Nachweis des Antikörpers erstreckt sich nur auf die Hämolyse-reaktion, nicht auf die Präzipitine. Wie schon von vielen Autoren vermutet und besonders von *Torikata*<sup>13)</sup> betont worden ist, könnte man diese, wenn man eine bestimmte konzentrierte Menge des Präzipitins isolieren könnte, auch mit der Präzipitinreaktion nachweisen. Weil für die Reaktion eine gewisse Menge von Präzipitinen nötig ist, konnte angesichts der Schwierigkeit, diese zu erhalten, ihre Isolierung bis heute nicht erzielt werden. Der Isolierung des Präzipitins stehen noch viele Schwierigkeiten entgegen. Ich will

sie hier kurz anführen.

Erstens: das Antigen, im Gegensatz zu den anderen Immunreaktionen, ist nicht korpuskulär, sondern eine Kolloidalflüssigkeit. Bei der Mischung mit entsprechendem Immunserum findet die Fällung zwar statt, aber der Niederschlagsstoff ist schwer aus diesem Kolloidalmilieu zu isolieren, weil es schwer ist, eine genügend grosse Menge des Präzipitats durch die Zentrifuge zu erhalten. Es ist auch nicht wahrscheinlich, dass man nach vielmaligem Waschen dieses leichte Präzipitat gewinnen könnte.

Deshalb habe ich auf Rat von Prof. *Ogata* das Antigenserum getrocknet und korpuskuläres Serumpulver als bindendes Antigen angewendet.

Bei diesem Serumpulver habe ich noch den einen Vorteil gehabt, dass bei Isolierung der Antikörper das Antigeneiweiss, das natürlich auch für die Endreaktion hemmend wirkt, weniger in die Isolierungsflüssigkeit übergeht.

Zweitens: wir müssen bei Isolierung des Präzipitins möglichst die eiweisslöslichen Chemikalien, wie Alkali oder Säure, vermeiden, weil doch das Serumeiweiss leichter löslich ist als Bakterieneiweiss oder Organeiweiss.

Drittens: es bleibt eine gewisse Schwierigkeit für den Nachweis des isolierten Präzipitins, weil die Präzipitinreaktion nach der Ringprobe ganz anders ist als bei anderen Immunkörpern. Bei der Titerbestimmung der anderen Immunkörper braucht man ihr Verdünnungssystem, und die Antigenmenge bleibt immer konstant. Bei der Präzipitinprobe muss man aber gerade umgekehrt vorgehen, um den Präzipitinring in der Grenzschicht zu erhalten. Das Immunserum wird dabei unverdünnt in die untere Schicht hineingegossen, und darüber bringt man die verdünnten Antigene.

Deswegen muss die untere Kolloidalschicht schwerer sein als die Antigenschicht. Ich habe daher die isolierten Präzipitine geeignetem Kolloidalmilieu (Normalserum, Stärkelösung usw.) beigemischt und die Reaktion geprüft. (*Die genaue Beschreibung dieses Vorganges wird von Prof. Dr. M. Ogata gegeben.*)

## Technik.

### I Vorbereitung.

#### A. Immunisierung und Titerbestimmung.

Ich habe mit Rinderserum das Kaninchen oft (über 5 mal) immunisiert und nach 7 Tagen aus der letzten Injektion den Titer nach der *Uhlenhutschen* Methode bestimmt. Es ist unter obigen Bedingungen nötig, dass für meine Isolierungszwecke der Titer des Immunserums

mindestens über 10,000—20,000 mit Ringprobe ist. Die Beobachtung des Präzipitates habe ich bei Zimmertemperatur 1/4—1/2 Stunde lang angestellt.

### B. Antigene für Bindungszwecke.

Das frische Rinderserum wurde in Zimmertemperatur mit Hilfe des elektrischen Fächers getrocknet und danach fein pulverisiert.

Dieses Serumpulver wird im Exikator aufbewahrt, einen Teil davon habe ich benützt.

### C. Bindungsversuche.

1. Die Mengenverhältnisse der Antigene für die Isolierungszwecke. *Eisenberg* hat als erster konstatiert, dass das Absorptionsvermögen der Antigene sich bei Präzipitinvermehrung bis zu einem bestimmten Grade vermehrt, d. h. man kann mit einer Antigenmenge noch mehrere Antikörpereinheiten absorbieren, wenn das Immunsorium stärker ist.

Dieser Befund wurde von *Müller* bei Milchlaktoserumpräzipitin, von *Cattani* bei Hepatoantiserum, von *Torikata* bei Bakterienpräzipitin bestätigt. Noch früher wurde diese Tatsache genau nach *Eisenberg* und *Volk* bei Agglutinin studiert, und *Bordet*, *Ehrlich*, *Madsen*, *Arrhenius*, *Danysz*, *Morgenroth*, *Landsteiner* etc. haben diese Mengenverhältnisse nachgewiesen.

Für Isolierungszwecke ist dieser Befund deshalb verwendbar, weil bei übersättigtem Antigen viel leichter als bei nur wenig mit Antikörper gebundenem ein Wiederfreimachen möglich ist.

Ich habe deshalb hoch beladenes Präzipitat für die Isolierung benützt, lies es mit verschiedenen Antigenmengen bei bestimmten Ambozeptoreinheiten sich verbinden und studierte die Bindungsverhältnisse.

Zu diesem Zwecke habe ich durch Untersuchung der Abgüsse die Reste des Präzipitins konstatiert. Dabei fand ich für 1 cc Immunsorium 0.01 gr getrocknetes Antigenpulver als geeigneten Bindungsfaktor.

Tabelle 1 zeigt genau diese Mengenverhältnisse.

Tabelle 1.

Die Mengenverhältnisse des Antigens für die Isolierungszwecke.

Menge des Antigens f. 1 cc Antiserum		Verdünnungsgrad des Antigens									
		10	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000
0.005	Abguss	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
0.01	Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.02	Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.05	Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.1	Abguss	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Originalimmunsorium		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

2. Die für die Bindung nötige Zeitdauer. Mit obiger Antigenmenge geht die Bindung beider Faktoren so überaus schnell, dass dabei ein langes Stehen dieser Mischung nicht nötig ist und nach 15 Minuten kein grosser Unterschied mehr gefunden werden kann.

Dies Verhältnis ist aus Tabelle 2 zu ersehen.

Tabelle 2.

Einfluss der Zeiten auf die Bindung von Antigen und Antikörper.

Zeit	Verdünnungsgrad des Antigens									
	10	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000
1/4 St. Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1/2 St. Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1 St. Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2 St. Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24 St. Abguss	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Originalimmunserum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

## II Isolierungsmethode.

### A. Bindung.

0.04 gr Serumpulver wurden in 4 cc Immunserum gemischt, darauf wurde das Gemisch gut geschüttelt. Dann wurde es bei 37°C im Brutofen 2 Stunden lang digeriert. Während dieser Digerierungszeit habe ich das Gemisch wiederholt gut geschüttelt; dabei hatte sich in dem Gemisch einiges flockiges Präzipitat schon gebildet. Dieses flockige Präzipitat taucht in dem Medium unter, doch konnte ich es durch starke Zentrifugierung unten absetzen. Danach wurde der Abguss mit Vorsicht in ein anderes Rohr abpipettiert, um den nicht gebundenen Überschuss des Präzipitins zu prüfen.

### B. Waschung.

Der Bodensatz, d. h. die gebundenen Präzipitine, wurde nach Zusatz von 0.85%iger Kochsalzlösung 3 mal abzentrifugiert, und das obenstehende Waschwasser jedesmal gut abpipettiert, um den Serumrest möglichst zu entfernen. Bei dieser Behandlung wurden auch einige locker gebundene Präzipitine frei, doch nach 3 maliger Waschung waren keine nachweisbaren Präzipitine im Waschwasser mehr vorhanden.

Dieses serumfreie Präzipitat wurde mit destilliertem Wasser oder mit Kochsalzlösung (Kontrollprobe) bis zur ursprünglichen Menge (4 cc Serummenge entsprechend) aufgefüllt.

Tabelle 3.  
Präzipitin im Waschwasser.

Zahl der Waschun- gen		Verdünnungsgrad des Antigens									
		10	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000
1	Waschwasser	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Waschwasser	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Waschwasser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Originalimmunserum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Abguss	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

### C. Isolierung.

Nach kräftigem Schütteln wurden die beiden Röhren in dem Wasserbad bei 53°C 1/2 Stunde lang digeriert, und während dieser Digerierung wurde dieses Gemisch bisweilen ebenfalls geschüttelt. Danach wurde dieses Gemisch durch Zentrifugierung wieder in Bodensätze und Abgüsse getrennt. Für die Präzipitinreaktion ist es nötig, dass in beiden Medien möglichst gleiche Salzmengen enthalten sind, um die Diffusion beider Kolloidalschichten zu vermeiden.

Zweitens ist, um die feinen Präzipitatkörnchen an der Grenzschicht festzuhalten, eine bestimmte Viskosität beider Medien nötig.

Daneben ist es erwünscht, dass das spezifische Gewicht beider Medien sich unterscheidet, natürlich muss die obere Antigenschicht leichter sein als die untere Immunkörperschicht. Um obigen Bedingungen zu entsprechen, habe ich der isolierten Flüssigkeit (destilliertem Wasser) Kochsalzkrystalle bis zu 0.85% zugesetzt. Mit Rücksicht auf die eben erwähnten zwei Faktoren habe ich mit normalem Kaninchenserum oder 10.0%igem Meerschweinchenserum oder einem anderen Kolloidmedium, wie 1.0%iger Stärkelösung unter Beibehaltung von 0.85% Kochsalz diese isolierten Abgüsse verdoppelt. Ein Teil dieses verdünnten Präzipitins wurde wie bei der *Uhlenhutschen* Originalmethode in Kapillarreagenzgläser verteilt.

Zur Vorsicht fügte ich die Antigensera hinzu und wartete die kommende Reaktion ab. Das erste Resultat ist in Tabelle 4 angezeigt. Wie oben ersichtlich ist, kann man bei Isolierung des Präzipitins die Vorzüge des destillierten Wassers erkennen, ebenso auch bei anderen Immunkörpern.

### Wirkung der Temperatur.

Nach *Landsteiner* geht bei Isolierung des Agglutinins die Menge des freigewordenen Antikörpers proportional mit der Temperaturhöhe

Tabelle 4.  
Die isolierten Präzipitine.

		Verdünnungsgrad des Antigens									
		10	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000
Isolierte	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Präzipitine	K	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Originalimmenserum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Abguss		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

A = destilliertes Wassermedium.

K = Kochsalzmedium.

des Mediums. Nach der Untersuchung von *Isreal Weinstein* ist zur Trennung des Agglutinins eine Temperaturhöhe von 37°C bis 54°C erforderlich, aber bei diesen Wärmegraden hatte er keine grossen Unterschiede für die Isolierung gefunden. Auch nach *Furuhata* (bei Hämooagglutinin) und *Ogata* (bei Bakterienagglutinin) wurde die geeignete Temperatur für die Isolierung mit 42°C angegeben, aber von keinem der beiden Forscher wurde über den Parallelismus zwischen Temperatur und Menge des isolierten Agglutinins etwas Bestimmtes ausgesagt. Bei obigen 3 Isolierungsmethoden wirken auch andere Faktoren mit, wie die Chemikalien, jedoch fehlt der Parallelismus zwischen Temperaturhöhe und der isolierten Antikörpermenge.

Wenn man dagegen zur Isolierung nur einen Faktor anwendet, z. b. nach *Kosakai* bei Hämolyseisolisierung, so findet man diese Temperaturwirkung viel deutlicher. Je mehr die Temperatur steigt, desto mehr isolierte Hämolyse kann man bekommen. Dies gilt auch für meine Präzipitinisolisierung, weil dabei für die Trennung nur die Temperaturwirkung als einziger Faktor in Betracht kommt.

Ich habe in diesen Untersuchungen die Temperatur von 37°C bis 55°C graduell gesteigert und dabei die Menge des freigewordenen Präzipitins gemessen. Wie aus untenstehender Tabelle 5 zu ersehen ist, habe ich den Parallelismus zwischen Temperaturhöhe und isolierter Präzipitinmenge gefunden. Eine Temperatur über 55°C konnte man für die Isolierung nicht anwenden, weil eine höhere Temperatur schädigend wirkt; bei 56°C habe ich nur noch geringe Mengen Präzipitin bekommen.

#### Die zur Isolierung nötige Zeitdauer.

In dem vorangegangenen Kapitel habe ich schon die für Isolierung des Präzipitins geeigneten Bedingungen, wie salzfreies Medium und die nötige Temperatur, gefunden; hier werde ich die Zeitdauer, die

Tabelle 5.  
Temperatureinfluss auf die Präzipitinisolierung.

Temperatur	Medium	Verdünnungsgrad des Antigens										
		10	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000
37°C	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	K	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42°C	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	K	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53°C	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	K	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55°C	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	K	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Originalimmunserum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Abguss		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

A = destilliertes Wassermedium.

K = Kochsalzmedium.

zur Isolierung erforderlich ist, angeben. Ich vermute, dass die Wiederabtrennung des gebundenen Präzipitins aus Antigen in dem Augenblick vor sich geht, in dem das Medium für diese Bedingungen unzweckmässig wird. Denn ich habe keinen grossen Unterschied über 1/4 Stunde hinaus bei der Isolierung gefunden.

In Tabelle 6 zeigen sich diese Beziehungen bei 1/4, 1/2 und 1 Stunde, natürlich vorausgesetzt, dass die anderen Bedingungen die gleichen bleiben.

Tabelle 6.  
Einfluss der Digerierungszeit auf die Präzipitinisolierung.

Zeit	Medium	Verdünnungsgrad des Antigens										
		10	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	25,000
1/4 St.	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	K	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1/2 St.	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	K	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1 St.	A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	K	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Originalimmunserum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Abguss		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

A = destilliertes Wassermedium.

K = Kochsalzmedium.

## Über die Mengenverhältnisse des freigewordenen Präzipitins.

### (Quotient der Bindung und Isolierung)

Es ist klar geworden, dass nach der *Uhlenhutschen* Originalmethode das Mengenverhältnis des Präzipitins nicht erkennbar ist, weil bei ihr nur die Reagierbarkeit des Immunserums für Antigen angezeigt wird. (*Vergleich: Die Präzipitinbestimmung aus dem Immunkörper, Prof. Dr. M. Ogata.*) Bei meiner Isolierung erreicht der Titer des isolierten Präzipitins in Tabelle 4 bei halbstündiger Isolierung eine solche Höhe, dass der isolierte Präzipitintiter ungefähr bis zur Hälfte des Originalserums steigt. Bei anderer Antikörperisolierung nach derselben Methode, wie bei Agglutinin nach *Ogata*, zeigt der Titer der isolierten Agglutinine, aus den gebundenen Agglutininen selbst berechnet, noch geringere Verhältnisse, und bei Originalserum noch weiter eine schlechtere Isolierung. Deswegen habe ich zur Kontrolle, ob dabei der Rest des Präzipitins mitwirken kann, die Verdünnung des Originalserums mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeführt und gefunden, dass bei stark verdünntem Immunserum das Phänomen der Präzipitation ganz anders auftritt. Bei über 100 maliger Verdünnung des Originalserums tritt die Präzipitinreaktion nur bei geeigneter Bindungszone der Antigene auf, deshalb kann ich behaupten, dass die isolierten Präzipitinreaktionen nicht aus Serungemisch entstehen, sondern infolge wieder freigewordenen Präzipitins auftreten müssen, weil bei dieser Isolierungsmethode nach der Waschung das Originalserum über tausendmal verdünnt und bei so stark verdünntem Serum die Präzipitinreaktion nicht mehr sichtbar ist.

Deswegen habe ich nach der *Ogataschen* Methode die quantitativen Mengenverhältnisse ausgerechnet und ungefähr das gleiche Resultat erzielt wie bei Agglutinin.

Das Immunserum zeigt mit Originalmethode den Titer 1:10,000. Durch Verdünnung mit 10.0% Meerschweinchenserum reagiert das Immunserum bis 1:500 bei Antigenverdünnung (1:2,500), die als Bindungszone des Antigens anzusehen ist. Deshalb habe ich den Titer 1:500 festgesetzt.

Nach Digerierung mit dem Antigen wird der Abguss abgetrennt und wieder der Titer nach derselben Methode bestimmt. Dabei habe ich nach der originalen Methode bei 1:100, nach der Verdünnungsmethode bei doppelter Verdünnung des Abgusses keine Reaktion beobachtet, und deshalb den Titer 1:1 bestimmt. Deswegen binden sich ungefähr alle Präzipitine mit Antigenpulver, wenn sich bei der Originalmethode eine starke Reaktion bei 1:100 sichtbar angezeigt hätte. Der Bindungsquotient ist also  $499/500$  angerechnet. In dem

isolierten Medium zeigt sich die Präzipitinreaktion bis zur Antigenverdünnung 1 : 5,000, deshalb ist nach der Originalmethode ungefähr 1/2 des Präzipitins als abgetrennt anzusehen. Nach der Verdünnungsmethode reagiert es aber 1 : 4 bei Bindungszone, deshalb ist der Titer 1 : 4 und der Quotient des freigewordenen Präzipitins 4/499 angerechnet.

Am Ende dieses Kapitels will ich noch über die Spezifität dieser Methode einiges hinzufügen, weil bei diesen Versuchen die mechanische Absorption des Immunkörpers durch Antigen berücksichtigt werden muss.

Deshalb habe ich statt des entsprechenden Rinderserumpulvers Pferdeserumpulver bei der Bindung angewendet und bei gleicher Behandlung die Isolierung ausgeführt.

Bei dieser Behandlung bindet sich natürlich das Pferdeserumpulver noch viel schlechter als das Rinderserumpulver, und ich konnte im isolierten Medium das Präzipitin nicht nachweisen, wie Tabelle 8 zeigt.

Tabelle 7.  
Quotient der Bindung und Isolierung.  
(Bestimmung nach *Ogatascher* neuer Methode)

	Verdünnungsgrad des Immunkörpers									
	1	2	4	8	10	25	50	100	250	500
Isoliertes Präzipitin	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Originalimmunserum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Abguss	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bindungsquotient: 499/500    Quotient der freigewordenen Präzipitine: 4/499  
Bindungszone: 1:2,500

Tabelle 8.  
Bindung und Isolierung mit heterogenem Antigen.  
(Pferdeserumpulver)

	Verdünnungsgrad des Antigens (Rinderserum)									
	10	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000
Originalimmunserum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Abguss	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Isoliertes Präzipitin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Immunsrum: Antirinderkaninchenserum.

### Über den komplementbindenden Ambozeptor.

Es ist schon viel darüber gestritten worden, ob die Präzipitine und die komplementbindenden, d. h. die *Bordet* und *Gengouschen* Antikörper

dieselben Immunkörper sind. Nach vielen Untersuchungen mit dem Serum oder mit dem Organeiwiss haben wir in unserem Institut bewiesen, dass nach der Verdünnungsmethode unsere Reaktionen sowohl qualitativ als auch quantitativ beide übereinstimmen können. (siehe *Präzipitinbestimmung aus dem Immunkörper*, 2. Mitteilung von Prof. Dr. M. Ogata.) Auch von anderem Gesichtspunkt aus habe ich diese Ansicht gestützt, weil ich bei dem Versuche dieser Isolierung den komplementbindenden Ambozeptor gleich in freigewordenen Präzipitinen ebenfalls nachgewiesen habe. Nach Isolierung auf dieselbe Methode habe ich dem Medium des Präzipitins nur das Kochsalz bis zum physiologischen Kochsalzgehalt hinzugefügt. Diese Flüssigkeit wird, wie die nächstfolgende Tabelle zeigt, abgeteilt, und dazu werden die Antigene und Komplemente hinzugefügt. Nach einstündiger Digerierung bei 37°C wird das hämolytische System beigemischt und 2 Stunden lang in den Brutofen gestellt. Zu meiner grossen Überraschung habe ich dabei auch das positive Resultat nachgewiesen. Bei konzentriertem Antigen erweist sich die Komplementbindung als ungenügend zur Präzipitinreaktion, aber bei verdünntem Antigen wirkt sie etwas stärker.

Tabelle 9.

Komplementbindungsversuch mit isolierter Präzipitinflüssigkeit.

	Verdünnungsgrad des Antigens							
	10	50	100	500	1,000	2,000	5,000	10,000
Komplementbindung	-	-	+	+	+	+	+	-
Präzipitinreaktion	+	+	+	+	+	+	-	-

**Stickstoffbestimmung.**

Man hat verschiedene Versuche zur Isolierung des Immuserum enthaltenden Immunkörpers angestellt, um das übrigbleibende Eiweiss im Serum zu beseitigen. Meine zu diesem Zwecke vorgenommenen Experimente haben bei Isolierung des Präzipitins im destillierten Wassermedium bessere Resultate als im Kochsalzmedium ergeben.

Ich habe nach der *Kjeldahlschen* Methode den Stickstoff in verschiedenen Medien für die Präzipitinisolierung bestimmt. Die Stickstoffmenge der freien Präzipitin enthaltenden Flüssigkeit ist 0.08 gr in 100.0 cc bei destilliertem Wassermedium und 0.1gr bei Kochsalzmedium, dagegen enthält das ursprüngliche Serum 1.01 gr Stickstoff. Bei diesen Versuchen zeigt sich, in Übereinstimmung mit den Resultaten von *Kosakai*, *Furuhata*, *Ogata* und *Kageyama*, dass der Antikörpergehalt mit dem Eiweissgehalt des Mediums nicht parallel geht. (siehe *Tabelle 10*)

Tabelle 10.  
Stickstoffbestimmung.

	Präzipitintiter	Stickstoffmenge im 100 cc
Originalimmunserum	1 : 10,000	1.01
Isoliertes Präzipitin (A)	1 : 5,000	0.08
Isoliertes Präzipitin (K)	1 : 500	0.1

(A) = destilliertes Wassermedium. (K) = Kochsalzmedium.

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

### Zusammenfassung.

1. Das Serumpräzipitin isoliert sich reversibel aus Antigen- und Antikörperbindung.
2. Die Isolierungsmethode und der Nachweis des Präzipitins sind noch schwieriger als die anderer Immunkörper, und deshalb sind folgende Bedingungen zu berücksichtigen.
  - a) Das Immunserum muss eine genügende Präzipitinmenge enthalten. Diese wird erst nach vielmaliger Immunisierung erzielt. Die Präzipitinmenge ist nach der neuen Präzipitinnmessung von *Ogata* bestimmbar.
  - b) Zu Isolierungszwecken wird das Serumantigen durch Trocknen pulverisiert. Bei Mischung mit dem Immunserum wird eine möglichst kleine Menge davon benützt.
  - c) Das salzfreie Medium ist viel zweckmässiger für die Isolierung als das salzhaltige, am zweckmässigsten ist destilliertes Wassermedium.
  - d) Die Temperatur zur Isolierung beträgt zwischen 53°C—55°C.
  - e) Als Zeitdauer für die Isolierung genügen 1/4—1/2 Stunde.
3. Die Eiweissmenge des isolierten Mediums geht nicht parallel mit der Präzipitinstärke.
4. Den komplementbindenden Ambozeptor kann man gleichzeitig in dem isolierten Präzipitinmedium nachweisen, sogar im gleichen Mengenverhältnis.
5. Aus obiger Isolierung kann man die Identifizierung beider Antikörper nachweisen.

### Literatur.

- <sup>1</sup> *Pick*, Beiträge z. Chem., Physiol. u. Pathol., Vol. 1, 1901, s. 351. — <sup>2</sup> *Widal et Sicard*, Ann. de L'inst. Pasteur, T. 100, 1897, p. 33. — <sup>3</sup> *Tizzoni und Cattani*, Centralbl. f. Bakt., Bd. 9 u. 10, 1891, s. 189 u. 33. — <sup>4</sup> *Hahn und Trommsdorf*, Münch. med.

Wochenschr., März 1900, s. 415. — <sup>5</sup> *Landsteiner* und *Jagic*, Wien. klin. Woch., 1904, s. 63. — <sup>6</sup> *Michaelis*, Zeits. f. klin. Med., Bd. 56, 1905, s. 409. — <sup>7</sup> *Kosakai*, Journal of Imm., Vol. 3, 1918, p. 109. — <sup>8</sup> *Furukata*, Japan med. World, No. 6, 1921, p. 1. — <sup>9</sup> *Ogata*, Zeits. f. Imm., Bd. 39, 1924, s. 270. — <sup>10</sup> *Miwa*, Eiseigakuden-enbiogakuzasschi, Bd. 17, 1922, s. 179. — <sup>11</sup> *Hunton*, Journal of Imm., Vol. 6, 1921, No. 2. — <sup>12</sup> *Kageyama*, Okayama Igakkaizasschi, Nr. 437, 1926, s. 684. — <sup>13</sup> *Torikata*, Koktopräzipitinogene und Koktoimmunogene. — <sup>14</sup> *Weinstein, I.*, Journal of Imm., Vol. 3, 1918, s. 17.

---