

(Aus dem Schweizerischen Forschungsinstitut in Davos, pathologisch-anatomische und bakteriologische Abteilung [Leiter: P. D. Dr. F. Roulet].)

## **Beiträge zur Spezifität der Entzündung mit besonderer Berücksichtigung des tuberkulösen Granuloms.**

Von

**Fred. Roulet und Konrad Bloch.**

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 19. September 1936.)

Während die Mehrzahl der Krankheitserreger beim Eindringen in den Körper meist wesensgleiche, nur in ihrer Intensität wechselnde Entzündungserscheinungen, ohne eigentlich individuell verschiedene Charakterzüge hervorrufen, ist es eine seit jeher bekannte Eigentümlichkeit einzelner Bakterien, daß sie besondere, für sie typische, sog. „spezifische“ Veränderungen in den Körpergeweben zu verursachen vermögen, die gewissermaßen Varianten des Entzündungsgrundtyps darstellen. Durch diese Besonderheit der kennzeichnenden Merkmale ist es überhaupt möglich, im histologischen Präparat das Vorliegen solcher Krankheiten wie Typhus, Morbus Bang, Rhinosklerom, Lepra, Tuberkulose, Syphilis oder Tularämie zu unterscheiden. Um diese morphologische Verschiedenartigkeit der Gewebsreaktion zu erklären, beruft man sich auf die Erkenntnis der Spezifität der Infektionserreger, auf welcher *Robert Koch* und *Pasteur* das ganze Gebäude der Bakteriologie errichtet haben, und mit der der Begriff der Spezifität der Infektionskrankheiten innig verbunden ist. Eine weitere Umgrenzung des Spezifitätsbegriffes brachte die Entwicklung der Immunologie mit den *Ehrlichschen* Forschungen, durch welche bewiesen werden konnte, daß „die Antikörper ausschließlich auf denjenigen Krankheitserreger abgestimmt sind, der ihre Entwicklung veranlaßt hat, daß sie aber gegenüber fremden Krankheitserregern wirkungslos sind“. Man gelangte allmählich zur Auffassung, daß alle Gifte und Bestandteile der Bakterien, die „antigen“ wirken, als spezifisch zu betrachten wären. Er liegt nun nahe, sich zu fragen, wie die Bakterien zu ihrer spezifisch gerichteten Wirkung gelangen können: Produzieren sie ein spezifisches Gift oder reagiert der Körper in spezifischer Weise durch Antikörperbildung gegenüber dem Keim als Ganzem oder vielleicht nur gegenüber einzelnen Teilkörpern seiner Leibessubstanz? Die erste dieser Fragen darf sicherlich als weitgehend geklärt betrachtet werden; von den Untersuchungen aus letzter Zeit seien nur als Beispiel diejenigen von *Bieling* und *Oelrichs* über die Wirkungsweise des Diphtherietoxins, welches allein das Angehen von Diphtheriebacillen an der

Schleimhautoberfläche ermöglicht, erwähnt; und andererseits hat die Erforschung der antitoxischen Immunsera gezeigt, daß alle Toxine, die zur Bildung von Antitoxinen führen, spezifische Antigene darstellen. Somit erscheint auch der erste Teil der zweiten Frage summarisch beantwortet. Daß die Verhältnisse nicht für alle Bakterien dieselben sind, weiß man schon lange, und gerade darin liegt wahrscheinlich der Grund einer spezifischen Wirkung.

Die Versuche, sich Klarheit darüber zu verschaffen, ob nicht besondere aus den Bacillenleibern dargestellte Körper Träger der spezifischen pathogenen oder immunologischen Wirkung sind, dürfen als allgemein bekannt vorausgesetzt werden; sie sind eigentlich durch die Entdeckung des Diphtherietoxins von *Roux* und *Yersin* (1888) eingeleitet worden und wurden durch *Kochs* Tuberkulindarstellung (1897) stark gefördert. Damals schon ist es allerdings aufgefallen, daß die aus den Bakterienleibern isolierten „Gifte“ nicht immer dasselbe Krankheitsbild wie die Bakterien selbst auslösen; die weiteren Fortschritte der Immunologie mochten für viele Einzelfälle entsprechende Erklärungen finden. An die Lösung der einen Frage ist man allerdings nur zögernd herangegangen, welche für den Pathologen immerhin eine besondere Wichtigkeit besitzt: Auf welcher Eigenschaft beruht das Vermögen gewisser Keime, ganz abgesehen von ihrem Vermögen eine Erkrankung mit spezifischem, klinischem und grobanatomischem Gepräge hervorzurufen, besondere histologische Gewebsantworten zu verursachen, die ebenfalls als spezifisch zu beurteilen sind, wie ein Tuberkel, ein Gumma, ein Leprom oder ein Rotzknötchen? Auf diese Frage weiß der Bakteriologe meist keine Antwort, und man wundert sich immer wieder, daß man im Schrifttum erst 1932 auf Untersuchungen von *Sabin* und Mitarbeitern stößt, die für 2 Keime, den Tuberkelbacillus und den Leprabacillus, den Beweis geliefert haben, daß die von *Sternberg* 1902 schon ausgesprochene Auffassung zu Recht besteht, wonach die pathogene Wirkung solcher Keime an eine besondere, in Äther-Alkohol und Chloroform lösliche Substanz des Bacillenleibes gebunden ist.

In meinem ersten Beitrag (1934) zur Histogenese des Tuberkels, wurde in Bestätigung der älteren *Sternbergschen* Befunde gezeigt, daß die „Entstehung eines Tuberkels, d. h. des morphologischen Ausdruckes der Gewebsschädigung durch Tuberkelbacillen, vom Faktor ‚Leben‘ der Keime weitgehend unabhängig“ sei. Es konnte ferner gezeigt werden, daß auch in abgetötetem Zustande die Typenunterschiede zwischen bovinen und humanen Stämmen zum Ausdruck kommen und daraus der Schluß gezogen werden, daß zwischen der Pathogenität und der Virulenz einerseits, dem physikalisch-chemischen Aufbau der Säurefesten andererseits, gesetzmäßige Beziehungen bestehen müssen. Es standen uns damals sowohl aus humanen wie aus bovinen Tuberkelbacillen, nach dem *Andersonschen* Schema hergestellte „A 3-Phosphatid“-Präparate zur

Verfügung, mit welchen im Kaninchenversuch, durch intracutane Einverleibung, tuberkelähnliche Granulome erzeugt wurden. Seit 2 Jahren haben wir uns mit den Lipoiden (Phosphatid und Neutralfett) des Tuberkelbacillus weiter beschäftigt und sind schließlich zu verschiedenen Ergebnissen gelangt, durch welche nicht nur eine deutlichere Erfassung der chemischen Struktur vom Tuberkelbacillus sondern auch eine schärfere Umgrenzung der Frage nach der Histogenese des Tuberkels ermöglicht worden ist.

Aus den bisherigen Erfahrungen über die Chemie des Tuberkelbacillus sei folgendes erwähnt<sup>1</sup>:

*Anderson* und seinen Mitarbeitern *Chargaff*, *Newmann*, *Spielmann*, die sich besonders mit der Lipoidchemie der Säurefesten beschäftigt haben (Über Eiweißchemie vgl. *Johnson* und Mitarbeiter, Literatur bei *Kallós*), gelang erstmals nach Extraktion von Tuberkelbacillen mittels organischer Lösungsmittel, die Zerteilung der Lipoidfraktion in 3 Gruppen: *Acetonlösliches Fett*, *Phosphatide* und *Wachse*. Mit ihrem besonderen Aufarbeitungsschema (*Chargaff*) haben sie in allen untersuchten säurefesten Bakterien (pathogene und nicht pathogene) chemisch einander sehr ähnliche Verbindungen gefunden, die aber hinsichtlich ihres Lipoidgehalts für die einzelnen Bakterientypen etwas differierten. Bemerkenswert ist vor allem die Tatsache, daß diese Bakterienlipide sich grundsätzlich von den Vertretern der gleichen Körperklasse tierischer oder pflanzlicher Herkunft unterscheiden, und daß es daher berechtigt ist, sie als dem tierischen Organismus artfremd zu bezeichnen. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß z. B. die acetonlösliche Fettfraktion kein echtes Glycerid darstellt, sondern daß offenbar als alkoholische Komponente, mit denen die Fettsäuren verestert sind, das Disaccharid Trehalose fungiert, ein Verbindungstyp, wie er bisher noch nicht beobachtet worden ist. Ebenso ist die Wachsfraction nicht vergleichbar mit den bekannten tierischen und pflanzlichen Wachsen, welche als Ester aus hochmolekularen Fettsäuren und Alkoholen mit gleicher Anzahl von Kohlenstoffatomen gekennzeichnet sind. Die Wachse der Säurefesten sind äußerst komplexer Art, ihre hydrolytische Spaltung erweist neben dem Gehalt von Fettsäuren und unverseifbaren Bestandteilen vor allem das Vorhandensein von Polysacchariden, Aminozucker und organisch gebundener Phosphorsäure.

Die Extraktion von Bakterien mit organischen Lösungsmitteln und die Isolierung chemischer Individuen hieraus begegnet den Schwierigkeiten, die in der Lipoidchemie ganz allgemein auftreten, in besonderem Maße (vgl. hierzu *E. Hecht*). Gegenseitige Löslichkeitsbeeinflussung, mangelndes Krystallisationsvermögen und das Fehlen charakteristischer Schmelzpunkte erschweren eine Entscheidung darüber, welcher Reinheitsgrad den auf Grund verschiedener Löslichkeit voneinander getrennten Lipoidfraktionen zugesprochen werden darf. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte haben wir eine *Reinigung der Phosphatidfraktion* unternommen, um zu erfahren, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Reinheitsgrad und der biologischen Wirksamkeit feststellen läßt.

Es sei daran erinnert, daß das „A 3-Phosphatid“ aus humanen Tuberkelbacillen von *Anderson* als ein Körper beschrieben wurde, der

<sup>1</sup> Ein ausführliches kritisches Übersichtsreferat findet sich im Zbl. Tbk.forsch. 42, H. 1/2 (1935) von *P. Kallós* und *L. Kallós-Dejffner*.

2,3% Phosphor und 0,4% Stickstoff enthält, und der bei hydrolytischer Spaltung Palmitinsäure, ferner 2 neue flüssige gesättigte Fettsäuren, die Tuberkulostearinsäure  $C_{19}H_{38}O_2$  und die optisch aktive d-Phthionsäure  $C_{26}H_{52}O_2$  liefert. Als wasserlösliches Spaltprodukt wurde neben Glycerinphosphorsäure und Ammoniak ein Gehalt von etwa 30% Zucker genannt.

Die ausführlichen chemischen Untersuchungsergebnisse mit dem Analysenmaterial erscheinen demnächst andernorts; es sollen hier nur die wesentlicheren Tatsachen, die in Zusammenhang mit unserer Fragestellung bemerkenswert sind, erwähnt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß der Stickstoffgehalt von 0,4% des nach dem *Andersonschen* Schema hergestellten Phosphatids aus Tuberkelbacillen auf eine Verunreinigung mit Ammoniumsalz, das aus der synthetischen Nährflüssigkeit adsorbiert wird, zurückzuführen ist. Nachdem wir uns überzeugen konnten, daß eine organische Stickstoffbase fehlte, war es erlaubt anzunehmen, daß keines der bekannten Lipide, wie Lecithin, Kephalin oder Sphingomyelin vorliegt. Es gelang dann der Beweis, daß dem „A 3-Phosphatid“ das Magnesiumsalz einer Phosphatidsäure zugrunde liegt. Als Begleitsubstanzen, die im Phosphatidmolekül nicht chemisch gebunden sind, wurden gefunden: Ammoniumsalz, Kohlehydrate und wachsartige Bestandteile. Nach einer Behandlung des Rohphosphatids mit Wasser kann der Stickstoffgehalt von 0,4% als Ammonsalz abgetrennt werden, gleichzeitig werden die Kohlehydrate teilweise entfernt. Es ist aber schwer zu entscheiden, ob das sehr fest am Phosphatid anhaftende Kohlehydrat — eine bei pflanzlichen Phosphatiden oft beobachtete Erscheinung — nur physikalisch adsorbiert ist und somit eine Verunreinigung darstellt. Die teilweise Abtrennbarkeit durch Wasser spricht für diese Anschauung.

Andererseits wird in neuerer Zeit zwischen chemischer Bindung und physikalischer Adsorption für Extraktstoffe komplexer Natur aus organischem Material nicht mehr völlig scharf unterschieden und der von *R. Willstätter* eingeführte Begriff der Symplexbildung, zum Beispiel für die Glykogen-Eiweißverbindungen und Lipoid-Proteinkomplexe, darf vielleicht auch für die Bindungsverhältnisse zwischen Phosphatid und Zucker in unserem Falle angewendet werden.

Die wachsartigen Bestandteile, die frei von N und P sind, keine Sterinreaktionen geben, und deren hauptsächliches Spaltprodukt das unverseifbare Wachs *Andersons* ist, lassen sich ebenfalls nur schwer von dem phosphorhaltigen Lipoid abtrennen, da sie die gleichen Löslichkeitseigenschaften wie dieses aufweisen. Der Weg, der zur Isolierung der vermutlich reinen Phosphatidsäure führte, war folgender: Mit verdünnter Säure unter schonenden Bedingungen läßt sich organisch gebundenes Magnesium abspalten, die erhaltene freie Säure in ein Bleisalz überführen und aus diesem nach Abspaltung des Bleis eine Phosphatidsäure erhalten, die 3,8% Phosphor enthält, frei von Stickstoff und Kohlehydrat ist, während die biologischen Reizwirkungen erhalten

bleiben. Das Fehlen von Stickstoff und die Natur einer zweibasischen Säure, die auf Grund der Titration mit Alkali feststellbar ist, lassen den Schluß zu, daß das Phosphatid aus humanen Tuberkelbacillen eine Diglyceridphosphorsäure darstellt, wie sie von *Chibnall* und *Channon* aus Pflanzencytoplasma isoliert wurde, mit dem Unterschied jedoch, daß die Tuberkulophosphatidsäure sich durch den Gehalt hochmolekularer optisch aktiver Fettsäuren auszeichnet, welche bisher in der Natur noch an keiner anderen Stelle aufgefunden wurden.

In Anlehnung an die früheren in diesem Archiv veröffentlichten Versuche über die biologische Wirksamkeit der verschiedenen Fraktionen aus Tuberkelbacillen, d. h. die Fähigkeit tuberkelähnliche Granulome zu erzeugen, sind die neu dargestellten Substanzen<sup>1</sup> sowie die im Laufe des Reinigungsprozesses abgetrennten Stoffe und die Neutralfette in ähnlicher Versuchsanordnung geprüft worden. *Sabin* und ihre Mitarbeiter, die alle Lipidfraktionen verschiedener Säurefester auf ihre Wirksamkeit untersuchten, konnten hauptsächlich mit der Phosphatidfraktion aber auch mit dem Neutralfett und dem sog. „weichen Wachs“ tuberkelähnliche Strukturen im Gewebe (Netz) gesunder Kaninchen erzeugen. Es geht jedoch aus diesen Arbeiten eindeutig hervor, daß die mit dem Phosphatid erhaltenen Gewebsveränderungen, sowohl an Intensität wie an Spezifität diejenigen durch Fett oder Wachs erzeugten weitaus übertreffen, daß ferner nur mit außerordentlich großen mehrmaligen Dosen von Fett bzw. Wachs, tuberkulöse Granulome zu erzeugen sind. In unseren neuen Versuchen wurden die zu prüfenden Stoffe in einheitlicher Weise in Vaselineöl<sup>2</sup> aufgelöst im Verhältnis 10 mg in 1 ccm; die Tiere (Kaninchen) erhielten davon 0,1 ccm, d. i. 1 mg *nur einmal* intracutan.

Es ließ sich dabei feststellen, daß die aus humanen und aus bovinen Tuberkelbacillen gewonnenen *reinen Phosphatidsäurepräparate* eine eindeutige spezifische Gewebsantwort hervorrufen. Es schwankte hierbei, je nach dem Material, der Phosphorgehalt zwischen 3,4 und 3,8%, Stickstoff war nicht vorhanden.

Wie nach intracutaner Einverleibung von abgetöteten oder lebenden Tuberkelbacillen besteht anfangs eine erhebliche leukocytaire Reaktion; die Öltröpfchen, in welchen das Phosphatidsäurepräparat gelöst ist, werden von einem Leukocytenwall umgeben und schon nach 8 Tagen teilweise abgebaut. Nach 2 Wochen (Abb. 1) entstehen im Entzündungsfeld knötchenartig angeordnete große helle Zellen, die alle Eigenschaften der Epitheloidzellen, wie man sie bei der Kaninchentuberkulose findet, aufweisen: Teils zeigen sie scharfe Umrisse, teils bilden sie syncytiale Zusammenhänge; ihr Protoplasma ist feinschaumig, färbt sich gelblich mit Hämatoxylin. Der Kern erscheint chromatinarm mit deutlicher Membran und 1–3 Kernkörperchen.

<sup>1</sup> Auch an dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. *R. Bieling*, „Behringwerke“, Marburg, für seine liebenswürdige Hilfe für die Beschaffung größerer Bakterienmengen bestens gedankt.

<sup>2</sup> Um Mißverständnisse in der Deutung der gewonnenen Ergebnisse zu beseitigen muß betont werden, daß Vaselineöl allein (bei intracutaner Einführung) niemals reizend wirkt: eine Fremdkörperwirkung kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

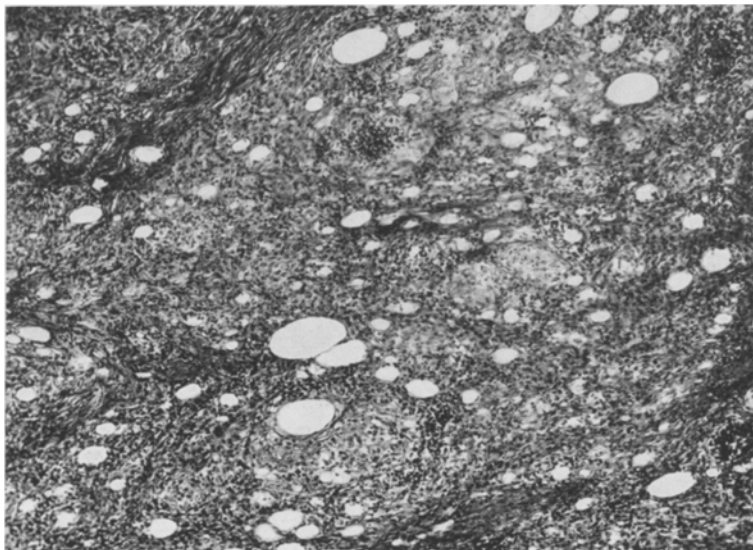


Abb. 1. Hautreaktion beim Kaninchen nach Einverleibung von Phosphatidsäure aus bovinen Tuberkelbacillen, 2. Woche: Beginn der Epitheloidzellenbildung, häufig am Rande eines Leukocytenherdes (knötchenartig angeordnete helle Zellen).  
(Leitz Oc. 5  $\times$ ; Obj. apochr. 16 mm.)



Abb. 2. Individualisierte Tuberkel mit Riesenzellen und Lymphocytenwall 3 Wochen nach intracutaner Einverleibung von Phosphatidsäure aus bovinen Tuberkelbacillen.  
(Leitz, Oc. 8  $\times$ ; Obj. apochr. 16 mm.)

Bereits nach 3 Wochen liegen ausgesprochene Tuberkel vor (Abb. 2): Es sind knötchenförmige Granulome von den Epitheloidzellen gebildet worden, oft mit typischen *Langhansschen* Riesenzellen am Rande oder in der Mitte der Gebilde (Abb. 3); die einzelnen Knötchen sind von einem oft sehr breiten Lymphocytenkranz umgeben und bilden entweder länglich angeordnete Streifen in der Cutis oder sehr dichte Komplexe, die bis in die Subcutis reichen. Oft lassen sich den Lymphbahnen entlang ganze Ketten kleiner Granulome nachweisen. Wie in den ersten Untersuchungen kann auch diesmal festgestellt werden, daß die Riesenzellen durch vermehrte Kernteilung ohne Cytoplasmateilung entstehen; sie stellen abnorme Epitheloidzellen dar, wie es auch *Sabin* beschrieben hat, in welchen oft reichliche feinste Vakuolen nachgewiesen werden können.

Einige Besonderheiten der diesmaligen Reaktionen müssen hervorgehoben werden:

1. Mit der reinen Phosphatidsäure entstehen tuberkuloide Granulome bereits nach 14 Tagen bis 3 Wochen, während sie nach Einverleibung des Ausgangsmaterials, des „A 3-Phosphatids“, bei den ersten Versuchen erst nach einem Monat voll ausgebildet waren. Der Reinheitsgrad

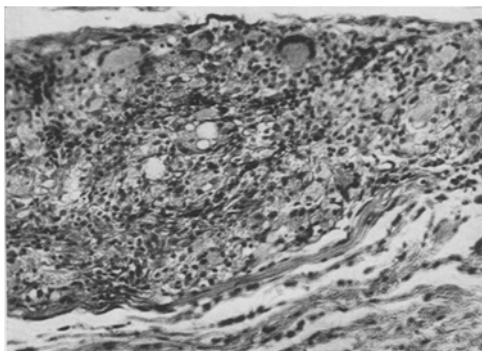


Abb. 3. Bildung *Langhansscher* Riesenzellen im Tuberkel nach Einverleibung von Phosphatidsäure aus bovinen Tuberkelbacillen beim Kaninchen, 30. Tag. Feinschaumige Beschaffenheit der Epitheloidzellen zum Teil mit deutlichen Umrissen. (Leitz, Oc. 5 ×; Obj. apochr. 16 mm).

der spezifisch wirksamen Substanz spielt also eine eindeutige Rolle.

2. Zwischen der Wirkung der Präparate aus humanen oder bovinen Tuberkelbacillen konnten mit der Phosphatidsäure sehr deutliche Unterschiede festgestellt werden, die sich auf die Intensität beziehen. Während bei Kaninchen mit den Stoffen aus bovinen Tuberkelbacillenstämmen sehr lebhaft und langdauernde Hautreaktionen hervorgerufen worden sind, wirkte die Phosphatidsäure aus humanen Stämmen viel weniger stark; schon makroskopisch zeichneten sich solche Reaktionen durch rasche Abnahme der Schwellung aus mit Neigung zur Bildung flacher Narben, wo sehr spärliche Knötchen liegen (Abb. 4). Dagegen hat die Phosphatidsäure aus humanen Tuberkelbacillen beim Menschen eine äußerst lebhaft Granulombildung zur Folge gehabt; aus technischen Gründen wurden die im Selbstversuch gewonnenen Hautstellen erst nach 6 Wochen herausgeschnitten; sie zeigten eine schwere Cutisveränderung mit reichlichen, durchaus typischen Tuberkeln mit Riesenzellen (Abb. 5) und starker fibröser Vernarbung, wobei einzelne Riesenzellen im faserreichen Gewebe liegen bleiben.

Neben der reinen Phosphatidsäure wurden wiederum, wie bereits erwähnt, *Neutralfette* und *Wachse aus Tuberkelbacillen* in der gleichen

Versuchsanordnung (teilweise auch mit doppelten Dosen, d. i. 2 mg Substanz) geprüft. Eine eindeutige spezifische Gewebsantwort wurde

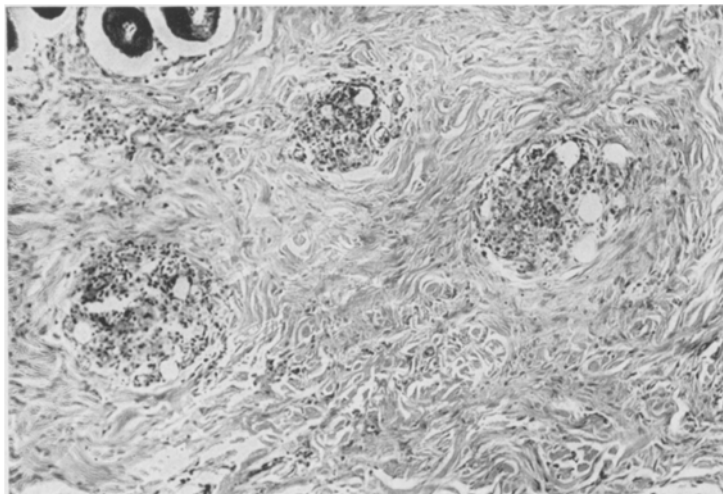


Abb. 4. Spärliche tuberkelähnliche Knötchen nach intracutaner Einverleibung von Phosphatidsäure aus humanen Tuberkelbacillen beim Kaninchen, 1. Monat. (Leitz, Oc. 8  $\times$ ; Obj. apochr. 16 mm.) (Vgl. Abb. 5.)

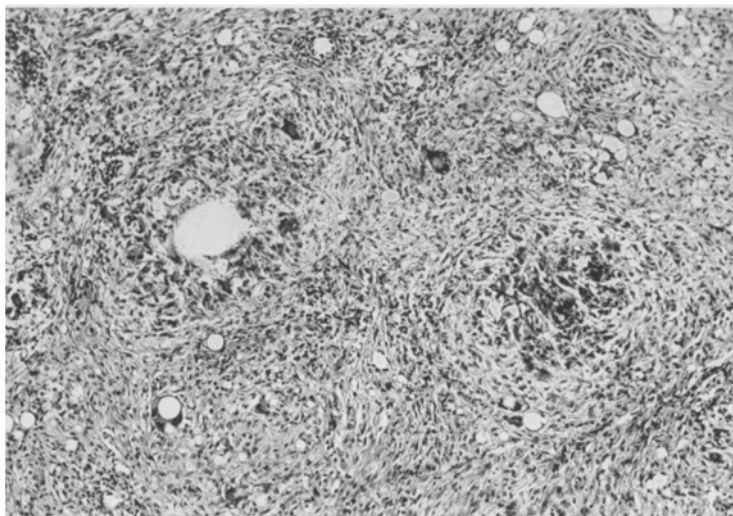


Abb. 5. Tuberkelbildung in der menschlichen Haut nach intracutaner Einverleibung von Phosphatidsäure aus humanen Tuberkelbacillen. 6. Woche. (Leitz, Oc. 5  $\times$ , Obj. apochr. 16 mm.)

ebensowenig wie bei den ersten Versuchen (*Roulet* 1934) festgestellt. Die Frage der Dosierung ist zweifellos von großer Bedeutung, sonst



würde man sich die Versuche *Sabins*, die mit Neutralfett und „weichem Wachs“ aus Säurefesten ebenfalls tuberkelähnliche Granulome erzeugen konnte, nicht erklären. Wir sind der Ansicht, daß verwertbare Schlüsse über die Wirksamkeit des einen oder des anderen Stoffes nur dann gezogen werden können, wenn mit minimalen Dosen gearbeitet worden ist. Wie *Anderson* selbst erwähnt, gelingt es durch Fraktionierung mit organischen Lösungsmitteln nicht, Fett, Wachs und Phosphatid vollständig voneinander zu trennen. Wenn daher, wie *Sabin* berichtet, große Mengen von Fett oder Wachs (bis 500 mg) einverleibt werden, so wächst mit steigender Dosis die Gefahr, daß das nicht abgetrennte beigemengte Phosphatid, der Träger der spezifischen Wirkung, in genügender Menge im Gewebe vorliegt, um eine typische Reaktion hervorzurufen. Es ist ferner zu bedenken, daß die Phosphatidfraktion nur höchstens 2% der Leibessubstanz des *Bacillus* ausmacht und daß selbst eine Dosis von 1 mg einer Menge von Tuberkelbacillen entspricht, wie sie im tuberkulös infizierten Tier sehr wahrscheinlich niemals realisiert sein dürfte, jedenfalls nicht als örtlich begrenzte Masse.

Diese Versuchsergebnisse beweisen wiederum, daß die Spezifität der Gewebsantwort bei der Tuberkulose auf die Besonderheit der chemischen Beschaffenheit der *Kochs*chen Bacillen zurückzuführen ist; darüber hinaus geht aus unseren Befunden wohl eindeutig hervor, daß der Träger dieser besonderen Wirkung der phosphorhaltige Lipoidanteil des *Bacillus* ist, und zwar die Phosphatidsäure, welche besonders charakterisiert wurde und deren Wirkung mit dem Reinigungsgrad gesteigert werden konnte. Frühere Kontrolluntersuchungen mit anderen Lipoiden (*Lecithin* aus Eiern, *Kephalin*, *Spingomyelin* aus Hirn) hatten unter denselben Versuchsbedingungen gezeigt, daß diese tierischen Phosphorlipoide niemals instande waren, ähnliche Reaktionen hervorzurufen. Es ist deshalb notwendig, den Versuch zu unternehmen, eine nähere Analyse der spezifischen Wirkung durchzuführen, und insbesondere haben wir uns bemüht, einen Punkt zu klären, nämlich die Frage, *welcher Bestandteil der Phosphatidsäure Träger der spezifischen Wirkung ist?*

Es können hierbei 2 Momente eine Rolle spielen: Einmal könnte die besondere chemische Konstitution der Phosphatidsäure als Ganzes von Bedeutung sein, wie noch weiter unten ausgeführt werden soll; allein ausschlaggebend ist die chemische Konstitution aber nicht, denn sonst würden andere aus Pflanzen isolierte Phosphatidsäuren ähnlich wirken, was sie nicht tun. Als Kontrolle diene uns ein derartiges Präparat aus Kohlblättern, welches uns von Prof. *A. C. Chibnall* (London) in lebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden ist. Es fand hier, nach intracutaner Einverleibung, eine fein disperse Speicherung in Histocyten statt, ohne daß jedoch eine entzündliche Reaktion aufgetreten wäre und ohne knötchenförmige Ansammlung der gespeicherten Zellen. Diese Elemente waren meist rund oder eiförmig, ihr Protoplasma erschien

schaumig, gröber als bei Epitheloidzellen. Nach 3 Wochen war die Reaktion vollständig abgeklungen, histologisch war vom Fremdkörper nichts mehr nachzuweisen.

Wie es schon erwähnt wurde, geht aus *Andersons* Untersuchungen hervor, daß bei der hydrolytischen Spaltung des „A 3-Phosphatids“ vor allem zwei bisher unbekannte Fettsäuren (Tuberkulostearinsäure und Phthionsäure) isoliert werden können. Es liegt nahe, eine dieser

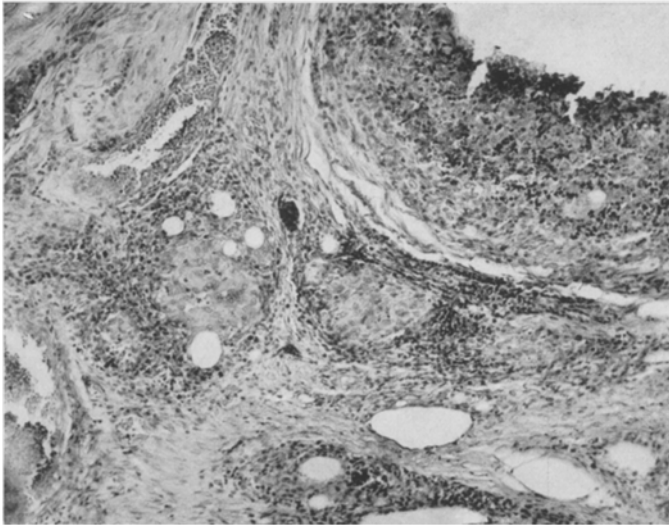


Abb. 6. Hautreaktion beim Kaninchen nach intracutaner Einverleibung vom Fettsäurengemisch aus Phosphatidsäure, 3. Woche: Oben rechts: Absceßwand mit noch lebhafter leukocyitärer Durchsetzung. Darunter, in der Kapsel, zwei tuberkelähnliche Knötchen mit Riesenzellbildung und lymphocyitärer Umgrenzung. (Leitz, Oc. 5  $\times$ ; Obj. apochr. 16 mm.)

dem tierischen Organismus artfremden Fettsäuren für die spezifische Reaktion verantwortlich zu machen. *Sabin* und ihre Mitarbeiter geben auch tatsächlich an, mit der optisch aktiven d-Phthionsäure, als einzigem hydrolytischem Spaltprodukt des Phosphatids, tuberkulöse Granulome erhalten zu haben; die Intensität der Gewebsantwort blieb allerdings hinter der durch Phosphatid erzeugten zurück. Die reine Phthionsäure stand uns leider, wegen Mangel an Material, nicht zur Verfügung; wir konnten lediglich ein durch Hydrolyse aus „A 3-Phosphatid“ erhaltenes Fettsäurengemisch prüfen. Die Gewebsreaktion war durch eine besonders lebhafte akute Entzündung mit Absceßbildung gekennzeichnet, wobei ein Umschlag in ein chronisches Stadium später erfolgte als bei den Phosphatidsäurereaktionen. Erst nach 4 Wochen bis 1 Monat können am Rande von Abscessen kleine, vorwiegend riesenzellhaltige Knötchen beobachtet werden (Abb. 6) mit lymphocyitärer Reaktion, bei allerdings

noch vorhandener leukocyitärer Durchsetzung der Absceßwand. Die Gewebsantwort ist also in ihrer Spezifität abgeschwächt, während sie in ihrem „unspezifischen entzündlichen Anteil“ gesteigert erscheint.

In diesem Zusammenhang erachteten wir es als notwendig, *verschiedene Fettsäuren* unter ähnlichen Versuchsbedingungen zu prüfen. Es wurden folgende Substanzen am Kaninchen intracutan eingeführt (1 mg): *Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Ricinolsäure, Erucasäure, Chaulmoograsäure*. Diese Säuren sind gewählt worden, um über den etwaigen Einfluß der Kettenlänge, des Sättigungsgrades und der Ringstruktur (Chaulmoograsäure) zu orientieren. Diese Stoffe riefen nur unspezifische, teilweise sehr lebhafte, oft aber gar unbedeutende Entzündungserscheinungen hervor, die durch einen flüchtigen Charakter gekennzeichnet waren. Nach 14 Tagen konnten die Reaktionsstellen oft nur mit Mühe an der Kaninchenhaut gefunden werden.

Aus diesen beiden letzten Versuchsreihen geht der Unterschied zwischen der Wirkung der eben erwähnten Fettsäuren tierischer bzw. pflanzlicher Herkunft und der Fettsäuren, die nur aus Tbk.-Bacillen isolierbar sind, deutlich hervor; man kann somit annehmen, daß den zum Aufbau des Phosphatidsäuremoleküls dienenden Fettsäuren (Tuberkulostearinsäure und Phthionsäure) eine besondere Reizwirkung zuzuschreiben ist. Wir erinnern daran, daß die optisch aktive d-Phthionsäure nur aus dem Fett, dem Phosphatid und dem „weichen Wachs“ der humanen Tuberkelbacillen von *Anderson* isoliert worden ist, die entsprechenden Fettsäurefraktionen aus bovinen und Geflügel-Tuberkelbacillen und aus Saprophyten sind optisch inaktiv und biologisch unwirksam (*Chargaff*). Bestünde die Ansicht von *Sabin* und Mitarbeitern zu Recht, wonach die d-Phthionsäure die alleinige Ursache für die Granulombildung durch Bakterienlipide sei, dann dürfte es nach dem oben Gesagten nur mit den Lipoiden der humanen Tuberkelbacillienstämmen möglich sein, spezifische Reaktionen im Tierversuch zu erzeugen. Das ist aber nicht der Fall, denn nach den gleichen Forschern besitzen auch die Lipide, insbesondere die Phosphatide der anderen Säurefesten die gleiche „tuberkulogene“ Eigenschaft. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß auch Lipide von bovinen Tuberkelbacillen, Geflügeltuberkelbacillen, Timothéegrassbacillen usw. d-Phthionsäure enthalten, deren Reindarstellung große Schwierigkeiten bereitet. Es ist in den hier mitgeteilten Versuchen gezeigt worden, daß mit der Phosphatidsäure aus bovinen Tuberkelbacillen beim Kaninchen sogar wesentlich stärkere Hautreaktionen erzielt werden konnten, als mit dem gleichen, aus humanen Bacillen isolierten Stoff, was unter anderem als Beweis für das Vorhandensein eines wirksamen Fettsäurenanteils im bovinen Phosphatid herangezogen werden darf.

Wenn aber die d-Phthionsäure alleiniger Träger der spezifischen „tuberkulogenen“ Eigenschaft der Bacillenleibessubstanz sein sollte,

dann müßte man eigentlich erwarten, daß sie in Substanz am stärksten wirksam ist, desgleichen sollte auch das Neutralfett aus Tuberkelbacillen, das etwa 40% flüssiger gesättigter Fettsäuren enthält, die Phosphatidfraktion an biologischer Wirksamkeit übertreffen.

Es bestehen zwar bisher keine Angaben über den Prozentgehalt der verschiedenen Lipoidfraktionen an d-Phthionsäure, nur solche über den Anteil an flüssigen gesättigten Fettsäuren, die im wesentlichen aus Tuberkulostearinsäure und Phthionsäure bestehen. Die Zahlen sind für humane Tuberkelbacillen

38% im acet unlöslichen Fett,

21% im Phosphatid (*Chargaff*).

Unsere Versuche erweisen entgegen dieser Annahme — bei Anwendung geringer Dosen — die Überlegenheit der Phosphatidsäure (als Gesamtmolekül); die chemische Konstitution muß also doch hierbei eine sehr wesentliche Rolle spielen.

Unter Berücksichtigung aller geschilderter Tatsachen sei folgende Deutung für die Ausnahmestellung der Phosphatidfraktion bzw. der daraus isolierten Phosphatidsäure in bezug auf ihr Vermögen, tuberkelähnliche Granulome zu erzeugen, gegeben:

Aus der histologischen Betrachtung verschiedener Granulomstadien geht hervor, daß, nachdem eine akute Entzündung stattgefunden hat, der einverleibte Körper bald von Histiocyten aufgenommen wird. Es ist hierbei zu bedenken, daß sich das Phosphatid durch besondere Löslichkeitseigenschaften auszeichnet: Einerseits löst es sich in Ölen und Fetten, wie alle anderen Lipide auch; auf der anderen Seite aber läßt es sich, wie jedes hydrophile Kolloid, leicht in Wasser emulgieren und bildet stabile wäßrige Emulsionen. Diese Eigenschaft, die z. B. auch Lecithin besitzt, liegt in der besonderen chemischen Struktur des Phosphatids begründet, welches in seinem Molekül zwei polare Gruppen enthält, eine hydrophobe Paraffinkette, der das Phosphatid seine Fettlöslichkeit verdankt, und den hydrophilen Glycerinphosphorsäurerest, welcher die Tendenz des Phosphatidmoleküls, wäßrige Emulsionen zu bilden, verursacht (vgl. *Thierfelder* und *Klenk*). Diesen besonderen Strukturverhältnissen und den damit verbundenen Löslichkeitseigenschaften verdanken die Phosphatide ihre rasche Resorption durch Zellen.

Für die Tuberkulophosphatidsäure darf man daher annehmen, daß diese als sowohl fettlöslicher Körper wie als hydrophiles Kolloid in der Zelle besonders günstigen Resorptionsbedingungen begegnet und sich folglich im Zellprotoplasma in äußerst feiner Form verteilen kann. Der Dispersionsgrad des injizierten Fremdkörpers spielt nun sicher eine große Rolle bei dessen hydrolytischer Spaltung und wird bei steigendem Verteilungsgrad begünstigt sein. Das in die Zelle aufgenommene Phosphatid wird einem allmählich vor sich gehenden hydrolytischen Spaltungsprozeß unterzogen, wobei freie Fettsäuren — unter ihnen die d-Phthionsäure — entstehen; auch sie befinden sich in sehr fein verteiltem Zustande und

können dann ihre besonderen Reizwirkungen entfalten; die zur Entstehung eines tuberkulösen Granuloms führen. Man ist gezwungen, die Teilnahme dieser artfremden Fettsäuren an dem spezifischen Granulationsprozeß anzunehmen, denn eine derartige pathologische Gewebsveränderung nach Einwirkung sehr geringer Substanzmengen kann nach den geläufigen Vorstellungen nicht durch einen Körper hervorgerufen werden, der zu den normalen Bestandteilen des tierischen Organismus gehört (Lecithin, Kephalin z. B.).

Eine zusammenfassende Betrachtung der hier mitgeteilten Versuchsergebnisse führt zu folgendem *Schluß*: Wenn man von allen immunbiologischen Gesichtspunkten absieht, die im Verlauf einer tuberkulösen Erkrankung auftreten und als wesentliche Faktoren für die *Art* der Gewebsantwort nach dem Eindringen von Tuberkelbacillen in den Körper mitspielen, so findet sich die Erklärung der Tuberkelbildung, d. h. des Urtyps einer spezifischen Gewebsantwort auf einen bakteriellen Schädling, im besonders gearteten chemischen Aufbau des Erregers selbst. Im Falle des Tuberkelbacillus sind es die Lipotide, und zwar nur gewisse Teile davon, welche die Träger der spezifischen „tuberkulogenen“ Wirkung sind. Durch die chemische Differenzierung der Lipotide aus Tuberkelbacillen läßt sich eine Substanz, eine Phosphatidsäure, gewinnen, die dank ihrer eigentümlichen physikalisch-chemischen Konstitution für die Tuberkelbildung verantwortlich gemacht werden kann, weil sie vor allem infolge ihrer Löslichkeitseigenschaften besonders günstigen Resorptionsbedingungen in den Zellen des Bindegewebes begegnet, wodurch ihr rasches Eindringen in den Zellkörper in fein disperser Form ermöglicht wird mit dem Ergebnis, daß sich diese speichernden Bindegewebszellen zu Epitheloidzellen umwandeln.

Diese Hinweise auf die Spezifität der Tuberkelbacillenlipotide in bezug auf ihr Vermögen, ein spezifisch strukturiertes Granulom zu erzeugen, erhalten durch die modernen Anschauungen über die Serologie der Tuberkulose wertvolle Ergänzungen. Nach den Untersuchungen *Kurt Meyers* sind es besonders die Arbeiten von *Dienes* und die ausführlichen Forschungen *Pinnors*, die den Beweis geliefert haben, daß die Phosphatide aus Tuberkelbacillen nach parenteraler Einverleibung bei gesunden Tieren gruppenspezifische Antikörper zu erzeugen vermögen; darüber hinaus können sie als wirksame Antigene im Komplementbindungsversuch mit Seren von Tuberkulösen fungieren, und zwar auch dann, „wenn gegen Eiweißantigene keine Spur von Reaktionsfähigkeit vorliegt“. Sie besitzen dagegen keine Tuberkulinwirkung, die allein mit der Eiweißfraktion aus Tuberkelbacillen in mehr oder weniger starkem Ausmaße zu erzielen ist; mit der Eiweißfraktion läßt sich für gewöhnlich keine Komplementbindung mit tuberkulösen Seren nachweisen. Durch die Anwendung dieser Feststellung auf das Komplementbindungsver-

fahren in der Praxis sind besonders in letzter Zeit (vgl. *Witebsky* und *Klingenstein*) wichtige Ergebnisse gezeitigt worden.

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung festzustellen, daß *einige an tuberkulösen Kaninchen vorgenommene Versuche mit Phosphatidsäure und Fettsäuren aus Tuberkelbacillen desselben Stammes, der zur Infektion diente* (Stamm bov. S. IV aus dem Robert Koch-Institut in Berlin), eindeutig gezeigt haben, daß die Intracutanreaktion beim kranken Tier (allergisches Tier) nicht stärker ausgefallen ist als beim gesunden, normergischen Tier; insbesondere bestanden keine Unterschiede in der anfänglichen exsudativen Phase des Entzündungsvorgangs.

Es wäre eine verdienstvolle Arbeit, diese an einen chemischen Körper gebundene Spezifität eines Mikroorganismus, die sowohl serologisch als patho-histologisch zum Ausdruck kommt, bis in die Einzelheiten zu verfolgen. Unsere Befunde einer stärkeren Wirksamkeit der Phosphatidsäure aus bovinen Tuberkelbacillen im Kaninchenorganismus im Gegensatz zu Phosphatiden aus humanen Stämmen, die ihrerseits beim Menschen viel wirksamer waren, stellen bereits einen Fortschritt in diese Richtung dar; für eine derartige „chemische Typenspezifität“ besitzt man zur Zeit nur serologische Hinweise, wie die Erkenntnis der Typenspezifität der Pneumokokken auf Grund chemisch definierbarer Zuckerarten (*Heidelberger* und Mitarbeiter).

Wenn man im allgemeinen die bisherigen Ergebnisse über die Rolle, welche besondere, für einzelne Bakterienarten charakteristische chemische Bausteine zum Auslösen einer spezifischen Gewebsantwort spielen, überblickt, so scheinen nur die Untersuchungen an Tuberkelbacillen eine Bereicherung unserer Kenntnisse über die Bedingungen, unter welchen ein spezifischer Entzündungstyp auftritt, gebracht zu haben. Über die chemische Zusammensetzung anderer Krankheitserreger, die, wie die Tuberkulose, im Körper Veränderungen mit spezifischem Gepräge erzeugen, weiß man zur Zeit so gut wie nichts. Es wurde in Amerika über die chemische Zusammensetzung von *Leprabacillen* viel gearbeitet, ohne daß man jedoch die Ergebnisse dieser Forschungen ohne weiteres verwerten darf, denn in Anbetracht der sich widersprechenden Angaben über Züchtungsergebnisse von *Leprabacillen*, ist es nicht ohne weiteres sicher, daß die untersuchten Keime wirkliche *Leprabacillen* überhaupt gewesen sind. Ein wichtiger Grund für diese Lücke in unseren Kenntnissen über etwaige spezifische Stoffe aus Spirochäten, Rotzbacillen oder Rhinoklerombacillen z. B. dürfte wohl auf der Schwierigkeit beruhen, diese Mikroorganismen in genügender Menge zu züchten, um sie dann verarbeiten zu können.

Es ist selbstverständlich, daß auf dem Gebiete der Entstehungsbedingungen eines tuberkulösen Granuloms noch viele, zum Teil recht wesentliche Fragen offenstehen. Insbesondere vermögen die hier mitgeteilten Befunde keine befriedigende Antwort für die Entstehung epithe-

loidzelliger Granulome nach Tuberkulininjektion<sup>1</sup> bei Tuberkulösen (*Zieler, Blumenberg*) oder bei sogenannten „bacillenfreien“ Tuberkuliden zu geben. Immerhin liefern unsere Befunde wichtige Hinweise für die Richtigkeit der Auffassung, daß die Verschiedenartigkeit der biologischen Eigenschaften des Tuberkelbacillus an voneinander deutlich unterscheidbare und wohl definierte chemische Bausteine der Leibessubstanz dieser Keime gebunden zu sein scheinen.

### Zusammenfassung.

Aus bovinen und humanen Tuberkelbacillen konnte nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln nach dem *Andersonschen* Verfahren eine Substanz gewonnen werden, die als Magnesiumsalz einer Phosphatidsäure charakterisiert wurde. Dieser Körper ist der Träger der besonderen „tuberkulogenen“ Wirkung der Tuberkelbacillen, ihm verdanken diese Keime ihre Eigenschaft, Tuberkel zu erzeugen. Die Phosphatidsäure entfaltet ihre besondere Wirkung zum Teil auf Grund ihrer chemischen Konstitution, weil sie infolge ihrer Löslichkeitseigenschaften (Löslichkeit in Fetten und Ölen, Bildung stabiler wäßriger Emulsionen) sehr günstigen Resorptionsbedingungen in den Bindegewebszellen begegnet. Dadurch ist ein rasches Eindringen der Substanz in den Zellkörper in fein disperser Form ermöglicht, mit dem Ergebnis, daß sich die speichernden Bindegewebszellen zu Epitheloidzellen umwandeln. Diese Phosphatidsäure aus Tuberkelbacillen unterscheidet sich von den anderen im Pflanzenreich bekannten Phosphatidsäuren durch ihren Fettsäurenanteil; diese Fettsäuren (Tuberkulostearinsäure und Phthionsäure) sind flüssige, gesättigte Fettsäuren, die im Verlauf der hydrolytischen Spaltung auftreten und sehr wahrscheinlich letzten Endes die Träger der spezifischen Gewebsantwort darstellen. Sie können allerdings nur dann ihre Wirkung entfalten, wenn sie mit dem Gesamtmolekül der Phosphatidsäure von den Zellen aufgenommen worden sind und werden nach einem intracellulären hydrolytischen Spaltungsprozeß frei.

Die Phosphatidsäure aus humanen Tuberkelbacillen wirkt beim Menschen stärker als derselbe aus bovinen Tuberkelbacillen dargestellte Stoff; und umgekehrt ist die Wirkung „boviner Phosphatidsäuren“ beim Kaninchen stärker als die der „humanen“ Präparate, was einen Hinweis für die „chemische Spezifität“ dieser Stoffe darstellt. Die Fortschritte auf dem Gebiete der Serologie der Tuberkulose stehen in Übereinstimmung mit den mitgeteilten Ergebnissen, insbesondere wurde gezeigt, daß die Phosphatidsäure und die Fettsäuren aus Tuberkelbacillen bei tuberkulös infizierten Kaninchen nicht stärker gewirkt haben als bei gesunden Tieren. Dieser Befund ist dadurch zu erklären,

<sup>1</sup> Im Alttuberkulin können sich allerdings noch Bacillenleiber oder Teile davon nachweisen lassen.

daß den Phosphatiden keine Tuberkulinwirkung (wie den Eiweißen aus Tuberkelbacillen) zukommt.

Bisher haben nur die Untersuchungen an Tuberkelbacillen Hinweise für die Rolle charakteristischer chemischer Bausteine aus den Bacilleneiweißern im spezifischen Entzündungsprozeß geliefert.

### Schrifttum.

#### *Zusammenfassende Darstellungen.*

Über Tuberkelbacillenchemie: *Chargaff, E.*: *Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. 12, Teil. 2, H. 2. 1930. — *Kallós, P. u. L. Kallós-Deffner*: *Zbl. Tbk.forsch.* **42**, H. 1/2 (1935).

Über Serologie der Tuberkulose: *Witebsky, E. u. R. Klingenstein*: *Erg. Tbk.forsch.* **5**, 123 (1933).

*Anderson, J.*: *J. of biol. Chem.* **74**, 537 (1927). — *Physiologic. Rev.* **12**, 166 (1932). — *Bieling, R.*: *Beitr. Klin. Tbk.* **86**, 561 (1935). — *Bieling, R. u. L. Oelrichs*: *Z. Immun.forsch.* **87**, H. 3/4 (1936). — *Bloch, K.*: *Biochem. Z.* **285**, 372 (1936). — *Hoppe-Seylers Z.* **294**, 1 (1936). — *Blumenberg, W.*: *Beitr. Klin. Tbk.* **61**, 509 (1925). — *Chibnall, A. C. and H. J. Channon*: *Biochemic. J.* **21**, 231 (1927). — *Degkwitz, R.*: *Lipoide und Ionen*. Dresden: Theodor Steinkopff 1933. — *Hecht, E.*: *Z. Tbk.* **74**, 28 (1934). — *Biochem. Z.* **297**, H. 3/4 (1935). — *Pinner, M.*: *Beitr. Klin. Tbk.* **73**, 784 (1930). — *Roulet, F.*: *Virchows Arch.* **294**, H. 1 (1934). — *Sabin, Fl. R.*: *Amer. Rev. Tbc.* **25**, 153 (1932). — *Sabin, Fl. R., C. A. Doan and C. E. Forkner*: *J. exper. Med.* **52**, Nr 6, Suppl. 3 (1930). — *Sabin, Fl. R., K. C. Smithburn and R. M. Thomas*: *J. of exper. Med.* **62**, 751 und 771 (1935). — *Smithburn, K. C. and Fl. R. Sabin*: *J. of exper. Med.* **56**, 867 (1932). — *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* **30**, 1035 (1933). — *J. of exper. Med.* **61**, 771 (1935). — *Willstätter, R.*: *Hoppe-Seylers Z.* **225**, 110 (1934).