

日本外科寶函 第20卷 第1號
ARCHIV FÜR JAPANISCHE CHIRURGIE

XX. BAND. 1. HEFT, 1. JANUARY 1943.

原 著

Die Impedinerscheinung des Toxins von
WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen
bei der Phagocytose in vitro (I. Teil)

Von

Dr. S. Yamane.

(Aus der chirurgischen Klinik der Mandschurischen Medizinischen Fakultät, Mukden)

I. Mitteilung. Nachweis des in dem Toxin enthaltenen
Impedins, das die normale Phagocytose hemmend wirkt.

Testmaterialien:

1) FN. Eine 14-tägige Leber-Leber-Bouillonkultur von WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen (Stamm "Pekin" von der Militäraerztlichen Bildungsanstalt, dessen Toxizität mittels Meerchweinchenpassage erhöht worden war) wurde durch eine Filterkerze getrieben und das Filtrat (FN) in 0.5% Karbolsäure versetzt und mit Natrium carbonicum die Reaktion schwach alkalisch gemacht.

2) FK. Das native Filtrat (FN) wurde in einem bei 100° C siedenden Wasserbade 30 Minuten lang abgekocht, wobei eine Trübung noch ein Niederschlag entstand.

3) Staphylokokken. Die Aufschwemmung der 24-stündigen Agarkultur auf physiologischer Kochsalzlösung (Kokkengehalt 0.00245 cc in Präzipitometer nach Prof. R. Torikata) wurde, sterilisiert bei 60° C, 30 Minuten lang abgekocht und mit 0.5% Karbolsäure versetzt.

4) Leukozyten. Wir brauchen Ascytes, die 4 Stunden nach der Injektion von 10 cc neutraler Bouillon in die Bauchhöhle der Meerschweinchen abpunktiert wird.

Versuchsordnung.

Wir prüfen nach WRIGHT die die normale Phagocytose in vitro fördernde Wirkung der Testmaterialien. Dabei variierten wir die Menge der Testmaterialien von 0.1, 0.2, 0.4, und 0.8 cc, um ihre Phagocytose fördernde Eigenschaft in ihrem maximalen Wert miteinander vergleichen zu können.

Ergebnisse der Versuche:

Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Testdosis	0.1		0.2		0.4		0.8		
Art des Antigen	FN	FK	FN	FK	FN	FK	FN	FK	Bouillon
Phagocytat	73.3	85.9	78.2	103.6	67.6	80	58.6	69	44

1) Der Grad der Phagocytose, der sich im Phagocytat dokumentiert, ist immer grösser bei

FK als bei FN, ohne Ruecksicht auf die Menge des Antigens. Dies zeigt das Vorhandensein des Impedin im nativen Filtrat (FN).

2) In Bezug auf die Menge des Antigens konstatierten wir das Phagocytat sowohl bei FK als auch bei FN mit 0.2 cc immer als am staerksten und mit 0.1 cc als naechst stark, aber mit 0.4 und 0.8 cc als vermindert.

3) Die Phagocytose ist immer bei beiden Testmaterialien (FN, FK) groesser als bei Bouillon.

II. Mitteilung. Die optimale Abkochungszeit der Toxine zur totalen Vernichtung des Impedin.

Es steht fest, dass die Toxine das Impedin enthalten. Im folgenden soll die optimale Abkochungszeit der Toxine zur voelligen Vernichtung des Impedin festgestellt werden.

Testmaterialien.

1) FN, wie in der I. Mitteilung angegeben.

2) FK. Das native Filtrat wurde in einem bei 100° C siedenden Wasserbad stufenweise verschieden lange Zeit (von 10 Minuten an bis 60 Minuten) abgekocht. Dabei entstand weder eine Truebung noch ein Niederschlag.

3) Staphylokokken, wie in der I. Mitteilung angegeben.

Versuchsordnung.

Als Testdosis zogen wir laut der I. Mitteilung 0.2 cc heran, weil sich bei dieser Dosis immer die maximale Antigenavitaet herbeifuehren liess. Sonstiges ist wie in der I. Mitteilung angegeben.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt :

Abkochungszeit der Testmaterialien	0	10	20	30	40	60	B
Phagocytat	73.6	80.2	95.0	108.6	86.3	75.6	45.2

Zusammenfassung.

1) Verglichen mit der Groesse der Phagocytat, zeigte das abgekochte Filtrat immer groesser als das native Filtrat, dabei zeigte sich weiterhin, dass je laenger die Abkochungszeit bis zu 30 Minuten ist, desto staerker die Phagocytose ist. Das 30 Minuten lang abgekochte Filtrat zeigt die geroesste Phagocytose.

2) Wenn die Abkochungszeit laenger als 30 Minuten ist, d. h. bei 40 und 60 Minuten, wird die Phagocytose schwaecher. Trotzdem zeigt das 60 Minuten lang abgekochte Filtrat eine groessere Phagocytose als das native Filtrat.

3) Daraus kann man schliessen, dass das native Filtrat das Impedin erhaelt und dieses durch 30 Minuten lang Abkochung voellig vernichtet, wobei die Antigenavitaet voellig erhalten bleibt.

Die Impedinerscheinung des Anatoxin von WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen bei der Phagocytose in vitro (II. Teil).

I. Mitteilung. Nachweis des in dem Anatoxin enthaltenen Impedin, das auf die normale Phagocytose hemmend wirkt.

In dem I. Teil dieser Untersuchung haben wir nachgewiesen, dass das Toxin von WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen das Impedin erhalten bleibt. Im folgenden soll das Anatoxin das Impedin enthalten festgestellt.

Testmaterialien.

- 1) FN.
- 2) FK, wie in dem I. Teil angegeben.
- 3) AN. Das native Filtrat von Gasbacillenkultur ohne Karbolisierung wurde in 0.5% Formollesung (die Formalin in 35 Volumprozent enthaelt) versetzt und 4 Wochen lang bei 37°C gelagert, wobei weder eine Truebung noch ein Niederschlag entstand.
- 4) AK. Das native Anatoxin wurde in einem bei 100°C siedenden Wasserbad 30 Minuten lang abgekocht, wobei weder eine Truebung noch ein Niederschlag entstand.
- 5) Bouillon. Ein Teil von Leber-Leber-Bouillon, der zur Kultur der WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen gebraucht wird.
- 6) Bouillon, in Formollesung versetzt. Ein Teil von Leber-Leber-Bouillon in 0.5% Formollesung versetzt und 4 Wochen lang bei 37°C gelagert, wobei weder eine Truebung noch ein Niederschlag entstand.

Experiment 1. Die Toxizitaet der Testmaterialien durch die Dosis letalis minimalis fuer normale Mäuse ausgedrueckt.

ausgedrueckt.

Als Versuchstiere haben wir Mäuse, die ungefaehr gleiches Koerpergewicht haben, verwendet, ihnen die Testmaterialien in die Bauchhoehle eingespritzt und den Ausgang 24 Stunden nach der Injektion beobachtet.

Ergebnisse.

Art des Antigen	FN	FK	AN	AK	B	B(F)
D. 1. m.	1.0	1.2	2.3	2.5	6.0	5.0

Die Toxizitaet wurde bei FK in der Ratio 1.00 : 0.83, bei AN 1.00 : 0.43, bei AK 1.00 : 0.40 reduziert. Dies zeigt, dass die Toxizitaet durch die Formalinmethode in einem groesseren Masse als durch die Kochmethode vermindert wird.

Experiment. 2.**Testmaterialien.**

- 1) AN.
- 2) AK. wie in der I. Mitteilung angegeben.
- 3) Leukocyten, wie in der I. Teil angegeben.
- 4) Bouillon, wie in der Experiment I (I. Mitteilung) angegeben.

Versuchsordnung.

Wie in dem I. Teil angegeben, nur anstatt FN und FK das native und gekochte Anatoxin (AN, AK) als Antigen verwendet.

Ergebnisse.

Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt :

Antigendosis	0.1		0.2		0.4		0.8		Kontrol
Antigenarten	AN	AK	AN	AK	AN	AK	AN	AK	B
Phagocytat	57.3	77.2	67.2	88.3	57	74.3	54.3	64.6	43

Daraus kann man konstatieren :

1) Bei dem 30 Minuten lang abgekochten Anatoxin sind die Phagocytate immer groesser als bei dem nativen Antigen.

2) Die Antigenavitaet ist bei der Testdosis 0.2 cc am groessten und zwar bei AN 67.2 bei AK 88.3, d. h. 100 : 131.

Aus den Versuchsergebnissen der bisherigen Experimente kann man folgende, Tabelle zusammengestellt :

Art des Antigen		FN	FK	AN	AK
Toxizitaet nach D.l.m. fuer Maeuse		1.0	0.833	0.434	0.400
Testdosis	0.1	162.0	195.2	133.2	179.5
bei der	0.2	186.8	235.4	157.2	205.3
Phagocytose		(79.9)	(100)	(76.5)	(100)
in	0.4	153.1	181.1	132.5	172.0
vitro (ccm)	0.8	133.1	156.8	126.2	150.9
Maximale Impedinerscheinung		20.3	—	23.5	—
Die maximale Antigenavitaet ohne Beruecksichtigung der Toxizitaet		100	126	84.1	109.9
Die maximale Antigenavitaet bei gleicher Toxizitaet		100	151.2	193.7	274.7

Betreffend die WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen stellt sich folgendes heraus :

- 1) Durch die Anatoxinmethode wurde die Toxizität des Primaertoxins (AN) auf 0.43 reduziert.
- 2) Bei der Anatoxinmethode wird nicht nur die Toxizität, sondern auch die Antigenavität reduziert, während allerdings die Toxizität in viel grösserem Masse beeinflusst wird.
- 3) Ohne Berücksichtigung der Toxizität liess sich die maximale Antigenavität folgendermassen ordnen :
FN (1.00), FK (1.26), AN (0.84), AK (1.10).
- 4) Bei der Berücksichtigung der Toxizität liess sich die Antigenavität der Testmaterialien folgendermassen ordnen :
FN (1.00), FK (1.51) AN (1.94), AK (2.75).
- 5) Das Impedin wird durch die Anatoxinmethode nicht vernichtet.
- 6) Durch das Abkochen des Anatoxin 30 Minuten lang in siedendem Wasserbad gewinnt man die besten antigenen Materialien, die einerseits die grösste Antigenavität und andererseits die kleinste Giftigkeit haben.
- 7) Das Anatoxin, trotzdem seine Giftigkeit zu $\frac{1}{2}$ reduziert ist, erhielt mehr Impedin als das Primaertoxin. So ist die Impedinwirkung ganz anders als die Toxinwirkung.

II. Mitteilung. Die optimale Abkochungszeit des Anatoxin zur totalen Vernichtung des Impedin.

Es steht fest, dass das Anatoxin trotz der beträchtlichen Reduzierung der Giftigkeit noch immer das Impedin in vollem Masse wie beim Primaertoxin erhält. Im folgenden soll die optimale Abkochungszeit des Anatoxin zur totalen Vernichtung des Impedin festgestellt werden.

Testmaterialien.

- 1) AN, wie in der I. Mitteilung angegeben.
 - 2) AK. Das Anatoxin wird in einem bei 100°C siedenden Wasserbad stufenweise verschieden lange Zeit (von 10 Minuten bis 60 Minuten) abgekocht. Dabei entstand weder eine Trübung noch ein Niederschlag.
 - 3) Staphylokokken, wie im Experiment 1 angegeben.
- Versuchsordnung, wie im I. Teil angegeben. Als Testmaterial zogen wir jetzt das Anatoxin heran.

Die Ergebnisse der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt :

Art des Antigen		Primaertoxin (FN)	4 Wochen gelagertes Anatoxin (AN)
Toxizitaet nach D.I.m. fuer Maeuse (30 Minuten gekochte Filtrat)		0.833	0.400
Abkochungszeit (Minuten)	0	162.8 (67.7)	137.1 (64.1)
	10	177.4 (73.8)	159.9 (73.8)
	20	210.1 (87.4)	172.9 (80.4)
	30	240.2 (100)	213.7 (100)
	40	190.9 (79.4)	167.6 (78.8)
	60	167.2 (69.6)	148.7 (69.5)
Maximale Impedinwirkung		32.3%	35.9%
Maximale Antigenavitaet nach Vernichtung des Impedin		100*	88.9*
Maximale Antigenavitaet bei Vernichtung des Impedin sowie bei gleicher Toxizitaet		100**	185.9**

* Prozentwerte der in 30 Minuten lang abgekochten Testmaterialien enthaltenen Phagocytaet.

** Prozentwerte der nach der Toxizitaet des gekochten Toxin und des gekochten Anatoxin gezaehlten Phagocytaet.

Zusammenfassung.

- 1) Das 4 Wochen gelagerte Anatoxin enthielt das gleichartige Impedin wie das Primaertoxin
- 2) Diese Impedinwirkung wird durch 30 Minuten langes Abkochen total vernichtet, wobei das gekochte Anatoxin die maximale Antigenavitaet darstellt.
- 3) Durch die Anatoxinmethode faellt die Toxizitaet des Primaertoxin von 100 auf 48, gleichzeitig die maximale Antigenavitaet von 100 auf 88.9 ab.
- 4) Die Verminderung der Antigenavitaet ist viel geringer als die Herabsetzung der Toxizitaet, so duerfte bei gleichen Toxizitaet die immunologische Wirkung des Anatoxin (evzl. gekochtes Anatoxin) groesser sein als die des gekochten Toxins.
- 5) Das Impedin wird durch die Anatoxinmethode keineswegs vernichtet, also gilt die Impedintheorie auch fuer das Anatoxin.

Der Unterschied der immunologischen Wirkung bei dem Anatoxin und dem Toxin von WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen (III Teil).

I. Mittheilung. Die immunisierende Wirkung bei gleicher Testdosis und ungleicher Toxizitaet.

Es steht fest, dass wie in dem Toxin auch in dem Anatoxin das Impedin erhalten ist und

dass diese Impedinwirkung durch 30 Minuten langes Abkochen total vernichtet wird.

Im folgenden sollen die Einflüsse auf die allgemeine Immunität des nativen und abgekochten Toxins und Anatoxins miteinander verglichen werden.

Testmaterialien.

- 1) FN.
- 2) FK, wie in dem I. Teil angegeben.
- 3) AN.
- 4) AK, wie in dem II. Teil angegeben.

Experiment 1: Testdosis 0.5 cc

Die Versuchskaninchen wurden in 4 Gruppen zu je 2 eingeteilt. Man injiziert FN (Gruppe A), FK (Gruppe B), AN (Gruppe C), AK (Gruppe D) je 0.5 cc in die Auricularvenen. Blutentziehung 10 Tage nach der Injektion aus den Halsarterien und das Blutserum ausscheiden lassen. Das Blutserum wurde in 0.5% Karbolsäure versetzt und im Wasserbad 30 Minuten lang bei 56°C erhitzt, d. h. inaktiviert. Wir haben jeden Morgen die Körpergewichtsschwankung der Versuchstiere gemessen.

Das Serum wurde nach multipler Verdünnung, d. h. 2-fach, 4-fach, 8-fach usw. verdünnt. Eine Mischung von 1 cc jedes verdünnten Serums und 1 cc Primaertoxin wurde gut umgerührt und in den Brutofen bei 37°C 45 Minuten lang aufbewahrt. 0.1 cc von dieser Mischung wurde den Meerschweinchen intracutan eingespritzt. 24 Stunden nach der Einspritzung prüfen wir den Grad der Rötung oder der Nekrose der Injektionslokalität.

Der Titel des Immunserums wurde mit dem Verdünnungsgrad, der Nekrose nicht entstehen lässt, gezeigt, während eine Mischung von Primaertoxin und physiologischer Kochsalzlösung oder eine von Primaertoxin und normalem Kaninchenserum immer 24 Stunden nach der Injektion eine Nekrose verursacht.

Experiment 2: Testdosis 1.5 cc

Den Versuchstieren wurde zuerst 0.5 cc, eine Woche später 1.0 cc von jedem Testmaterial eingespritzt und sie wurden so immunisiert.

Sonstiges wie in Experiment 1 angegeben. Diesmal wurde das Immunserum bis zu 16-fach verdünnt.

Experiment 3: Testdosis 3.5 cc

Immunisierung durch die Injektion wöchentlich je 0.5, 1.0 und 1.5 cc. Das Immunserum wurde diesmal bis zu 32-fach verdünnt.

Experiment 4: Testdosis 7.5 cc

Immunisierung durch die Injektion der Testmaterialien wöchentlich je 0.5, 1.0, 2.0, und 4.0 cc. Das Immunserum wurde bis zu 64-fach verdünnt.

Experiment 5: Testdosis 15.5 cc

Injektion der Testmaterialien woechentlich je 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 und 8.0 cc.

Die Versuchsergebnisse dieser 5 Experimente sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Art der Antigen	FN		FK		AN		AK	
Testdosis	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.
0.5	1(4/4)*	0.99	1(2/4)	0.92	1(3/4)	1.03	0	1.02
1.0	4(3/4)**	0.96	4(1/4)	0.93	2(2/4)	0.99	2(2/4)	1.10
3.5	8(3/4)	1.04	4(1/4)	0.83	4(2/4)	1.06	2(2/4)	1.14
7.5	32(1/4)	0.98	8(1/4)	1.19	4(3/4)	1.15	4(2/4)	1.09
15.5	32(1/4)	1.10	16(1/4)	0.95	8(1/4)	1.09	8(2/4)	1.07
Mittelwert der Zu- und Abnahme des Koerpergewichtes	1.01		0.97		1.06		1.08	

K.G.-schw.: Koerpergewichtsschwankung.

*: Durch die Injektion des Immunerums entsteht keine Nekrose an den 4 Injektionsstellen.

**: Durch die Injektion des 4-fach verduennnten Serums entsteht keine Nekrose an den 3 Injektionsstellen (usw).

Zusammenfassung.

Man erkennt aus der Experimenten folgendes:

- 1) Die durch die Injektion des Primaertoxins gewonnene Immunitaet ist staerker als die durch Anatoxin gewonnene Immunitaet, dabei zeigt das native Antigen groessere Antigenavitaet als das gekochte.
- 2) Gemaess der Testdosis zunehmend, d. h. nach der Reihenfolge von 0.5, 1.5, 3.5, 7.5 und 15.5 cc, ist die allgemeine Immunitaet staerker.
- 3) Die mit dem Toxin immunisierte Tiergruppe zeigt groessere Abnahme des Koerpergewichts als die mit Anatoxin immunisierte Tiergruppe. Der Prozentsatz der Koerpergewichtsabnahme ist bei der mit dem Toxin immunisierten Tiergruppe groesser als bei der mit Anatoxin immunisierten.

II. Mitteilung. Die immunisierende Wirkung bei gleicher Toxizitaet und ungleicher Testdosis.

Nach der I. Mitteilung steht fest, dass die allgemeine Immunitaet bei ungleicher Toxizitaet und gleicher Testdosis durch das Toxin staerker als durch das Anatoxin entsteht. Dabei zeigt das native Antigen groessere Antigenavitaet als das gekochte.

Im folgenden soll die Immunitaet bei gleicher Toxizitaet und ungleicher Testdosis geprueft werden.

Testmaterialien und Versuchsordnung entspröden denen in der I. Mitteilung angegebenen.

- Experiment 1. Testdosis $\frac{1}{2}$ D. 1. m., d. h. FN (0.5 cc), FK (0.6 cc), AN (1.15 cc), AK (1.25 cc)
- Experiment 2. Testdosis $1\frac{1}{2}$ D. 1. m., d. h. FN (1.5cc), FK (1.8 cc), AN (3.45 cc), AK (3.75 cc).
- Experiment 3. Testdosis $3\frac{1}{2}$ D. 1. m., d. h. FN (3.5 cc), FK (4.2 cc), AN (8.05 cc), AK (8.75 cc)
- Experiment 4. Testdosis $7\frac{1}{2}$ D. 1. m., d. h. FN (7.5 cc), FK (9.0 cc), AN (17.2 cc), AK (18.75 cc)
- Experiment 5. Testdosis $15\frac{1}{2}$ D. 1. m., d. h. FN (15.5 cc), FK (18.5 cc), AN (35.5 cc) AK (38.75 cc)

Die Versuchsergebnisse dieser 5 Experimente sind in folgender Tabelle zusammengestellt :

Art der Antigen	FN		FK		AN		AK	
Testdosis	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.	Index	K.G.-schw.
$\frac{1}{2}$ D.l.m.	1(4/4)*	0.99	2(2/4)	0.89	2(4/4)	1.04	2(2/4)	1.01
$1\frac{1}{2}$ D.l.m.	4(3/4)**	0.96	4(4/4)	0.92	4(1/4)	1.02	4(2/4)	1.06
$3\frac{1}{2}$ D.l.m.	8(3/4)	1.04	16(1/4)	1.05	8(1/4)	1.08	8(1/4)	1.02
$7\frac{1}{2}$ D.l.m.	16(3/4)	0.97	16(3/4)	1.97	16(2/4)	1.08	32(1/4)	1.08
$15\frac{1}{2}$ D.l.m.	32(1/4)	1.10	32(2/4)	1.05	32(2/4)	1.05	32(1/4)	1.08
Mittelwert der Zu- und Abnahme des Koerpergewichtes	1.01		0.98		1.05		1.05	

*: Durch die Injektion des nicht verduennten Serums entsteht keine Nekrose an den 4 Versuchsstellen.

**: Durch die Injektion des 4-fach verduennten Serums entsteht keine Nekrose an den 3 Versuchsstellen (usw).

Zusammenfassung.

- 1) Die Antigenavitaet des gekochten Toxins ist ohne Ausnahme bei gleicher Toxizitaet groesser als das native Toxin.
- 2) Die Antigenavitaet des gekochten Anatoxins ist bei gleicher Toxizitaet, ausgenommen Testdosis $1\frac{1}{2}$ und $7\frac{1}{2}$ D. 1. m., kleiner als das native Anatoxin.
- 3) Diese Tatsache zeigt, dass das WELCH-FRAENKELschen Gasbacillen Toxin das Impedin erhaelt und dass das Impedin durch das Abkochen 30 Minuten lang total vernichtet wird.
- 4) Die Tatsache, die die immunisierende Wirkung des gekochten Toxins bei gleicher Toxizitaet groesser als das native Toxin ist, zeigt, dass die Giftigkeit und das Impedin nicht identisch ist.
- 5) Bei gleicher Toxizitaet ist die immunisierende Wirkung des gekochten Anatoxins nicht immer groesser als die des nativen Anatoxins. Dieses ist vielleicht auf die Tatsache, dass die Verminderung der Antigenavitaet bei dem Anatoxin etwas starker als die Reduzierung der Giftigkeit ist, zurueckzufuehren.

(Autorreferat)