

(Aus der Seuchenabteilung des Robert-Koch-Institutes in Berlin [Prof. Dr. B. Lange]
und der pathologisch-anatomischen Abteilung des Schweizerischen Forschungs-
institutes in Davos.)

Studien zur Histogenese des tuberkulösen Granuloms.

Von

Dr. Fred. Roulet (Davos).

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. November 1934.)

Der Aufbau des tuberkulösen Granulationsgewebes, die einzelnen Gewebsantworten auf den Reiz des eingedrungenen Tuberkelbacillus sind seit altersher bekannt, ihr Wesen wurde in allen Einzelheiten durch die 1927 erschienene Monographie von *Pagel* so gut wie erschöpfend geschildert. Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß es unter anderem eine der Eigentümlichkeiten des Tuberkuloseerregers ist, daß er vermag, beim Eindringen in den Körper neben unspezifischen, entzündlichen Gewebsveränderungen gewissermaßen pathognomonische Gewebsschäden zu verursachen und somit der entstehenden Gewebsantwort ihr charakteristisches Gepräge zu verleihen. Es ist eigentümlich, daß man der Frage nach den Ursachen einer derartigen spezifischen Gewebsreaktion auf einen bestimmten Krankheitserreger wie den Tuberkelbacillus eigentlich nur recht zögernd nachgegangen ist, während das Wesen des Wechselspiels von exsudativen und produktiven Reizantworten ausführlich untersucht wurde. Morphogenetisch betrachtet sind die einzelnen Phasen der Entstehung eines Tuberkels wohl bekannte Tatsachen; primäre Leukocytenimmigration (von einigen Forschern allerdings abgelehnt), mächtige histiocytäre Reaktion, Bildung von Epitheloidzellen, Verkäsung usw., aber wir bleiben heute noch über die eigentliche Natur der sich dabei abspielenden Zellen- und Gewebsveränderungen sehr wenig unterrichtet; es wurde höchstens die Vermutung ausgesprochen, daß hierbei eine physikalisch-chemisch zu denkende „Gewebsdissimilation“ (*Pagel*) eine Rolle spielt.

Wir wissen, daß auch abgetötete Tuberkelbacillen imstande sind, parenteral verimpft, im Tierkörper spezifische Granulome zu erzeugen und daß hierbei offenbar ganz bestimmten chemischen Stoffen eine wesentliche, vielleicht entscheidende Bedeutung zukommt.

Darüber geben uns zum Teil schon ältere Angaben im Schrifttum einigermaßen Aufschluß. Schon 1890 hat man sich mit solchen Problemen beschäftigt: *Mafucci*, *Wyssokowitsch*, *Prudden* und *Hodenpyl* haben bei Einverleibung von abgetöteten Tuberkelbacillen bei Meerschweinchen oder Ratten das Auftreten von Epitheloidzellknötchen beobachtet. Die einzige ausführliche Untersuchung darüber stammt

von C. Sternberg, der diese Befunde bestätigte und darüber hinaus gezeigt hat, daß die pathologische Wirkung entfetteter (d. h. mehrmals mit Alkoholäther, Äther und Chloroform extrahierter) Bakterien viel geringer ist als die der nur durch Dampf abgetöteten Bacillen. Er fand bereits, „daß die pathogene Wirkung der Tuberkelbacillen an eine im Bacillenleib enthaltene Substanz gebunden ist, die bei den Äther-Alkohol-Chloroformextrakten den Bacillen entzogen, vielleicht zerstört wird“. Viele seiner Befunde wurden später (1927) von H. Corper und M. B. Lurie, zuletzt von Pozzi (1932) und von Winge (1934) bestätigt.

Dieser Umstand bei der Tuberkelbildung, d. h. die spezifische Gewebsreaktion infolge Einverleibung abgetöteter Bakterien, ist besonders wichtig und bedeutet eine, in der Bakteriologie ganz einzigartige Erfahrung. Sie ermöglicht, eine der oben gestellten Fragen folgendermaßen zu beantworten: *Die Entstehung eines Tuberkels, d. h. des morphologischen Ausdrucks der Gewebsschädigung durch Tuberkelbacillen, ist vom Faktor „Leben“ der Keime weitgehend unabhängig.*

Diese Angaben wurden im Rahmen einer größeren Untersuchungsreihe, die im Robert-Koch-Institut angelegt wurde, einer eingehenden Prüfung unterzogen. Es soll hier über die pathologisch-histologische Seite berichtet werden, eine Besprechung des morphologisch-klinischen Teils der gewonnenen Ergebnisse wird von Prof. Br. Lange demnächst erfolgen. Als Versuchstiere dienten gesunde Kaninchen, als Einführungsweg der zu prüfenden Substanzen, bzw. Bacillenaufschwemmungen diente die intracutane Einspritzung.

Die Wirkung von Vollbacillen im abgetöteten Zustande.

Wenn, wie beispielsweise Corper und Lurie dies annehmen, die Wirkung der lebenden säurefesten Bacillen im tierischen Körper in der Hauptsache oder gar ausschließlich von ihrer physikalisch-chemischen Zusammensetzung abhängt, dann müßte erwartet werden, daß die Wirkung abgetöteter säurefester Vollbacillen ihrer Pathogenität im lebenden Zustand parallel geht. Der stärkste Ausschlag wäre dann bei einer vergleichenden Prüfung von abgetöteten Saprophyten und abgetöteten echten Tuberkelbacillen in vivo zu erwarten, aber auch beim Vergleich beispielsweise abgetöteter boviner und humaner Tuberkelbacillen müßte beim Kaninchen eine dem Verhalten der lebenden Bacillen analoge Divergenz der Wirkung hervortreten und in ähnlicher Weise bei einem Vergleich abgetöteter virulenter und abgeschwächt virulenter boviner oder humaner Tuberkelbacillen.

Die Wirkung lebender säurefester Saprophyten im Tierkörper ist ja bekannt. Unsere eigenen Versuche mit lebenden Saprophyten (es wurde vornehmlich als Vertreter dieser Gruppe der *Timothéebacillus* verwandt) haben in Bestätigung anderer Angaben (vgl. B. Lange, Alexa, Jelin u. a., vgl. Eichbaum) gezeigt, daß die intracutane Injektion von mittleren Mengen ($\frac{1}{5}$ mg) solcher Bakterien (*Smegma*-, *Frosch*-, *Trompeten*-, *Wasser*-, *Schildkröten*-, *Timothéebacillen*) von Warmblütern ohne

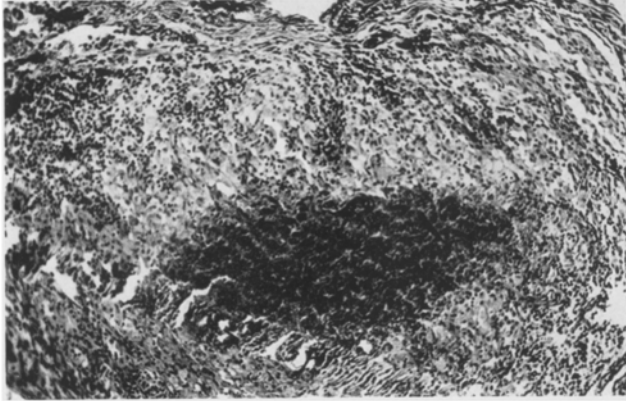
wesentliche lokale oder allgemeine Reaktion vertragen wird: es kommt gelegentlich zu einer Absceßbildung mit verhältnismäßig rascher Heilung. Bei intravenöser Einverleibung entstehen in den Organen kleine Knötchen, die sich histologisch von echten Tuberkeln dadurch unterscheiden lassen, daß ihr Zentrum keine Verkäsung, sondern eine Vereiterung aufweist, und daß Epitheloid- und Riesenzellen sehr spärlich sind, oder sogar fehlen. Ein Weiterwachsen dieser Herde fehlt immer.

Der Organismus reagiert also den lebenden Keimen gegenüber mit einer durchaus unspezifischen Antwort; die Bakterien werden entweder rasch abgebaut oder eliminiert, ohne daß eine tuberkelähnliche Struktur im flüchtigen Granulom beobachtet werden kann. Demgegenüber zeigen bemerkenswerterweise unsere *Versuche mit intracutaner Einspritzung großer Mengen abgetöteter säurefester Saprophyten*, daß kein wesentlicher Unterschied des Reaktionsablaufes im Vergleich zu abgetöteten *pathogenen Säurefesten* (humanen, bovinen Stämmen oder Geflügel-Tuberkelbacillen) besteht. Die histologische Untersuchung solcher Intracutanreaktionen deckt keine grundsätzlichen Unterschiede auf, die entstehenden Granulome sind in ihren Einzelheiten vollkommen ähnlich. Abweichungen hinsichtlich der Ausdehnungen der Hautreaktionen bei Einverleibung boviner Stämme werden im zweiten Teil dieses Abschnittes berücksichtigt (S. 267).

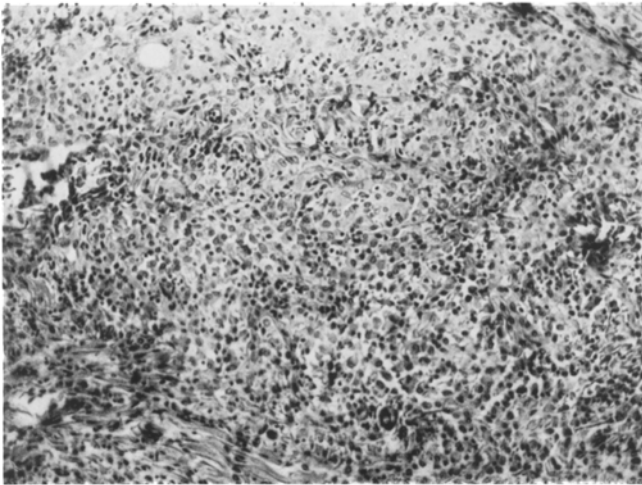
Als erste Antwort des Gewebes besteht nach einer Woche (übrigens wie nach Einverleibung eines vollvirulenten Stammes) eine die Cutis diffus durchsetzende Leukocyteninfiltration, oft schon mit absceßähnlicher Ansammlung leukocytärer und histiocytärer Elemente mit Nekrose der Bindegewebsfasern und nicht sehr weit in die Umgebung reichender Begleitentzündung. Bacillen sind im Eiterherd sehr reichlich darstellbar. Nach etwa zwei Wochen setzt eine Umwandlung ein: das Bindegewebe reagiert am Rande der Eiterung mit einer Wucherung ortsständiger Zellen (Abb. 1) und mit einer Umwandlung von einigen Exsudatzellen; es entstehen große, etwas blasige, scharf begrenzte Zellen mit verhältnismäßig chromatinarmem Kern, kurz, *Epitheloidzellen* von typischer Beschaffenheit, die den Herd wallartig umgeben und, falls er nicht nach außen durchbricht, ihn allmählich organisieren, so daß nach Ablauf von 4—5 Wochen eine Art diffuser Epitheloidzellenwucherung beobachtet werden kann, (Abb. 1 b) mit Riesenzellen und kleinen Nekroseherdchen. Kleine Epitheloidzellknötchen werden auch in den Lymphscheiden von Hautgefäßen beobachtet; sie sind oft bacillenhaltig und deuten auf Abtransport über den Lymphweg hin.

Meistens fehlt in solchen Herden eine zentrale Verkäsung, abgesehen von dem ursprünglich stattfindenden Zerfall des Eiterherdes; die circumfokale Begleitentzündung ist, nachdem die produktive Reizantwort eingesetzt hat, stets lymphocytärer Art. Eine Reaktion, selbst nach Einspritzung abgetöteter *boviner* Tuberkelbacillen, ist von einer solchen

abgetöteter *Saprophyten* nicht zu unterscheiden. Hier wie da besteht nach der 6. Woche eine diffuse Wucherung von großen eckigen, durchaus typischen Epitheloidzellen, meist ohne oder mit spärlichen kleinen



a



b

Abb. 1a. Tuberkuloides Knötchen mit zentraler Verkäsung, 15 Tage nach Einspritzung von $\frac{1}{5}$ mg abgetöteter Timothée-Grasbacillen. Epitheloidzellwall. Lymphocytenkranz. Leitz Ok. 5, Obj. 8. b Diffuse Epitheloidzellenbildung im Bereich einer Intracutanreaktion, 15 Tage nach Einspritzung von $\frac{1}{5}$ mg abgetöteter Wassersaprophyten. Leitz Ok. 8, Obj. 3.

Verkäsungen, vielfach treten Riesenzellen auf, nur selten finden sich kleine Verkäsungsherdchen.

Der Umstand, daß lebende Saprophyten nicht in demselben Maße tuberkuloides Granulom hervorrufen wie abgetötete, erklärt sich dadurch, daß sie gleich anfangs sehr stark reizen, wie aus der fast rein leukocyitären Reaktion hervorgeht. Durch die massige leukocytaire Infiltration werden die Bacillen, wie die Präparate zeigen,

sehr rasch abgebaut, rascher, als wenn sie vorher abgetötet worden sind (man findet sie dann bis zum 15. Tag zum Teil als Körnchen). Es kommt noch dazu, daß, wenn sie lebend eingeführt werden, die Eiterung meist an der Hautoberfläche ausbricht und zur Ulcusbildung führt, allerdings mit rascher Heilungstendenz (45. Tag).

Als weitere Kontrolle wurden noch *intraperitoneale* Einspritzungen von großen Dosen abgetöteter Bacillen bei Kaninchen ausgeführt; die Tiere bekamen je zweimal 10 mg in einem Abstand von einem Monat. Auch hier waren die Befunde für alle untersuchten Stämme (Typ. human.,

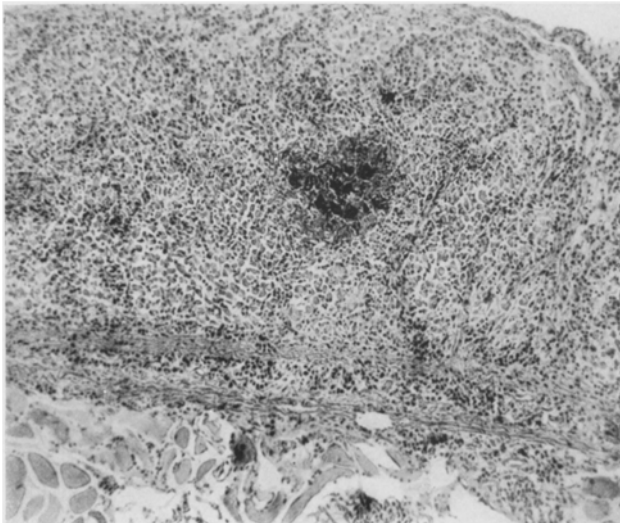


Abb. 2. Knötchenförmiges, epitheloidzelliges Granulom mit zentraler Verkäsung an der Zwerchfellunterseite, 3 Monate nach intraperitonealer Einverleibung größerer Dosen (bis 5 mg) Geflügeltuberkelbacillen. Leitz Ok. 5, Obj. 3.

bovin., gallinac.) identisch; es bestand auf der ganzen Bauchfellserosa eine diffuse Aussaat hanf- bis hirsekorngroßer, grauweißer, glasiger Knötchen, die sich vielfach zu größeren Klumpen mit verkästem Zentrum zusammengeschlossen hatten. Auch die Zwerchfellunterseite, Leber- und Milzserosa waren mit Knötchen bedeckt. Histologisch lassen sie eine charakteristische tuberkulöse Struktur erkennen (Abb. 2) mit ausgedehnten Epitheloidzellwucherungen und ausschließlich lymphocytärem oder polyblastischem circumfokalem Entzündungsring; eine Verkäsung, wo zuweilen einige Bacillenklümpchen anzutreffen sind, findet sich im Zentrum der Knötchen sehr häufig. Im großen Netz, das nicht selten ausgesprochen knotig umgewandelt ist, lassen sich alle Einzelheiten der Tuberkelentstehung in besonders anschaulicher Weise verfolgen. Es wandeln sich ansässige Elemente des Netzes und auch, wie es *Sabin* und ihre Mitarbeiter betont haben, Zellen aus den Milchflecken („monocytoide Zellen“) allmählich unter Vergrößerung ihres Leibes in Epi-

theloidzellen um. Sie bleiben zunächst im Zellverband, zeigen ein feinwabiges, bisweilen fast feinschaumiges Cytoplasma und einen chromatinarmen, scharf umrissenen Kern mit mehreren Nucleolen. Dort wo sie sehr dicht liegen, kommen die Zellverbindungen nicht deutlich zum Vorschein, sie liegen mosaikartig aneinandergepreßt, ihre Grenzen sind sehr deutlich, sie verdienen die Bezeichnung „Epitheloidzellen“. Es sei hier schon hervorgehoben, daß die Hauptveränderungen bei dieser Umwandlung von Reticulumzellen des Netzes oder von histiocytären Elementen zu Epitheloidzellen im Cytoplasma ihren Sitz zu haben scheint; nicht nur die Zunahme an Volumen des Zelleibes, sondern auch die eigenartige, vielleicht als „Entmischung“ des Protoplasmas zu deutende feine Vakuolisierung sind Veränderungen, die besonders wichtig zu sein scheinen; auf diesen Punkt wird später noch eingegangen werden (vgl. S. 273).

Die Frage, ob die Wirkung abgetöteter Tuberkelbacillen beim normergischen Kaninchen je nach der ursprünglichen Virulenz des verwandten Stammes oder je nach der Dosis verschieden ausfällt, wird andernorts eingehender berücksichtigt werden. Es sei hier nur hervorgehoben, daß abgetötete *bovine* Tuberkelbacillen beim Kaninchen in der Regel stärkere Reaktionen hervorriefen als *humane*. Die nach Injektion boviner Tuberkelbacillen entstandenen Infiltrate blieben während längerer Zeit unverändert als feste, ziemlich ausgebreitete und erhabene Papeln sichtbar; meist fand sich histologisch eine stärkere Entzündung mit heftiger anfänglicher Leukocytenbeteiligung.

Darüber hinaus scheint die Beobachtung bemerkenswert zu sein, daß gewisse *hochvirulente bovine* Stämme, so z. B. der hochvirulente Stamm S. 17 aus dem Robert Koch-Institut, auch im abgetöteten Zustande eine viel intensivere und rascher einsetzende Granulombildung, mit verhältnismäßig spärlichem Zerfall, aber von längerer Dauer, hervorriefen als schwach virulent *bovine*. Schwach virulente *humane* Stämme (Lupus z. B.) sind wie die schwach virulenten bovinen Stämme weniger wirksam als stark virulente. Am deutlichsten wohl sind die Ergebnisse mit abgetötetem B.C.G.: 6 Wochen nach Einspritzung von $\frac{1}{5}$ mg der abgetöteten Bacillen ist kaum noch ein kleines, knötchenförmiges Granulom sichtbar, während zu demselben Zeitpunkt, an der Injektionsstelle der übrigen abgetöteten bovinen oder humanen Bacillen zuweilen noch erhebliche Veränderungen (oft noch mit exsudativem Charakter) vorliegen.

Sternbergs Deutung seiner früher erwähnten Befunde sowie die Angaben der Nachuntersucher (Corper und Lurie, Pozzi, Winge) bestehen hiernach zum Teil zu recht. Die Erzeugung spezifischer Gewebsveränderungen (Tuberkel) erscheint in der Tat wesentlich bedingt durch den *physikalisch-chemischen Aufbau* der Säurefesten. Wenn sich uns in der biologischen Wirkung zwischen abgetöteten Tuberkelbacillen

des Typus bovinus und solchen des Typus humanus und ferner zwischen abgetöteten Tuberkelbacillenkulturen hoher und niederer Virulenz beim Kaninchen deutliche quantitative Unterschiede ergeben haben, so spricht diese Beobachtung für einen *Parallelismus zwischen Pathogenität und physikalisch-chemischen Aufbau der Säurefesten*. In Widerspruch zu einer solchen Annahme steht aber unsere Feststellung, daß säurefeste Saprophyten in abgetötetem Zustand ebenso stark wirken wie abgetötete virulente bovine Bacillen. Um dies merkwürdige Verhalten aufzuklären, müssen wir zunächst die Frage zu beantworten suchen, *an welche chemische Fraktion oder an welche Fraktionen denn überhaupt die spezifische Wirkung in vivo geknüpft ist*. Weiter wäre zu untersuchen, ob die starke bzw. geringe Wirkung der verschiedenen geprüften Säurefesten etwa ihrem Gehalt an dieser spezifisch wirksamen Fraktion entspricht.

Die Wirkung der chemischen Fraktionen der Bacillen.

Die Bakterienchemie hat hier neue Wege geschaffen, indem sie neben der rein chemischen Analyse der in möglichst reine Bestandteile zerlegten Bakterienleiber auch die Möglichkeit gab, eine biologische Analyse der in dieser Weise gewonnenen Fraktionen durchzuführen.

Bisher wurden besondere Bakterienarten untersucht, die sich von vorneherein durch irgendwelche charakteristische Merkmale kennzeichnen: durch eine besondere Farbe ihrer Kulturen, wie z. B. der *Bacillus pyocyaneus* oder der *Bacillus prodigiosus*, durch ihren hohen Fettgehalt wie die Diphtheriebacillen, die Tuberkelbacillen und die säurefesten Saprophyten, oder noch durch ihren Zuckergehalt wie die Pneumokokken und die Friedländerbacillen. Man hat sich nicht mit der Fragestellung begnügt, Eiweißkörper, Polysaccharide oder Fettsubstanzen verschiedener Konstitution zu gewinnen, sondern schon frühzeitig war die Arbeitsrichtung die, daß nach der spezifischen Wirkung der einzelnen Körper geforscht wurde.

Die ersten Forschungen auf diesem Gebiet sind ein Verdienst amerikanischer Autoren (*Avery und Heidelberger, Goebel u. a.*), die den chemischen Aufbau der Kapselsubstanz der Pneumokokken untersuchten (1915—1925), wobei insbesondere gezeigt werden konnte, daß chemisch definierbare Zuckerarten als Träger der Typenspezifität der Pneumokokken zu betrachten sind, während der Eiweißanteil dieser Keime annähernd für alle Typen der gleiche ist. Mit der chemischen Zusammensetzung des Tuberkelbacillus hat man sich ebenfalls auch schon sehr früh beschäftigt; wie es *Möllers* ausspricht, hat „der Wunsch, die für die Behandlung der Tuberkulose wichtigen Stoffe aus den Bakterienleibern darzustellen, ebenfalls den Anreiz dazu gegeben, sich mit ihrem chemischen Aufbau näher zu beschäftigen“. Es liegen eingehende Untersuchungen über Wasser-, Fett- und Eiweißgehalt der Tuberkelbacillen schon am Anfang dieses Jahrhunderts vor. Es wurde damals festgestellt, daß das Hauptmerkmal der säurefesten Bakterien der Fettgehalt ihrer Hülle sei, welcher etwa 20—30% der Gesamtbakterienmasse ausmachen dürfte.

Bereits 1916 wurde von *Bürger und Möllers* festgestellt, daß sich die Fettstoffe der Tuberkelbacillen 1. aus größeren Mengen höherer Fettsäuren (Laurinsäure, Myristinsäure, Isocetinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure), 2. aus einem Diaminomono-phosphatid, 3. aus reichlichen Mengen hochmolekularer Alkohole, 4. aus Kohlenwasserstoffen zusammensetzen. Es sei hier vorweggenommen, daß in ausgedehnten Versuchen dieser Forscher an gesunden und tuberkulösen Meerschweinchen keine spezifische Cutanreaktion mit diesen Stoffen hervorgerufen werden konnte.

Erst in den letzten Jahren hat man sich, wenn man von den Untersuchungen *Muchs* und seiner Mitarbeiter (vgl. *Haim*) absieht, die keine reinen Produkte erzielten (die sog. „Partigene“), wieder von amerikanischer Seite mit der Frage nach dem chemischen Aufbau des Tuberkelbacillus beschäftigt und in einer groß angelegten Untersuchungsgemeinschaft sind alle möglichen säurefesten Bakterien unter Leitung des Chemikers *R. Anderson* (Chicago) eingehend geprüft worden. Die folgende Tabelle gibt einen Teil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wieder:

Tabelle 1.

Fraktion in Prozent der Gesamtmasse	Tuberkelbacillen			Saprophyten		
	Humanus	Bovinus	Gallinac	Timothée	Smegma	Schildkröte
Phosphatid . . .	6,5	2,3	1,5	0,6	4,0	2,0
Neutralfett . . .	6,2	2,2	3,3	2,8	7,1	14,9
Wachs	11,0	10,8	8,5	5,0	2,1	1,4
Gesamtlipoide . .	23,7	15,3	13,3	8,4	13,2	18,3
Polysaccharid . .	0,9	1,0	1,1	3,9	—	1,2
Bakterienrückstand	75,0	83,7	85,5	87,7	86,8	80,6

Eigene Untersuchungen.

Die Frage nach den wirksamen Substanzen des Tuberkelbacillus, welche das für die Tuberkulose so typische Epitheloidzellengranulom hervorrufen, wurde von uns in Anlehnung an die vorbildlichen Arbeiten der amerikanischen Forscher verfolgt. Leider stellten sich im Laufe der Versuche gewisse Unvollkommenheiten der Technik von *Anderson* und *Chargaff* heraus, die uns zwangen, zunächst von quantitativen Untersuchungen über den Gehalt an den verschiedenen Fraktionen bei den einzelnen Säurefesten ganz abzusehen. Die mit einer neuen Methode unternommenen Versuche sind zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Über einen neuen Weg, den wir beschritten haben, sei hier lediglich bemerkt, daß dabei große Mengen lebender, in Wasser aufgeschwemmter Tuberkelbacillen vor Extraktion der Fettstoffe durch Schütteln in Gefäßen mit Glasperlen möglichst vollständig zertrümmert wurden.

Wir haben uns also zunächst darauf beschränkt, nach dem von *Anderson* und seinen Mitarbeitern angegebenen Schema¹ große Mengen von Tuberkelbacillen in ihre Fraktionen zu zerlegen und haben dann die einzelnen Fraktionen auf gesunde Kaninchen intracutan verimpft.

Es zeigte sich sehr bald, daß die *Neutralfette* und das *Wachs* meist unwirksam sind; die durch die Injektion hervorgerufene Papel verschwindet bald, höchstens kann man noch bei einigen Tieren nach einem Monat ein Fettdepot in der Cutis nachweisen, jedoch ohne Begleitentzündung. Mit den wassergelösten *Kohlehydraten* wurden überhaupt keine oder nur ganz schwache Reaktionen unspezifischer Art erzeugt. Ähnlich verhielten sich die wasserlöslichen *Eiweißkörper*. Mit dem

¹ Vgl. auch *Chargaff*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von *Abderhalden*, Abt. XII, Bd. 2, H. 2. 1933.

Bakterienrückstand (erhalten nach Extraktion der Lipaide und der wasserlöslichen Stoffe), wohl in der Hauptsache aus unlöslichen Eiweißverbindungen bestehend, wurden in einigen Versuchen Granulome erzeugt, die aber mehr den Charakter von Fremdkörpergranulomen hatten und nicht den von Tuberkeln.

Die bei der chemischen Analyse gewonnene *Phosphatidfraktion* war allein imstande, bei intracutaner Injektion spezifische Granulome zu erzeugen. Mit anderen sog. Phosphatiden¹ war es nicht möglich ähnliche Wirkungen zu erzielen.

Eierlecithin (Merck) zum Beispiel ruft nur eine belanglose Gewebsantwort hervor, der Fremdkörper wird in Histiocyten gespeichert und allmählich abtransportiert; in einigen Fällen wurde er an Ort und Stelle abgebaut und wirkte dabei (offenbar durch die frei werdenden Fettsäuren) stark reizend, es trat ein Fremdkörpergranulom auf. Ähnlich, aber weniger stark wirksam, fielen Kontrollversuche mit verschiedenen aus einer Milz bei *Niemann-Pickscher* Krankheit gewonnenen Extrakten aus, die von Herrn Doz. Dr. E. Epstein, Wien, in liebenswürdiger Weise überlassen wurden, wofür an dieser Stelle nochmals gedankt werden soll. Weder Gemische, welche Neutralfette, Cholesterin und acetonlösliche Phosphatide enthielten, noch solche, in denen sich acetonunlösliche und ätherlösliche (Lecithin, Kephalin) befanden, oder solche endlich, in denen die äther- und acetonunlöslichen Phosphatide (Sphingomyelin z. B.) enthalten waren, führten zu Granulombildung.

Endlich kamen verschiedene aus Schweinshirn hergestellte Phosphatide² zum Versuch, einmal reines Kephalin, weiter acetonunlösliche Phosphatide als Gemisch, in dem in der Hauptsache Lecithin und Kephalin enthalten waren. Auch diese Körper waren nicht imstande, Hautreaktionen hervorzurufen. Bei diesen Kontrolluntersuchungen waren jeweils etwas stärkere Dosen angewandt (bis 5 mg in 0,1 ccm) als bei den Versuchen mit den Tuberkelbacillenfraktionen (1 mg in 0,1 ccm).

¹ Unter Phosphatiden versteht man chemische Verbindungen, die Phosphorsäure, Glycerin, höhere Fettsäuren und eine organische, stickstoffhaltige Base enthalten. Diese, *Lecithin* und *Kephalin* (Monoaminophosphatide, charakterisiert durch das Verhältnis $P:N = 1:1$) kommen sowohl frei vor (ätherlöslich) als auch locker gebunden an Vertreter anderer Körperklassen (ätherlöslich erst nach Alkoholbehandlung). Zuweilen fehlt den oben definierten Phosphatiden das Glycerin, z. B. dem ätherunlöslichen Sphingomyelin (Diaminophosphatid $P:N = 1:2$) oder die organische Base, wie bei der nur im Pflanzenreich vorkommenden stickstofffreien Phosphatidsäuren.

Stoffe anderer Zusammensetzung (Protagon, Jecorin usw.) sind Mischungen der obengenannten Phosphatidtypen untereinander, als auch mit Vertretern anderer Körperklassen.

² Die Präparate wurden von meinem Mitarbeiter, Dr. E. Hecht, nach dem üblichen Vorarbeitungsschema (vgl. A. Fischer und E. Hecht: Biochem. Z. **269**, 115 (1934) nach vorangegangener Trocknung mit Aceton bis zur annähernden Cholesterinfreiheit aus dem Petrolätherextrakt gewonnen.

Mit dem „*Phosphatid*“ aus bovinen und menschlichen Tuberkelbacillenstämmen wurden Hautreaktionen erzielt, welche denjenigen, die weiter oben für die abgetöteten Säurefesten beschrieben wurden, sehr ähnlich sehen. Nicht selten fielen sie sogar ausgedehnter aus und zeigten insbesondere bei der mikroskopischen Untersuchung sehr klare und eindeutige histologische Bilder; die Granulombildung ist intensiver, man möchte sogar sagen „reiner“.

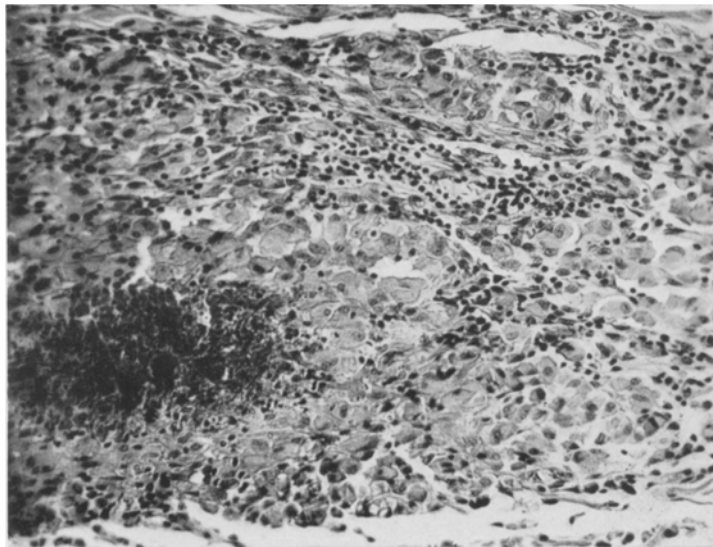


Abb. 3. Rand eines knötchenförmigen Granuloms mit zentraler Verkäsung, etwa 50 Tage nach intracutaner Einspritzung von 1 mg „Tuberkulosephosphatid“. Typische Epitheloidzellen am Rand der Nekrose, circumfokale Lymphocyteninfiltrate. Leitz Ok. 8, Obj. 4.

Die Betrachtung einer solchen Reaktion nach 30 Tagen zeigt ausgedehnte, bisweilen knötchenartige Ansammlungen heller, ziemlich großer Zellen, oft mit scharfen Umrissen, vielfach aber mit kurzen Ausläufern im Verband stehend; ihre Kerne sind chromatinarm, zeigen eine deutliche Membran und 2—3 Nucleolen; das Protoplasma erscheint etwas körnig, da und dort wie feinschaumig, im H.E.-Präparat leicht grau-bläulich färbbar. Diese Zellen sind typische Epitheloidzellen. Sie bilden teils längliche, zwischen auseinandergeschobenen Bindegewebsbündeln gelegene Stränge oder Zellkomplexe (Abb. 3), teils bauen sie knötchenförmige Granulome auf (Abb. 4), überall sind die Knötchen und Stränge von lymphocytenreichen Infiltraten umgeben. Nicht selten ist die Übereinstimmung mit Tuberkeln vollkommen (Abb. 5), es kommen Riesenzellen vom *Langhansschen* Typ vor, die vielfach am Rande später (etwa 60 Tage) einsetzender käsiger Nekrosen häufiger auftreten und

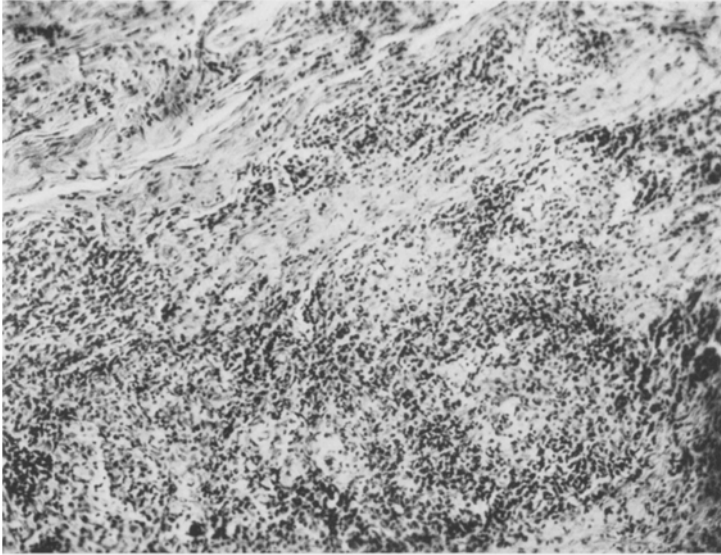


Abb. 4. Multiple, knötchenförmige, epitheloidzellige Granulome 45 Tage nach intracutaner Einspritzung von 1 mg „Tuberkulosephosphatid“. Starke lymphocytäre Randinfiltration. Leitz Ok. 5, Obj. 3.

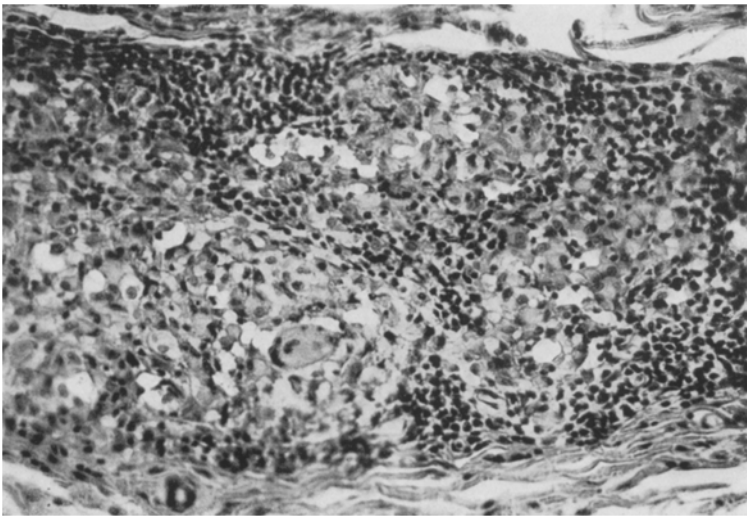
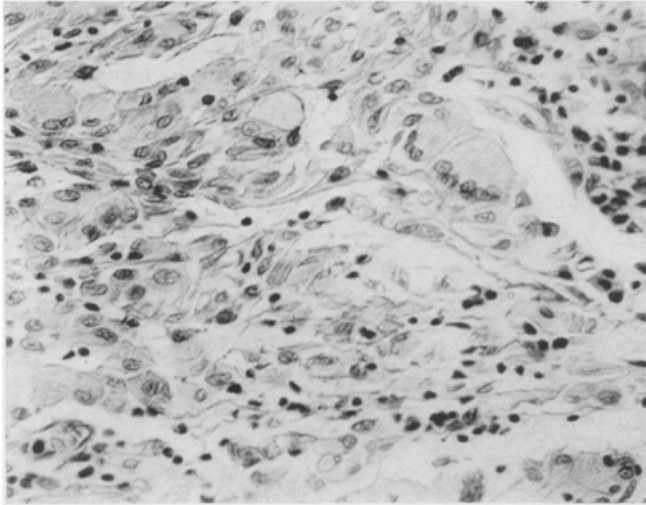


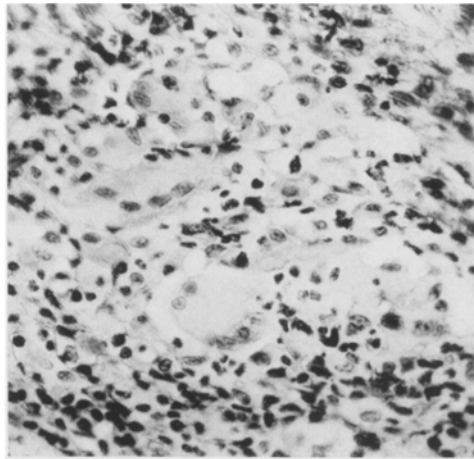
Abb. 5. Tuberkuloide Knötchen mit Epitheloidzellen und Riesenzellen in der Cutis, 45 Tage nach Einspritzung von 1 mg „Tuberkulosephosphatid“. Leitz Ok. 8, Obj. 4.

fast immer durch vermehrte Kernteilung der Epitheloidzellen, ohne Protoplasmateilung, entstehen, nirgendwo aber Beziehungen zu Capillarsprossen aufzuweisen scheinen (Abb. 6 a—b).

Wie es *Sabin* und ihre Mitarbeiter vermuten, wird der injizierte Körper von histiocytären Elementen (die amerikanischen Forscher sprechen von „Monocyten“) in feiner Dispersion aufgenommen und



a



b

Abb. 6a und b. Verschiedene Stadien von Epitheloid- und Riesenzellenbildung nach Einspritzung von „Tuberkulosephosphatid“ (Näheres vgl. Text). Leitz Ok. 8, Obj. 6a.

wie die färberischen Reaktionen zeigen (negativer *Smith-Dietrich*, negative Sudanfärbung) offenbar weiter verarbeitet. Dabei machen die phagocytierenden Zellen Veränderungen durch, welche allmählich zu einer Vergrößerung des Leibes führen, mit einer gewissen „Verstärkung“

der Zellmembran (möglicherweise durch eine weiter fortschreitende Assimilation und Umwandlung der Lipoiden durch das Zellplasma) wobei die charakteristische Gestalt einer Epitheloidzelle entsteht. Zwischen diesen Zellen und den Riesenzellen lassen sich alle Übergänge darstellen, wie es aus der Abb. 6b z. B. deutlich zu ersehen ist. Nach den Angaben amerikanischer Forscher (*Sabin, Doan und Forkner*) sind die, nach Einverleibung von „Phosphatiden“ aus den verschiedenen säurefesten Bacillen erzeugten Reaktionen in ihrem Wesen durchaus ähnlich; immer wieder traten die zuweilen knötchenförmigen epitheloid- und riesenzelligen Granulome hervor, wodurch die Identität unserer Reaktionen nach Einführung abgetöteter Säurefester eine Erklärung finden kann. Bei der Epitheloidzellentstehung und demnach der Tuberkelbildung muß also ein Stoff eine Rolle spielen, der im Protoplasma der Phagocyten eine feine Dispersion erleidet. Es liegt auf der Hand, die Bacillenlipoiden dafür verantwortlich zu machen. Bei Versuchen mit abgetöteten Bacillen kann man oft genug beobachten, daß eine Zelle mehrere Bacillen beherbergt, wobei ihr Leib sich vergrößert, und je stärker körnig und feinwabig erscheint, um so stärker die Säurefestigkeit der Bacillen abnimmt; die Stäbchen zerfallen in Körnchen, die Zelle wird zur Epitheloidzelle. Dies alles deutet auf einen weitgehenden Abbau der Bacillenleiber hin und da schließlich die frei werdenden und assimilierten Stoffe bei den verschiedenen Säurefesten dieselben sind, entstehen ähnliche Zell- bzw. Gewebsveränderungen.

Sabin und ihre Mitarbeiter haben versucht, die „Phosphatidfraktion“ des Tuberkelbacillus noch weiter zu zerlegen, und erblickten in einer Fettsäure, der sog. „Phthionsäure“ („Phthioic acid“ *Anderson*) den für die Gewebsantwort verantwortlichen Stoff. Die dabei entstehenden Infiltrate sind ebenfalls epitheloidzellhaltig, haben andererseits vielmehr das Gepräge von Fremdkörperwirkungen und nicht die ausgesprochene knötchenförmige Anordnung; auch sind die entstandenen Riesenzellen eher Fremdkörperriesenzellen ähnlich, wie es auch von *Boissevain* und *Ryder* hervorgehoben wurde.

Bei der Beurteilung der Frage nach der *Spezifität* der beschriebenen Gewebsantworten nach Einführung von „Tuberkelphosphatiden“, d. h. der Frage, ob, wie es den Anschein hat, die Phosphatide aus Tuberkelbacillen *allein* die Fähigkeit besitzen, tuberkuloide Granulome hervorzurufen, müssen verschiedene Momente berücksichtigt werden. Einmal muß daran erinnert werden, daß schon *Auclair* (1897) mit aus Tuberkelbacillen gewonnenen Fettstoffen käsiges Nekrosen erzeugt hat, daß ferner *Ray* und *Shipmann* mit Tuberkelbacillenauszügen Tuberkel erzielt haben, und daß *Haim*, der dieser Frage eingehend nachgegangen ist, typische tuberkuloide Granulome nach Einspritzung von Partigenen F und N (namentlich mit N-Partigen) in der Schweinehaut erzeugen konnte. Damals schon wurde die eigentümliche Feststellung gemacht, daß Fettstoffe aus Tuberkelbacillen viel eher tuberkelähnliche Granulome hervorzurufen vermögen als Organlipoiden oder Öle. Auch unsere Kontroll-

untersuchungen haben nur uncharakteristische Reizantworten gezeigt, obschon die angewandten Lipoide auch der Phosphatidgruppe angehörten. Aus diesen Befunden muß man den Schluß ziehen, daß das „Tuberkulosephosphatid“ nach *Anderson*, welches im Experiment allein die tuberkuloide Reizantwort zeitigt, entweder ein reines Phosphatid mit einer von den bisher bekannten Phosphatiden vollkommen verschiedenen Zusammensetzung darstellt, oder daß dieser Körper mit irgendwelchen Spuren anderer Stoffe verunreinigt ist, wobei er nur als Schlepper dienen würde. [Einige Bedenken über die Reinheit des Präparates wurden schon von *Boissevain* und *Ryder* (1931) ausgesprochen]. Man könnte allerdings nach all dem, was über das Tuberkulosephosphatid bisher bekannt ist, anzweifeln, daß es sich tatsächlich um ein Phosphatid im engeren Sinne des Wortes handelt. Nach den Angaben der amerikanischen Forscher (vgl. *Chargaff*) sollte dieser Stoff keine andere Base als Ammoniak enthalten, weiter 13—14% Glucose, während reine Phosphatide zuckerfrei sind, wohl aber unter Umständen in Bindung mit Zucker vorkommen sollen (vgl. *Thierfelder* und *Klenk*, S. 86). Darüber hinaus soll erwähnt werden, daß eine einwandfreie Analyse dieses „Tuberkulosephosphatids“ bisher nicht mitgeteilt worden ist. Nach den letzten Angaben von *Chargaff*¹ enthält das Phosphatid 2,7% P und 0,4% N. Hieraus errechnet sich ein prozentuales Verhältnis $N : P = 1,00 : 3,05$. Es würde sich demnach um ein *Monoamino-triphosphatid* handeln. Es muß hier ausdrücklich hervorgehoben werden, daß aus der Fülle der kühnsten Kombinationen über die P : N-Verhältnisse (Triaminophosphatid, Triamindiphosphatid, Pentaaminomonophosphatid usw.) eigentlich zur Zeit nur zwei Typen als sichergestellt betrachtet werden dürfen:

Monoaminophosphatide: $\left\{ \begin{array}{l} \text{Lecithin} \\ \text{Kephalin} \end{array} \right\} P : N = 1 : 1$

Diaminomonophosphatide: Sphingomyelin, $P : N = 1 : 2$,

wenn man von der N-freien, bisher nur im Pflanzenreich nachgewiesenen Phosphatidsäure absieht.

Wie dem auch sei, erlauben die mitgeteilten Beobachtungen den *Schluß*, daß die produktiven Veränderungen (d. h. das tuberkulöse Granulom), welche im Körper durch Tuberkelbacillen hervorgerufen werden, erst nach Resorption gewisser Stoffe aus dem Bakterienleib seitens ortständiger Bindegewebelemente und freier Histiocyten entstehen. Es spielt hier wahrscheinlich eine funktionelle Reizung mit nachträglicher Wucherung der Zellen eine viel größere Rolle, als man bisher annahm. Es ist gewiß nicht abzulehnen, daß in gewissen Fällen auch eine primäre, unmittelbare Gewebsschädigung durch die Tuberkelbacillen eintreten kann, man denke z. B. an die miliaren Nekrosen bei der Sepsis tuberculosa, oder an foudroyant verlaufende Fälle von käsiger Pneumonie. Diese alternativen Veränderungen treffen aber meistens

¹ *Abderhalden*: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd.12, Teil 2, S.109.

solche Organismen, die der Infektion gegenüber wehrlos sind und es bleibt, wie es *Pagel* z. B. ausspricht, „fraglich, ob die primäre Alteration notwendige Voraussetzung für die tuberkulöse Herdbildung überhaupt ist“. Dies gilt natürlich auch für die hier uns interessierende produktive Gewebsantwort, welcher zweifelsohne physikalisch-chemische Prozesse zugrunde liegen. Daneben muß aber noch ein anderer Faktor eine Rolle spielen, nämlich die Reizwirkung des Bacillus selbst als Fremdkörper besonderer Art (*Pagel*), eine Eigentümlichkeit der Säurefesten überhaupt, namentlich auch im abgetöteten Zustande, die anderen Bakterien abgeht. Diesem Umstand liegt am wahrscheinlichsten die besondere chemische Zusammensetzung der Säurefesten zugrunde, und es spielen dabei die Fettstoffe die wichtigste Rolle, denn mit entfetteten Bakterien werden nur unspezifische Fremdkörpergranulome hervorgerufen. Es ist anzunehmen, daß die Fetthülle des Tuberkelbacillus, nach dem Eindringen in den Körper, zu einem Teil wenigstens abgebaut wird, wodurch Verbindungen, die offenbar Phosphorsäure, Glycerin, höhere Fettsäuren enthalten, in feiner Dispersion im Protoplasma (mit oder ohne Bacillen) aufgenommen werden und eine Umgestaltung der Bindegewebelemente zu Epitheloid- und Riesenzellen hervorrufen. Nach dieser Anschauung wäre also die produktive tuberkulöse Gewebsantwort unter anderem eine Art von besonderer Fremdkörperreaktion den Bacillen und namentlich ihren Fettstoffen, vielleicht neuartigen, noch nicht ausreichend erforschten Phosphatiden, gegenüber.

Möglicherweise gelingt es, durch eine weitere Erforschung dieser Phosphatide auch die von uns beobachteten Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Säurefesten im abgetöteten Zustande aufzuklären. Mit den Angaben von *Anderson* (siehe Tabelle auf S. 269) können unsere Befunde nicht in Einklang gebracht werden. Es ist nicht recht erklärlich, warum die *Timothéebacillen* mit dem geringsten Gehalt von Phosphatiden die Wirkung humaner Tuberkelbacillen mit dem zehnfach größeren Gehalt übertreffen.

Zusammenfassung.

Von der wichtigen Tatsache ausgehend, daß auch abgetötete Tuberkelbacillen bei parenteraler Injektion im tierischen Körper typische tuberkulöse Granulome erzeugen können, wurde durch intracutane Injektion am Kaninchen geprüft, inwieweit in der Wirkung von Säurefesten verschiedener Pathogenität und Virulenz in abgetötetem Zustande Unterschiede hervortreten. Es ergaben sich in der Tat dabei hinsichtlich der erzeugten Gewebsreaktion quantitative Unterschiede: abgetötete bovine Bacillen wirkten beim Kaninchen stärker als abgetötete humane, hochvirulente bovine stärker als schwachvirulente. Diese Feststellung legt die Vermutung nahe, daß zwischen der Pathogenität und der Virulenz einerseits, dem physikalisch-chemischen Aufbau der Säurefesten andererseits gesetzmäßige Beziehungen bestehen. Auffallenderweise war aber die

Wirkung säurefester Saprophyten im abgetöteten Zustand nicht schwächer als die von abgetöteten virulenten bovinen Tuberkelbacillen. Es deutet dies darauf hin, daß die *Pathogenität der Säurefesten jedenfalls nicht entscheidend von ihrer physikalisch-chemischen Zusammensetzung abhängt*.

In Bestätigung der Angaben amerikanischer Autoren, im besonderen von *Sabin* und Mitarbeitern, erwies sich unter den einzelnen durch Analyse gewonnenen Fraktionen die *Phosphatidfraktion als der spezifisch wirksame Bestandteil der Tuberkelbacillen*. Es war nicht möglich, die gleiche Wirkung mit *Phosphatiden* anderer Herkunft zu erzielen. Untersucht wurden u. a. Phosphatide aus Milz von *Niemann-Pickscher* Krankheit, aus Eigelb und aus Schweinehirn. Hiernach kann vermutet werden, daß das Tuberkulosephosphatid nach *Anderson* entweder einen neuen Körper der Phosphatidgruppe darstellt oder daß es verunreinigende Beimengungen bestimmter Art enthält. Auf jeden Fall zeigen unsere Untersuchungen, daß bei der Entstehung eines tuberkulösen Granuloms, und namentlich der Epitheloidzellen, gewisse Lipide der Phosphatidgruppe eine ausschlaggebende Rolle spielen. Nachdem die Fetthülle der Tuberkelbacillen zunächst von den Gewebezellen wenigstens zu einem Teil abgebaut ist, treten die genannten Lipide in feiner Dispersion im Protoplasma auf und führen zur Entstehung der charakteristischen Epitheloidzellen. *Das tuberkulöse Granulom muß demnach, morphogenetisch betrachtet, als Reaktion auf eine Art von Fremdkörperwirkung der Bacillen und namentlich ihrer Phosphatide — vielleicht neuartiger, noch unbekannter Zusammensetzung — angesehen werden.*

Schrifttum.

- Alexa, A.*: Ann. Inst. Pasteur **42**, 1366 (1928). — *Anderson, R. J.*: Physiologic. Rev. **12**, 166 (1932); (hier frühere Arbeiten angeführt). — *Auclair*: Etude expérimentale sur les poisons du bacille tuberculeux. Thèse de Paris 1897. — *Boissvain, C. A.* and *C. T. Ryder*: Amer. Rev. Tbc. **24**, 751 (1931). — *Chargaff, E.*: Naturwiss. **1931**, 202. — Z. Tbk. **142**, 61 (1931). — Hoppe-Seylers Z. **201**, 195 (1931). — *Abderhaldens* Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Bd. 12, H. 2, Teil 2. 1933. — *Corper, H.* and *M. B. Lurie*: Amer. Rev. Tbc. **15**, 237 (1927). — *Doan, C. A.*, *Fl. R. Sabin* and *C. E. Forkner*: J. of exper. Med. **52**, Suppl.-Bd. **3**, 89 (1930). — *Eichbaum, F.*: Erg. Hyg. **14**, 82 (1933). — *Haim, A.*: Beitr. Klin. Tbk. **71**, 269 (1929). — *Jelin, W.*: Zbl. Bakter. I Orig. **108**, 41 (1928). — *Lange, Br.*: Dtsch. med. Wschr. **1920**, 763; **1921**, 528. — Z. Hyg. **93**, 43 (1921). — *Müller, H.*: Zbl. Tbk.forsch. **35**, H. 9/10 (1931). — *Pozzi, L.*: Boll. Ist. sieroter. milan. **11**, 677 (1932). — *Ray, L. W.* and *J. S. Shipman*: Amer. Rev. Tbc. **7**, 88 (1923). — *Sabin, Fl. R.*: Amer. Rev. Tbc. **25**, 153 (1932). — Physiologic. Rev. **12**, 141 (1932). — *Sabin, Fl. R.*, *C. A. Doan* and *C. E. Forkner*: J. of exper. Med. **52**, Suppl.-Bd. **3** (1930). — *Smithburn, K. C.* and *F. R. Sabin*: J. of exper. Med. **56**, 867 (1932). — *Sternberg, C.*: Zbl. Path. **13**, 753 (1902). — *Thierfelder, H.* u. *E. Klenk*: Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. Berlin: Julius Springer 1930. — *Winge, K.*: Habilitationsschrift Kopenhagen 1934.