Aus dem Staatlichen Sero-therapeutischen Institute in Wien.
(Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf).

Ueber Immunisierung mit atoxischen Toxinen.¹⁾

Von Prof. Dr. E. Löwenstein.

Zweifellos ist die wirksamste Maßnahme zur Bekämpfung von Volksepidemien die aktive Schutzimpfung, wie sie uns Jenner für die Blattern gezeigt hat.

Für prophylaktische Zwecke dürfen nur absolut giftfreie Impfstoffe verwendet werden.

Von diesem Gedanken ausgehend, habe ich mich seit 1900 bemüht, solche giftfreie, aber hochwirksame Impfstoffe herzustellen. Als Repräsentanten dieser Infektionen habe ich zunächst das Tetanustoxin gewählt, weil es das stärkste Gift überhaupt ist und weil seine Wirkung so unverkennbar jeden Irrtum ausschließt.

Die Aufgabe bestand nun darin, das Tetanustoxin so zu verändern, daß es nicht mehr giftig ist, aber doch noch Immunität erzeugt. Unzählige Mäuse wurden für diese Zwecke geopfert, indem eine große Reihe chemischer Substanzen in ihrer Wirkung auf das Tetanustoxin geprüft wurde, aber bis zum Jahre 1905 waren alle Versuche negativ ausgefallen. Behring und Ehrlich haben sich mit derselben Frage beschäftigt, ohne zu einem brauchbaren Resultat zu kommen. Auch Ehrlich hat dieser Frage sein Augenmerk zugewendet, er hat in der Tat einmal mit Dr. Benario eine ungiftige Vakzine erhalten, aber, wie er Hofrat R. Paltauf erzählt hat, war das nur ein zufälliges Ergebnis, es ist ihm nie wieder gelungen, ein solches Toxoid des Tetanustoxins herzustellen.

Im Jahre 1909 konnte ich endlich über ein Verfahren berichten, das die restlose Lösung dieses Problems, wenigstens in technischer Hinsicht, garantierte. Versetzt man nämlich eine hochgiftige Tetanusbouillon, die etwa in der Verdünnung 1:10 000 eine Maus tötet, mit Formol und läßt diese Verbindung durch längere Zeit unter dem Einfluß des diffusen Tageslichtes stehen, so erhält man eine Tetanuskakzine, welche den höchsten Anforderungen der Immunisierungstechnik genügt. Mäuse und Meerschweinchen, welche wir aktiv auf keine Weise gegen Tetanus immunisieren können, erwerben durch eine einzige Injektion dieser vollkommen ungiftigen Vakzine eine praktisch unbegrenzte Immunität. Ich konnte Meerschweinchen, welchen ich 5 ccm Vakzine eingepflicht hatte, die 50 000 tödliche Dosis Toxins mit lebenden Tetanusbazillen einspritzen, ohne daß die Meerschweinchen erkrankten. Nach einer einzigen Injektion haben diese so hochempfindlichen Tiere schon reichlich Antitoxin im Blute gezeigt.

Beim weiteren Studium dieser Frage zeigte es sich, daß nicht etwa die ultravioletten Strahlen es sind, welche die Entgiftung bewirken, sondern, wie ich bei einem Beleuchtungsversuch unter verschiedenen gefärbten Gläsern beweisen konnte, sind es gerade die roten Strahlen, id est die Wärmestrahlung, unter welchen die Entgiftung am raschesten vor sich geht.

Diese Versuche, welche ich von einer Lungenheilstätte aus publiziert, fanden damals keine Beachtung, sodaß ich 1911 die Versuche nochmals mit Eisler aufnahm. Diese Versuche ergaben nur eine vollinhaltliche Bestätigung meiner Ergebnisse und erweiterten — als eine Konsequenz meines 3-Farbenversuches — die Erkenntnisse nur in der einen Richtung, daß wir einfach die Entgiftung bei 37° im Brutschrank vornahmen, ohne irgendwelche Lichtquellen zu Hilfe nehmen zu müssen.

Auf Wunsch von Hofrat R. Paltauf wurden dann die Versuche an Pferden begonnen, eine Arbeit, die später durch meine Kriegsdienstleistung zunächst unterbrochen und später von Eisler fortgesetzt wurde.

Die Versuche an Pferden haben für die Immunisierungstechnik eine große praktische Bedeutung, denn die Immunisierung gegen Tetanus nimmt doch eine sehr lange Zeit in Anspruch, da die Pferde außerordentlich empfindlich und sogar nach der Behring'schen Tetanus-Empfindlichkeitsskala empfindlicher gegen Tetanus sind als

die Maus und das Meerschweinchen. Es ist deshalb oft $\frac{1}{2}$ —1 Jahr Behandlung notwendig, um zu einer Immunisierung zu kommen, die einer einmaligen Vakzineinjektion entspricht.

Diese Versuche am Pferd haben während meiner Kriegsdienstleistung Eisler und Silberstein fortgesetzt und sind zu einer rückhaltlosen Empfehlung meiner Methode gekommen.

Es war nun naheliegend, dieselbe Methodik für die Entgiftung der anderen Toxine zu verwenden, insbesondere für die Entgiftung des Diphtherietoxins heranzuziehen. Von dem Jahre 1907 an habe ich es immer wieder versucht, im Jahre 1911 mit Eisler, später mit Busson, dieselbe Frage zu lösen, ohne zu einem für die Praxis verwendbaren Resultat zu kommen.

Viel weiter zurück noch liegen die Versuche Behrings, der schon Ende der 90er Jahre das Diphtherietoxin durch Jodchlorid und Goldsalze usw. zu verändern suchte, ohne aber seinem Ziele näher zu kommen. Immer wieder zeigte sich, daß mit dem Verluste der Giftwirkung auch die Immunisierungskraft so zurückgegangen war, daß eine praktische Immunisierung nicht gelang. Da aber Behring doch die Notwendigkeit einer Immunisation erkannte, wenn man auf einen gleichen Erfolg in der Bekämpfung der Diphtherie als Volksseuche hinzielt, so griff er ein Verfahren wieder auf, das den Immunitätsforschern längst bekannt war. Roux, Babes, Georges Dreyer und Madsen, Park in Amerika, Kretz haben Pferde mit einem Toxin immunisiert, das durch Antitoxin nicht vollständig entgiftet war. Insbesondere Kretz hat im Paltauf'schen Institute systematische Versuche in dieser Richtung unternommen, welche die Brauchbarkeit dieser Methode für die Immunitätstechnik erwiesen. Behring basierte nun sein neues Diphtheriebekämpfungsverfahren auf der Tatsache, daß unterneutralisierte Gemische, d. h. Gemische, welche noch einen geringen Rest von freiem Toxin besitzen, noch imstande sind, Immunität zu erzeugen.

Behring setzte also an Stelle der Serumprophylaxe die aktive Immunisierung, bei welcher der Organismus selbst die Schutzkörper bilden muß.

Zweifellos kann die Tragweite der Erkenntnis der Notwendigkeit der aktiven Schutzimpfung seitens Behrings nicht hoch genug eingeschätzt werden. Bisher hat dieses Verfahren in der Praxis noch zu wenig Eingang gefunden, um ein klares Urteil über die Zuverlässigkeit dieser Methode zu gewinnen.

Gegen die Verwendung von unterneutralisierten Mischungen von Toxin und Antitoxin sind aber doch 4 gewichtige Einwände zu erheben, wie ich in meiner Habilitationsarbeit — im Jahre 1914 erschienen — ausführte:

1. Können wir die Wirkung unterneutralisierter Mischungen nicht in ihren letzten Konsequenzen auf den menschlichen Organismus übersehen; ein Beispiel hierfür ist die Toxinwirkung im Meerschweinchen- und Kaninchenversuch, welche sich in einer Lähmung der Extremitäten von Meerschweinchen und Kaninchen äußert und den Lähmungen im Verlaufe der menschlichen Diphtherie entspricht; wir können diese Lähmungen außerordentlich leicht im Tierversuch durch Injektion von unterneutralisierten Gemischen erzielen.

2. Ist der Organismus gerade zur Zeit der Diphtheriegefahr nicht mit Antitoxin versorgt, sondern steht sogar unter dem Einfluß des geringen, aber doch vorhandenen Toxinüberschusses.

3. Ist infolge der Giftwirkung nur eine äußerst vorsichtige und langsame Immunisierung möglich, welche in 3—4, ja bis 7 Injektionen durchgeführt werden muß; deshalb ist die praktische Brauchbarkeit dieser Methode nicht hoch anzuschlagen. Bei der Umständlichkeit dieses Verfahrens sind Massenimpfungen außerordentlich schwer durchführbar.

4. Haben Busson und ich gefunden, daß die Toxizität solcher Mischungen beim Lagern zunimmt. Ich ging nun von der Ansicht aus, daß bei der Injektion eines neutralen Gemenges von Toxin und Antitoxin eine völlige Zerlegung dieses Gemenges im Organismus stattfindet; daß wir also nicht notwendig haben, mit unterneutralisierten Gemischen zu arbeiten, sondern ruhig mit vollkommen glatten, ja sogar mit Gemischen arbeiten können, die freies Antitoxin enthalten.

Für die Richtigkeit dieser Anschauung sprechen wieder folgende Gründe:

1. Wie ich zeigen konnte, tritt die Immunität nach Injektion von Gemischen erst nach rund 40 Tagen in Erscheinung und erreicht erst ihre volle Höhe mit dem 100. bis 120. Tag nach der Injektion; nach einer einfachen Toxininjektion ist die Höhe der Immunität nach 18 Tagen erreicht.

2. Entspricht die Höhe der auf diesem Wege erzielten Immunität immer der ganzen im Gemenge enthaltenen Toxinquantität.

3. Haben Busson und ich gezeigt, daß beim Kaninchen die Immunität erst nach 180 Tagen eintritt; das Kaninchen ist nämlich für Diphtherie noch empfindlicher als das Meerschweinchen, trotzdem es mindestens 4—5mal so schwer ist, und es existiert bisher in der Literatur erst ein einziges Kaninchen, bei dem eine aktive Immunität gegen Diphtherie gelungen ist. (Dreyer.)

Bei unseren Versuchen zeigte sich nun, daß selbst nach 120 Tagen die Immunität noch nicht eingetreten war, und erst bei der Prüfung nach 180 Tagen zeigten die Kaninchen sowohl Antitoxin im Blute als aktive Immunität; man muß also annehmen, daß die Verbindung Toxin-Antitoxin lange Zeit im Körper des Kaninchens kreist und

¹⁾ Vortrag in der Gesellschaft der Aerzte in Wien am 17. VI. 1921.

erst nach 3—4 Monaten langsam die Zerlegung einsetzt und das Toxin abgespalten wird.

Busson und ich haben nun im Jahre 1914 solche Toxin-Antitoxinmischungen hergestellt und an Ziegen, Kaninchen, Meerschweinchen geprüft und bestätigt, daß eben die Immunisierung mit Gemischen, die einen geringen Ueberschuß von Antitoxin enthalten, gelingt.

Diese Versuche wurden durch den Krieg unterbrochen und konnten erst nach 5 Jahren wieder aufgenommen werden. Als wir nun im Jahre 1918 mit denselben Gemischen, die eben 5 Jahre im Eisschrank gestanden hatten, unsere Versuche wieder fortsetzten, zeigten sich folgende Verschiebungen in der Neutralisierung: Die unterneutralen Gemenge waren giftiger geworden, die überneutralisierten Gemische aber hatten an Immunisierungskraft gewonnen.

Aus diesen in vielen Versuchsserien erhobenen Befunden ergibt sich ohne weiteres der Schluß, daß in der Praxis nur mit den überneutralisierten, d. h. einen freien, wenn auch geringen Antitoxinüberschuß führenden Gemischen zu arbeiten ist, da diese Gemische innerhalb von 7 Jahren ihren vollen Wert erhalten haben. Mit solchen neutralen oder überneutralen Gemischen läßt sich nun außerordentlich leicht in der Praxis arbeiten, da man mit einer einzigen, vollkommen unschädlichen Injektion von 0,1 ccm auskommt.

Kollege Kassowitz aus der Kinderklinik v. Pirquet wird über die praktischen Erfolge dieser Methode berichten, sodaß ich hier nur die theoretischen Konsequenzen andeuten will.

Durch diese Versuche ist also der Nachweis erbracht, daß wir bei jedem Toxin bis jetzt 3 Funktionen kennen:

1. die Giftwirkung, 2. die Antitoxinerzeugung, 3. die Antitoxinbindung.

Es gelingt, durch einen chemischen Eingriff die Giftfunktion von der Antitoxinerzeugung zu trennen; wenn auch das Problem der vollkommenen Umwandlung des Diphtherietoxins in seine ungiftige, aber noch immunisierende Modifikation noch nicht gelungen ist, so ist doch das Problem für die praktische Diphtheriebekämpfung vielleicht um einen Schritt der Lösung näher gebracht.

Ich bin aber vollkommen überzeugt, daß auf diesem Wege eine ebenso restlose Lösung der theoretischen Seite des Problems wie beim Tetanustoxin gelingen wird.

Behring, *Gesammelte Abhandlungen* 1915 Bonn. — Busson und Löwenstein, *Zschr. f. exper. Path.* 1914; *Zschr. f. exper. Ther.* 1920; *Zbl. f. Bakt.* 1921. — Eisler und Löwenstein, *Zbl. f. Bakt.* 1911, 1912, 1913, 1915. — Löwenstein, *Zschr. f. Hyg.* 1909; *Zschr. f. exper. Path. u. Ther.* 1914; *W. kl. W.* 1916.