

Die Meerschweinchenpathogenität von Tuberkelbazillen, die aus spezifisch vorbehandelten Ratten stammen

Die Resistenz der Ratte gegen eine typische tuberkulöse Erkrankung ist seit langem bekannt¹. Es ist dabei aufgefallen, daß diese Eigenschaft mit dem Fehlen der Sensibilisierbarkeit gegen Tuberkulin verbunden ist². Weder das KOCHSche noch das ARTHUSSche Phänomen lassen sich erzeugen, und die Ratte zeichnet sich allgemein durch eine geringe Neigung zu allergischen Phänomenen aus³. Eine Allergie gegen Tuberkulin, wie sie gewöhnlich an der Haut geprüft wird, kann somit keinen Anteil am Gesundbleiben tuberkulös infizierter Ratten haben. Möglicherweise entwickelt sich aber eine davon verschiedene Immunität entsprechend dem Zustand, den BIRKHAUG⁴ und CORPER und COHN⁵ bei tuberkulösen, gegen Tuberkulin desensibilisierten Meerschweinchen nachgewiesen haben. Es wäre denkbar, daß eine derartige Umstimmung des Wirtsorganismus die Pathogenität von eingebrachten Tuberkelbazillen verändert.

In der Absicht, diese Frage zu prüfen, wurden folgende, orientierende Versuche ausgeführt:

13 erwachsene weiße Ratten beiderlei Geschlechts werden durch wöchentlich einmalige intravenöse Injektion von je 1 mg autoklavierter, humaner Tuberkelbazillen vorbehandelt, und zwar 1 Tier 7mal, 6 Tiere 11mal und 6 Tiere 13mal. — Bei früheren Untersuchungen ist die makro- und mikroskopische Unversehrtheit der Leber trotz reichlichen Gehalts an virulenten Tuberkelbazillen aufgefallen. Es wurde deshalb angenommen, daß sich eine allfällige Änderung der Beziehung zwischen Wirt und Parasit besonders an diesem Organ geltend machen würde. Eine Woche nach Abschluß der Vorbehandlung werden deshalb 10 Tiere mit der absichtlich niedrig gehaltenen Dosis von $\frac{1}{1000}$ mg (Feuchtgewicht) desselben Stammes, der autoklaviert zur Vorbehandlung gedient hat, intrahepatisch nach Eröffnung der Bauchhöhle injiziert. (Es handelt sich um einen frisch isolierten, auf Sauton gehaltenen Humanusstamm, von dem $\frac{1}{1000}$ mg subkutan erwachsene Meerschweinchen in rund 3 Monaten an generalisierter Tuberkulose zugrunde gehen läßt.) 3 Tiere erhalten dieselbe Dosis intravenös, 12 Ratten dienen als Kontrollen, von denen 5 intravenös und 7 intrahepatisch infiziert werden. Die Tiere werden nach 6–25 Wochen durch Dekapitation getötet. Sie weisen, wie üblich, keine makroskopisch erkennbaren pathologischen Veränderungen auf.

Zur Prüfung der Pathogenität für Meerschweinchen wird die Rattenleber frisch mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung im Mörser zerrieben. Von der Suspension werden jeweils 2 cm³ einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert.

Als Beispiel werden die Versuche mit den Lebern derjenigen Ratten herausgegriffen, die während 11 Wochen mit wöchentlich 1mal 1 mg toter Tuberkelbazillen intravenös vorbehandelt und 13 Wochen nach der intrahepatischen Infektion mit $\frac{1}{1000}$ mg desselben, lebenden Bazillenstammes getötet worden sind:

		Geschlecht	Anfangsgewicht g	Endgewicht g	Leber g	Milz g	Lebensdauer nach der Infektion, Wochen
Meerschweinchen Nr.	8	♂	400	240	11	1	17*
	9	♂	340	420	42	9	19
	10	♂	410	300	31	4	8
	14	♂	400	300	28	6	15
	Kontrollen						
	5	♂	450	375	40	2,5	14
	6	♂	500	360	46	7,5	11*
	7	♂	500	540	38	3	20

* Spontan eingegangen, übrige Tiere getötet.

Alle Meerschweinchen weisen teils leichte, teils schwere tuberkulöse Veränderungen auf, ohne daß sich eine gesetzmäßige Verteilung derselben auf die eine der Gruppen feststellen ließe. Auffallend ist die Häufigkeit der schweren, tuberkulösen Leberzirrhosen bei den Meerschweinchen. — Es ist zu vermuten, daß die Resistenz der Ratte gegenüber Tuberkulose ein primärer Zustand ist. Eine Sensibilisierung gegen die Bestandteile der Tuberkelbazillen scheint nicht stattzufinden oder sich in keiner Pathogenitätsänderung der in den vorbehandelten Organismus eingebrachten, lebenden Bazillen auszuwirken.

Dem Vorsteher der pathologisch-anatomischen Anstalt der Universität Basel, Herrn Prof. Dr. A. WERTHEMANN und Herrn Prof. Dr. F. ROULET sei bestens für ihre Unterstützung gedankt, ebenso der I. R. Geigy AG.

H. BIRKHÄUSER

Tuberkulosefürsorgestelle Basel, den 30. Mai 1949.

Summary

Tubercle bacilli of the human type were injected intrahepatically into white rats, after these animals had been treated previously with killed bacilli of the same strain. Suspensions of the infected livers later proved to be equally pathogenic for guinea-pigs whether they were taken from specifically pre-treated or from untreated rats.

On the Effect of Isomers of PAS (para-aminosalicylic acid) and Related Substances on the Tuberculostatic Effect of PAS

In previous papers, LEHMANN¹, it was mentioned that the discovery of the tuberculostatic effect of PAS was based on a theory that this substance should be able to inhibit the stimulatory effect of salicylic acid on the respiration of the tubercle bacillus (BERNHEIM²) and thereby inhibit even the growth of the bacillus.

The inhibition of growth was easily shown, but the inhibitory effect on respiration could not be demonstrated³. The mechanism of growth inhibition by PAS was therefore obscure.

¹ R. KOCH, Berliner klin. Wschr. 19, 221 (1882).

² Übersicht bei C. C. WESSELS, Amer. Rev. Tuberc. 43, 449 ff. (1941).

³ E. HEHRE und J. FREUND, Arch. Pathol. 27, 289 (1939).

⁴ K. BIRKHAUG, Acta med. Scand. 109, 250 (1941).

⁵ H. J. CORPER und M. L. COHN, Amer. Rev. Tuberc. 41, 71 (1940).

¹ J. LEHMANN, The Lancet, Jan. 5, 14 (1946); Svenska Läkartidn. 43, 2029 (1946); Nordisk Medicin 31, 2112 (1946); 33, 140 (1947); Rev. gén. Sci. 54, 222 (1947).

² F. BERNHEIM, Science 92, 204 (1940).

³ J. LEHMANN, Rev. gén. Sci. 54, 222 (1947).

Another explanation was supposed to be an interference of PAS with the nitrogen metabolism of the bacillus. It is known from the work of KLEIN and KAMIN¹, and HERNER² that benzoic and salicylic acid specifically inhibit the desamination of alpha-amino acids. If PAS had a still stronger effect on this process a serious disturbance of the intermediate metabolism and growth could be expected. Even this explanation was not found valid, as PAS did not poison the desamination of amino acids in the bacillus³.

New approaches to the problem were therefore undertaken in a series of experiments conducted in 1946, in which it was investigated whether isomers of PAS and other related compounds were able to compete with PAS and abolish the tuberculostatic effect. The specificity of the structural relationship between the different groups in PAS could in this way be elucidated and could amplify earlier knowledge on this subject LEHMANN⁴, YOUNG, RALEIGH and YOUNG⁵, GOODACRE, MITCHELL and SEYMOUR⁶, HIRT and HURN⁷ and perhaps open the way for new theories.

In an early phase of these experiments the writer was informed by a personal communication from Dr. S. TOBIE, of the American Cyanamid Company, that H. J. WHITE, bacteriologist at the Company, in unpublished results had been able to show a competitive effect of para-aminobenzoic acid (PABA) on PAS. As will be seen from the following experiments this observation could be fully verified and was announced in a paper presented at the November Meeting of the Swedish Tuberculosis Association in Stockholm 1947, together with the other results presented in this paper. Similar findings with PABA have been reported by YOUNG *et al.*⁵ GOODACRE *et al.*⁷ and HURN⁸.

The effect of monohydroxybenzoic acids on the tuberculostatic effect of PAS

The experiments were arranged so that in simultaneous series the tuberculostatic effect of the neutralized acids were tested alone in concentrations from 10^{-3} to 10^{-7} mol and in the same concentrations together with PAS at a fixed concentration of 10^{-5} mol. This concentration of PAS was chosen as it is the lowest concentration by which a nearly complete inhibition is accomplished (90–95% inhibition in all the present experiments). A competitive effect will therefore diminish the inhibitory effect of this concentration of PAS. The strain used was the BCG strain, the medium was that of SAUTON. Technic as described elsewhere (LEHMANN⁹).

It will be seen (Table), that the monohydroxybenzoic acids tested alone increase in tuberculostatic effect as the hydroxy group moves closer to the carboxyl group thus from the para-position to the ortho-position, which is in accordance with earlier observations⁹. When com-

bined with PAS no significant competitive effect is seen. Ortho-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) could have been expected to diminish the effect of PAS, as this configuration is represented in PAS. Possibly there is a slight effect at 10^{-5} mol, i. e. in the same concentration as PAS. However, the inhibition is not significant.

Inhibition of different benzoic acid derivatives—alone and combined with 10^{-5} mol PAS—on the growth of the tubercle bacillus (BCG) in per cent

Concentration of substance in medium (molarity)		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
2-hydroxybenzoic acid	Alone	90	88	35	3	2
	+ PAS 10^{-5}	90	90	70	76	74
3-hydroxybenzoic acid	Alone	89	70	10	2	0
	+ PAS 10^{-5}	88	87	78	80	77
4-hydroxybenzoic acid	Alone	46	30	7	3	2
	+ PAS 10^{-5}	90	88	88	87	90
2-amino-benzoic acid	Alone	67	23	20	17	2
	+ PAS 10^{-5}	82	80	78	78	74
3-amino-benzoic acid	Alone	89	15	7	5	3
	+ PAS 10^{-5}	89	82	82	78	78
4-amino-benzoic acid	Alone	93	80	25	3	3
	+ PAS 10^{-5}	95	55	0	55	90
2-hydroxy-3-amino-benzoic acid	Alone	30	12	5	0	0
	+ PAS 10^{-5}	94	93	92	93	93
2-hydroxy-5-amino-benzoic acid	Alone	35	7	4	3	3
	+ PAS 10^{-5}	96	96	94	93	95
3-hydroxy-4-amino-benzoic acid	Alone	96	32	3	3	0
	+ PAS 10^{-5}	96	96	93	93	93

The effect of monoaminobenzoic acids on the tuberculostatic effect of PAS

Even in these experiments earlier observations are verified, i. e. the tuberculostatic effect of the monoaminobenzoic acids increases when the amino group moves away from the carboxyl group, thus from the ortho-position to the para-position. In combination with PAS no competitive effect of the ortho- and meta-amino acids is seen. The para-aminobenzoic acid (PABA), however abolishes completely the tuberculostatic effect of PAS in equimolar concentration (10^{-5} mol). At 10^{-6} mol PABA in itself has no tuberculostatic effect, but inhibits the effect of PAS to about 50%. In 10^{-4} mol PABA itself has a rather strong tuberculostatic effect—80% inhibition—nearly as strong as PAS in 10^{-5} mol—90% inhibition. Instead of an expected additive inhibitory effect, the two substances antagonize one another, resulting in a decrease to about 50% inhibition.

The effect of monoamino-monohydroxybenzoic acids on the tuberculostatic effect of PAS

The tuberculostatic effect of 3-amino- and 5-amino-2-hydroxy-benzoic acids is very little pronounced—only at 10^{-3} mol a slight effect is seen, whereas 4-amino-3-hydroxy-benzoic acid has a more pronounced effect, but considerably less than PAS¹. All these acids—so closely related to PAS—could be expected to exert the strongest competitive effect on PAS. However, none of them has any competitive effect at all.

¹ J. LEHMANN, The Lancet, Jan. 5, 14 (1946); Svenska Läkartidn. 43, 2029 (1946); Nordisk Medicin 31, 2112 (1946); 33, 140 (1947); Rev. gén. Sci. 54, 222 (1947).

¹ J. R. KLEIN and H. KAMIN, J. Biol. Chem. 138, 507 (1941).

² B. HERNER, Acta physiol. Scand., Vol. 8, Suppl. 23.

³ J. LEHMANN, Rev. Gén. Sci. 54, 222 (1947).

⁴ J. LEHMANN, The Lancet, Jan. 5, 14 (1946); Svenska Läkartidn. 43, 2029 (1946); Nordisk Medicin 31, 2112 (1946); 33, 140 (1947); Rev. Gén. Sci. 54, 222 (1947).

⁵ G. P. YOUNG, G. W. RALEIGH, and A. S. YOUNG, J. Bacteriol. 54, 409 (1947).

⁶ C. L. GOODACRE, B. W. MITCHELL, and D. E. SEYMOUR, Quart. J. Pharmacy Pharmacol. 21, 301 (1948).

⁷ R. HIRT and H. HURN, Helv. chim. acta 32, 378 (1949).

⁸ H. HURN, Schweiz. Z. Pathol. Bakteriologie. 12, 282 (1949).

⁹ J. LEHMANN, The Lancet, Jan. 5, 14 (1946); Svenska Läkartidn. 43, 2029 (1946); Nordisk Medicin 31, 2112 (1946); 33, 140 (1947); Rev. gén. Sci. 54, 222 (1947).

Discussion

The predominating competitive effect of PABA among the mono-aminobenzoic acids is well understood, as this configuration is most closely related to PAS. The complete absence of such an effect of the three mono-amino-monohydroxybenzoic acids is confusing, as well as the absent effect of salicylic acid. This acid should, from a theoretical point of view, have the same possibility as PABA to compete with PAS, as both configurations are represented in PAS. All these findings seem to point to an important role of PABA for the tubercle bacillus. That PABA is produced by the tubercle bacillus is shown by SJÖGREN and EKSTRAND¹ and POPE and SMITH². However, PABA is in itself no growth factor for the tubercle bacillus, as seen from the above experiments. Even in concentrations as low as 10^{-8} to 10^{-12} mol no stimulating effect of PABA can be demonstrated. On the contrary, already at a concentration of 10^{-4} mol (1.4 mg %), PABA shows 80% inhibition of the growth of the tubercle bacillus. As PABA nevertheless seems to be of importance for the tubercle bacillus, it seems enticing to assume that PABA only is one constituent of a complex compound acting as a growth factor for the bacillus. As a model for such a substance folic acid can be mentioned. Folic acid itself does not, however, act as a growth factor for the tubercle bacillus (concentrations from 10^{-3} to 10^{-12} mol tested). If such a complex compound is acting as a growth factor, it seems to be linked with the enzyme systems of the tubercle bacillus mainly through the PABA constituent, as PAS is able to compete with PABA. Such a hypothesis has naturally only value as a guide for continued experiments to find more or less specific growth factors for the tubercle bacillus. No such factor is known at present.

Acknowledgment:—The author is indebted to the Swedish Association for the Prevention of Tuberculosis for economical support, to K. G. ROSDAHL, the Ferrosan Company, Malmö, for the synthesis of the monoamino-monohydroxybenzoic acids, and to Miss J. KUTTNER for technical assistances.

J. LEHMANN

Central Laboratory, Sahlgren's Hospital, Gothenburg, April 4, 1949.

Zusammenfassung

1. Die Wirkung einiger Monoamino-oxybenzoesäuren, Monoxybenzoesäuren und Monoamino-monooxybenzoesäuren auf den tuberkulostatischen Effekt von Para-aminosalicylsäure (PAS) wurde untersucht.

2. Von den geprüften Substanzen übte nur Para-aminobenzoinsäure (PABA) eine antagonistische Wirkung auf PAS aus. Diese deutet darauf hin, daß PABA für Tuberkelbazillen bedeutsam ist.

3. Es wird angenommen, daß PABA sich als Bestandteil eines komplexen Wachsfaktors der Tuberkelbazillen geltend macht und daß PAS diesem Wachsfaktor entgegenwirkt.

¹ B. SJÖGREN and T. EKSTRAND, *Nature* 156, 476 (1945).

² H. POPE and D. T. SMITH, *Amer. Rev. Tuberculosis* 54, 559 (1946).

DISPUTANDA

Zur CO₂-Resttheorie im Pflanzenbau

GABRIELSEN¹ und Mitarbeiter² wiesen darauf hin, daß es schon früheren Untersuchern aufgefallen ist, daß in

¹ E. K. GABRIELSEN, *Nature* 161, 138 (1948).

² E. K. GABRIELSEN und L. SCHOU, *Exper.* 5, 116 (1949).

geschlossenen Systemen grüne Pflanzen oder Teile davon, selbst bei intensivster Belichtung, nicht fähig sind, die von ihnen ausgeatmeten Mengen von CO₂ völlig hinwegzuassimilieren¹. Der praktisch eminent wichtige Sinn des sich unter solchen Umständen einstellenden Grenzwertes an CO₂ wurde von mir 1919² und 1920 in der Abhandlung *Kohlensäure und Pflanzen* (W. Knapp, Halle) auf den Seiten 1–40 eingehend hinsichtlich allen Pflanzenwuchses und aller Nahrungsschöpfung auf Erden erörtert. Auch den Ausdruck *Schwellenwert* (Threshold Value) findet man dort bereits auf den Seiten 7 und 9. Um was es sich handelt, ergeben einige wörtliche Zitate aus meinen früheren Abhandlungen. Auf Seite 40 des Buches stellte ich zunächst gegenüber, daß im Luftmantel der Erde 1530·10⁹ Tonnen CO₂ enthalten seien und daß der jährliche Wuchs grüner Pflanzen 86,5·10⁹ Tonnen CO₂ verbrauche. Es könnten also in einem Jahre $\frac{1}{18}$ der im Luftmantel der Erde vorhandenen CO₂-Mengen verschwinden, deren Gehalt also von 30 auf 28,34/100 000stel fallen. Dann fuhr ich wörtlich fort: «Immerhin eine Größe, die uns bereits recht verdächtig sein sollte, aber schließlich doch noch nicht sagt, daß die CO₂ in der Luft mangle: denn wir haben gesehen, daß der Innendruck der Pflanzen wohl auch noch eine Verminderung um ein weiteres $\frac{1}{18}$ auf 26,68/100 000 zuläßt, wodurch schon diese disponible CO₂-Menge auf das Doppelte des Nötigen wüchse. Außerdem hören die dauernden Quellen für CO₂ auch nie auf zu strömen und neue Mengen davon in die Luft zu entsenden, wie die tierische Atmung, die Verwesungsprozesse, die Bodentätigkeit usw. Indessen, was im großen Mittel als hinreichend erscheint, und namentlich dann, wenn, wie bemerkt, die vorhandene CO₂-Menge doch nur gerade hinreichend ist, führt naturgemäß in speziellen Fällen leicht zu einem Zustande des Mangels. Also wenn die CO₂ in der Atmosphäre wohl auch nicht immer im Minimum ist, so sind doch sehr leicht Fälle möglich, wo sie es wirklich ist bzw. äußerst leicht in den Stand des Minimumfaktors beim Pflanzenwuchs gerät...» Dies war der Sinn der 1917 konzipierten und 1919 veröffentlichten CO₂-Resthypothese bzw. Resttheorie: Der mittlere CO₂-Gehalt der Luft von um 0,030% ist nicht das Reservoir an CO₂, aus dem die Grünpflanzen beliebig schöpfen können, sondern der mittlere Rest oder Überbleibsel, den sie unter den mittleren herrschenden Bedingungen von Licht, Temperatur und Feuchte und sonstigem nicht mehr ausnützen können. Schon damals leitete ich ab, daß bei starker Belichtung dieser Wert evtl. auf 0,010% herabgehen könne. Und indem ich in den folgenden 30 Jahren die Luft an den verschiedensten Orten Europas untersuchte, z. B. im Binnenlande Norddeutschlands³, am Strande der Nordsee⁴, im Hochgebirge um Davos und Muottas Murail⁵, gelangte ich schließlich dazu, im geschlossenen System — es wurden Kronen von Fliederhochstämmchen in Cellophansäcke eingeschlossen — den Restwert an Atmungs-CO₂ 1929⁶ mit 0,009–0,012% festzustellen, also genau identisch wie GABRIELSEN dies 1948 für Hollunderblätter fand. Indem ich einige der Sätze aus der Schlußzusammenfassung dieser Mitteilung

¹ A. A. IRWING, *Ann. Botany* 24, 805 (1910).

² E. REINAU, *Kohlensäure und Pflanzen*, S. 1ff. (W. Knapp, Halle 1920).

³ E. H. REINAU, *Die Technik in der Landwirtschaft* 5, 186 (1924).

⁴ E. H. REINAU, *Festschrift anlässlich des 70. Geburtstages von Jul. Stoklasa*, S. 305 (Parey, Berlin 1928).

⁵ Gerlands Beiträge zur Geophysik 25, 178 (1930). — E. REINAU, *Praktische Kohlensäureddüngung in Gärtnerei und Landwirtschaft*, S. 23ff. und S. 59 (Springer-Verlag, Berlin 1927).

⁶ E. H. REINAU, *Gartenwissenschaft* 3, 101 (1930).