



No. 29.

Berlin, den 16. Juli 1908.

34. Jahrgang.

Aus dem Laboratorium der Hydrotherapeutischen Anstalt der Universität in Berlin. (Leiter: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. L. Brieger.)

Ueber die Gewinnung von Typhustoxin durch Lecithin und dessen immunisierende Wirkung.

Von Oberstabsarzt z. D. Dr. R. Bassenge.

In No. 4 dieser Wochenschrift¹⁾ wurde von mir mitgeteilt, 1. daß 1%ige, mit sterilem destillierten Wasser hergestellte Lecithinemulsionen steril sind, 2. daß diese Lecithinemulsionen die Eigenschaft besitzen, eingesäte Typhusbazillen unter dem Bilde des Pfeifferschen Versuches aufzulösen und 3. daß mit Hilfe von Lecithinemulsionen hergestellte Typhustoxine imstande sind, bereits innerhalb 24 Stunden Meerschweinchen eine derartige Immunität zu verleihen, daß sie eine intraperitoneale Infektion mit Typhusbazillen ohne Beeinträchtigung ihrer Gesundheit überstehen. Die weiteren in dieser Richtung angestellten Versuche haben die Richtigkeit der vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnisse im wesentlichen bestätigt.

Es eröffnete sich durch diese ein ganz neuer Ausblick für die Herstellung eines praktisch brauchbaren Typhustoxins zu Immunisierungszwecken. Die Immunisierung nach der Wrightschen und der Pfeiffer-Kolleschen Methode mit Hilfe mehr oder minder großer Mengen von Suspensionen abgetöteter Bakterien hatte den offenbaren Uebelstand, daß neben wirklichen gelösten Toxinen noch eine Menge unlöslicher, schwer assimilierbarer Stoffe dem Organismus einverleibt wurden, die eine solche Stärke der Reaktions- und Reizerscheinungen auslösten, daß die Methode für praktische Zwecke recht bedeutende Unbequemlichkeiten zur Folge hatte. Die ungelösten Bakterienzellen stellten offenbar diese schwer assimilierbaren und schwer resorptionsfähigen Stoffe dar. Ein anderer Uebelstand der Suspensionen abgetöteter Bakterien war der, daß sie bei längerer Aufbewahrung ihren Charakter dadurch ändern mußten, daß weitere Stoffe unbekannter Natur in Lösung übergingen.

Demgegenüber hatten die mittels der Brieger-Mayerschen Schüttelmethode hergestellten Typhustoxine den unleugbaren Vorteil der leichteren Assimilierbarkeit, der auch für das Laienauge durch das Aussehen, die absolute Klarheit er-

kennbaren sicheren Sterilität und der unveränderlichen Zusammensetzung. Die Extraktion des Giftes aus den lebenden Bakterien nach dieser Methode ergab ein für die Immunisierung durchaus brauchbares, einwandfreies Gift, das innerhalb von 10–14 Tagen eine ausreichende Menge Schutzstoffe im Blutserum der damit behandelten Menschen und Tiere bildete. Es haben sich deshalb dieser Brieger-Mayerschen Ausschüttelungsmethode mehrere Forscher auch bei Gewinnung von Schutzstoffen aus anderen Bakterien (Schweineseuche, Dysenterie) bedient und auffällige praktische Erfolge damit erzielt. Dagegen war dieses durch Schütteln aus lebenden Typhusbakterien extrahierte Gift nicht sehr stark toxisch; es mußten schon ungewöhnlich hohe Dosen des Giftes Versuchstieren eingespritzt werden, um sie zu töten. Infolgedessen war auch der antitoxische Wert des Blutserums der vorbehandelten Tiere und Menschen nicht sehr bedeutend.

Nachdem die bakteriolytische Eigenschaft der Lecithinaufquellungen von mir festgestellt war,¹⁾ lag es nahe, diese Eigenschaft des Lecithins zur Herstellung eines Toxins zu benutzen. Durch das Schütteln von Typhusbazillen in Lecithinaufquellung mußten nicht nur alle Stoffwechselprodukte und Endotoxine in die Bakterienaufschwemmung übergehen, sondern diese mußte auch alle in den Zellmembranen und Bakterienleibern enthaltenen, sonst unlöslichen Stoffe in löslicher Form enthalten. Es mußten also die Lecithinaufschwemmungen der geschüttelten Bakterien sämtliche in den Bakterienzellen und Zellmembranen enthaltenen Bakterientoxine in gelöster Form zusammenfassen und eine Flüssigkeit von höchstem Toxingehalt darstellen. Die Giftigkeit dieses Toxins mußte alle mit den bisherigen Extraktionsmethoden gewonnenen Gifte ganz bedeutend übertreffen und das gewonnene Toxin ein solches von höchster Konzentration sein.

Das im Handel käufliche Lecithin ist eine zähe, fettig anzufühlende, dicke, fadenziehende Masse von braungelber Farbe und dem Aussehen eines eingedickten Ohrenschmalzes, wie man es in Ohrenschmalzpfropfen findet. Die zu den Versuchen verwendeten Lecithine sind hergestellt in den Fabriken von E. Merck, Darmstadt und von der Aktien-Gesellschaft für Anilinfabrikation, Berlin (Agfa). Merck stellt aus Eigelb bereitetes Ovo-Lecithin her, außerdem noch Präparate aus Hirn und Pflanzen. Das Agfa-Lecithin ist ein Ovo-Lecithin. Während die Merckschen Lecithine eine gleichmäßigere Beschaffenheit bezüglich des Aussehens und der Konsistenz zeigen, wechselt das Agfa-Lecithin etwas in der Farbe. Das

1) Ueber eine bakteriologisch interessante Eigenschaft des Lecithins.

1) cf. diese Wochenschrift 1908, No. 4.

Mercksche Ovo- und Pflanzen-Lecithin zeigt eine gleichmäßige, braungelbe Farbe, ein glasiges Aussehen und gleiche Konsistenz, das Hirn-Lecithin ist heller, etwas gelblicher. Dagegen haben die Agfa-Ovo-Lecithine eine tiefbraune Farbe, etwa wie die Oberfläche von Liebig's Fleischextrakt, dem sie im Geruch auffallend ähneln, während die Merckschen Lecithine nur einen schwachen, etwas ranzigen Geruch aus freien Fettsäuren aufweisen.

Bernthsen gibt in seinem Lehrbuch der organischen Chemie als Formel für Lecithin $C_{44}H_{81}NO_8P$ an; es sei ein charakteristischer Bestandteil der Nierensubstanz, des Gehirns, des Eidotters etc. Es stelle eine kristallisierbare, wachsähnliche Masse dar, in Wasser zu einer opalisierenden Flüssigkeit aufquellend, in Alkohol und Aether löslich. Es zerfalle durch Verseifung in Cholin, Glycerinphosphorsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure und sei daher als Glycerin aufzufassen, in welches an Stelle von je einem Wasserstoffatom ein Palmitinsäure-, ein Stearinsäure- und ein Phosphorsäurerest eingetreten sind, welcher letzterer seinerseits noch mit Cholin in esterartige Verbindung getreten ist.

Alle diese Stoffe können an der Wirkung des Lecithins auf die Bakterien beteiligt sein; besondere Untersuchungen darüber sind im Briegerschen Laboratorium im Gange; der Umstand, daß altes Lecithin sich wirksamer zeigte als frisch hergestelltes, spricht dafür, daß diese Spaltungsprodukte nicht ganz ohne Einfluß auf die Wirkung sind.

Für die Versuche wurden von vier verschiedenen Lecithinen, nämlich von: 1. Mercks Ovo-Lecithin; 2. Mercks Hirn-Lecithin; 3. Mercks Pflanzen-Lecithin und 4. Agfa-Ovo-Lecithin 1%ige Aufquellungen in der Weise hergestellt, daß je 1 g des Lecithins mit 99 ccm sterilen destillierten Wassers übergossen und in großen Erlenmeyerschen Kolben von 250 ccm Inhalt 48 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt wurden. Es gelang auf diese Weise Aufquellungen herzustellen, die bis auf einige Spuren fester Teile alles Lecithin aufgequellt enthielten. Diese 1%igen Aufquellungen stellten gewissermaßen gesättigte Aufquellungen dar; eine stärkere Konzentration als die 1%ige war mittels dieser Methode nicht zu erhalten. Die Aufquellungen sind weißlich trübe, Seifenlösungen ähnlich; die Aufquellung des Agfa-Lecithin ist etwas gelblich.

Die drei Merckschen Lecithine erwiesen sich nach der Aufquellung in Wasser stets als steril, während das Agfa-Lecithin nicht steril war. Letzteres mußte daher behufs weiterer Verwendung fraktioniert bei 55° C je zweimal zwei Stunden sterilisiert werden, ehe es zur weiteren Verwendung kam. Sämtliche Lecithine waren von den betreffenden Fabriken frisch bereitet und in anerkennenswerter Weise für die Versuche zur Verfügung gestellt worden.

Es wurden von den vier genannten 1%igen sterilen Lecithin-Aufquellungen je 10 ccm in sterile Röhrchen abgefüllt und mit je einer Oese (2 mg) 20stündiger Typhus-Agarkultur besetzt. Diese frisch hergestellten Typhus-Lecithin-Röhrchen zeigten unmittelbar nach der Herstellung und auch noch nach einstündiger Beobachtung im hängenden Tropfen lebende, gut bewegliche Typhusbazillen neben vielfach zerfallenden, unbeweglich gewordenen und in Körnchen aufgelösten. Erst nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank konnten auch in diesen Röhrchen bei mikroskopischer Beobachtung lebende Typhusbazillen nicht mehr nachgewiesen werden, auch blieben die davon angelegten Bazillenkulturen vollkommen steril während Kontrollen typisches Wachstum aufwiesen.

In dem alten Merckschen Ovo-Lecithin, welches länger als ein Jahr bereits im Laboratorium aufbewahrt wird, trat aber der Zerfall der Typhusbazillen schon während der ersten mikroskopischen Beobachtung vollkommen auf.

Mit den 1%igen Lecithin-Aufquellungen wurden dann weiter 24stündige Typhus-Agarkulturen in der Weise abgeschwemmt, daß mit je 5 ccm der Lecithinaufquellung eine Kultur aufgenommen und immer 10 Röhrchen nacheinander mit weiteren 5 ccm dieser Aufquellung nachgespült wurden. Es ergab die Behandlung von 10 Agarkulturen etwas mehr als 55 ccm Flüssigkeit. Diese wurden in sterilen Erlenmeyerschen Kölbchen 24–48 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt. Nach der bakteriologischen Prüfung erwiesen sich diese Bazillen-Aufschwemmungen noch nicht vollkommen frei von keimfähigen Typhusbazillen. Einige wenige dieser freilich ungeheuren Mengen von Bakterien entgingen immer noch der Auflösung. Es mußten die Aufschwemmungen daher noch weiter mit Chloroform versetzt und geschüttelt werden, bis man vollkommen sterile Toxine erhielt.

Diese von vier verschiedenen Lecithinarten hergestellten Toxine waren von fast gleichartiger Giftigkeit und Wirkung auf Versuchstiere. In verschiedenen Versuchsreihen erwies sich stets 0,5 ccm jedes Toxins, Meerschweinchen von etwa 200 g Gewicht intraperitoneal einverleibt, als durchaus unschädlich; der Gesundheitszustand, die Munterkeit der Tiere blieb unbeeinflusst. Dosen von 1 ccm wirkten bisweilen — bei etwa $\frac{1}{2}$ der behandelten Tiere —

tödlich, bei etwa $\frac{1}{3}$ krankmachend, $\frac{1}{3}$ blieb innerhalb 24 Stunden bei ungestörtem Wohlbefinden. 2 ccm des Giftes wirkten bei allen Tieren innerhalb 24 Stunden tödlich. Die Tiere zeigten stets ein ausgedehntes hämorrhagisches peritonitisches Exsudat ohne Typhusbazillen. Die tödliche Dosis des Giftes lag also für Meerschweinchen bei etwa 1 ccm und etwas mehr.

Mehrere Versuchsreihen von Meerschweinchen wurden danach teils mit 0,5 ccm, teils mit 1 ccm des Giftes intraperitoneal behandelt und erhielten dann nach verschiedenen Zeiträumen eine Normalöse eines höchst virulenten Typhusstammes, dessen einfach tödliche Dosis für die Versuchstiere etwa $\frac{1}{20}$ Normalöse war, nachgespritzt. Diejenigen Tiere, welche sogleich und eine Stunde nach der Toxininjektion die 20fach tödliche Dosis lebender Typhusbazillen nachgespritzt erhielten, verendeten ebenso wie die Kontrolltiere ausnahmslos innerhalb 7–9 Stunden nach der Injektion der Typhusbazillen. Dagegen blieben alle Tiere, welche 20–24 Stunden nach der Toxininjektion die 20fach tödliche Dosis an Typhusbazillen intraperitoneal erhielten, bei ungestörtem Wohlbefinden, während die Kontrolltiere innerhalb 7–9 Stunden nach der Injektion an typischer Typhusperitonitis verendeten. Dabei zeigte sich kein Unterschied, wenn die Tiere mit 0,5 oder wenn sie mit 1,0 ccm des Toxins vorbehandelt waren. Tiere, welche durch die vorhergehende Toxininjektion von 1 ccm nach 24 Stunden noch krank waren, erholten sich sogar trotz der nachfolgenden Typhusbazillenninjektion auffallend schnell und blieben andauernd gesund und munter. Zur Kontrolle wurden mehrere der immunen und mit Bazillen nachbehandelten Tiere nach 24 Stunden getötet. Die Obduktion derselben ergab vollkommen normale Verhältnisse, keine Spur peritonitischer Erscheinungen, keine Spur von Exsudat und niemals Spuren von Typhusbazillen; die von verschiedenen Peritonealabstrichen angelegten Kulturen blieben ausnahmslos steril.

Eine Anzahl der mit den verschiedenen Toxinen vorbehandelten Tiere wurde nach 2, 4, 8, 9, 13, 31 und 38 Tagen mit derselben 20fach tödlichen Dosis Typhusbazillen nachbehandelt, ohne daß irgend eine Beeinträchtigung ihres Wohlbefindens auftrat. Die Tiere erwiesen sich also auch für längere Zeit nach mehreren Wochen noch vollkommen immun.

Das Verhalten und die Wirkung des mittels Lecithins hergestellten Typhustoxins eröffnet bedeutungsvolle Aussichten für die Typhusimmunisierung und die Typhustherapie. Während die bisher zu immunisatorischen Zwecken hergestellten Typhustoxine besonders die Bildung antiinfektiöser Stoffe im Tierkörper bewirkten, scheint dieses Toxin die sofortige Produktion auch antitoxischer Stoffe nach sich zu ziehen. Auf diese Weise ließe sich auch der fast vollkommene Fortfall der negativen Phase nach eingeleiteter Immunisierung erklären, in welcher Phase die mit den bisherigen Typhusschutzstoffen vorbehandelten Individuen der Typhusinfektion in erhöhtem Maße ausgesetzt waren.

Das Einspritzen von Typhusbazillen nach der Vorbehandlung mit einem Toxin, das hauptsächlich bakteriolytische Eigenschaften hervorruft, muß notwendigerweise auch durch Lösung der Bakterien bedeutende Giftmengen frei machen, denen die Tiere erliegen, wenn nicht gleichzeitig der hohe Toxingehalt die Bildung antitoxischer Schutzstoffe zur Folge hat.

Jedenfalls ist das Lecithin imstande, das Gift der Typhusbazillen in einer Weise und einer Menge frei zu machen, die bisher noch nicht gelungen ist. Es ist danach nur eine Frage der Technik, das durch Lecithinausschüttelung gewonnene Typhustoxin von eventuellen für den menschlichen Organismus schädlichen Lecithinwirkungen (Hämolyse) zu befreien, um ein Toxin zu gewinnen, das im Blutserum die Bildung hoher antitoxischer Werte schafft und so das Toxin nicht nur für immunisatorische, sondern auch für therapeutische Zwecke geeignet macht. Es scheint, daß die Behandlung der Lecithin-aufquellungen mit Chloroform ein hierfür geeignetes Mittel ist. Nach dem Schütteln mit Chloroform läßt sich das Toxin gut abgießen und stellt eine weißliche, trübe Flüssigkeit dar. Zu den Versuchen wurde dieses Toxin verwendet. Es zeigte sich aber, daß dasselbe durch Pukallfilter vollkommen geklärt werden kann, ohne seine giftigen und immunisierenden Eigenschaften einzubüßen.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß das Lecithin auch für andere pathogene Mikroorganismen bakteriolytische Eigenschaften besitzt, die für die Zwecke der Toxingewinnung brauchbar sind.

Schlußfolgerungen: 1. Altes, längere Zeit aufbewahrtes Lecithin in 1% iger Aufquellung ist ein Mittel, um Typhusbazillen vollkommen aufzulösen; Aufquellungen frisch bereiteten Lecithins besitzen dieselbe Eigenschaft, wenn auch in geringerem Maße.

2. Durch die Ausschüttelung der Typhusbazillen in 1% igen Lecithinaufquellungen sind alle in den Zellmembranen und in dem Zellinhalt der Bazillen enthaltenen Stoffe und ihre durch das Ausschütteln gewonnenen Ausscheidungsprodukte so vollkommen gelöst enthalten, daß sie einen hervorragenden, bis jetzt noch nicht erreichten Toxingehalt aufweisen.

3. Dieses so gewonnene Toxin besitzt eine ganz außerordentlich hohe immunisatorische Wirkung, durch welche die erfolgreiche Immunisierung gegen hohe, vielfach tödliche Dosen bei kleinen Versuchstieren unter Wegfall der negativen Phase schon innerhalb 24 Stunden eintritt.

4. Das mittels Lecithin gewonnene Typhustoxin ist imstande voraussichtlich auch beim Menschen seine hervorragende immunisatorische Wirkung auszuüben und kann auch für die Typhusbehandlung selbst von hohem Werte werden.

5. Durch Schüttelung mit Chloroform und nachfolgender Pukallfiltration kann das Lecithin aus dem Toxin entfernt werden.
