II. Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin. Zur Chemie und Toxicologie des Tuberkel- bacillus.

Von Th. Weyl.

Herr Geheimrath Koch übergab mir vor Jahresfrist zu weiterer Untersuchung ein Product, welches derselbe aus ca. 500 Tuberculose-culturen auf Glycerin-Agar nach folgendem Verfahren erhalten hatte.¹⁾ Die durch Abkratzen von ihrem Nährboden befreiten Culturen wurden mit warmer verdünnter Natronlauge behandelt. Es entstand eine gelbliche, trübe Mischung, in welcher kleine, weissliche Fetzen umherschwebten. Die Flüssigkeit erstarrte beim langsamen Erkalten zu einer trüben Gallerte, die aus zwei Schichten bestand. Die obere Schicht sah festgewordenem Agar zum Verwechseln ähnlich, während sich am Boden des Gefässes jene weissen, früher erwähnten Fetzen angesammelt hatten.

Behufs weiterer Reinigung schnitt ich die Gallerte von der weissen Schicht los, löste sie in warmem Wasser unter Zusatz von etwas Natronlauge und filtrirte die gelbliche Lösung mit Hülfe des Heisswassertrichters durch doppelte Filter eines sehr dicken Filtrirpapiers. Das Filtrat liess ich so langsam erkalten, dass die Masse erst nach ca. 36 Stunden erstarrt war. Auf diese Weise erzielte ich eine nahezu vollkommene Trennung der Gallerte von der weissen Schicht. Nach dreimaliger Wiederholung des Processes war die Trennung eine vollständige, wie die mikroskopische Untersuchung ergab.

1. Die weisse Schicht.

Die weisse, durch mehrfache Behandlung mit warmer, verdünnter Natronlauge behandelte Masse bestand bei mikroskopischer Untersuchung aus vielfach gefalteten Membranen und in unregelmässigen Abständen wie aufgeblasen erscheinenden Schläuchen. Sie enthielt neben Kohlenstoff und Wasserstoff auch Schwefel und Stickstoff. Der Körper oder das Gemisch derselben war in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, auch in 5%iger Schwefelsäure unlöslich und löste sich langsam erst in concentrirter Schwefelsäure auf. Die mit Wasser verdünnte, dann durch Baryt von Schwefelsäure befreite Lösung wirkte nicht reducirend und reagirte weder mit Phenylhydrazin noch mit Benzoylchlorid und Natronlauge. Beim Kochen mit Millon's Reagens trat nur Gelbfärbung, keine Rothfärbung auf. Vielleicht deutet dieses Verhalten auf das Fehlen der hydroxylirten Phenylengruppe — $C_6H_4(OH)$ hin, welche z. B. im Tyrosin und im Eiweiss vorhanden ist.

Die erwähnte Substanz ist nun aber deshalb von ganz besonderem Interesse, weil sie mit grosser Deutlichkeit die spezifische Färbbarkeit der Tuberkelbacillen zeigt. Sie lässt

¹⁾ Hierzu fügte ich das Material von 100 Tuberculoseculturen, welche ich selbst angelegt hatte.

sich, einmal also mit Ziehl'scher Lösung gefärbt, durch 3% Schwefelsäure nicht mehr entfärben.

Wahrscheinlich entspricht diese „weisse Substanz“ der Hülle des Tuberkelbacillus,¹⁾ während die im folgenden zu schildernde Gallerte aus dem Protoplasma des Bacillus hervorging.

2. Die Gallerte.

Die Gallerte (s. o.) wurde mit warmem Wasser unter Zusatz von Natronlauge in Lösung gebracht und dann mit so viel lauwarmem Wasser versetzt, dass alles in Lösung blieb. In der Lösung riefen verdünnte Säuren einen flockigen, schwach braun gefärbten Niederschlag hervor.

Zur Abscheidung des flockig ausfallenden Körpers benutzte ich verdünnte Essigsäure, in deren Ueberschuss die Substanz unlöslich blieb.

Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hatte, wurde die über demselben stehende Flüssigkeit abgehebert, der Niederschlag nochmals in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure im Ueberschuss gefällt, nachdem die alkalische Lösung filtrirt war. Die Filtration ging nur langsam von Statten. Zur weiteren Reinigung wurde Lösung und Fällung noch zweimal wiederholt.

Der zuletzt erhaltene Niederschlag war rein weiss. Er wurde in Spitzgläsern zum Absitzen gebracht, nach Abhebern der Lauge abfiltrirt und noch feucht vom Filter zunächst in verdünnten, dann in absoluten Alkohol übertragen. Es resultirte eine lockere Masse, welche im Paraffin-Schwefelsäurevacuum zu einer schneeweissen, krümligen Masse zerfiel. Dieselbe wurde mehrere Stunden lang zunächst mit absolutem Alkohol, dann mit absolutem Aether am Rückflusskühler ausgekocht, im Paraffinvacuum von Aether und Alkohol befreit, gepulvert und nach dem Trocknen bei 105° zur Analyse gebracht. Der Körper enthielt Schwefel und Stickstoff.

0,1504 g gaben 0,006735 N = 4,4 % N; v = 6 cm; t = 20°; B = 746 (27. Juli 1889); 0,1586 g gaben 0,1050 H₂O = 7,3 % H und 0,3001 CO₂ = 51,6 % C.

Zur Bestimmung von Schwefel und Asche fehlte das Material. Der durch Säuren frisch gefällte und ausgewaschene Körper wurde durch Pepsin und Salzsäure nicht merkbar verändert. Er enthielt kleine Mengen von Phosphor²⁾, die in bekannter Weise erkannt wurden. Die Substanz war gegen verdünnte Säuren äusserst resistent und konnte, ohne sichtbare Veränderung zu erleiden, mit 3 % Schwefelsäure am Rückflusskühler mehrere Stunden gekocht werden. Hierbei wurde die Abspaltung einer reducirenden Substanz nicht bemerkt.

Der zur Analyse benutzte Körper war in warmen verdünnten Alkalien äusserst schwer löslich, während er sich in diesen Reagentien gleich nach der Ausfällung mit Säuren reichlich löste. Beim Kochen mit Millon's Reagens wurde Gelbfärbung, keine Rothfärbung erhalten.

Der analysirte Körper scheint mit Rücksicht auf seine Unlöslichkeit in einem Ueberschuss verdünnter Essigsäure den Mucinen am nächsten zu stehen.

Auffallend ist allerdings der geringe N-Gehalt desselben. Allein es könnte die Abspaltung eines N-haltigen Atomcomplexes bei der längeren Behandlung mit warmem Alkali stattgefunden haben.

Dagegen spricht der Umstand, dass beim Kochen mit verdünnten Säuren keine Abspaltung einer reducirenden Substanz erfolgte, nicht gegen die Zugehörigkeit des Körpers zu den Mucinen.

Denn erstens könnte diese Abspaltung bei der geringen Anzahl der Versuche, zu welchen die kleine Substanzmenge zwang, der Beobachtung entgangen sein. Zweitens aber sind wir ja durch Landwehr bereits mit einem Mucin, dem Gallenmucin, bekannt geworden, welches bei der Spaltung durch Säuren überhaupt keine reducirende Substanz abgibt. Endlich aber ist der Begriff „Mucin“ trotz der vortrefflichen Arbeiten von Landwehr und von Hammarsten noch immer ein so vager, dass die Bezeichnung des aus Tuberkelculturen isolirten Stoffes als eines „Mucins“ vorläufig völlig zu Recht bestehen dürfte.

Mit dem Mykoprotein und dem Anthraxprotein von Nencki und Schäffer, welche schwefelfrei sind, dürfte unser Körper kaum verglichen werden.

Eine kleine Substanzmenge habe ich zu einigen Thierversuchen benutzt, welche zu mittheilenswerthen Ergebnissen führten.

Ich bereitete mir zwei Lösungen der mucinähnlichen Substanz in einer höchst verdünnten Sodalösung. Beide Lösungen waren keimfrei.

Lösung I: 2 ccm derselben ergaben nach dem Abdampfen in gewogener Platinschale und nach dem Trocknen bei 105° einen Rückstand von 0,003 g. Nach dem Verkohlen wurde mit Schwefelsäure abgeraucht und ein Rückstand von 0,002 Na₂SO₄ = 0,0001 Na₂CO₃ + 10 H₂O erhalten. 1 ccm der Lösung I entspricht also 0,00145 g organischer (wirksamer) Substanz.

Von dieser Lösung erhielten unter die Rückenhaut: 2 Kaninchen je 0,5 ccm, und 2 grosse Meerschweinchen die gleiche Dosis. An den beiden Kaninchen wurde keine Veränderung bemerkt. Die beiden Meerschweinchen zeigten an der Injectionsstelle drei Tage nach der Injection einen trocknen Schorf in geringer Ausdehnung, der nach 4—5 Tagen abfiel.

Ferner injicirte ich von Lösung I unter die Rückenhaut:

2 Mäusen je 0,1 ccm 3 Mäusen je 0,3 ccm

2 „ 0,2 4 „ 0,5

Bei allen Thieren zeigte sich 3 Tage nach der Injection eine der Injectionsstelle entsprechende Schorfbildung. Dieselbe erreichte bei den 4 Mäusen, welche 0,5 ccm erhalten hatten, fast die Grösse eines Markstückes. Bei den anderen Mäusen war sie entsprechend kleiner. Der Schorf fiel nach 4—5 Tagen ab. Die Haut war an den Stellen, welche früher der Schorf bedeckte, von Haaren entblösst. Die Thiere blieben am Leben.

Der Schorf enthielt — nach dem Koch'schen Plattenverfahren untersucht — keine Mikroorganismen.

Lösung II: 1 ccm derselben enthielt 0,00195 wirksame (organische) Substanz. Die Gehaltsbestimmung wurde, wie bei Lösung I angegeben ist, ausgeführt.

Von dieser Lösung erhielten die beiden Kaninchen und die beiden Meerschweinchen, welche bei Lösung I benutzt worden waren, je 0,5 ccm unter die Rückenhaut. Nur die Meerschweinchen reagierten mit der bei Lösung I beschriebenen Schorfbildung.

Das gleiche war der Fall mit den Mäusen, von denen je 5 Stück je 0,1, 0,2, 0,3 und 0,5 ccm erhalten hatten.

Der injicirte Körper bewirkte also bei Mäusen bereits in einer Dosis von 0,000145 bis 0,000195 g locale Nekrose, wenn er subcutan injicirt wurde.

Durch diese Versuche ist nachgewiesen, dass sich in der angegebenen Weise aus Tuberkelculturen ein **Toxomucin** darstellen lässt. Es soll zunächst nicht behauptet werden, dass dieser Stoff sich in den Tuberkelbacillen präformirt findet.

Immerhin deuten die geschilderten Beobachtungen aber darauf hin, dass die Bacillensubstanz als solche bei der Beurtheilung von Gewebsveränderungen, welche man in der Nähe von eingewanderten Bacterien antrifft, keine so gleichgültige Rolle spielen mag, als man bisher zumeist anzunehmen geneigt ist.¹⁾

¹⁾ Bekanntlich hat Ehrlich (Deutsch. med. Wochenschr. 1882, p. 270) die Existenz einer mit specifischen Eigenschaften ausgestatteten Hülle auf Grund der nach ihm benannten Färbungsmethode deducirt.

²⁾ Vielleicht der Asche entstammend. Natürlich könnte man auch an ein Nucleoprotein denken.